



**HAL**  
open science

# Développement d'un test de génération de thrombine en présence de cellules : application à une population cirrhotique

Vincent Jury

## ► To cite this version:

Vincent Jury. Développement d'un test de génération de thrombine en présence de cellules : application à une population cirrhotique. Médecine humaine et pathologie. 2021. dumas-03544387

**HAL Id: dumas-03544387**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03544387v1>**

Submitted on 26 Jan 2022

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

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



UNIVERSITÉ CLERMONT AUVERGNE  
UFR DE MÉDECINE ET DES PROFESSIONS PARAMÉDICALES

THÈSE D'EXERCICE  
pour le  
DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE  
par

JURY Vincent

Présentée et soutenue publiquement le 26 octobre 2021

**DEVELOPPEMENT D'UN TEST DE GENERATION DE THROMBINE EN  
PRESENCE DE CELLULES : APPLICATION A UNE POPULATION  
CIRRHOTIQUE**

**Directeur de thèse :** Monsieur SINEGRE Thomas, Docteur, CHU Clermont-Ferrand  
Service d'Hématologie biologique

**Président du jury :** Monsieur BERGER Marc, Professeur, UFR de Médecine et des  
professions paramédicales de Clermont-Ferrand

**Membres du jury :**

- Monsieur LEBRETON Aurélien, Professeur, UFR de Médecine et des  
professions paramédicales de Clermont-Ferrand
- Monsieur ABERGEL Armand, Professeur, UFR de Médecine et des  
professions paramédicales de Clermont-Ferrand



UNIVERSITÉ CLERMONT AUVERGNE  
UFR DE MÉDECINE ET DES PROFESSIONS PARAMÉDICALES

THÈSE D'EXERCICE  
pour le  
DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE  
par

JURY Vincent

Présentée et soutenue publiquement le 26 octobre 2021

**DEVELOPPEMENT D'UN TEST DE GENERATION DE THROMBINE EN  
PRESENCE DE CELLULES : APPLICATION A UNE POPULATION  
CIRRHOTIQUE**

**Directeur de thèse :** Monsieur SINEGRE Thomas, Docteur, CHU Clermont-Ferrand  
Service d'Hématologie biologique

**Président du jury :** Monsieur BERGER Marc, Professeur, UFR de Médecine et des  
professions paramédicales de Clermont-Ferrand

**Membres du jury :**

- Monsieur LEBRETON Aurélien, Professeur, UFR de Médecine et des professions paramédicales de Clermont-Ferrand
- Monsieur ABERGEL Armand, Professeur, UFR de Médecine et des professions paramédicales de Clermont-Ferrand



## UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE

---

PRESIDENTS HONORAIRES  
UNIVERSITE D'AUVERGNE

: **JOYON** Louis  
: **DOLY** Michel  
: **TURPIN** Dominique  
: **VEYRE** Annie  
: **DULBECCO** Philippe  
: **ESCHALIER** Alain

PRESIDENTS HONORAIRES  
UNIVERSITE BLAISE PASCAL

: **CABANES** Pierre  
: **FONTAINE** Jacques  
: **BOUTIN** Christian  
: **MONTEIL** Jean-Marc  
: **ODOUARD** Albert  
: **LAVIGNOTTE** Nadine

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE et  
PRESIDENT DU CONSEIL ACADEMIQUE PLENIER  
PRESIDENT DU CONSEIL ACADEMIQUE RESTREINT  
VICE-PRESIDENTE DU CONSEIL D'ADMINISTRATION  
VICE-PRESIDENT DE LA COMMISSION DE LA RECHERCHE VICE  
PRESIDENTE DE LA COMMISSION DE LA  
FORMATION ET DE LA VIE UNIVERSITAIRE  
DIRECTEUR GENERAL DES SERVICES

: **BERNARD** Mathias  
: **DEQUIEDT** Vianney  
: **FOGLI** Anne  
: **HENRARD** Pierre  
  
: **PEYRARD** Françoise  
: **PAQUIS** François



## UFR DE MEDECINE ET DES PROFESSIONS PARAMEDICALES

DOYENS HONORAIRES

: **DETEIX** Patrice  
: **CHAZAL** Jean

DOYEN  
RESPONSABLE ADMINISTRATIVE

: **CLAVELOU** Pierre  
: **ROBERT** Gaëlle

## **LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT**

### **PROFESSEURS HONORAIRES :**

MM. BACIN Franck - BEGUE René-Jean - BEYTOUT Jean - BOMMELAER Gilles - BOUCHER Daniel - BUSSIERE Jean-Louis - CANO Noël - CASSAGNES Jean - CATILINA Pierre - CHABANNES Jacques - CHAZAL Jean - CHIPPONI Jacques - CHOLLET Philippe - CITRON Bernard - COUDERT Jean - DASTUGUE Bernard - DAUPLAT Jacques - DECHELOTTE Pierre - DEMEOCQ François - DE RIBEROLLES Charles - DETEIX Patrice - ESCANDE Georges - Mme FONCK Yvette - MM. GENTOU Claude - Mme GLANDDIER Phyllis - MM. IRTHUM Bernard - JACQUETIN Bernard - Mme LAVARENNE Jeanine - MM. LAVERAN Henri - LESOURD Bruno - LEVAI Jean-Paul - MAGE Gérard - MARCHEIX Jean Claude - MICHEL Jean-Luc - MONDIE Jean-Michel - PHILIPPE Pierre - PLAGNE Robert - PLANCHE Roger - PONSONNAILLE Jean - REY Michel - Mme RIGAL Danièle - MM. ROZAN Raymond - SCHOEFFLER Pierre - SIROT Jacques - RIBAL Jean-Pierre - SOUTEYRAND Pierre - TANGUY Alain - TERVER Sylvain - THIEBLOT Philippe - TOURNILHAC Michel - VANNEUVILLE Guy - VIALLET Jean-François - Mlle VEYRE Annie

### **PROFESSEURS EMERITES :**

MM. AUMAITRE Olivier - BOITEUX Jean-Paul - CHAMOIX Alain - DUBRAY Claude - ESCHALIER Alain - KEMENY Jean-Louis – LABBE André - Mme LAFEUILLE Hélène - MM. LEMERY Didier - LUSSON Jean-René

## **PROFESSEURS DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS**

### ***CLASSE EXCEPTIONNELLE***

M.	VAGO Philippe	Histologie-Embryologie Cytogénétique
M.	AVAN Paul	Biophysique et Traitement de l'Image
M.	DURIF Franck	Neurologie
M.	BOIRE Jean-Yves	Biostatistiques, Informatique Médicale et Technologies de Communication
M.	BOYER Louis	Radiologie et Imagerie Médicale option Clinique
M.	POULY Jean-Luc	Gynécologie et Obstétrique
M.	CANIS Michel	Gynécologie-Obstétrique
Mme	PENAULT-LLORCA Frédérique	Anatomie et Cytologie Pathologiques
M	BAZIN Jean-Etienne	Anesthésiologie et Réanimation Chirurgicale
M.	BIGNON Yves Jean	Cancérologie option Biologique
M.	BOIRIE Yves	Nutrition Humaine
M.	CLAVELOU Pierre	Neurologie
M.	GILAIN Laurent	O.R.L.
M.	LEMAIRE Jean-Jacques	Neurochirurgie
M.	CAMILLERI Lionel	Chirurgie Thoracique et Cardio-Vasculaire
M.	DAPOIGNY Michel	Gastro-Entérologie
M.	LLORCA Pierre-Michel	Psychiatrie d'Adultes
M.	PEZET Denis	Chirurgie Digestive
M.	SOUWEINE Bertrand	Réanimation Médicale

M.	BOISGARD Stéphane	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
Mme	DUCLOS Martine	Physiologie
M.	SCHMIDT Jeannot	Médecine d'Urgence
M.	BERGER Marc	Hématologie
M.	GARCIER Jean-Marc	Anatomie-Radiologie et Imagerie Médicale
M.	ROSSET Eugénio	Chirurgie Vasculaire
M.	SOUBRIER Martin	Rhumatologie
M.	ABERGEL Armando	Hépatologie
Mle	BARTHELEMY Isabelle	Chirurgie Maxillo-Faciale
M.	RUIVARD Marc	Médecine Interne

### *1ère CLASSE*

M.	CAILLAUD Denis	Pneumo-phtisiologie
M.	VERRELLE Pierre	Radiothérapie option Clinique
M.	D'INCAN Michel	Dermatologie - Vénérologie
Mme	JALENQUES Isabelle	Psychiatrie d'Adultes
M.	GERBAUD Laurent	Epidémiologie, Economie de la Santé et Prévention
M.	TAUVERON Igor	Endocrinologie et Maladies Métaboliques
M.	MOM Thierry	Oto-Rhino-Laryngologie
M.	RICHARD Ruddy	Physiologie
M.	SAPIN-DEFOUR Vincent	Biochimie et Biologie Moléculaire
M.	BAY Jacques-Olivier	Cancérologie
M.	COUDEYRE Emmanuel	Médecine Physique et de Réadaptation
Mme	GODFRAND Catherine	Anatomie et Cytologie Pathologiques
M.	LAURICHESSE Henri	Maladies Infectieuses et Tropicales
M.	TOURNILHAC Olivier	Hématologie
M.	CHIAMBARETTA Frédéric	Ophthalmologie
M.	FILAIRE Marc	Anatomie – Chirurgie Thoracique et Cardio-Vasculaire
M.	GALLOT Denis	Gynécologie-Obstétrique
M.	GUY Laurent	Urologie
M.	TRAORE Ousmane	Hygiène Hospitalière
M.	ANDRE Marc	Médecine Interne
M.	BONNET Richard	Bactériologie, Virologie
M.	CACHIN Florent	Biophysique et Médecine Nucléaire
M.	COSTES Frédéric	Physiologie
M.	FUTIER Emmanuel	Anesthésiologie-Réanimation
Mme	HENG Anne-Elisabeth	Néphrologie
M.	MOTREFF Pascal	Cardiologie
Mme	PICKERING Gisèle	Pharmacologie Clinique
M.	RABISCHONG Benoît	Gynécologie Obstétrique
M.	CHABROT Pascal	Radiologie et Imagerie Médicale
M.	DESCAMPS Stéphane	Chirurgie Orthopédique et Traumatologique
Mme	HENQUELL Cécile	Bactériologie Virologie
M.	POMEL Christophe	Cancérologie – Chirurgie Générale

### *2ème CLASSE*

Mme	CREVEAUX Isabelle	Biochimie et Biologie Moléculaire
M.	FAICT Thierry	Médecine Légale et Droit de la Santé

Mme	KANOLD LASTAWIECKA Justyna	Pédiatrie
M.	TCHIRKOV Andréï	Cytologie et Histologie
M.	CORNELIS François	Génétique
M.	LESENS Olivier	Maladies Infectieuses et Tropicales
M.	AUTHIER Nicolas	Pharmacologie Médicale
M.	BROUSSE Georges	Psychiatrie Adultes/Addictologie
M.	BUC Emmanuel	Chirurgie Digestive
M.	LAUTRETTE Alexandre	Néphrologie Réanimation Médicale
Mme	BRUGNON Florence	Biologie et Médecine du Développement et de la Reproduction
M.	ESCHALIER Romain	Cardiologie
M.	MERLIN Etienne	Pédiatrie
Mme	TOURNADRE Anne	Rhumatologie
M.	DURANDO Xavier	Cancérologie
M.	DUTHEIL Frédéric	Médecine et Santé au Travail
Mme	FANTINI Maria Livia	Neurologie
M.	SAKKA Laurent	Anatomie – Neurochirurgie
M.	BOURDEL Nicolas	Gynécologie-Obstétrique
M.	GUIEZE Romain	Hématologie
M.	POINCLOUX Laurent	Gastroentérologie
M.	SOUTEYRAND Géraud	Cardiologie
M.	EVARD Bertrand	Immunologie
M.	POIRIER Philippe	Parasitologie et Mycologie
Mme	PHAM DANG Nathalie	Chirurgie Maxillo-Faciale et Stomatologie
Mme	SARRET Catherine	Pédiatrie

## PROFESSEURS DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

### *1ère CLASSE*

M.	CLEMENT Gilles	Médecine Générale
M.	VORILHON Philippe	Médecine Générale

## PROFESSEURS DES UNIVERSITES

### *2ème CLASSE*

Mme	MALPUECH-BRUGERE Corinne	Nutrition Humaine
-----	--------------------------	-------------------

## PROFESSEURS ASSOCIES DES UNIVERSITES



Mme	BOTTET-MAULOUBIER Anne	Médecine Générale
M.	CAMBON Benoît	Médecine Générale
M.	TANGUY Gilles	Médecine Générale

<b>MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS</b>

<b><i>HORS CLASSE</i></b>
---------------------------

Mme	CHAMBON Martine	Bactériologie Virologie
Mme	BOUTELOUP Corinne	Nutrition
Mme	FOGLI Anne	Biochimie Biologie Moléculaire
Mle	GOUAS Laetitia	Cytologie et Histologie, Cytogénétique

<b><i>1ère CLASSE</i></b>
---------------------------

M.	MORVAN Daniel	Biophysique et Traitement de l'Image
Mle	GOUY Carole	Cytologie et Histologie, Cytogénétique
M.	MARCEAU Geoffroy	Biochimie Biologie Moléculaire
Mme	MINET-QUINARD Régine	Biochimie Biologie Moléculaire
M.	ROBIN Frédéric	Bactériologie
Mle	VERONESE Lauren	Cytologie et Histologie, Cytogénétique
M.	DELMAS Julien	Bactériologie
Mle	MIRAND Audrey	Bactériologie Virologie
M.	OUCHCHANE Lemlih	Biostatistiques, Informatique Médicale et Technologies de Communication
M.	LIBERT Frédéric	Pharmacologie Médicale
Mle	COSTE Karen	Pédiatrie
Mle	AUMERAN Claire	Hygiène Hospitalière
Mme	CASSAGNES Lucie	Radiologie et Imagerie Médicale
M.	LEBRETON Aurélien	Hématologie
M.	BUISSON Anthony	Gastroentérologie
M.	BOUVIER Damien	Biochimie et Biologie Moléculaire
M.	MAQDASY Salwan	Endocrinologie, Diabète et Maladies Métaboliques
Mme	NOURRISSON Céline	Parasitologie - Mycologie
Mme	PONS Hanaë	Biologie et Médecine du Développement et de la Reproduction

<b><i>2ème CLASSE</i></b>
---------------------------

M.	JABAUDON-GANDET Matthieu	Anesthésiologie – Réanimation Chirurgicale
----	--------------------------	--

M. COLL Guillaume  
M. GODET Thomas

Neurochirurgie  
Anesthésiologie-Réanimation et  
Médecine Péri-Opératoire

M. LACHAL Jonathan  
M. MOUSTAFA Farès

Pédopsychiatrie  
Médecine d'Urgence

## MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

### *1ère CLASSE*

Mme VAILLANT-ROUSSEL Hélène

Médecine Générale

### *2ème CLASSE*

Mme LAPORTE Catherine

Médecine Générale

## MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

### *HORS CLASSE*

M. BLANCHON Loïc  
M. MARCHAND Fabien  
Mme VAURS-BARRIERE Catherine

Biochimie Biologie Moléculaire  
Pharmacologie Médicale  
Biochimie Biologie Moléculaire

### *CLASSE NORMALE*

M. BAILLY Jean-Luc  
Mlle AUBEL Corinne  
Mlle GUILLET Christelle  
M. BIDET Yannick  
M. DALMASSO Guillaume  
M. PIZON Frank  
M. SOLER Cédric  
M. GIRAUDET Fabrice  
M. LOLIGNIER Stéphane  
Mme MARTEIL Gaëlle  
M. PINEL Alexandre

Bactériologie Virologie  
Oncologie Moléculaire  
Nutrition Humaine  
Oncogénétique  
Bactériologie  
Santé Publique  
Biochimie Biologie Moléculaire  
Biophysique et Traitement de l'Image  
Neurosciences – Neuropharmacologie  
Biologie de la Reproduction  
Nutrition Humaine

## **MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES DES UNIVERSITES**

M.	BERNARD Pierre	Médecine Générale
Mme	ESCHALIER Bénédicte	Médecine Générale
Mme	RICHARD Amélie	Médecine Générale
M.	TESSIERES Frédéric	Médecine Générale
Mme	ROUGE Laure	Médecine Générale

# REMERCIEMENTS

## **Aux membres du jury**

### **A Monsieur le Professeur Marc BERGER, Président du jury**

Je vous remercie sincèrement de me faire l'honneur de présider ce jury et de bien vouloir juger ce travail.

### **A Monsieur le Professeur Armand ABERGEL**

Je vous remercie de me faire l'honneur de juger ce travail et de nous faire confiance pour ce projet EXERCISE dont vous êtes l'investigateur principal.

### **A Monsieur le Professeur Aurélien LEBRETON**

Je te remercie de m'avoir accordé beaucoup de ton temps pour la formation en hématologie biologique et clinique. Je te suis reconnaissant de m'avoir accordé ta confiance pour débiter les consultations, m'intégrer au sein du CRC-MHC et d'être disponible pour me conseiller, m'aiguiller et parfois me remettre sur les bons rails.

### **A Monsieur le Docteur Thomas SINEGRE**

Tout d'abord je te remercie pour ta disponibilité et tout le temps que tu as passé pour ce travail à me relire encore et encore mais également me conseiller, me rassurer malgré quelques déconvenues et me « bouger » quand il le fallait. Je voulais également te remercier pour ta présence pour notre formation en hémostase pour répondre à nos questions et de m'avoir impliqué dans le laboratoire.

## **Aux personnes ayant participé au travail**

### **A Monsieur le Docteur Louis Thomas DANNUS**

Je te remercie pour toute ton aide dans ce travail et tous tes conseils pour comprendre des résultats pas toujours attendus... Bien sûr une mention spéciale à ton implication dans notre formation en onco-hémato lors du premier semestre.

### A Madame Juliette BERGER

Je vous remercie pour les journées que vous avez passées à la culture des cellules et à nous conseiller dans ce domaine essentiel pour ce travail.

### A Madame Céline BOURGNE

Un grand merci pour ta disponibilité et tes précieux conseils avec les analyses de CMF.

### A Adeline, Alexandre, Angélique, Aurélie, Clara, Elise, Florent, Laetitia, Manon, Maryse, Maxence, Pascale, Stéphanie, Valérie, Virginie

Merci à vous tous pour votre accueil, votre disponibilité et votre soutien pour les manipulations en hémostase spécialisée, en culture cellulaire et en CMF.

### **Aux collègues de tous les jours**

#### A Anne Lise

Un grand merci pour ton accueil au CRC-MHC ainsi que ton aide. C'est un plaisir de t'avoir rencontrée et de travailler tous les jours avec toi

#### A toutes les personnes du laboratoire d'hématologie et à l'équipe de nuit

Merci pour votre gentillesse et votre aide notamment lors de mon premier semestre où je découvrais le laboratoire.

#### A Monsieur le Professeur Damien BOUVIER

Merci de m'avoir supporté/soutenu en PCEM1 et de m'avoir permis de réussir le concours. C'est avec plaisir que je t'ai retrouvé pendant l'internat de biologie où j'ai retrouvé ta disponibilité et ta bienveillance.

### **Aux proches**

A mes parents, merci pour votre soutien sans faille, votre patience et surtout d'avoir écouté mes inquiétudes durant toutes ces années sans me faire ressentir les vôtres.

A Charlette, je te suis reconnaissant pour tout ce que tu as fait pour me libérer du temps afin d'achever ce travail, me soutenir en ces moments difficiles et bien sûr tout ce que tu m'as apporté depuis tant d'années.

A Alex, Eddy et Flo pour tout ce que nous avons partagé depuis tout ce temps et plus récemment nos journées/soirées jeux de cartes bien folles.

A Anas, Gwen, Isaure, Ismail, Jeremy, Margaux, Marine, Maud, Nicolas, Pierre, Romain, Saer pour tous les souvenirs (soirées, vacances, restos/pizzas, sport, jeux...) que nous avons en commun et j'espère encore de nombreux moments à partager ensemble. Vivement cette saison hivernale !

A Claudel, Lucie, Samy et William, mes cointernes de choc avec qui même si on était pas payé cher et bien on aura bien rigolé !

A tous les cointernes de biologie/ hématologie avec qui nous avons partagé un semestre (souvent en hémato d'ailleurs) et/ou plusieurs bières ou séances de sport.

# TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>17</b>
1. Cirrhose .....	18
1.1. Généralités .....	18
1.2. Epidémiologie.....	18
1.3. Manifestations cliniques .....	19
1.4. Diagnostic.....	19
1.5. Complications non hémostatiques.....	21
1.6. Complications hémorragiques .....	22
1.6.1. Hémorragies non digestives .....	22
1.6.2. Hémorragies digestives .....	23
1.7. Complications thrombotiques .....	23
2. Physiologie de l'Hémostase .....	25
2.1. L'hémostase primaire .....	25
2.2. La coagulation plasmatique.....	26
3. Modifications biologiques liées à la cirrhose et l'IHC .....	30
3.1. Hémostase primaire .....	30
3.2. Coagulation plasmatique .....	30
4. Exploration de la coagulation plasmatique.....	32
4.1. Tests standards.....	32
4.2. Le TGT .....	33
4.2.1. La méthode CAT.....	35

4.2.2.	Paramètres du TGT .....	37
4.2.3.	TGT et cirrhose .....	38
4.2.4.	Evolutions pour le TGT .....	43
5.	TGT en présence de cellules .....	44
6.	Contexte et Objectif.....	48
<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>		<b>49</b>
1.	Culture cellulaire .....	50
1.1.	Culture.....	50
1.2.	Cellules adhérentes.....	52
1.3.	Cellules en suspension.....	52
2.	Cytométrie en flux .....	53
3.	Echantillons de plasma .....	54
4.	Test de génération de thrombine .....	55
5.	Statistiques .....	56
<b>RESULTATS.....</b>		<b>57</b>
1.	Performances analytiques du TGT en présence de cellules .....	58
2.	Expression membranaire cellulaire d'EPCR et de TM .....	59
3.	Impact des cellules sur le TGT.....	61
3.1.	Impact des cellules adhérentes .....	61
3.2.	Impact des cellules en suspension.....	63
4.	Impact de la TM sur le TGT en présence de cellules.....	66
5.	Impact des PL membranaires sur le TGT .....	68
6.	Impact des cellules sur le TGT avec TM.....	70



7. Impact de l'EPCRs sur le TGT .....	74
8. TGT de patients atteints de cirrhose .....	77
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>80</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>85</b>
<b>REFRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>88</b>

# LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

## TABLEAUX

Tableau I. Synthèse TGT et cirrhose, 1 $\mu$ M de FT.....	40
Tableau II. Synthèse TGT et cirrhose, 5 $\mu$ M de FT.....	42
Tableau III. Synthèse TGT en présence de cellules en suspension .....	46
Tableau IV. Synthèse TGT en présence de cellules adhérentes.....	47
Tableau V. Analyse de reproductibilité .....	58
Tableau VI. Expression membranaire en TM et en EPCR .....	59
Tableau VII. Impact des cellules adhérentes sur le TGT .....	61
Tableau VIII. Impact des cellules adhérentes sur le TGT .....	62
Tableau IX. Impact des cellules en suspension sur le TGT .....	63
Tableau X. Impact des cellules en suspension sur le TGT .....	63
Tableau XI. Impact de la TM sur le TGT en présence de cellules adhérentes .....	66
Tableau XII. Impact de la TM sur le TGT en présence de cellules en suspension ...	66
Tableau XIII. Impact des cellules sur le TGT avec ajout de TM.....	73

## FIGURES

Figure 1. Aspect de cirrhose au TDM.....	20
Figure 2. Score de Child-Pugh .....	21
Figure 3. Schéma de la coagulation plasmatique .....	27
Figure 4. Voie de la Protéine C.....	28
Figure 5. Différentes étapes de la coagulation plasmatique et TGT .....	34
Figure 6. Thrombinogramme .....	38
Figure 7. Confluence cellulaire HEK293.....	51
Figure 8. Expression membranaire en TM et en EPCR des cellules HEK293.....	59

Figure 9. Expression Membranaire en TM et en EPCR des cellules endothéliales aortiques.....	60
Figure 10. Impact des cellules adhérentes sur le thrombinogramme .....	62
Figure 11. Impact des cellules en suspension sur le thrombinogramme .....	64
Figure 12. Impact de la concentration en cellules en suspension sur l'ETP .....	65
Figure 13. Impact de la TM sur l'inhibition de la génération de thrombine en présence de cellules.....	67
Figure 14. Impact sur le TGT de l'absence de PL dans le réactif .....	69
Figure 15. Impact des cellules sur la génération de thrombine en présence de TM. 71	
Figure 16. Impact de la TM sur l'ETP en présence de cellules.....	72
Figure 17. Impact des cellules sur le thrombinogramme avec ajout de TM.....	73
Figure 18. Impact de l'EPCRs sur le TGT en présence de cellules .....	75
Figure 19. Impact de l'EPCRs sur l'ETP en l'absence de cellules .....	76
Figure 20. Impact des cellules sur la génération de thrombine chez le patient atteint de cirrhose sans ajout de TM .....	78
Figure 21. Impact des cellules sur le Ratio ETP avec TM/ ETP sans TM (%) .....	79

## LISTE DES ABREVIATIONS

A : Activé

Ca<sup>2+</sup> : Calcium

CHC : Carcinome Hépatocellulaire

EP : Embolie Pulmonaire

EPCR : Récepteur Endothélial à la Protéine C

ETP : Endogenous Thrombin Potential

F : Facteur

FT : Facteur Tissulaire

HTP : Hypertension Portale

IHC : Insuffisance Hépatocellulaire

PBS : Tampon Phosphate Salin

PC : Protéine C

PCa : Protéine C activée

PL : Phospholipides

PPP : Plasma Pauvre en Plaquettes

PS : Protéine S

RVG : Rupture de Varice Gastrique

RVO : Rupture de Varice Œsophagienne

TGT : Test de Génération de Thrombine

TP : Taux de prothrombine

TVP : Thrombose Veineuse Profonde

## **INTRODUCTION**

# 1. Cirrhose

## 1.1. Généralités

La cirrhose se définit comme la complication terminale de toute inflammation chronique hépatique. L'OMS décrit la cirrhose comme une atteinte histologique du foie selon des critères microscopiques et macroscopiques. La cirrhose est un processus dynamique diffus et irréversible de fibrose du tissu hépatique. Cette fibrose détruit l'architecture normale du foie et les cellules hépatiques qui se régénèrent de manière anarchique créant des nodules hépatocytaires anormaux. Cette dégénérescence s'accompagne de dysfonctions et de complications multiples.(1)

## 1.2. Epidémiologie

Selon l'INSERM, en 2017, « 200.000 personnes sont atteintes de cirrhose en France dont 30% ont atteint le stade sévère de la maladie ». Le nombre de décès associé à la cirrhose est estimé à 15.000 par an, il s'agit de la cinquième cause de mortalité. Cette affection se manifeste après plusieurs années d'inflammation chronique, ainsi l'âge moyen au diagnostic est de 50 ans.(2) La cirrhose est la cause principale des indications de transplantation hépatique en Europe, 5500 chaque année.(3)

Plus de 90% des cas de cirrhose en France sont liés à trois pathologies : éthyliste chronique (consommation excessive et prolongée) ; infection virale (hépatite chronique liée au virus de l'hépatite B ou de l'hépatite C) ; syndrome métabolique.

Les autres étiologies comprennent les maladies auto-immunes du foie (notamment la cirrhose biliaire primitive) ou l'hémochromatose.(2)

### 1.3. Manifestations cliniques

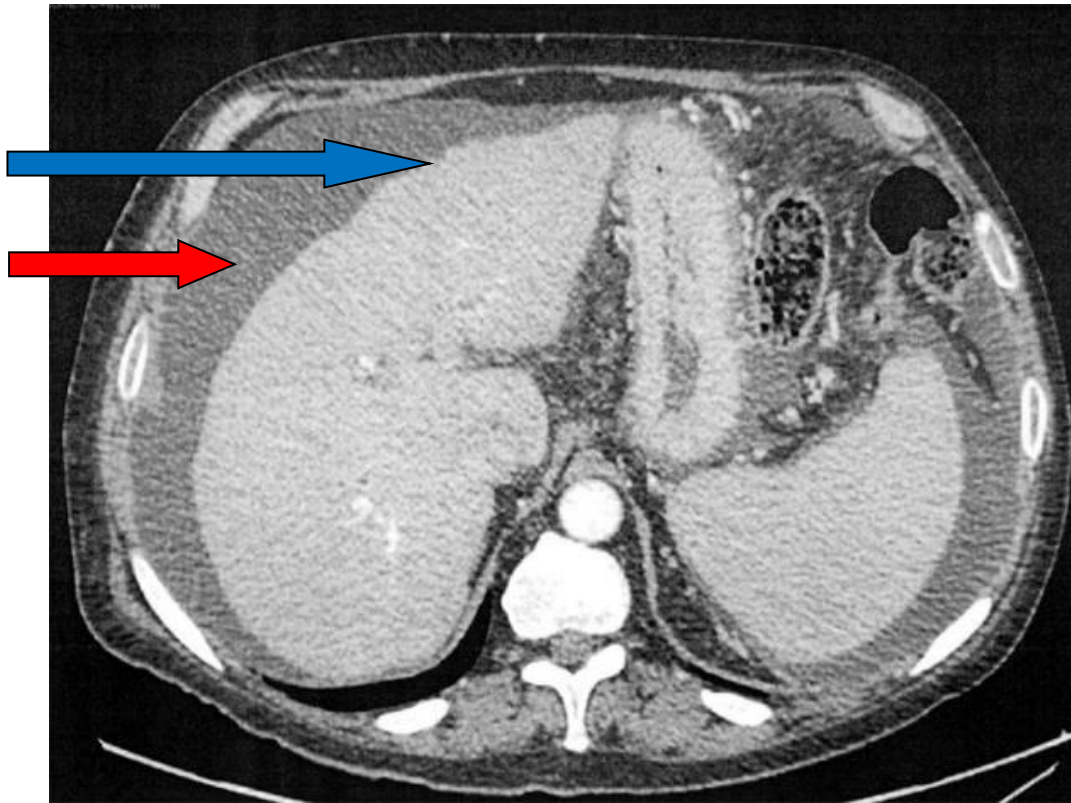
L'examen clinique peut être normal mais peuvent être retrouvés des signes d'insuffisance hépatocellulaire (IHC) comme des angiomes stellaires, une érythrose palmaire, des ongles blancs, un ictère conjonctival ou cutané. A la palpation, il est possible de constater une hépatomégalie associée à un durcissement du foie.(1)(4)

Des signes d'hypertension portale (HTP) comme une splénomégalie, de l'ascite ou une dilatation des veines sous cutanées abdominales peuvent être aussi retrouvés.

### 1.4. Diagnostic

Le diagnostic d'une cirrhose repose sur des critères histologiques macro et microscopiques ainsi que sur un ensemble d'arguments cliniques, biologiques et radiologiques.

A l'imagerie il peut être vu une perte de la régularité des contours du foie, une dysmorphie (Figure 1) avec atrophie ou hypertrophie de certains lobes. Les nodules de plus grande taille peuvent être visibles. Enfin des signes d'HTP comme une inversion du flux sanguin dans la veine porte (forme sévères) peuvent être vus en échographie.



**Figure 1. Aspect de cirrhose au TDM avec dysmorphie et contours bosselés du foie (4).**  
Flèche bleue : Contours irréguliers du foie ; Flèche rouge : Ascite

Historiquement le diagnostic reposait sur une ponction biopsie hépatique avec une analyse des tissus retrouvant l'organisation en nodules du tissu hépatique avec une fibrose plus ou moins étendue.

Actuellement le diagnostic peut reposer, dans certaines causes de cirrhose, sur des techniques non invasives comme le Fibrotest® (ensemble de tests biologiques :  $\alpha$ 2-macroglobuline, haptoglobine, apolipoprotéine A1, bilirubine totale, gamma GT en prenant compte l'âge et le sexe du patient) ou le Fibroscan® (élastométrie).

Enfin plusieurs scores sont utilisés pour évaluer la sévérité de la cirrhose. Le plus courant étant le score de Child-Pugh reposant sur cinq critères cliniques et biologiques. (Figure 2)



	1 point	2 points	3 points
Encéphalopathie (grade)	Absente	Grade I et II	Grade III et IV
Ascite	Absente	Minime	Modérée
Bilirubine totale ( $\mu\text{mol/L}$ )	< 35	35 à 50	> 50
Albumine (g/L)	> 35	28 à 35	< 28
Taux de prothrombine (%)	> 50	40 à 50	< 40
Child-Pugh A : score de 5-6 points : absence d'insuffisance hépatique			
Child-Pugh B : score de 7 à 9 points : insuffisance hépatique modérée			
Child-Pugh C : score > 9 points : insuffisance hépatique sévère			

**Figure 2. Score de Child-Pugh**

Dans la grande majorité des cas les patients sont asymptomatiques durant le processus de fibrose et le diagnostic est souvent posé au moment d'une complication.

### 1.5. Complications non hémostatiques

La cirrhose peut mener à plusieurs complications comme une IHC, une HTP et un carcinome hépatocellulaire (CHC). La destruction progressive des hépatocytes entraîne une dysfonction de la synthèse ainsi que l'élimination de nombreuses molécules par le foie.

La fibrose et la perte d'élasticité du tissu hépatique entraînent une grande résistance au flux sanguin intra-hépatique responsable d'une augmentation des pressions en amont (veine porte) appelée HTP. Dans les formes les plus sévères, une inversion du flux peut être retrouvée (hépatofuge). Cette HTP est la cause de plusieurs

phénomènes : une splénomégalie avec hypersplénisme ; une dilatation des vaisseaux sous cutanés abdominaux et l'apparition de varices œsophagiennes ou gastriques.

La destruction progressive et les régénérations successives des cellules hépatiques entraînent un réarrangement du tissu et l'apparition de nodules isolés. Tout ceci concoure à un risque accru de développement de CHC.

L'encéphalopathie hépatique est un mécanisme complexe liée à l'IHC. Une des explications est l'accumulation d'ammonium dans la circulation sanguine, qui à l'état physiologique est éliminé par l'hépatocyte sous forme d'urée. Lors d'IHC, cette accumulation va entraîner des dysfonctions neuronales au niveau cérébral. Cliniquement cela peut se manifester par un déficit cognitif et un comportement anormal.(5)

Le développement de l'ascite est lié à l'HTP qui entraîne une vasodilatation splanchnique. Cette vasodilatation contribue à une diminution du volume sanguin circulant effectif et ainsi à la stimulation du système rénine angiotensine aldostérone au niveau rénal. Ce système provoque une rétention accrue d'eau et de sodium dans l'organisme. Cet excès d'eau et de sodium va enfin se retrouver dans la cavité péritonéale par l'intermédiaire du système lymphatique hépatique, créant l'ascite.(6)

## 1.6. Complications hémorragiques

### 1.6.1. Hémorragies non digestives

Il a été décrit chez les patients atteints de cirrhose une symptomatologie hémorragique à type de saignements cutanéomuqueux comme des épistaxis

récidivantes, des ecchymoses spontanées, des saignements prolongés pour des coupures superficielles ou pour les femmes des ménorragies.(7)

#### 1.6.2. Hémorragies digestives

Les ruptures de varices œsophagiennes (RVO) sont une des complications les plus graves de la cirrhose. En effet, le ralentissement du flux sanguin au niveau du tronc porte entraîne un développement de réseaux vasculaires secondaires pour le retour veineux : veines œsophagiennes et gastriques et circulation sous cutanée.(8) L'importance du flux sanguin au niveau des veines œsophagiennes entraîne l'apparition de varices fragiles et susceptibles de rompre. Ces hémorragies peuvent être cataclysmiques et engager le pronostic vital du patient à court terme. En effet, 5% des patients décèdent des suites d'une hémorragie sur RVO en 48 heures et 20% lors des 6 premières semaines.(9)

La rupture de varices gastriques (RVG) est un phénomène moins fréquent que les RVO, en raison d'une fréquence moindre d'apparition de varices gastriques (par rapport aux œsophagiennes) mais un pronostic péjoratif est lié aux RVG.(10)

#### 1.7. Complications thrombotiques

En 2009 une étude rétrospective publiée par l'équipe de Sogaard reprend tous les cas de thromboses veineuses de 1980 à 2005.(11) Un total de 67519 patients a présenté une thrombose non provoquée sur cette période (36959 thromboses veineuses profondes TVP et 30560 embolies pulmonaires EP). Il a été démontré un risque plus élevé de thromboses veineuses chez les patients atteints de cirrhose avec un Odd Ratio à 2.06 (95% IC 1.79-2.38). Parmi les patients atteints de cirrhose

l'OR est de 2.02 (95% IC 1.78-2.31) pour les TVP et de 1.41 (95% IC 1.20-1.65) pour les EP.

Plus récemment en 2016 une méta-analyse publiée par l'équipe d'Ambrosino démontrait un risque majoré de TVP et d'EP chez les patients atteints de cirrhose.(12) Un total de 11 articles regroupant 695.012 patients atteints de cirrhose et 1.494.660 patients dits « contrôles » a conclu à un OR de 1.703 (95% IC 1.333-2.175) correspondant à une augmentation du risque de thrombose veineuse de 51.3%. Dans les analyses en sous-groupes, un OR a été retrouvé à 2.038 (95% IC 1.817-2.285) regroupant 19.237 patients et 847.082 « contrôles » pour les TVP. Un OR à 1.655 (95% IC 1.042-2.630) pour les EP regroupant 18.223 patients et 834.626 « contrôles » a été retrouvé.

Comme nous l'avons décrit, le tronc porte se situe en amont du foie et est sujet à plusieurs modifications lors de la cirrhose (augmentation des pressions ; ralentissement du flux). Le tronc porte draine plusieurs veines digestives comme la veine splénique ou la veine mésentérique supérieure, tout ceci appelé le système porte. Au niveau de ce système, les thromboses sont très rares dans la population générale (1%) mais la cirrhose est un facteur de risque démontré de thromboses à ce niveau.(13)

Le patient atteint de cirrhose est donc à risque majeur de saignements ou d'hémorragies (digestifs et cutanéomuqueux) mais également de thromboses (TVP, EP ou thromboses du système porte). Même s'il semble que des causes mécaniques peuvent expliquer certaines complications hémorragiques (augmentation du flux sanguin dans les varices œsophagiennes ou gastriques) et/ou thrombotiques (ralentissement du flux au niveau du système porte), une exploration de l'hémostase était nécessaire chez ces patients.

## 2. Physiologie de l'Hémostase

L'hémostase est un système finement régulé. Il s'agit d'un ensemble d'acteurs qui permet en cas de lésions vasculaires d'éviter une perte importante du volume sanguin (hémorragie) et d'éviter la formation aberrante de caillots (thrombose). A l'état physiologique lorsque l'endothélium est endommagé, deux systèmes sont activés : l'hémostase primaire et l'hémostase secondaire.

### 2.1. L'hémostase primaire

Lors d'une effraction vasculaire trois processus sont décrits : une vasoconstriction réflexe, l'activation plaquettaire et l'agrégation plaquettaire.

La vasoconstriction permet un ralentissement du flux sanguin et un temps de contact allongé entre les plaquettes circulantes et le sous endothélium. La fixation du facteur Willebrand à la glycoprotéine (GP) Ib (récepteur membranaire plaquettaire) entraîne un phénomène de « rolling » et la fixation du collagène à la GPIIb/IIIa et GPVI plaquettaire entraîne une stabilisation de la fixation plaquettaire au sous endothélium.(14)

Ces liaisons entraînent une cascade d'activations intra-plaquettaires concourant à l'activation plaquettaire. Lorsque les plaquettes sont activées il existe un changement de forme de la cellule qui émet des pseudopodes augmentant donc sa surface exposée. Il y a une augmentation de la concentration en calcium ( $Ca^{2+}$ ) intracytoplasmique, une synthèse de thromboxane A<sub>2</sub>, une sécrétion du contenu des granules (alpha et denses), un réarrangement des phospholipides (PL)

membranaires, appelé FLIP-FLOP et enfin une activation du récepteur membranaire GPIIb/IIIa.

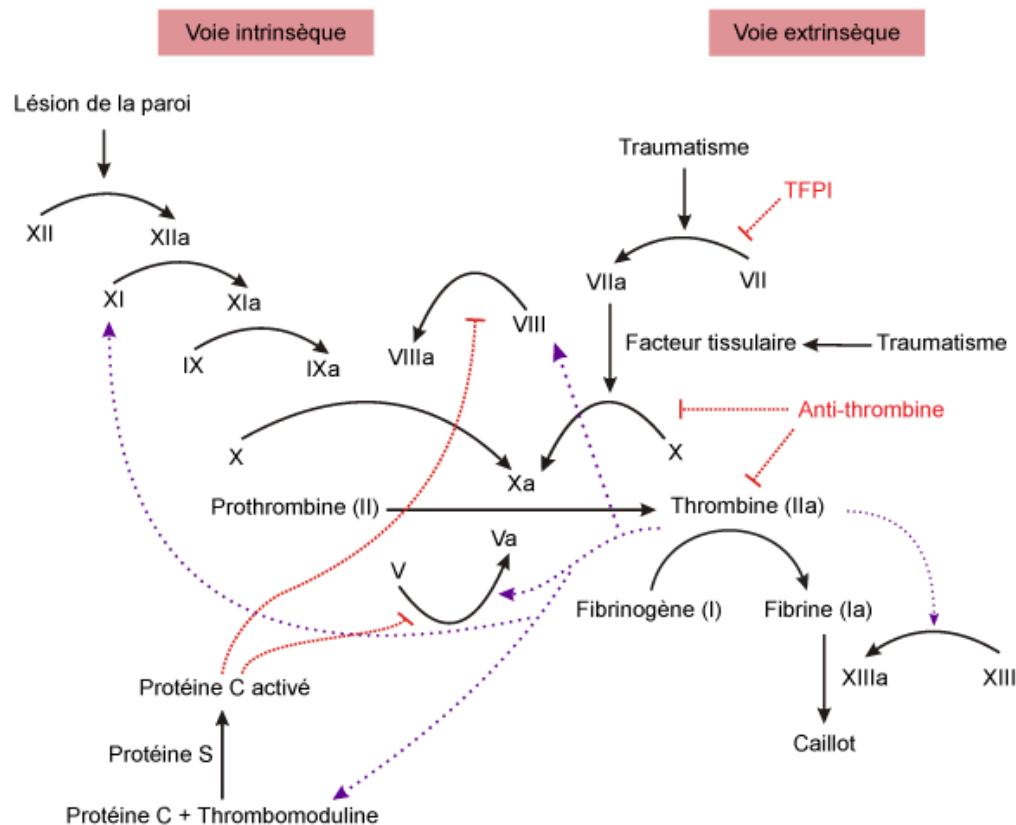
Le fibrinogène (circulant ou libéré par les plaquettes) se lie au GPIIb/IIIa plaquettaire activé et forme des ponts entre les plaquettes permettant l'agrégation plaquettaire. Le remaniement de la bicouche phospholipidique membranaire plaquettaire par le phénomène de FLIP FLOP provoque une augmentation des charges négatives à la surface des plaquettes.(15) Le  $Ca^{2+}$  libéré permet le rapprochement des facteurs, chargés négativement, à la surface des plaquettes et est donc indispensable à l'activation en cascade des facteurs de l'hémostase secondaire.

## 2.2. La coagulation plasmatique

La brèche vasculaire expose le facteur tissulaire (FT) exprimé au niveau du sous endothélium. Il se lie au facteur (F) VII circulant et le transforme en FVII activé (a). Ce complexe FT + FVIIa permet l'activation des FX et FIX. Le FXa et le FVa forment le complexe prothrombinase qui permet l'activation de la prothrombine en thrombine. Cette première étape correspond à la phase d'initiation de l'hémostase secondaire.(16) (Figure 3) Une partie de la thrombine générée se lie à l' $\alpha_2$ macroglobuline. Ce complexe inhibe l'action procoagulante de la thrombine et évite la formation d'un caillot à distance du site lésé.(17)

Les premières traces de thrombine générées vont permettre d'activer les FV, FVIII et FXI. Le FXIa augmente la quantité de FIXa qui avec son cofacteur le FVIIIa majore l'activation du FX. Cette augmentation des taux de FXa et de FVa provoque une démultiplication importante de la quantité de thrombine générée. Enfin la thrombine transforme le fibrinogène circulant en fibrine. Cette fibrine va s'assembler et sous l'effet du FXIII va former un réseau stable de fibrine : le caillot.

La cascade enzymatique de la coagulation plasmatique nécessite la présence de PL et de  $Ca^{2+}$ . Les PL sont apportés par la membrane plaquettaire, à la surface desquelles ont lieu les réactions. Le  $Ca^{2+}$  est libéré par les plaquettes après leur activation.



**Figure 3. Schéma de la coagulation plasmatique**

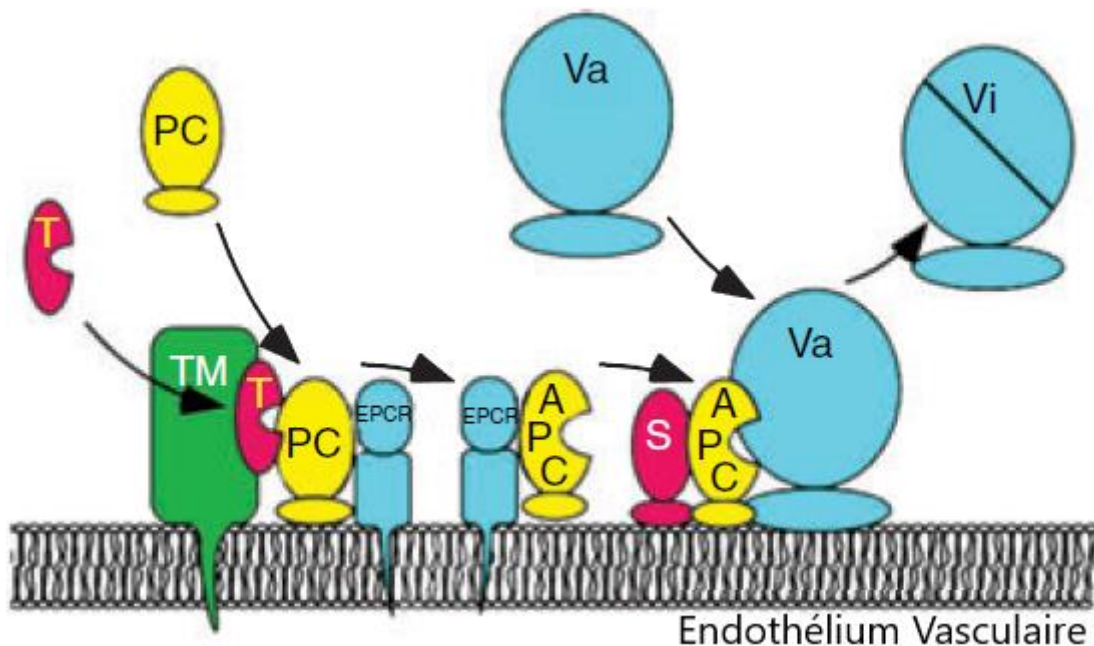
TFPI : Tissue Factor Pathway Inhibitor ; Flèches noires : activation ; Flèches violettes : activation par la thrombine ; Traits rouges : inhibition

En parallèle, la thrombine se lie avec une grande affinité à la thrombomoduline (TM) exprimée à la surface de l'endothélium vasculaire. La TM est une protéine transmembranaire exprimée par l'endothélium. Cette liaison empêche l'interaction de la thrombine avec le fibrinogène et permet l'activation de la protéine C (PC).(18,19) (Figure 4) L'expression membranaire de la TM par les cellules endothéliales est

plutôt homogène d'un lit vasculaire à l'autre (vaisseaux artériels, veineux, capillaires) dans la grande majorité des organes hormis au niveau cérébral où seulement des traces de TM sont retrouvées.(18)

A la surface des cellules endothéliales on retrouve également le récepteur endothélial à la protéine C (EPCR) qui permet de lier la PC. Ce rapprochement sur l'endothélium de la thrombine et de la PC permet une multiplication par vingt de l'activation de la PC par la thrombine.(20) En revanche l'EPCR présente une répartition hétérogène. Très fortement exprimé dans les gros vaisseaux artériels et fortement exprimé dans les gros troncs veineux, l'EPCR est très faiblement exprimée dans les capillaires.(21) Ceci a permis d'expliquer, en partie, que l'EPCR augmente le potentiel d'activation de la PC par le complexe thrombine-TM dans les gros vaisseaux où les pressions et les flux sanguins sont plus importants et donc le temps de contact entre PC circulante et thrombine liée à la TM était limité.

Une fois activée, la PC avec son cofacteur la protéine S (PS) permet l'inhibition du FVIIIa et du FVa.



**Figure 4. Voie de la Protéine C (Esmon, 2010)**

APC : Protéine C activée ; EPCR : Endothelial Protein C Receptor ; PC : Protéine C ; T : Thrombine ;  
 TM : Thrombomoduline ; S : Protéine S ; Va : Facteur V activé ; Vi : Facteur V inhibé



En situation physiologique, l'hémostase empêche la formation aberrante d'un caillot mais également une extension trop importante de ce dernier lors d'une effraction vasculaire. Dans un contexte de cirrhose des complications hémorragiques et thrombotiques ont donc été décrites. L'hémostase a donc été étudiée chez ces patients et plusieurs modifications ont pu être mises en évidence.

### **3. Modifications biologiques liées à la cirrhose et l'IHC**

#### **3.1. Hémostase primaire**

L'IHC est responsable d'une diminution de la production des plaquettes par défaut de synthèse de la thrombopoïétine (TPO) par les hépatocytes.(22) La TPO est le facteur de croissance majeur des mégacaryocytes, précurseurs des plaquettes.(23) De plus, l'IHC peut se compliquer d'un hypersplénisme responsable d'une rétention des éléments cellulaires circulants comme les plaquettes, ce qui aggrave la thrombopénie.(22)

En revanche, le taux de facteur Willebrand, synthétisé par les mégacaryocytes et les cellules endothéliales est augmenté chez les patients atteints d'IHC. L'ADAMTS13, protéine clivant le facteur Willebrand, diminuant ainsi ses capacités pro coagulantes, est retrouvé à des taux diminués chez les patients atteints de cirrhose par rapport à des témoins.(24,25)

#### **3.2. Coagulation plasmatique**

Les hépatocytes sont les cellules du foie permettant la synthèse de la majorité des facteurs de la coagulation plasmatique qu'ils soient procoagulants ou anticoagulants.(26) Lors de l'IHC, les hépatocytes présentent une altération de leurs fonctions de synthèse. Ainsi avec l'évolution de la fibrose hépatique les facteurs de l'hémostase secondaire vont voir leurs taux diminuer par défaut de production.

En revanche, le FVIII synthétisé au niveau hépatique mais également par l'endothélium présente des niveaux élevés dans le plasma des patients atteints de

cirrhose.(27) La synthèse extra-hépatique semble compenser le défaut de production des hépatocytes. De plus, le FVIII circulant est lié au facteur Willebrand qui le protège d'une élimination précoce. Or les taux de facteur Willebrand chez les patients atteints de cirrhose sont plus élevés que dans la population générale. Enfin l'élimination du FVIII est hépatique par l'intermédiaire de son récepteur la LDL related protein (LRP). Cette LRP est diminuée en cas de cirrhose.(28) Ainsi le FVIII présente un niveau de production peu modifié par la cirrhose grâce à la synthèse extra-hépatique et une clairance diminuée par augmentation du taux de facteur Willebrand et une diminution de la LRP.

Pour conclure la cirrhose provoque de multiples modifications biologiques procoagulantes et anticoagulantes. Au niveau clinique, les patients atteints de cirrhose peuvent présenter des complications hémorragiques et thrombotiques avec un pronostic péjoratif sur la survie du patient. Il est donc important dans un laboratoire d'analyses médicales de connaître les tests explorant l'hémostase secondaire pour évaluer ces modifications biologiques et leur retentissement sur la coagulation dans son ensemble.

## 4. Exploration de la coagulation plasmatique

### 4.1. Tests standards

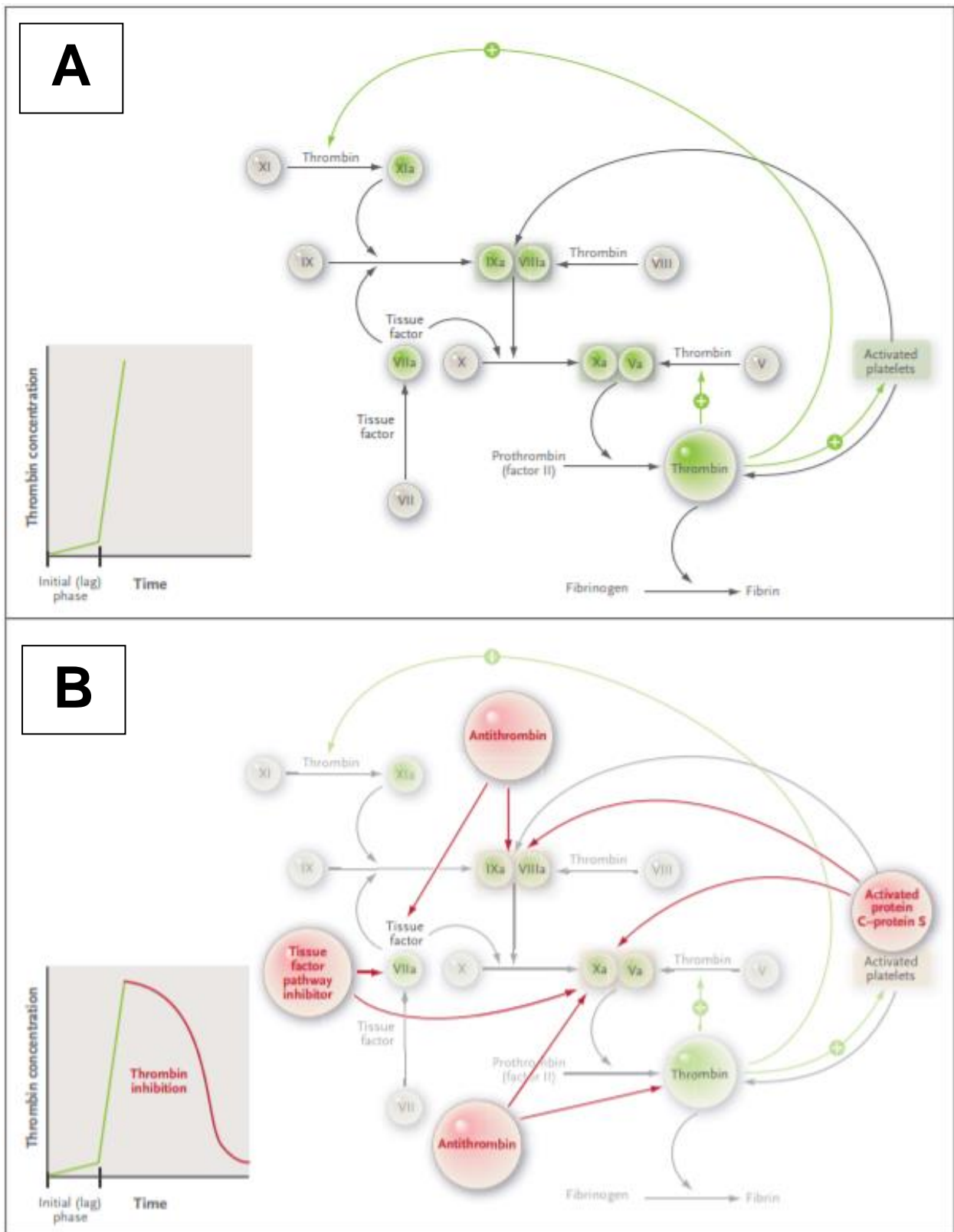
Les tests classiques explorant la coagulation plasmatique comme le taux de prothrombine (TP) et le TCA sont utilisés depuis de nombreuses années, notamment chez les patients atteints de cirrhose. Chez ces patients, les temps de coagulation sont allongés (augmentation du TCA, diminution du TP) à cause des déficits en facteurs liés à l'IHC. Ainsi pendant longtemps, le patient atteint de cirrhose était considéré comme naturellement anticoagulé. Cette hypothèse a été récemment remise en cause. En effet, lors de procédures invasives à risque hémorragique comme la biopsie hépatique, ce phénotype hémorragique biologique n'est pas corrélé à des saignements abondants.(29,30) Il a été démontré que la transfusion de FVIIa recombinant ne permettait pas de contrôler des saignements sur ruptures de varices malgré une normalisation du TP.(31) Enfin les complications hémorragiques lors de transplantations hépatiques ont considérablement diminué au fil des années mais semble être en lien avec les évolutions des techniques chirurgicales plutôt qu'à un changement de prise en charge du risque hémorragique ou du saignement.(32) Le risque hémorragique majeur des patients atteints de cirrhose provient du risque de RVO ou de RVG. Ces dernières ne semblent pas liées au phénotype biologique mais plutôt à une complication mécanique de l'HTP ou une dysfonction endothéliale. (33,34)

Cette dissociation phénotype biologique/ phénotype clinique peut être expliquée par les techniques de réalisation des tests standards. Ces tests ne reflètent que le temps nécessaire à l'apparition des premières traces de fibrine *in vitro*. La phase

d'amplification de la génération de thrombine conduisant à la formation d'un caillot de fibrine stable et l'inhibition par l'antithrombine et la voie de la PC n'est pas prise en compte. Une technique permettant d'étudier l'hémostase secondaire dans son ensemble comme le test de génération de thrombine (TGT) semble nécessaire pour explorer l'hémostase secondaire chez les patients atteints de cirrhose.

## 4.2. Le TGT

Le TGT est une technique qui permet de mesurer la quantité de thrombine générée au cours du temps après activation de l'hémostase secondaire par mise en contact du plasma avec du FT et des PL. Cette technique se rapproche au plus près des phénomènes se déroulant *in vivo*. L'analyse au cours du temps permet d'étudier le rôle de la boucle d'amplification et l'action des inhibiteurs. (Figure 5)



**Figure 5. Différentes étapes de la coagulation plasmatique et TGT (35)**

A : Phases d'initiation et d'amplification

B : Phase d'inhibition

Cette technique est connue depuis plus de 50 ans et deux révolutions ont permis au TGT de se développer au début des années 2000. Initialement, il s'agissait d'une technique fastidieuse. Le plasma du patient était recalcifié permettant la génération de thrombine. Par la technique dite du « sous échantillonnage », du plasma était prélevé régulièrement et mis en présence de fibrinogène. Ainsi plus la réaction avançait dans le tube primaire, plus la transformation du fibrinogène en fibrine était rapide.(36) La première révolution est permise grâce à l'équipe de Hemker au début des années 1990 grâce à l'utilisation d'un substrat chromogénique spécifique de la thrombine avec lecture par un spectromètre. Cette évolution permet donc d'éviter le « sous échantillonnage » et donc de limiter les imprécisions de mesure.(37) La dernière étape, au début des années 2000, est la semi-automatisation de la technique appelée Calibrated Automated Thrombogram (CAT) et l'utilisation d'un substrat fluorescent, le Z-gly-gly-Arg couplé au 7-amino-4-méthylcoumarine. Ce substrat permet de s'affranchir de l'interférence liée à la turbidimétrie et ainsi autorise l'utilisation d'un plasma riche en plaquettes ou encore d'éviter l'étape de défibrination.(38)

#### 4.2.1. La méthode CAT

Dans une plaque 96 puits, le plasma du patient est mélangé à un réactif déclenchant contenant du FT et des PL. Ce mélange est incubé pendant 10 minutes à 37°C dans l'automate. La réaction est déclenchée après l'ajout par l'automate d'un mélange de Ca<sup>2+</sup> et du substrat fluorescent de la thrombine. En parallèle un « calibrant », contenant une concentration connue du complexe  $\alpha_2$ macroglobuline-thrombine, est mélangé au plasma sans ajout de FT ni de PL. Une mesure du signal fluorescent est faite simultanément sur ces deux mélanges. L'analyse sur le puit « calibrant » permet

d'éviter les biais de mesure liés à la variation de coloration du plasma. De plus l'utilisation du calibrant permet de s'affranchir de l'effet dit « filtre interne » correspondant à une absence de linéarité entre la quantité de thrombine générée et la quantité de signal détectée. Enfin l'activité coagulante de la thrombine est inhibée par sa liaison avec l' $\alpha$ 2macroglobuline, mais cette liaison n'inhibe pas la capacité de la thrombine à cliver le substrat. La présence du complexe  $\alpha$ 2macroglobuline-thrombine dans le calibrant permet de mesurer le signal émis non lié à une activité coagulante.

Il existe plusieurs réactifs déclenchants dont les concentrations variables en FT et en PL destinés à une utilisation particulière. L'étude du rôle procoagulant des plaquettes est réalisée sur plasma riche en plaquettes mélangé à un réactif contenant du FT mais pas de PL (PRP Reagent®, Stago®). L'étude des maladies hémorragiques (notamment l'hémophilie A) est réalisée sur plasma pauvre en plaquettes (PPP) mélangé à un réactif contenant des PL et une faible concentration en FT (PPP Low Reagent®, Stago®). L'utilisation d'une forte concentration en FT en présence de PL (PPP High Reagent®, Stago®) permet d'étudier l'impact d'un traitement anticoagulant. Enfin l'étude des profils thrombotiques est réalisée à partir d'un réactif contenant une concentration intermédiaire en FT avec des PL (PPP Reagent®, Stago®) auquel est ajouté un activateur de la voie de la PC : la TM.

Le TGT selon la méthode CAT, commercialisé par Stago® comprend un fluoromètre (Fluoskan Ascent Fluorometer) pour la détection du signal et un logiciel (Thrombinoscope software) pour le calcul des paramètres du thrombinogramme. D'autres techniques ont vu le jour comme le Technoclone avec l'automate Ceveron® ou l'Innovance ETP commercialisé par Siemens®.

Enfin le plus récent à avoir été commercialisé : le ST-Genesia® (Stago®) qui est totalement automatisé et qui permet la réalisation de contrôles de qualités et une



calibration quotidienne. Cet automate permet d'adapter le TGT au plus près d'une activité de laboratoire de routine.

#### 4.2.2. Paramètres du TGT

Le TGT permet d'exploiter plusieurs paramètres. (Figure 6)

Le temps de latence, exprimé en minutes, correspond au délai d'apparition des premières traces de thrombine générée. C'est seulement ce temps qui est étudié par le TP.

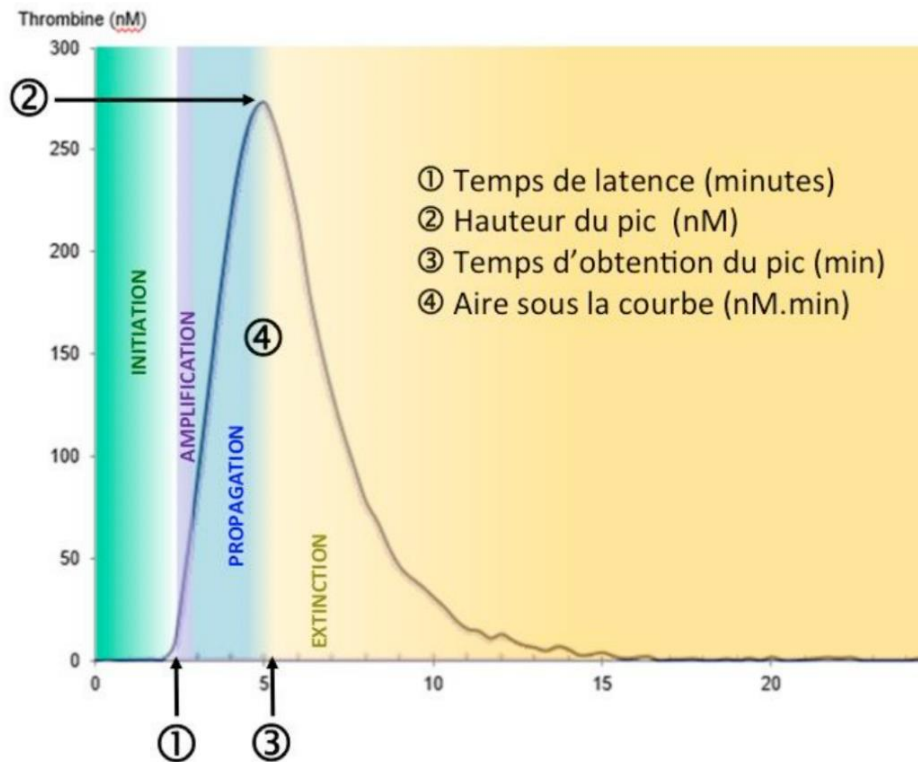
La hauteur du pic, exprimée en nM correspond à la quantité maximale de thrombine.

Le temps au pic, exprimé en minutes correspond au temps nécessaire pour atteindre le pic de thrombine générée.

Le potentiel endogène de thrombine (ETP), exprimé en nM.min correspond à l'aire sous la courbe et reflète la quantité totale de thrombine générée.

L'index de vélocité, exprimé en nM/min correspond à la cinétique de la formation de la thrombine durant la phase ascendante.

Le start tail, exprimé en minutes correspond au temps nécessaire au retour à la ligne de base.



**Figure 6. Thrombinogramme Source : ALEBRETON**

#### 4.2.3. TGT et cirrhose

Depuis 2005 plusieurs équipes se sont intéressées à la génération de thrombine chez les patients atteints de cirrhose. Une synthèse des principaux résultats pour différentes conditions analytiques est reprise dans les Tableau I et II.

La génération de thrombine initiée par une faible concentration en FT montre des résultats hétérogènes. La majorité des publications mettent en évidence une diminution de la génération de thrombine des patients atteints de cirrhose en comparaison aux témoins sains (27,39–41). D'autres ne retrouvent aucune différence significative.(42–45) Enfin une augmentation significative est observée par l'équipe de Kleinegris *et al.* en 2014.(46) La sévérité de la maladie impacte la génération de thrombine avec une diminution significative de l'ETP pour les stades

les plus avancés.(39) Lorsque la TM est ajoutée les résultats sont moins hétérogènes. Certains ne retrouvent pas de différence significative de l'ETP entre patients et témoins.(40,42) Alors que d'autres équipes observent une augmentation significative chez les patients.(27,45) Enfin l'utilisation de TM permet d'évaluer l'inhibition apportée par la voie de la PC en calculant le ratio « ETP avec TM / ETP sans TM ». Ce ratio est augmenté chez les patients quand ils sont comparés aux témoins, suggérant une moindre sensibilité à l'action de la TM chez les patients atteints de cirrhose. (27,41,44–47)(Tableau I)

**Tableau I. Synthèse TGT et cirrhose, 1µM de FT**

	TRIPODI <i>et al.</i> (40)	TRIPODI <i>et al.</i> (41)	DELAHOUSSE <i>et al.</i> (42)	GATT <i>et al.</i> (43)	LISMAN <i>et al.</i> (27)	YOUNGWON <i>et al.</i> (47)
PL (µmol/L)	0,5	1	1		0,8	
TM (nmol/L)	4	4	4		2	2,5
TM origine			rTM		rTM	rTM
ETP (sans TM) patients	308 (40-585)	1380 (525-2398)	1109 (210-1705)	1331+/-414,7	NR	
ETP (sans TM) témoins	451 (300-632)	1856 (1011-2921)	1296 (897-1737)	1484+/- 401	1752 (987-2665)	
ETP TM patients	209 (34-368)	1095 (373-1857)	888 (109-1448)		NR	
ETP TM témoins	188 (0-455)	1202 (313-1925)	738 (381-1041)		761 (125-1766)	
Comparaison Ratio avec TM/sans TM Patients vs Témoins		0,80 vs 0,66			NR	NR

	GROENEVELD <i>et al.</i> (48)		KLEINEGRIS <i>et al.</i> (46)	KREMERS <i>et al.</i> (44)	RUSSO <i>et al.</i> (45)	DILLON <i>et al.</i> (39)
PL (µmol/L)	4		4	4	4	4
TM (nmol/L)	1 ; 2 ; 4 ; 8		0,56	0,56	1,5	
TM origine			rTM	rTM	rTM	
ETP (sans TM) patients	786+/-84 (MELD >12)	583+/-33 (MELD<12)	Normalisé à un pool de plasmas normaux CPA : 146% CPB : 169% CPC 161%	NR	1000	1376+/-361
ETP (sans TM) témoins	559+/-64 (MELD >12)	559+/-64 (MELD<12)			1092 (973-1242)	1711+/-318
ETP TM patients	NR	NR			600	
ETP TM témoins					330 (221-511)	
Comparaison Ratio avec TM/sans TM Patients vs Témoins			CPB : 0,90 vs 0,66 CPC : 0,96 vs 0,66	NR	0,5 vs 0,29	

CP : Child-Pugh ; ETP : Endogenous thrombin potential ; NR : Valeurs numériques non renseignées ; PL : Phospholipides ; rTM : Thrombomoduline de poumon de lapin ; rTM : Thrombomoduline recombinante ; TM : Thrombomoduline

■ : Diminution significative patients vs témoins ■ : Augmentation significative patients vs témoins ■ : Pas de différence significative

Cases vides : pas d'analyse statistique réalisée

Lorsque la génération de thrombine est initiée par une concentration intermédiaire de FT, certains observent des ETP comparables entre patients et témoins. (44,46,48–51) Alors que d'autres équipes retrouvent des ETP significativement diminués chez les patients par rapport aux témoins.(42,52–54) Quand la TM est ajoutée, seulement deux équipes ont retrouvé des résultats d'ETP comparables.(53) Toutes les autres études retrouvent une augmentation de l'ETP chez les patients comparés aux témoins.(42,43,49–52,54–56) Les ratios « ETP avec TM / ETP sans TM » sont systématiquement augmentés chez les patients par rapport aux témoins. (43,49,51,53,56) (Tableau II)

**Tableau II. Synthèse TGT et cirrhose, 5µM de FT**

	DELAHOUSSE <i>et al.</i> (42)	CHAIRETI <i>et al.</i> (56)	GROENEVELD <i>et al.</i> (48)	KLEINEGRIS <i>et al.</i> (46)	POTZE <i>et al.</i> (52)	KREMERS <i>et al.</i> (44)
TM origine	rITM	rITM		rTM	rTM	rTM
TM (nmol/L)	15	4	1 ; 2 ; 4 ; 8	0,56		
ETP (sans TM) patients	1192 (802-1656)	1352 (857-2006)	938+/-73	NR	771,4 (419-1262,3)	NR
ETP (sans TM) témoins	1476 (986-2480)	1585 (1108-2244)	896+/-48		908,5 (684,1-1813,4)	
ETP TM patients	1042 (288-1754)	929 (237-1677)	NR		616,4 (144,6-1046,7)	
ETP TM témoins	714 (192-1653)	593 (296-1406)		355,4 (168,3-1251,4)		
Comparaison Ratio avec TM/sans TM Patients vs Témoins		0,7 vs 0,4				

	LEBRETON <i>et al.</i> (49)	SINEGRE <i>et al.</i> (50)	BOS <i>et al.</i> (55)	RASSI <i>et al.</i> (53)	TALON <i>et al.</i> (51)	WAN <i>et al.</i> (54)
TM origine	rITM	rITM	TM	rTM	rITM	
TM (nmol/L)	1	4		5	3,3	10
ETP (sans TM) patients	CPA : 1096 CPB : 1295 CPC : 1360	CPA : 1238 CPB : 1337 CPC : 1403		1256 (986-1526)	1282 (1157-1429)	90,5 (82,3-101)
ETP (sans TM) témoins	1287 (1153-1369)	1273 (1191-1432)		1515 (1297-1786)	1340 (1226-1487)	105 (96-121)
ETP TM patients	CPA : 702 CPB : 990 CPC : 1178	CPA : 776 CPB : 1120 CPC : 995	AI : 670 (381-786) NASH : 683 (528-940) OH : 753 (609-944) Viral : 719 (527-859)	973 (731-1258)	1058 (867-1073)	75,8 (67,4-84,5)
ETP TM témoins	527 (357-733)	508 (410-725)	420 (305-581)	784 (528-1321)	579 (477-759)	47,8 (38,1-58)
Comparaison Ratio avec TM/sans TM Patients vs Témoins	CPA : 0,59 vs 0,47 CPB : 0,76 vs 0,47 CPC : 0,82 vs 0,47			0,82 vs 0,60	0,83 vs 0,43	

AI : Auto-Immune ; CP : Child-Pugh ; ETP : Endogenous thrombin potential ; NASH : Stéato-hépatite non alcoolique ; NR : Valeurs numériques non renseignées ; OH : éthyliste chronique ; PL : Phospholipides ; rITM : Thrombomoduline de poumon de lapin ; rTM : Thrombomoduline recombinante ; TM : Thrombomoduline

■ : Diminution significative patients vs témoins ■ : Augmentation significative patients vs témoins ■ : Pas de différence significative  
Cases vides : Pas d'analyse statistique réalisée

#### 4.2.4. Evolutions pour le TGT

Les données cliniques et l'utilisation du TGT ont ainsi permis de remettre en cause le dogme du patient cirrhotique naturellement anticoagulé. Au contraire, ces patients sont particulièrement sujets aux thromboses et le TGT a pu montrer une hypercoagulabilité chez ces patients, notamment en intégrant, grâce à la TM, le système PC/PS, qui est perturbé. La cirrhose engendre d'autres anomalies susceptibles d'être explorées par le TGT.

Une forme soluble de l'EPCR (EPCRs) qui conserve toutes ses fonctions de ligand a été identifiée.(57,58) Cet EPCRs est une protéine de 43kDa résultant du clivage de la partie extracellulaire de l'EPCR par une métalloprotéase.(59) Récemment une équipe avait mis en évidence des taux plus élevés d'EPCRs (ng/mL) chez les patients atteints de cirrhose par rapport aux témoins  $239 \pm 1.8$  vs  $127 \pm 1.5$  ( $p < 0,0001$ ) sans que le mécanisme ne soit identifié.(60) Cette forme soluble de l'EPCR garde son habilité à se lier à la PC et à la PC activée (PCa). Il a été démontré que cette liaison empêchait l'activation de la PC en PCa par la thrombine et inhibait l'action de la PCa entraînant donc potentiellement un effet procoagulant.(61) Le rôle de cette augmentation des taux plasmatiques d'EPCRs dans l'état d'hypercoagulabilité lié à la cirrhose pourrait être étudié par le TGT.

Ces deux récepteurs, TM et EPCR, essentiels pour le système de la PC, sont physiologiquement présents sur l'endothélium vasculaire.(16)

Le TGT en présence de cellules endothéliales pourrait être un outil pouvant mieux refléter *in vitro*, les différents mécanismes mis en jeu lors de l'hémostase secondaire *in vivo*.

## 5. TGT en présence de cellules

Il existe plusieurs adaptations du TGT en présence de différents types cellulaires. En 2017, Sassi *et al.* démontre l'effet procoagulant des cellules d'adénocarcinome ovarien en lien avec une surexpression de FT de ces cellules.(62) Les cellules endothéliales (Human Umbilical Vein Endothelial Cells HUVEC et Human Microvascular Endothelial Cells from Derma HMVEC-D) ont également été testées par Catieau *et al.* en 2018.(63) Ils ont démontré une diminution significative de la génération de thrombine lorsque celle-ci est réalisée sur cellules endothéliales en comparaison au test classique sans cellules. En effet, une augmentation significative du temps de latence a été observée (6.5 min HUVEC et 6.3 minutes HMVEC-D versus 4.14 min pour le contrôle sans cellules) ainsi qu'une diminution de la hauteur du pic (194 nM HUVEC et 178 nM for HMVEC-D versus 302 nM pour le contrôle) et de l'ETP (1618 nM.min HUVEC et 1593 nM.min HMVEC-D versus 1700 nM.min pour le contrôle). Ce travail confirmait les résultats retrouvés par Coll *et al.* en 2013.(64) Ils montraient que la surface des cellules endothéliales tendait à réguler l'hémostase secondaire par le système de la PC. En effet, ils avaient utilisé une cellule hybride d'HUVEC et de cellule carcinomateuse pulmonaire (exprimant fortement la TM et l'EPCR) et trouvaient une diminution du pic de près de 56% (371 nM sans cellules versus 170 nM avec cellules) et une diminution de l'ETP de près de 40% (2078 nM.min sans cellules versus 1202 nM.min avec cellules) à partir d'un plasma normal. Ils avaient répété l'expérience en utilisant des plasmas déficients en PC ou en PS. Sur le plasma déficient en PC la diminution du pic était moins importante, environ 30% (464 nM sans cellules versus 322 nM avec cellules) et la diminution de l'ETP était d'environ 10% (2293 nM.min sans cellules versus 2054 nM.min avec cellules)



montrant l'impact de la PC sur le TGT mais également le rôle des cellules endothéliales dans ce système et plus particulièrement des récepteurs membranaires TM et EPCR. Lorsque le TGT se faisait en présence de cellules, les temps de latence étaient augmentés de 107% sur le plasma normal et de 68% sur plasma déficient en PC en comparaison avec le TGT sans cellules. Les mêmes tendances étaient retrouvées sur le plasma déficient en PS.(64) A notre connaissance, le TGT en présence de cellules endothéliales n'a jamais été étudié pour explorer l'hémostase chez les patients atteints de cirrhose. Cette adaptation du TGT pourrait être intéressante par l'apport cellulaire de la TM, chez ces patients où des modifications moléculaires et cellulaires sont décrites

Cependant, dans les études adaptant le TGT avec la présence de cellules les configurations cellulaires étaient différentes. Les cellules étaient directement mises en suspension dans le mélange réactif/plasma.(62,65–67)(Tableau III) Alors que d'autre équipes faisaient adhérer les cellules au fond des puits.(63,64,68–71) (Tableau IV). Le nombre de cellules par puits pouvait également différer d'une étude à l'autre. De plus différents réactifs ont été utilisés en fonction de la concentration en FT ou en PL. La mise en place du TGT en présence de cellules sur PPP, a nécessité l'expérimentation de différentes conditions analytiques pour l'étude des performances de ce TGT adapté comme de l'impact lié à la présence de cellules (adhérentes ou en suspension) sur le TGT.

**Tableau III. Synthèse TGT en présence de cellules en suspension**

	Sassi 2017 <i>et al</i> (62)	Gierczak 2014 <i>et al.</i> (66)	Adesanya 2017 <i>et al.</i> (65)	Pepler 2017 <i>et al.</i> (67)
Cellules étudiées	Cellules cancéreuses	HEK293 et cellules cancéreuses	Cellules cancéreuses	HEK293 (+/- EPCR et TM)
Nombre de cellules (volume)	400 à 20000 dans PPP (80µL)	10000 (5µL)	930 à 100000 cellules (20µL)	80000 (20µL)
Plasma		40µL PPP	80µL PPP	50µL PPP
Réactif activateur	Pas de FT ni de PL (20µL de solution saline)	Pas de FT ni de PL (30µL PBS)	20µL (1pM FT et 4µM PL)	5µL RecombiPlastin (FT et PL dilution finale 1/1000)

EPCR : Endothelial Protein C Receptor ; FT : Facteur Tissulaire ; PL : Phospholipides ; PPP : Plasma Pauvre en Plaquettes ; TM : Thrombomoduline

**Tableau IV. Synthèse TGT en présence de cellules adhérentes**

	Djedidi <i>et al.</i> (68)	Catieau <i>et al.</i> (63)	Coll <i>et al.</i> (64)	Geenen <i>et al.</i> (70)	Billoir <i>et al.</i> (69)	Rousseau <i>et al.</i> (71)
Cellules étudiées	HUVEC et Cellules cancéreuses	HUVEC/HMVEC	EA hy926 Cells (TM et EPCR)	EA hy926 Cells (TM et EPCR)	Endothelial Aortique cells	Cellules cancéreuses
Nombre de cellules/puits (volume)	5000 (100µL)	5000	40000 (200µL)	NR	5000 (100µL)	5000 (100µL)
Lavage Cellulaire	3 fois en PBS + 1 (solution saline)	3 fois en PBS	1 fois en PBS	NR	Retrait milieu de culture	3 fois (PBS) + 1 (solution saline)
Volume PPP	80µL PPP + 20µL NaCl (0,9%)	80µL PPP	NR	80µL PPP	80µL PPP	80µL PPP
Réactif activateur	20 µL (5pM FT 4µM PL)	20 µL (0,5pM FT 4µM PL)	5 pM FT et 15µM PL	20µL (0pM FT 24µM PL)	20µL (5pM ou 1 pM FT 4µM PL)	20µL (5pM FT 4µM PL)

EPCR : Endothelial protein c receptor ; FT : Facteur tissulaire ; HMVEC : Human microvascular endothelial cells ; HUVEC : Human umbilical vein endothelial cells ; PL : Phospholipides ; PPP : Plasma pauvre en plaquettes ; TM : Thrombomoduline ; NR : Non renseigné

## 6. Contexte et Objectif

Ce travail de thèse s'intègre dans l'étude EXERCISE (Professeur A. Abergel) qui cherche notamment à démontrer l'impact de l'EPCR membranaire et soluble dans l'état d'hypercoagulabilité lié à la cirrhose. Il s'agit d'une étude exploratoire, monocentrique, transversale de type cas/témoins visant à inclure 180 patients atteints de cirrhose (60 CPA ; 60 CPB ; 60 CPC), 60 patients atteints de CHC et 60 témoins sains.

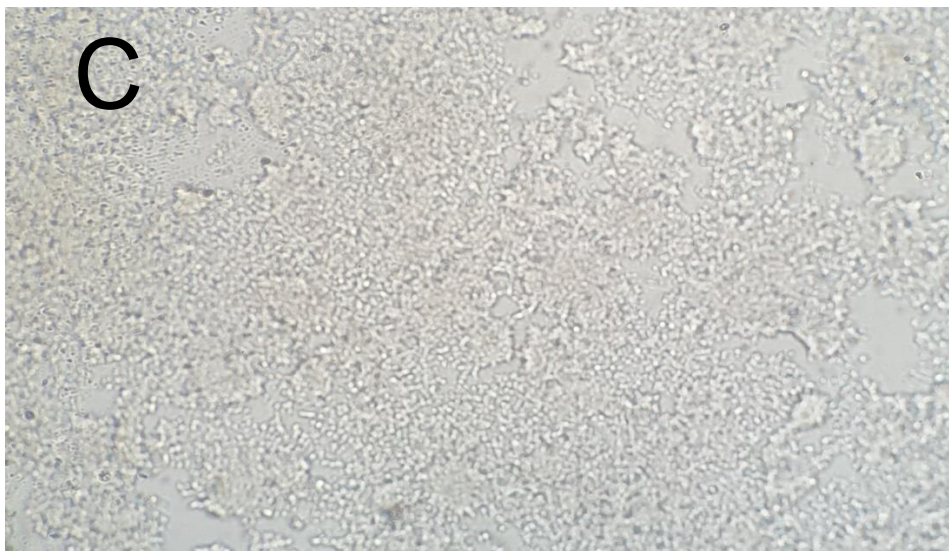
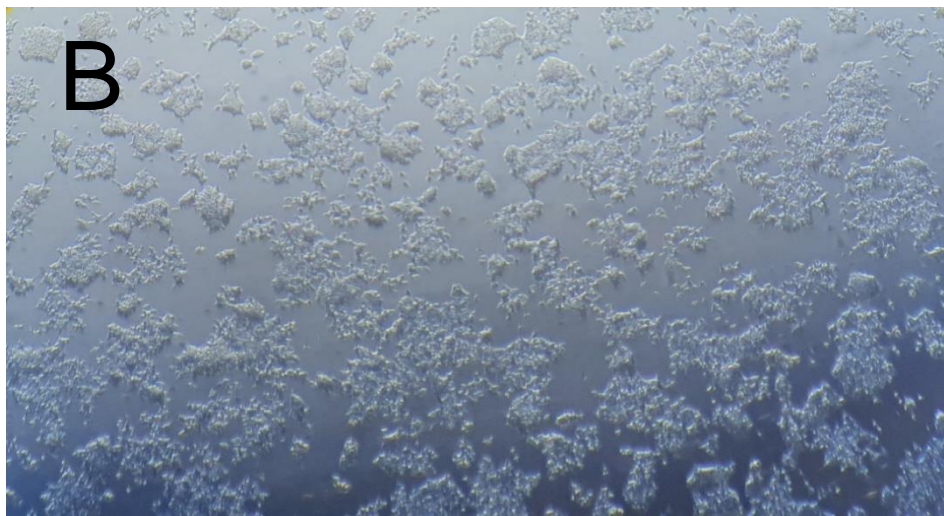
L'objectif de ce travail est l'étude de l'impact respectif de la TM et de l'EPCR membranaires dans le processus de coagulation plasmatique du sujet sain et cirrhotique. Pour cela nous avons entrepris de mettre en place et valider un TGT en présence de cellules endothéliales. Plusieurs lignées cellulaires seront utilisées avec une expression différentielle en TM et EPCR (aortique, veine saphène, micro-vaisseaux cutanés). Différentes méthodologies peuvent être utilisées, les cellules pouvant notamment être ajoutées selon deux configurations soit adhérentes soit en suspension. En revanche les performances de ces adaptations ne sont pas connues. Le travail initial a donc pour but d'étudier l'influence propre de la présence de cellules (adhérentes ou en suspension) sur les paramètres de génération de thrombine. Dans ce but, des cellules HEK293, qui n'expriment ni la TM ni l'EPCR ont été utilisées dans différentes conditions analytiques afin de valider la méthode.(67)

## **MATERIELS ET METHODES**

# 1. Culture cellulaire

## 1.1. Culture

La lignée testée pour la mise en place du TGT provient de cellules embryonnaires HEK293 (Human Embryonic Kidney 293, ECAC collection de la santé publique anglaise). Le milieu de culture utilisé était du milieu de EAGLE modifié par Dulbecco (DMEM) contenant une forte concentration en glucose avec des acides aminés non essentiels mais sans L-Glutamine (GIBCO®) avec 10% de sérum de veau fœtal (Biowest®). Du milieu de culture spécifique pour cellules endothéliales (EGM MV2 kit prêt à l'emploi, Promocell®) a été utilisé pour les cellules endothéliales d'origine aortique (Promocell®). Les cellules sont mises en cultures dans des flacons de 25cm<sup>2</sup> et incubées à 37°C en atmosphère humidifiée avec 5% de CO<sub>2</sub>. A 80% de confluence (Figure 7), les cellules sont décollées par incubation avec un mélange de trypsine et d'EDTA pendant 2 minutes. Le sérum de veau fœtal est ajouté à la fin de ces 2 minutes pour neutraliser la trypsine. Les cellules sont ensuite centrifugées à 400g pendant 10 minutes à 4°C puis remises en suspension dans leur milieu de culture. La viabilité et le compte cellulaire sont faits sur un hémocytomètre : NucleoCounter® NC-3000™.



**Figure 7. Confluence cellulaire HEK293**

A : Pas de confluence cellulaire

B : Confluence cellulaire moyenne

C : Confluence cellulaire > 80%

Photos prises au laboratoire d'hématologie CHU Estaing

## 1.2. Cellules adhérentes

Pour les expérimentations de génération de thrombine en présence de cellules adhérentes une dilution est faite pour obtenir un total de 200 cellules par microlitre ou 500 cellules par microlitre. 100µL de la solution obtenue estensemencée par puits (20.000 ou 50.000 cellules) dans une plaque de 96 puits à fond plat adaptée au TGT. La plaque est remise en incubation à 37°C, atmosphère humidifiée avec 5% de CO<sub>2</sub> jusqu'au jour du TGT (4 jours pour 50.000 cellules par puits et 7 jours pour 20.000 cellules par puits). Le jour du test, une vérification de la confluence cellulaire (> 80%) au fond des puits est faite au microscope. Le milieu de culture est retiré doucement des puits. Les cellules sont lavées deux fois avec 100µL de PBS.

## 1.3. Cellules en suspension

Les cellules en suspension sont préparées deux heures avant le début du TGT et mises dans la glace en attendant. Après analyse par l'hémocytomètre une dilution était nécessaire afin d'obtenir 1000 ou 3000 cellules par microlitre. 5µL de l'une de ces solutions, soit 5000 ou 15000 cellules, sont ensuite ajoutés au mélange réactif/plasma avant la mise en incubation dans l'automate.



## 2. Cytométrie en flux

L'expression membranaire en TM et en EPCR des lignées cellulaires est évaluée par une analyse de cytométrie en flux. Les cellules sont lavées deux fois avec 500µL de tampon phosphate salin (PBS) après le compte cellulaire et l'analyse de viabilité par l'hémocytomètre. Puis elles sont mises en incubation pendant 20 minutes à température ambiante avec 2.5 µL pour un million de cellules de allophycocianine (APC)-clone RCR252, un anticorps monoclonal de rat anti-EPCR humain (CD201) (BD Pharminogen™) et de Brilliant™ Blue 515 (BB515) -clone 1A4, un anticorps monoclonal de souris anti-TM humaine (CD141) (BD Horizon™). Les cellules sont ensuite lavées deux fois en PBS avec 1% de sérum albumine bovine avant détection du signal de fluorescence par un cytomètre en flux (BD LSRFortessa™ X-20, BD Biosciences®). Un contrôle négatif est réalisé pour chaque manipulation qui correspond à une analyse des cellules par le cytomètre sans incubation avec les anticorps. L'expression membranaire en TM et en EPCR des lignées endothéliales est comparée aux cellules HEK293 qui n'expriment aucun de ces deux récepteurs.

### **3. Echantillons de plasma**

Les échantillons de plasma utilisés dans l'étude ont été obtenus par ponction veineuse périphérique à partir de volontaires sains sans antécédents d'hémopathies, d'hépatopathies ou de troubles connus de l'hémostase. Ces plasmas au nombre de 5 ont permis de constituer un pool. Ils ont été prélevés sur des tubes contenant du citrate : 0.105M (BD Vacutainer®, 1 volume de citrate et 9 volumes de sang, volume total 5mL). Les tubes ont été centrifugés deux fois à 2500g pendant 15 minutes avec une décantation intermédiaire du plasma. Un second pool de plasmas normaux, commercial celui-ci, a également été utilisé (CRYOcheck™ Pooled Normal Plasma, PrecisionBiologic®). Enfin, les échantillons de plasma de patients atteints de cirrhose sont issus de fonds de tubes récupérés au laboratoire d'hématologie du CHU de Clermont-Ferrand.

## 4. Test de génération de thrombine

Le TGT selon la méthode CAT est réalisé sur des plaques de 96 puits. L'hémostase secondaire est activée par les réactifs avec des concentrations différentes de PL et de FT : le PRP Reagent® (Stago®) ne comprenant pas de PL et une concentration intermédiaire en FT ; le PPP Low Reagent® (Stago®) avec des PL et une faible concentration en FT et le PPP Reagent® (Stago®) avec des PL et une concentration intermédiaire en FT.

Pour activer la voie de la PC, la TM issue de poumon de lapin à la concentration finale de 3.3 nM est ajoutée dans le PPP Reagent® permettant d'inhiber 50% de l'ETP (manipulations préliminaires). Dans chaque puits, 80µL de plasma sont ajoutés à 20µL de réactif. La plaque est ensuite incubée à 37°C pendant 10 minutes dans l'automate puis la mesure est initiée par l'ajout de Ca<sup>2+</sup> et du substrat fluorogénique (Fluca Kit®, Stago®). Le signal de fluorescence est mesuré par un fluoromètre (Fluoroskan Ascent Fluorometer) et est converti en quantité de thrombine générée par un logiciel (Thrombinoscope software) pendant 60 minutes. Chaque analyse est réalisée en doublons, une différence inférieure à 10% pour l'ETP a permis de valider chaque test. Pour chaque condition, deux puits sont analysés avec un calibrant (Calibrator®, Stago®) pour correction du signal détecté. L'ETP, correspondant à la quantité totale de thrombine générée durant le test, est le principal paramètre d'intérêt pour l'interprétation des résultats.

## 5. Statistiques

Les analyses statistiques ont été faites sur le site « biostaTGV » (72) et sur le logiciel Microsoft Excel® (version 2017). Les tests statistiques étaient bilatéraux avec un risque de premier ordre  $\alpha = 0.05$ . Les données continues sont présentées sous forme de moyenne (écart-type). Les données indépendantes ont été comparées grâce au test de Student pour données appariées ou non.

## **RESULTATS**

# 1. Performances analytiques du TGT en présence de cellules

La répétabilité de chaque expérimentation de TGT est assurée grâce à la mesure en doublons. L'ensemble des résultats montre une variation de l'ETP inférieure à 10%. L'analyse de la reproductibilité a été réalisée sur le pool de plasmas normaux maison sur tous les paramètres du TGT dans les trois configurations : en l'absence de cellules, en présence de cellules adhérentes ou en présence de 5000 cellules en suspension. En l'absence de cellules, les coefficients de variation de l'ETP, la hauteur du pic et du temps au pic sont respectivement de 7.9%, 4.3% et 9.2%. On observe des performances similaires lorsque la technique est adaptée : 6%, 7% et 5% en présence de cellules adhérentes et 2.7%, 4.1% et 7% en présence de cellules en suspension. (Tableau V)

**Tableau V. Analyse de reproductibilité**

	Sans cellules (n=7)	Cellules adhérentes (n=9)	Cellules en suspension (n=7)
Temps de Latence	14,6%	7,4%	11,8%
ETP	7,9%	6,1%	2,7%
Hauteur du Pic	4,3%	7,0%	4,1%
Temps au Pic	9,2%	5,0%	7,0%
Index de Vitesse	10,8%	10,5%	10,6%
StartTail	5,2%	4,7%	2,8%

Coefficient de variation exprimé en %

## 2. Expression membranaire cellulaire d'EPCR et de TM

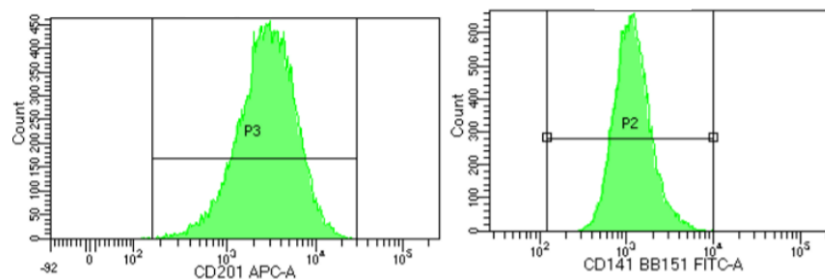
La moyenne d'intensité de fluorescence est de 3282 pour l'EPCR et 1300 pour la TM sur les cellules HEK 293 (Tableau VI ; Figure 8), et de 40825 pour l'EPCR et 48482 pour la TM sur les cellules endothéliales d'origine aortique (Tableau VI ; Figure 8). Ces données permettent de confirmer l'absence d'expression en TM et EPCR des cellules HEK 293 utilisées.

**Tableau VI. Expression membranaire en TM et en EPCR**

	Cellules HEK 293	Cellules endothéliales aortiques
TM (CD141)	1300	40825
EPCR (CD201)	3282	48482

Moyenne d'intensité de fluorescence

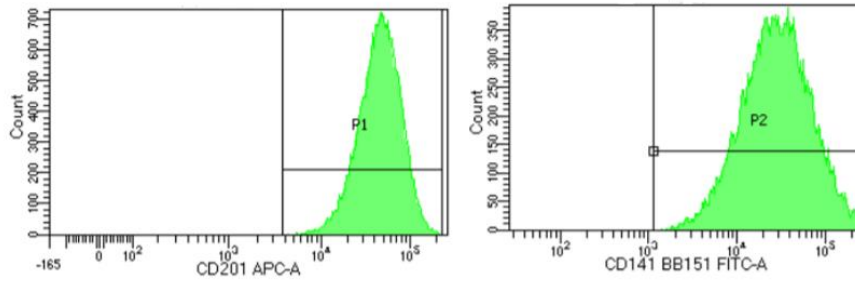
EPCR : Récepteur endothélial à la protéine C ; TM : Thrombomoduline



**Figure 8. Expression membranaire en TM et en EPCR des cellules HEK293**

CD201 : Récepteur endothélial à la protéine C ; CD141 : Thrombomoduline

En abscisse est représenté l'intensité de fluorescence en échelle logarithmique et en ordonnée le nombre de cellules



**Figure 9. Expression Membranaire en TM et en EPCR des cellules endothéliales aortiques**

CD201 : Récepteur endothélial à la protéine C ; CD141 : Thrombomoduline  
 En abscisse est représenté l'intensité de fluorescence en échelle logarithmique et en ordonnée le nombre de cellules



### 3. Impact des cellules sur le TGT

L'impact des cellules en suspension et des cellules adhérentes sur la génération de thrombine initiée par une concentration intermédiaire de FT a été évalué grâce à deux pools de plasmas (pool de plasma normaux maison et pool commercial).

#### 3.1. Impact des cellules adhérentes

Nous avons comparé le TGT réalisé en présence de cellules adhérentes par rapport au TGT réalisé sans cellules. La génération de thrombine du pool maison est diminuée par la présence des cellules adhérentes avec une diminution significative du pic de thrombine (nM)  $253 \pm 36$  vs  $473 \pm 21$  ( $p < 0.0001$ ) et une diminution significative de l'ETP (nM.min)  $1569 \pm 92$  vs  $1752 \pm 139$  ( $p = 0.01$ ). La génération de thrombine du pool commercial est également diminuée avec un pic diminué significativement  $183 \pm 19$  vs  $351 \pm 29$  ( $p < 0.001$ ) et une diminution non significative de l'ETP  $1164 \pm 94$  vs  $1273 \pm 154$  ( $p = 0.27$ ). Le temps au pic (min) est significativement augmenté pour les deux pools à  $6.3 \pm 0.6$  vs  $4.1 \pm 0.4$  ( $p < 0.0001$ ) et  $6.0 \pm 0.5$  vs  $4.4 \pm 0.4$  ( $p < 0.001$ ). (Tableau VII et Tableau VIII) Le tracé du thrombinogramme est représenté pour chaque condition en Figure 10.

**Tableau VII. Impact des cellules adhérentes sur le TGT**

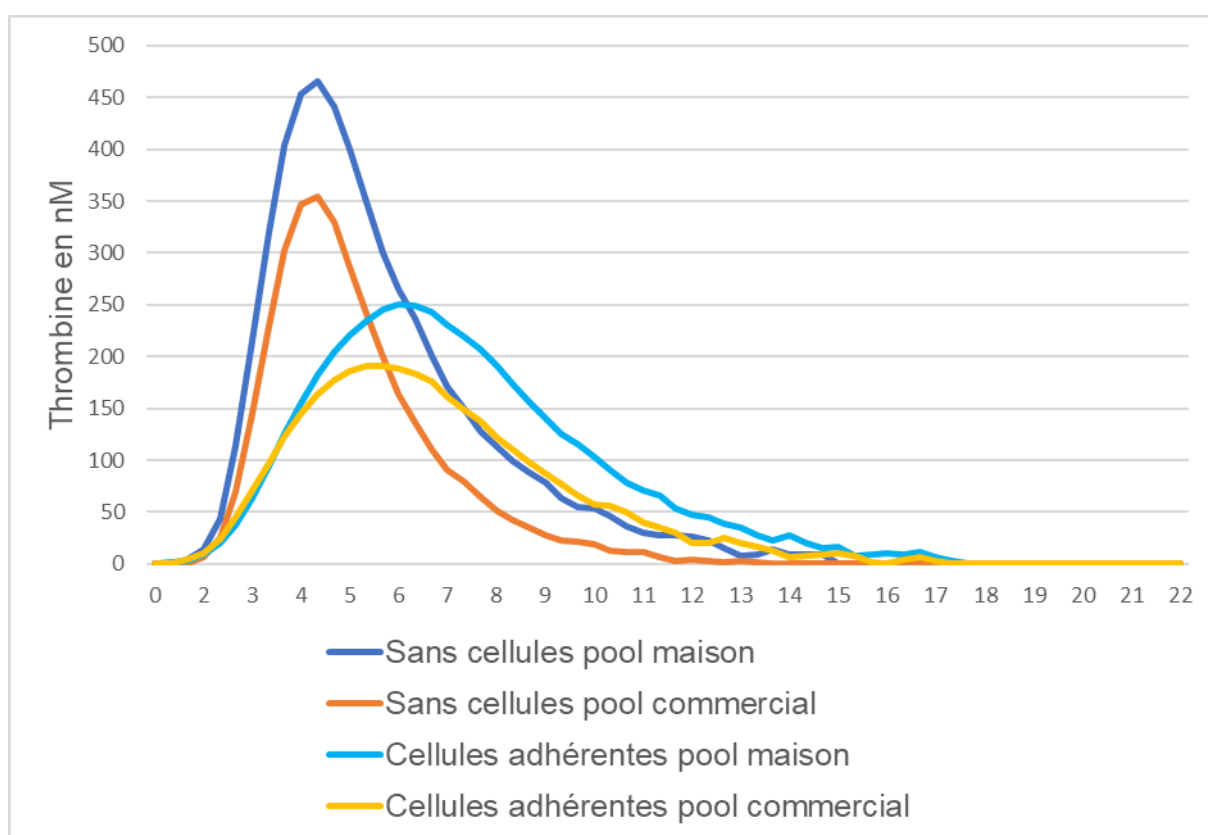
	Sans Cellules (n=7)	Cellules adhérentes (n=10)	p-value
Temps de Latence (min)	2,3 (0,3)	2,7 (0,2)	0.02
ETP (nM.min)	1752 (139)	1569 (92)	0.01
Hauteur du Pic (nM)	473 (21)	253 (36)	<0,0001
Temps au Pic (min)	4,1 (0,4)	6,3 (0,6)	<0,0001
Index de vélocité (nM/min)	264 (29)	73 (24)	<0,0001
Start Tail (min)	16,5 (0,9)	20,5 (1,2)	<0,0001

Plasma utilisé : pool maison ; Résultats exprimés en moyenne (écart-type)

**Tableau VIII. Impact des cellules adhérentes sur le TGT**

	Sans Cellules (n=4)	Cellules adhérentes (n=7)	p-value
Temps de Latence (min)	2,4 (0,4)	2,4 (0,3)	0.89
ETP (nM.min)	1273 (154)	1164 (94)	0.27
Hauteur du Pic (nM)	351 (29)	183 (19)	<0,001
Temps au Pic (min)	4,4 (0,4)	6,0 (0,5)	<0,001
Index de vélocité (nM/min)	172 (14)	52 (11)	<0,0001
StartTail (min)	15,6 (0,8)	20,2 (1,6)	<0,001

Plasma utilisé : pool commercial ; Résultats exprimés en moyenne (écart-type)



**Figure 10. Impact des cellules adhérentes sur le thrombinogramme**

### 3.2. Impact des cellules en suspension

Lorsque le TGT est réalisé en présence de cellules en suspension (5000 cellules), il n'y a pas de différences significatives sur les paramètres du thrombinogramme en comparaison avec le TGT réalisé sans cellules sur les deux pools de plasmas. L'ETP (nM.min) est peu modifié à  $1877 \pm 50$  vs  $1752 \pm 139$  ( $p=0.06$ ) pour le pool maison et à  $1318 \pm 91$  vs  $1273 \pm 154$  ( $p=0.65$ ) avec le pool commercial. Seule la hauteur du pic (nM) en présence de 5000 cellules en suspension est discrètement augmentée à  $498 \pm 21$  vs  $473 \pm 21$  ( $p=0.04$ ) sur le pool maison. (Tableau IX et Tableau X) Le tracé du thrombinogramme pour chaque condition est représenté en Figure 11.

**Tableau IX. Impact des cellules en suspension sur le TGT**

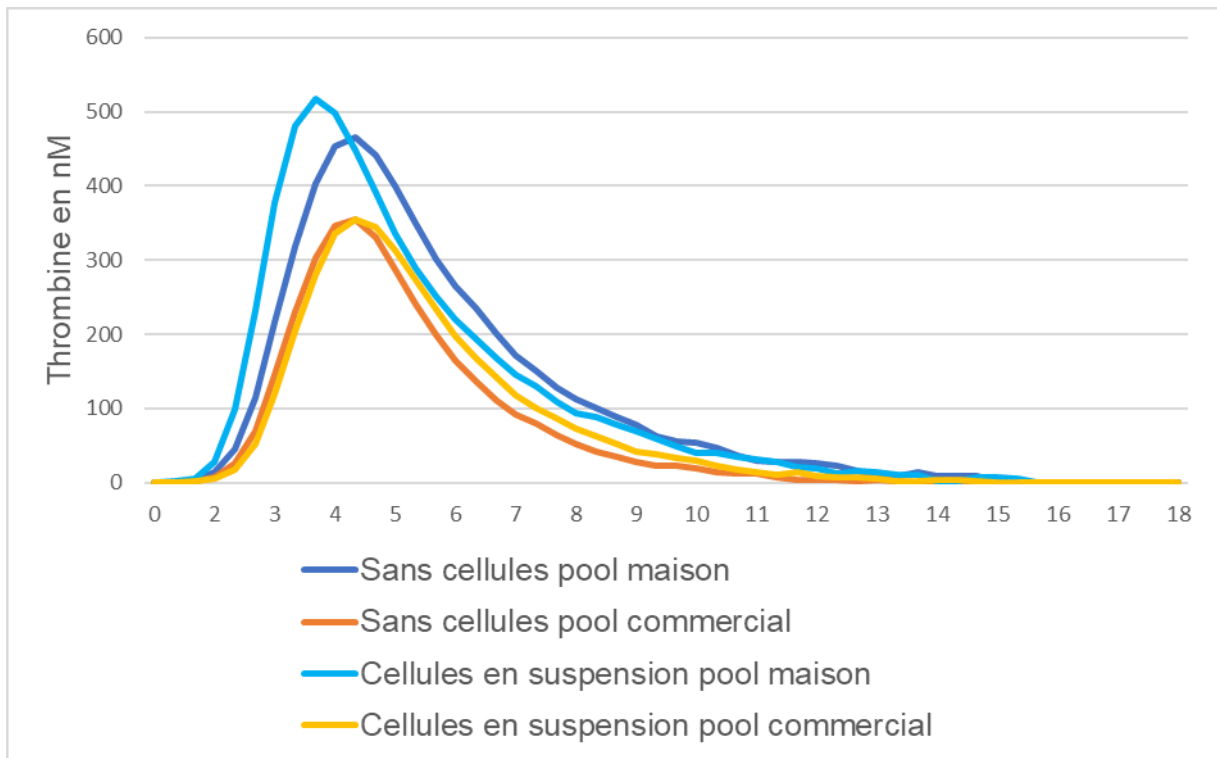
	Sans Cellules (n=7)	Cellules en suspension (n=7)	p-value
Temps de Latence (min)	2,3 (0,3)	2,2 (0,3)	0.49
ETP (nM.min)	1752 (139)	1877 (50)	0.06
Hauteur du Pic (nM)	473 (21)	498 (21)	0.04
Temps au Pic (min)	4,1 (0,4)	4,1 (0,3)	0.63
Index de vélocité (nM/min)	264 (29)	274 (29)	0.53
StartTail (min)	16,5 (0,9)	16,9 (0,5)	0.39

Plasma utilisé : pool maison ; Résultats exprimés en moyenne (écart-type)

**Tableau X. Impact des cellules en suspension sur le TGT**

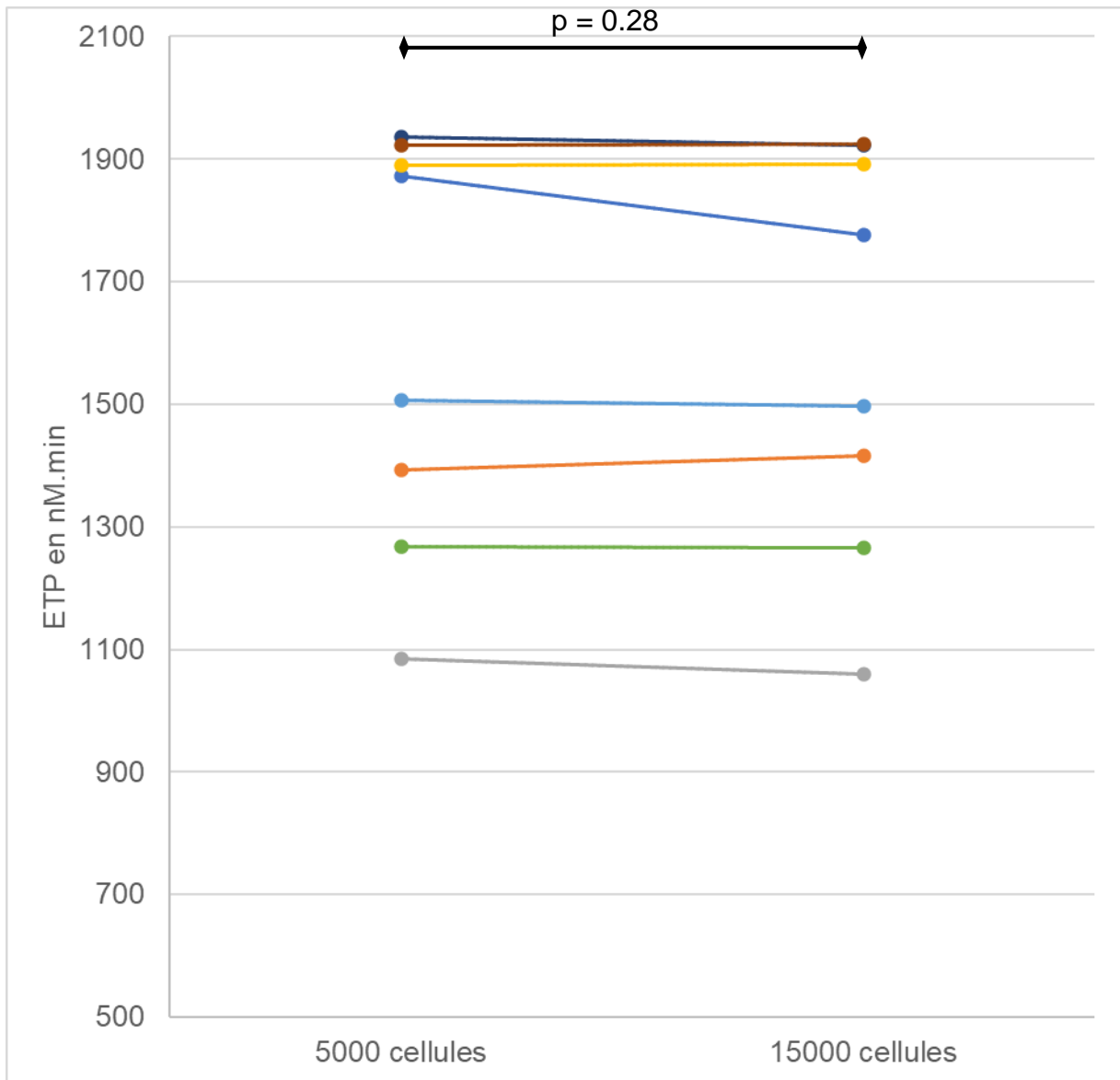
	Sans Cellules (n=4)	Cellules en suspension (n=3)	p-value
Temps de Latence (min)	2,4 (0,4)	2,4 (0,2)	0.80
ETP (nM.min)	1273 (154)	1318 (91)	0.65
Hauteur du Pic (nM)	351 (29)	355 (8)	0.79
Temps au Pic (min)	4,4 (0,4)	4,4 (0,1)	0.94
Index de vélocité (nM/min)	172 (14)	179 (13)	0.51
StartTail (min)	15,6 (0,8)	15,8 (0,3)	0.63

Plasma utilisé : pool commercial ; Résultats exprimés en moyenne (écart-type)



**Figure 11. Impact des cellules en suspension sur le thrombinogramme**

Pour explorer ces faibles modifications de la présence de 5000 cellules en suspension sur le TGT, une concentration avec 15000 cellules a été testée pour s'assurer que ces résultats n'étaient pas liés à une concentration trop faible en cellules. Il n'a pas été retrouvé de différences entre l'ajout de 5000 cellules ou de 15000 cellules en suspension. (Figure 12)



**Figure 12. Impact de la concentration en cellules en suspension sur l'ETP**

## 4. Impact de la TM sur le TGT en présence de cellules

Sur cellules adhérentes, l'ajout de TM engendre pour le pool maison une diminution significative de l'ETP (nM.min) et du pic (nM) : l'ETP diminue de  $1600 \pm 68$  à  $545 \pm 95$  ( $p < 0.0001$ ) et le pic de  $245 \pm 19$  à  $128 \pm 21$  ( $p < 0.0001$ ). Sur les cellules en suspension l'ajout de TM entraîne une diminution significative de l'ETP passant de  $1881 \pm 53$  sans TM à  $1710 \pm 81$  avec TM ( $p < 0.01$ ). Le pic n'est pas modifié à  $491 \pm 30$  vs  $498 \pm 23$  ( $p = 0.66$ ). (Tableau XI et Tableau XII) Pour objectiver l'impact de la TM sur le TGT en présence de cellules, le calcul du pourcentage d'inhibition a été réalisé. Cette inhibition est significativement augmentée en présence de cellules adhérentes à  $65\% \pm 4\%$  en comparaison avec les cellules en suspension à  $9\% \pm 5\%$  ( $p < 0.0001$ ). (Figure 13)

**Tableau XI. Impact de la TM sur le TGT en présence de cellules adhérentes**

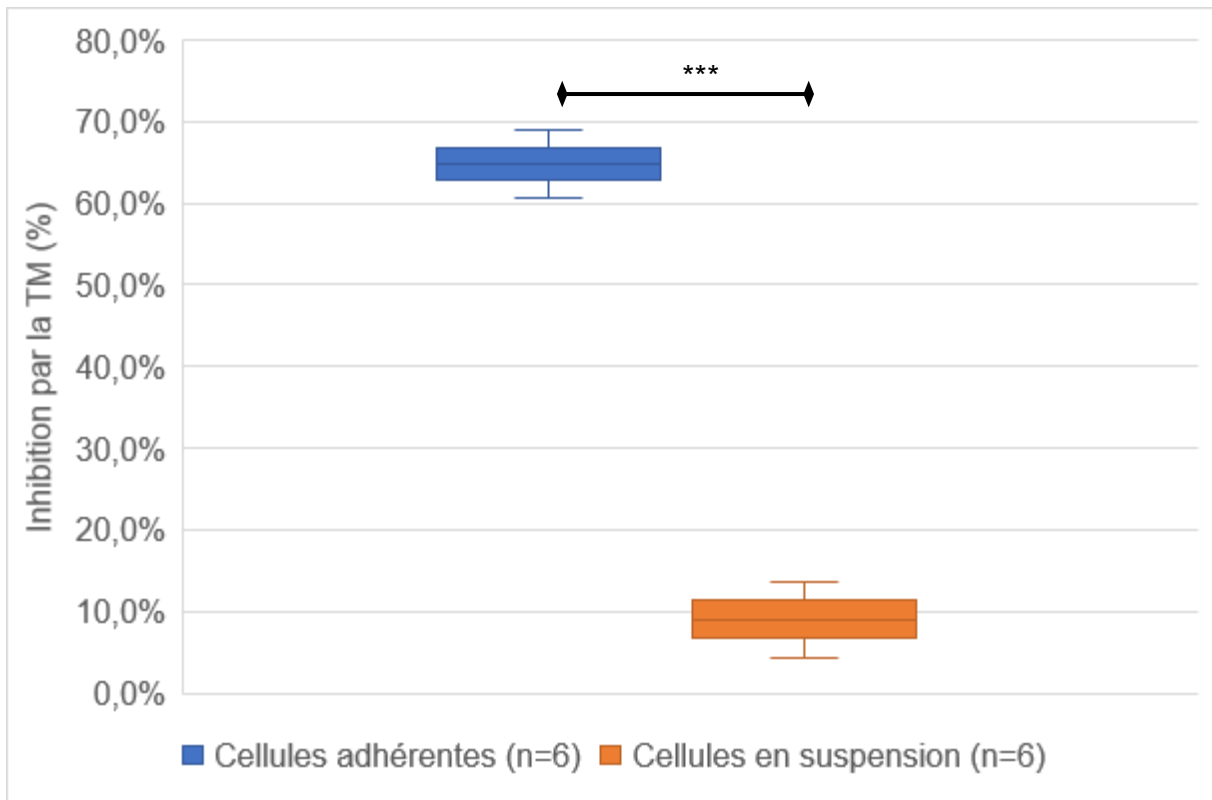
	TGT sans TM (n=7)	TGT avec TM (n=7)	p-value
Temps de Latence (min)	2,9 (0,2)	2,9 (0,3)	0,6
ETP (nM.min)	1600 (68)	545 (95)	<0,0001
Hauteur du Pic (nM)	245 (19)	128 (21)	<0,0001
Temps au Pic (min)	6,6 (0,3)	5,4 (0,3)	<0,0001
Index de vélocité (nM/min)	67 (8)	51 (8)	<0,01
StartTail (min)	21,1 (0,9)	16,4 (0,4)	<0,0001

Plasma utilisé : pool maison ; Résultats exprimés en moyenne (écart-type)

**Tableau XII. Impact de la TM sur le TGT en présence de cellules en suspension**

	TGT sans TM (n=6)	TGT avec TM (n=6)	p-value
Temps de Latence (min)	2,2 (0,3)	2,4 (0,3)	0,19
ETP (nM.min)	1881 (53)	1710 (81)	<0,01
Hauteur du Pic (nM)	498 (23)	491 (30)	0,66
Temps au Pic (min)	4,1 (0,3)	4,1 (0,3)	1
Index de vélocité (nM/min)	270 (29)	301 (29)	0,09
StartTail (min)	16,9 (0,5)	16,2 (0,2)	0,03

Plasma utilisé : pool maison ; Résultats exprimés en moyenne (écart-type)



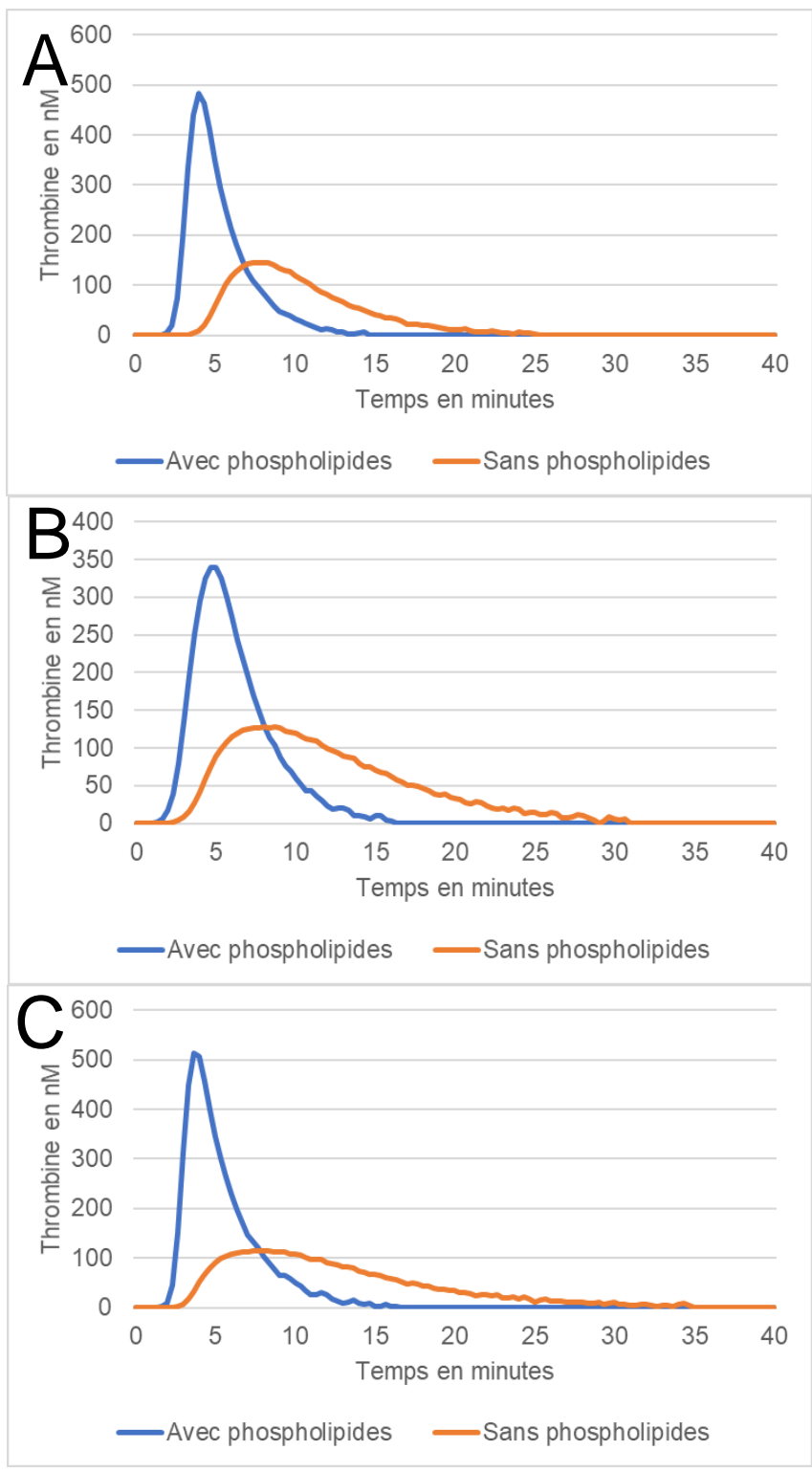
**Figure 13. Impact de la TM sur l'inhibition de la génération de thrombine en présence de cellules**

## 5. Impact des PL membranaires sur le TGT

En l'absence de cellules, l'utilisation d'un réactif ne contenant pas de PL entraîne un étalement du pic de thrombine (allongement des temps de latence et temps au pic, ETP peu modifié et un pic diminué) sans modification de l'ETP (nM.min) qui passe de  $1350 \pm 243$  à  $1381 \pm 234$  ( $p=0,43$ ) mais une diminution importante du pic (nM) qui passe de  $397 \pm 79$  à  $133 \pm 24$  ( $p=0,01$ ) en comparaison avec un réactif contenant des PL. (Figure 14A)

On observe les mêmes modifications lorsqu'un réactif ne contenant pas de PL a été utilisé en présence des deux configurations cellulaires.(Figure 14B et 14C) Ces résultats suggèrent que les PL membranaires des cellules HEK293 ne sont pas procoagulants dans notre adaptation du TGT.

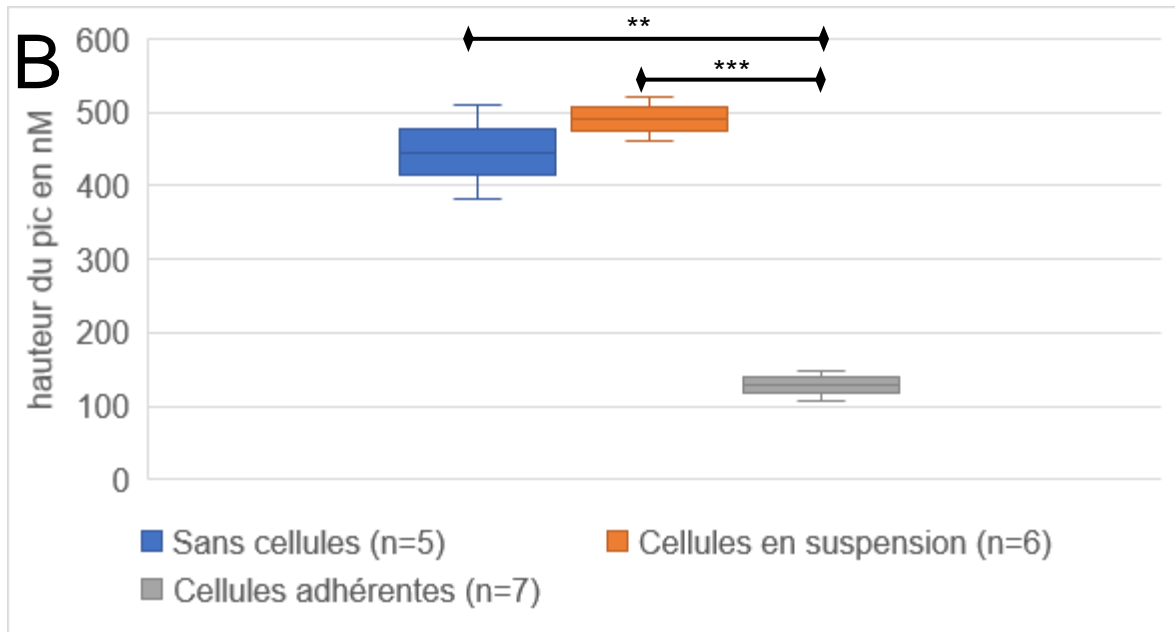
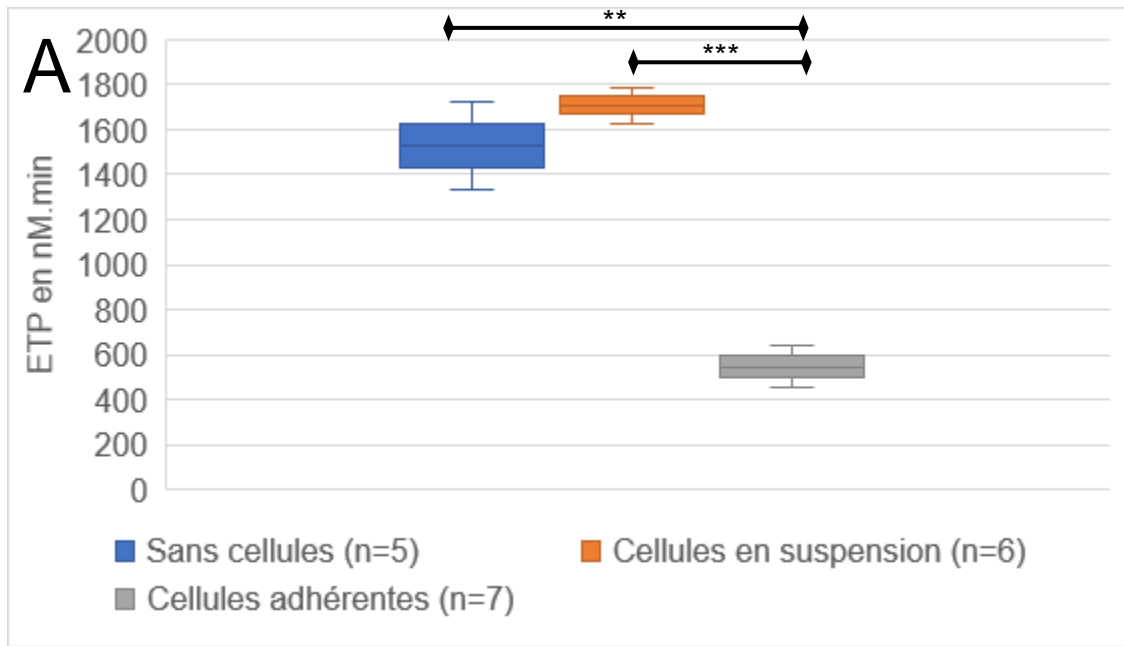




**Figure 14. Impact sur le TGT de l'absence de PL dans le réactif**  
 Plasma utilisé : pool maison,  
 A : TGT sans cellules ; B : TGT en présence de cellules adhérentes ;  
 C : TGT en présence de cellules en suspension

## 6. Impact des cellules sur le TGT avec TM

En présence de TM, la génération de thrombine du pool maison est impactée de manière différente par la configuration cellulaire. Comparé à la méthode CAT classique, l'ajout de cellules adhérentes entraîne une diminution de l'ETP (nM.min) qui passe de  $1528 \pm 198$  à  $545 \pm 95$  ( $p < 0.001$ ). Le pic (nM) diminue également de  $446 \pm 63$  à  $128 \pm 21$  ( $p < 0.001$ ). En revanche en présence de cellules en suspension, on n'observe pas de différence significative avec le TGT réalisé sans cellules. (Figure 15 ; Tableau XIII).

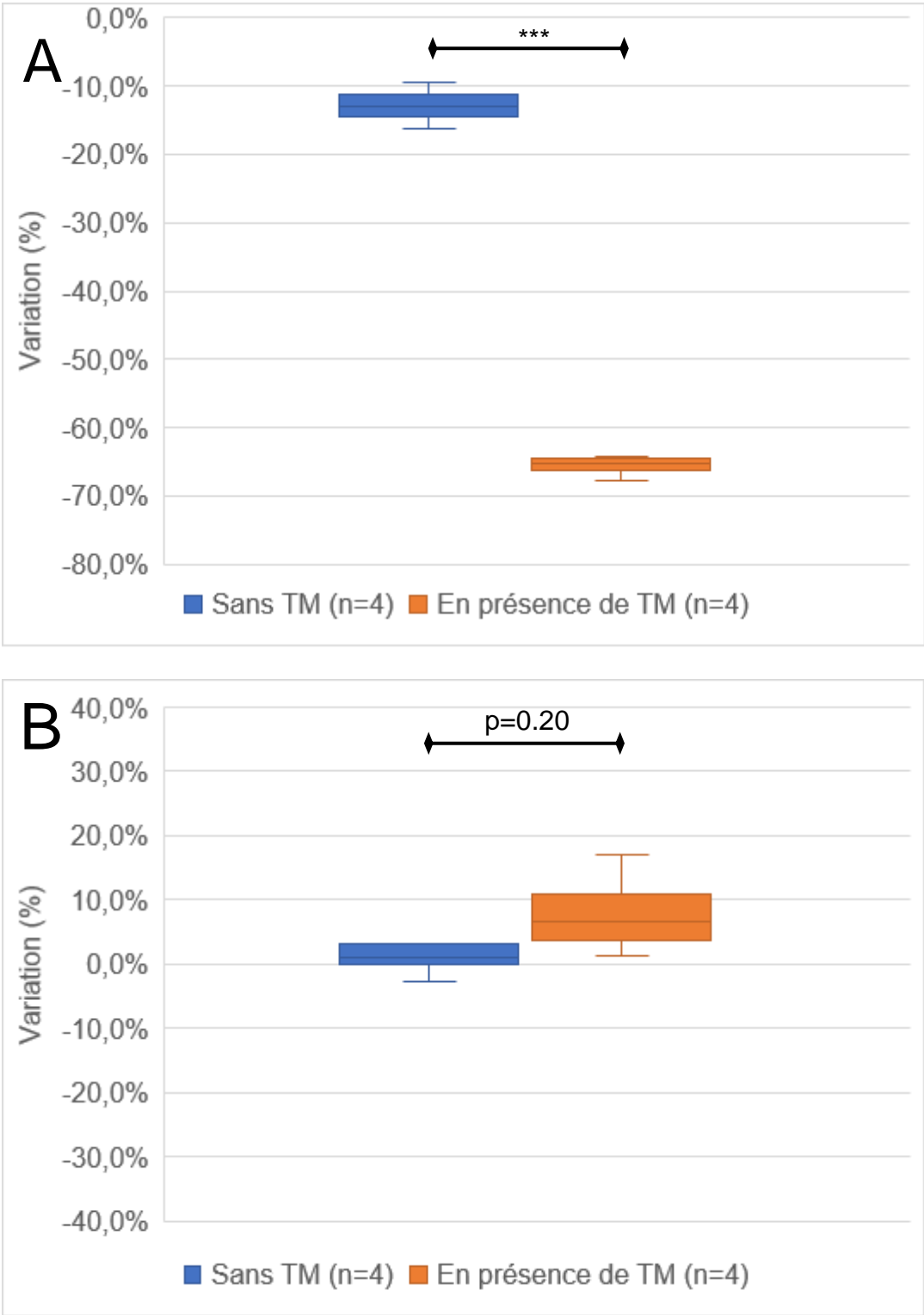


**Figure 15. Impact des cellules sur la génération de thrombine en présence de TM**

A : ETP (nM.min)  
B : Hauteur du pic (nM)

Lorsque le TGT en présence de cellule adhérentes est comparé à la méthode CAT classique, l'ajout de TM entraîne une inhibition (%) sur l'ETP significativement plus importante passant de  $13 \pm 3$  à  $66 \pm 2$  ( $p < 0,0001$ ). (Figure 16A) En revanche, l'absence de modification significative retrouvée par la présence de cellules en suspension sans TM  $2\% \pm 5\%$ , n'est pas modifiée par l'ajout de TM  $8\% \pm 7\%$

(p=0,20). (Figure 16B) Le thrombinogramme de chaque configuration est représenté en Figure 17.



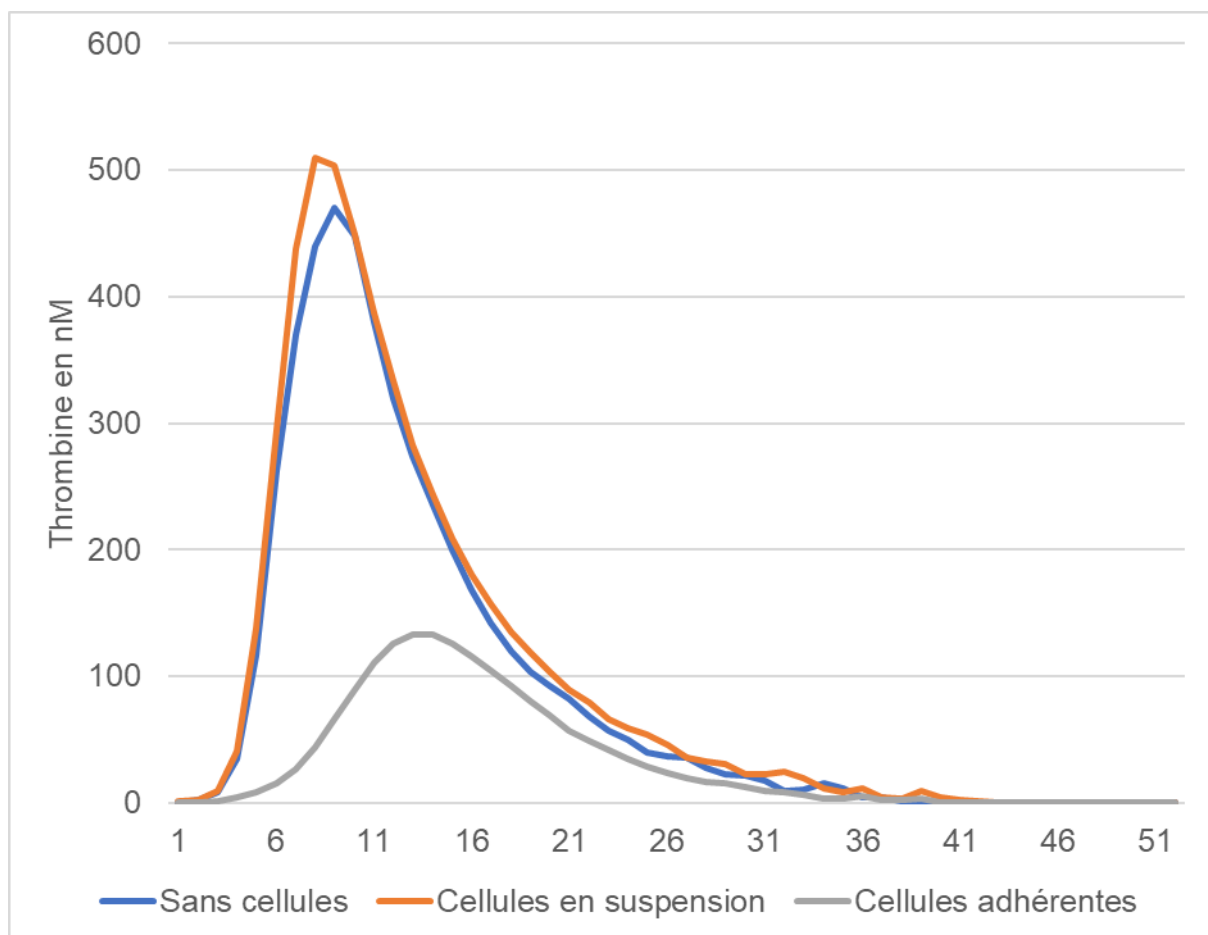
**Figure 16. Impact de la TM sur l'ETP en présence de cellules**

A : Cellules adhérentes  
B : Cellules en suspension

**Tableau XIII. Impact des cellules sur le TGT avec ajout de TM**

	Sans cellules (n=4)	Cellules en suspension (n=6)	p-value	Cellules adhérentes (n=7)	p-value
Temps de Latence (min)	2,5 (0,3)	2,4 (0,3)	0,58	2,9 (0,3)	0,06
ETP (nM.min)	1528 (198)	1710 (81)	0,11	545 (95)	<0,001
Hauteur du Pic (nM)	446 (63)	491 (30)	0,19	128 (21)	<0,001
Temps au Pic (min)	4,3 (0,4)	4,1 (0,3)	0,25	5,4 (0,3)	<0,01
Index de vélocité (nM/min)	251 (51)	301 (29)	0,1	51 (8)	<0,001
StartTail (min)	16,0 (0,4)	16,2 (0,2)	0,25	16,4 (0,4)	0,12

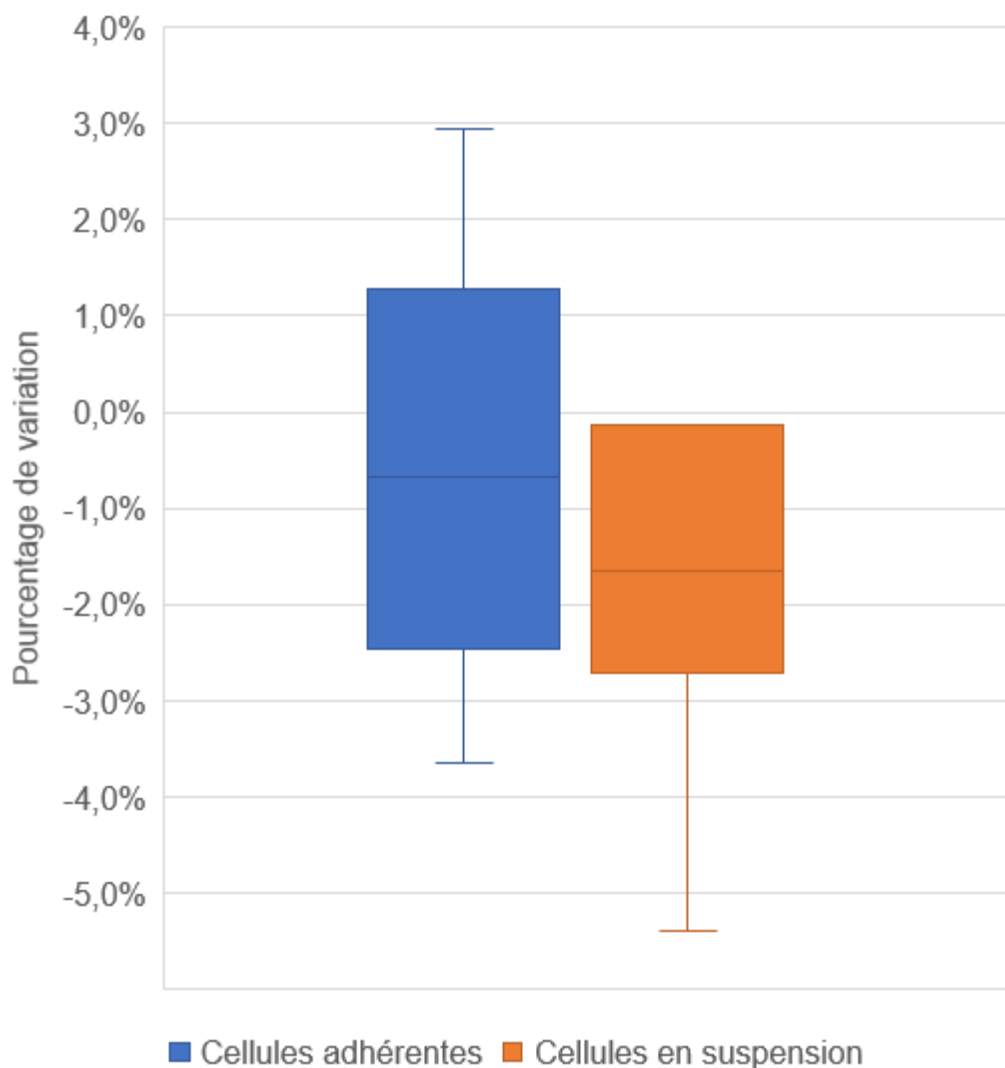
Plasma utilisé : pool maison ; Résultats exprimés en moyenne (écart-type)



**Figure 17. Impact des cellules sur le thrombinogramme avec ajout de TM**

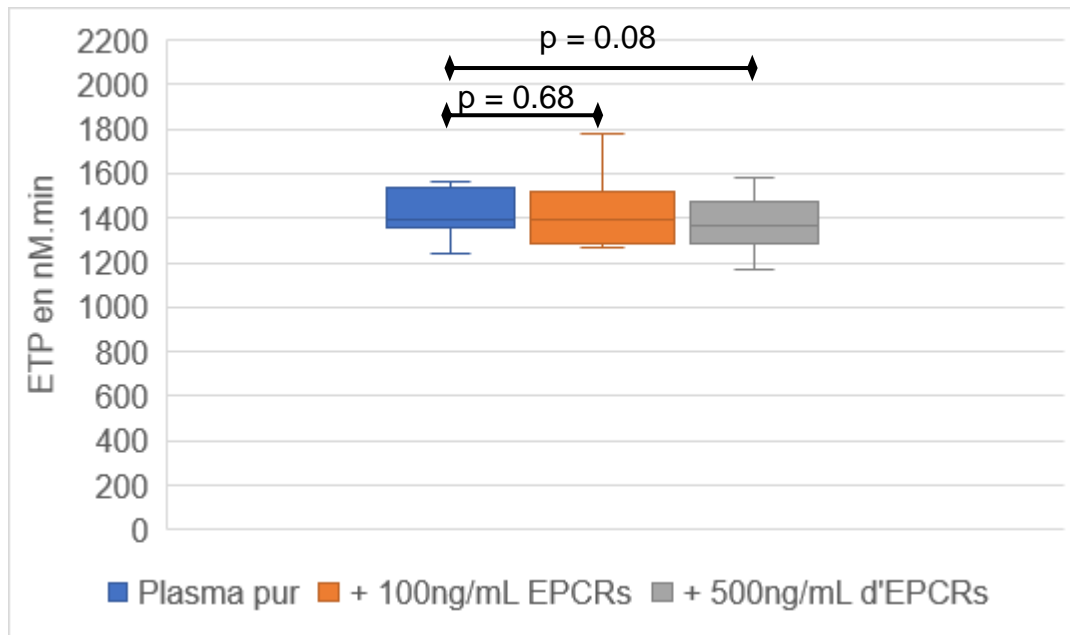
## 7. Impact de l'EPCRs sur le TGT

L'EPCRs par sa liaison avec la PC et la PCa inhibe l'activation de la PC et inhibe l'action de la PCa.(61) Cette action pourrait donc être en partie responsable de la résistance à la thrombomoduline retrouvée chez les patients atteints de cirrhose. En présence de cellules (en suspension ou adhérentes), il n'a pas été retrouvé de variation significative avec l'ajout de 1000ng/mL (concentration finale) d'EPCRs. La moyenne du pourcentage de variation est de  $-1\% \pm 3\%$  en présence de cellules adhérentes et de  $-1\% \pm 4\%$  en présence de cellules en suspension. (Figure 18)



**Figure 18. Impact de l'EPCRs sur le TGT en présence de cellules**  
 Concentration finale en EPCRs : 1000ng/mL

Ces résultats concordent avec des manipulations préliminaires réalisées sur plasmas témoins en l'absence de cellules où aucun impact n'avait été retrouvé avec la méthode CAT (ThrombinoScope BV, Stago®). En effet l'ETP (nM.min) moyen était à  $1408 \pm 312$  sans ajout d'EPCRs et aucune différence significative n'avait été retrouvée avec l'ajout de 100ng/mL ou de 500ng/mL d'EPCRs respectivement à  $1391 \pm 296$  ( $p=0,68$ ) et  $1349 \pm 286$  ( $p=0,08$ ). (Figure 19)

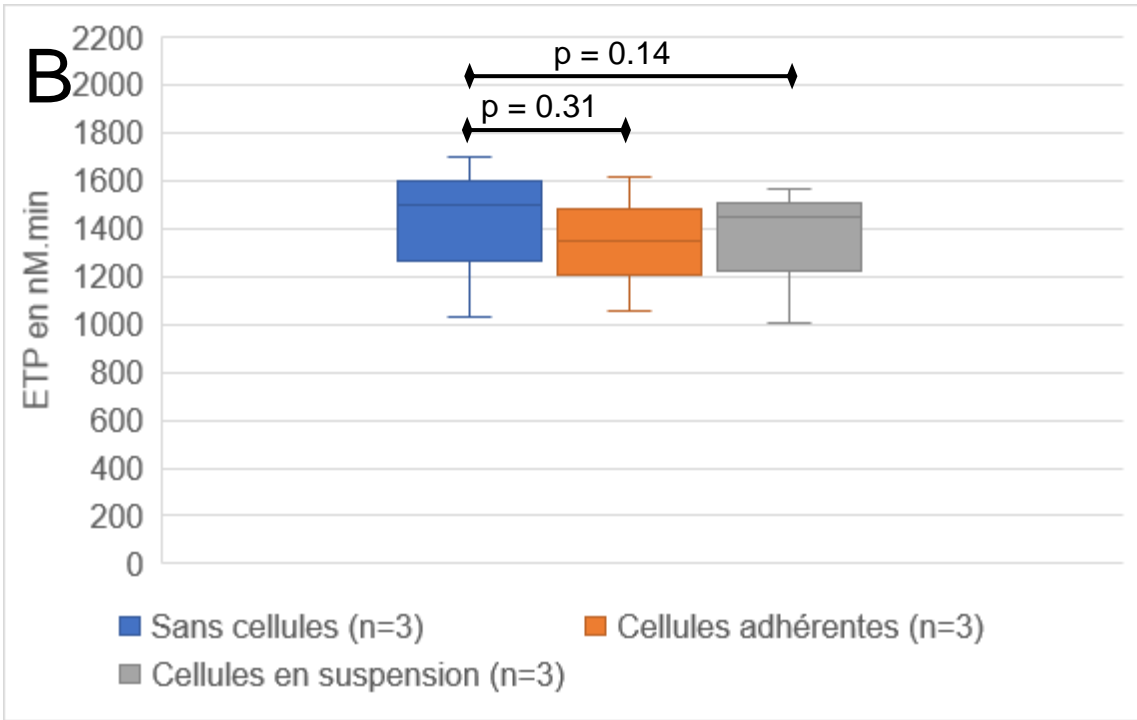
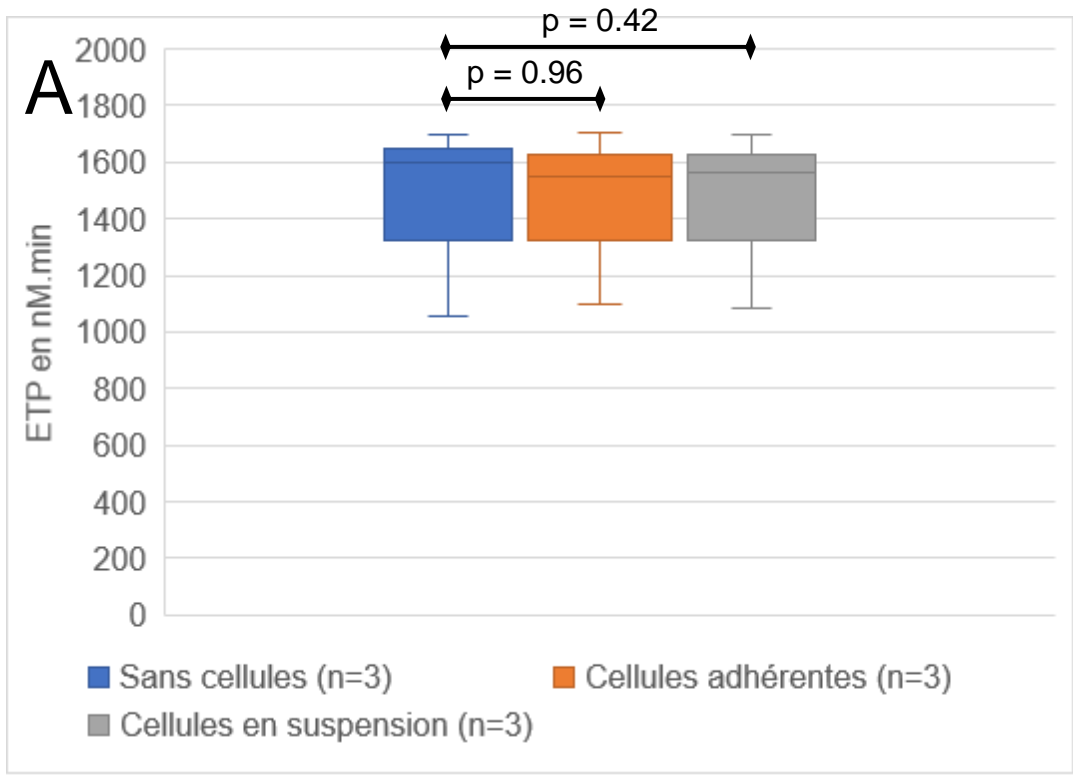


**Figure 19. Impact de l'EPCRs sur l'ETP en l'absence de cellules**  
 Concentration finale en EPCRs 100ng/mL ou 500ng/mL



## 8. TGT de patients atteints de cirrhose

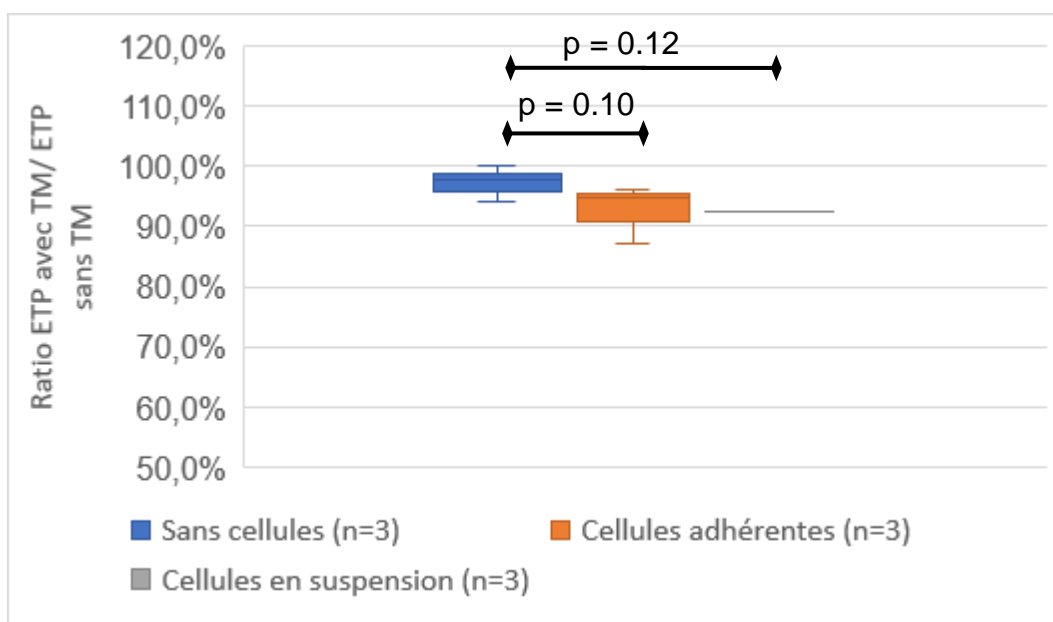
La diminution de la sensibilité à la TM observée sur les plasmas de patients atteints de cirrhose est retrouvée en présence de cellules. L'ETP moyen (nM.min) sans cellules de  $1449 \pm 343$  reste stable à  $1451 \pm 313$  ( $p=0,96$ ) en présence de cellules adhérentes et à  $1447 \pm 320$  ( $p=0,42$ ) en présence de cellules en suspension. En présence de TM, l'ETP (nM.min) reste stable également passant de à  $1410 \pm 342$  sans cellules à  $1341 \pm 279$  ( $p=0,31$ ) en présence de cellules adhérentes et  $1339 \pm 296$  ( $p=0,14$ ) en présence de cellules en suspension. (Figure 20)



**Figure 20. Impact des cellules sur la génération de thrombine chez le patient atteint de cirrhose sans ajout de TM**

A : Sans ajout de TM  
B : En présence de TM

La résistance à la TM peut être évaluée par le calcul du ratio « ETP avec TM/ ETP sans TM ». Il n'y a pas de modification significative entre le ratio moyen en l'absence de cellules :  $97\% \pm 3\%$  et le ratio en présence de cellules adhérentes :  $93\% \pm 5\%$  ( $p=0,10$ ) ou en présence de cellules en suspension :  $93\% \pm 0\%$  ( $p=0,12$ ). (Figure 21)



**Figure 21. Impact des cellules sur le Ratio ETP avec TM/ ETP sans TM (%)**

## **DISCUSSION**

La mise en place d'un TGT en présence de cellules a nécessité plusieurs expérimentations afin de définir une méthodologie performante en vue de l'étude sur le rôle de l'expression cellulaire endothéliale sur la coagulation du patient atteint de cirrhose. L'approche initiale a été de déterminer l'influence propre de la matrice cellulaire et ce indépendamment de marqueurs de surface tels que ceux possédés par les cellules endothéliales. En ce sens, des cellules HEK293 ont été utilisées car elles n'expriment pas de récepteurs membranaires impliqués dans la coagulation (TM, EPCR, FT). (66,67) A notre connaissance, il n'y a pas d'article qui compare le TGT réalisé sans cellules au TGT en présence de ces cellules HEK293. Notre analyse de performance retrouve des coefficients de variation comparables entre les trois configurations : sans cellules, cellules HEK293 en suspension et cellules HEK 293 adhérentes. Ces performances sont également comparables au TGT selon la méthode CAT classique déjà décrites dans la littérature. (73,74)

Nos résultats montrent que l'apport de cellules en suspension n'entraîne pas de modification notable de la génération de thrombine, et cela jusqu'à 3000 cellules/ $\mu$ L. Cette configuration ne semble pas provoquer d'interférences avec le TGT. Des manipulations avec un réactif ne contenant pas de PL (PRP Reagent®, Stago®) ont été réalisées pour analyser l'impact des PL membranaires de nos cellules sur le TGT. En l'absence de cellules l'utilisation de ce réactif entraîne un étalement du pic de thrombine avec un ETP conservé et une diminution significative du pic. Ces mêmes modifications sont retrouvées en présence des deux configurations cellulaires. Nous pouvons en déduire que les cellules utilisées n'apportent pas de PL procoagulants.

L'absence de modification par l'apport de 5000 cellules en suspension sur le TGT peut être en lien avec une concentration insuffisante en cellules. Nous avons donc

également testé une concentration supérieure : 15000 cellules, ce qui n'a pas provoqué de modification significative. Un impact des cellules en suspension sur le TGT a déjà été mis en évidence dès 500 cellules (62) ou 1000 cellules (65) pour le FT. (62,65) Pour nos deux marqueurs d'intérêt (TM et EPCR) des concentrations supérieures pourraient être nécessaires pour étudier leur impact. Cependant techniquement, il ne sera pas possible d'augmenter la concentration cellulaire au-delà de 4000 cellules/ $\mu$ L soit 20000 cellules au total. Ainsi le TGT en présence de cellules en suspension devra être étudié avec des cellules exprimant la TM et l'EPCR afin de confirmer que cette absence d'impact n'est pas en lien avec une concentration insuffisante en cellules.

Le TGT selon la méthode CAT adapté en présence de cellules adhérentes est à l'origine d'une diminution de la génération de thrombine. Cette différence d'impact entre les deux configurations cellulaires aurait pu être expliquée par la présence d'un tapis cellulaire au fond des puits gênant la lecture du signal par l'automate. Cependant les puits calibrants avec et sans cellules adhérentes donnent un signal identique nous permettant d'écarter cette hypothèse. Ce tapis cellulaire peut également interférer avec la génération de thrombine et la formation du caillot entraînant une interférence sur le signal détecté ou une action directe sur la quantité de thrombine générée. Le nombre de cellules peut également être responsable de ces différences puisque 20.000 ou 50.000 cellules étaientensemencées puis remises en culture jusqu'à obtenir une confluence >80%. Ceci peut suggérer une interférence ou un impact par les cellules à des concentrations supérieures à celles utilisées avec les cellules en suspension.

Le TGT selon la méthode CAT adapté avec la présence de cellules en suspension ou adhérentes semble donc être un outil performant pour l'étude de la coagulation.

En revanche, des expérimentations complémentaires seront donc nécessaires pour déterminer quelle configuration sera adaptée à l'étude des plasmas de patients atteints de cirrhose. Concernant cette population, la mesure de la génération de thrombine est classiquement réalisée en présence de TM afin de rendre fonctionnel le système de la PC/ PS. Si l'objectif final est bien d'utiliser la TM présente à la surface cellulaire, nous avons tout de même souhaité, dans ce travail de développement, évaluer l'impact des cellules en présence de TM soluble. Là encore le profil est différent selon la méthodologie employée pour apporter les cellules lorsqu'un pool de plasmas normaux a été analysé. En comparaison avec le TGT sans cellules, la présence de TM diminue fortement la génération de thrombine en présence de cellules adhérentes alors qu'aucune différence n'est observée avec les cellules en suspension. De plus l'ajout de TM diminue de manière importante la génération de thrombine en présence de cellules adhérentes alors que l'impact est plus discret avec les cellules en suspension. Ces données soulignent notamment une sensibilité accrue à l'action anticoagulante de la TM lorsque les cellules adhèrent au fond du puits. Or, il a été démontré que la diminution de la concentration en FT augmentait la sensibilité à la TM.(75) La présence d'une quantité importante de cellules au fond des puits pourrait interférer avec le FT des réactifs et ainsi augmenter la sensibilité du TGT à la présence de la TM et également expliquer les différences observées sans TM (allongement des temps, diminution du pic et de l'ETP).

L'impact de la TM a également été évalué sur des plasmas de patients cirrhotiques. La résistance à la TM déjà décrite en l'absence de cellules (43,49,51,53,56) est retrouvée en présence de cellules adhérentes ou en suspension.

Le rôle de l'EPCR, du fait de son implication dans la coagulation, sa distribution hétérogène à la surface endothéliale et les propriétés de sa forme soluble, mérite d'être exploré. Cela semble particulièrement approprié dans la pathologie cirrhotique où le clivage de la forme membranaire est augmenté, entraînant une élévation des taux de sa forme soluble ce qui n'est pas le cas pour la TM où la forme soluble a été retrouvée à des taux similaires chez les patients cirrhotiques en comparaison à des témoins sains.(60) Cette forme soluble lie la PC et la PCa avec la même affinité que la forme membranaire. La liaison de la PC à l'EPCR soluble diminue sa liaison à la forme membranaire par un phénomène de compétition et provoque une diminution de l'activation de la PC par le complexe thrombomoduline-thrombine.(61) Ainsi une augmentation de la concentration en EPCRs chez les patients atteints de cirrhose peut entraîner une diminution de l'inhibition par la voie de la PC et donc une augmentation de la génération de thrombine. Cependant, la méthode CAT classique sans cellules et celle en présence de cellules n'exprimant ni TM ni EPCR (en suspension ou adhérentes) n'est pas sensible à l'ajout d'EPCR soluble. La présence de TM sous forme soluble et non liée à des cellules dans les puits de réaction et l'absence d'EPCR membranaire à proximité pourrait expliquer cette absence de modification par l'ajout d'EPCR soluble. En effet, ces méthodes n'incluent pas tous les acteurs mis en jeu *in vivo*. Ainsi l'apport de cellules exprimant l'EPCR et la TM pourrait améliorer la sensibilité du TGT vis-à-vis de l'augmentation de la concentration en EPCR soluble dans le plasma des patients atteints de cirrhose.



## **CONCLUSION**

## CONCLUSION

Ces travaux de thèse s'intègrent dans la mise en place du protocole EXERCISE qui vise à approfondir la connaissance de la coagulation du patient cirrhotique en intégrant notamment la composante cellulaire. Les travaux préliminaires ont nécessité une adaptation technique du test de génération de thrombine et une évaluation des performances. Afin de pouvoir par la suite apprécier l'action des molécules de surface, notamment la TM et l'EPCR des cellules endothéliales, nous avons mis en place la technique sur cellules HEK293 qui n'expriment pas ces molécules et grâce à des plasmas normaux et de patients cirrhotiques.

Les performances en présence de cellules (quelle que soit la méthodologie) sont satisfaisantes en termes de répétabilité et de reproductibilité pour l'ensemble des paramètres, et comparables à la technique princeps. L'ajout des cellules peut se faire selon deux méthodes : adhérentes à confluence au fond des puits ou présentes en suspension avec le plasma et les réactifs. En comparaison avec le TGT réalisé sans cellules, la présence de cellules adhérentes entraîne une diminution significative de la génération de thrombine. Afin de pouvoir utiliser cette configuration cellulaire, des investigations complémentaires devront être réalisées pour expliquer ces variations. En revanche, on ne retrouve aucune modification significative en présence de cellules en suspension. L'utilisation de cette configuration semble être celle qui apporte le moins d'interférences sur le TGT. Cette méthode devra être validée par l'utilisation de cellules exprimant les marqueurs de surface d'intérêts (TM et EPCR). En effet, il faudra s'assurer qu'à cette concentration cellulaire ces molécules sont capables de jouer leur rôle inhibiteur de la coagulation. Les données sont similaires chez les patients atteints de cirrhose et la moindre sensibilité à la TM persiste lors des manipulations en présence de cellules (adhérentes ou en suspension).

Au final, ces travaux valident l'adaptation de la technique de génération de thrombine en présence de cellules. Ils ouvrent de nouvelles perspectives pour l'évaluation de la coagulation chez les patients atteints de cirrhose en intégrant l'impact inhibiteur des cellules endothéliales par la voie de la protéine C. Ils constituent une base indispensable à la poursuite du protocole Exercice pour lequel nous intégrerons différents types cellulaires, possédant une expression membranaire variable, notamment en TM et en EPCR.

Le Doyen de l'UFR de Médecine,

Professeur Pierre CLAVELOU



Le Président du Jury,

Professeur Marc BERGER

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Marc Berger". The signature is stylized and written over a horizontal line.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

1. Cirrhose | SNFGE.org - Société savante médicale française d'hépatogastroentérologie et d'oncologie digestive [Internet]. [cité 17 sept 2021]. Disponible sur: <https://www.snfge.org/content/cirrhose-0>
2. Cirrhose · Inserm, La science pour la santé [Internet]. Inserm. [cité 17 sept 2021]. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/dossier/cirrhose/>
3. Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK. Liver cirrhosis. *The Lancet*. mai 2014;383(9930):1749-61.
4. Cours [Internet]. [cité 17 sept 2021]. Disponible sur: <http://campus.cerimes.fr/hepato-gastro-enterologie/enseignement/item228/site/html/1.html>
5. Wijdicks EFM. Hepatic Encephalopathy. *N Engl J Med*. 27 oct 2016;375(17):1660-70.
6. Hou W, Sanyal AJ. Ascites: diagnosis and management. *Med Clin North Am*. juill 2009;93(4):801-17, vii.
7. Craxi A, Cammà C, Giunta M. Clinical aspects of bleeding complications in cirrhotic patients. *Blood Coagul Fibrinolysis Int J Haemost Thromb*. avr 2000;11 Suppl 1:S75-79.
8. C G, Am K. Esophageal varices. *JAAPA Off J Am Acad Physician Assist* [Internet]. juill 2011 [cité 17 sept 2021];24(7). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21748960/>
9. de Franchis R, Primignani M. Natural history of portal hypertension in patients with cirrhosis. *Clin Liver Dis*. août 2001;5(3):645-63.
10. Mumtaz K, Majid S, Shah H, Hameed K, Ahmed A, Hamid S, et al. Prevalence of gastric varices and results of sclerotherapy with N-butyl 2 cyanoacrylate for controlling acute gastric variceal bleeding. *World J Gastroenterol*. 28 févr 2007;13(8):1247-51.
11. Søggaard KK, Horváth-Puhó E, Grønbaek H, Jepsen P, Vilstrup H, Sørensen HT. Risk of venous thromboembolism in patients with liver disease: a nationwide population-based case-control study. *Am J Gastroenterol*. janv 2009;104(1):96-101.
12. Ambrosino P, Tarantino L, Di Minno G, Paternoster M, Graziano V, Petitto M, et al. The risk of venous thromboembolism in patients with cirrhosis. A systematic review and meta-analysis. *Thromb Haemost*. 5 janv 2017;117(1):139-48.
13. Ogren M, Bergqvist D, Björck M, Acosta S, Eriksson H, Sternby NH. Portal vein thrombosis: prevalence, patient characteristics and lifetime risk: a population study based on 23,796 consecutive autopsies. *World J Gastroenterol*. 7 avr 2006;12(13):2115-9.
14. Farndale RW, Siljander PR, Onley DJ, Sundaresan P, Knight CG, Barnes MJ. Collagen-platelet interactions: recognition and signalling. *Biochem Soc Symp*. 2003;(70):81-94.
15. Freyssinet J-M, Toti F. Formation of procoagulant microparticles and properties. *Thromb Res*. avr 2010;125 Suppl 1:S46-48.
16. Hoffman M, Monroe DM. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost*. juin 2001;85(6):958-65.
17. Atkinson HM, Parmar N, Berry LR, Chan AKC. Determination of alpha-2-macroglobulin complexes by a new immuno-activity assay. *Thromb Res*. mai 2012;129(5):635-40.

18. Maruyama I, Bell CE, Majerus PW. Thrombomodulin is found on endothelium of arteries, veins, capillaries, and lymphatics, and on syncytiotrophoblast of human placenta. *J Cell Biol.* août 1985;101(2):363-71.
19. Esmon CT. The protein C pathway. *Chest.* sept 2003;124(3 Suppl):26S-32S.
20. Taylor FB, Peer GT, Lockhart MS, Ferrell G, Esmon CT. Endothelial cell protein C receptor plays an important role in protein C activation in vivo. *Blood.* 15 mars 2001;97(6):1685-8.
21. Laszik Z, Mitro A, Taylor FB, Ferrell G, Esmon CT. Human Protein C Receptor Is Present Primarily on Endothelium of Large Blood Vessels. *Circulation.* 18 nov 1997;96(10):3633-40.
22. Peck-Radosavljevic M. Thrombocytopenia in chronic liver disease. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver.* juin 2017;37(6):778-93.
23. Kaushansky K. Thrombopoiesis. *Semin Hematol.* 1 janv 2015;52(1):4-11.
24. Tripodi A, Primignani M, Mannucci PM, Caldwell SH. Changing Concepts of Cirrhotic Coagulopathy. *Am J Gastroenterol.* févr 2017;112(2):274-81.
25. Lisman T, Bongers TN, Adelmeijer J, Janssen HLA, de Maat MPM, de Groot PG, et al. Elevated levels of von Willebrand Factor in cirrhosis support platelet adhesion despite reduced functional capacity. *Hepatology Baltim Md.* juill 2006;44(1):53-61.
26. Amitrano L, Guardascione MA, Brancaccio V, Balzano A. Coagulation disorders in liver disease. *Semin Liver Dis.* févr 2002;22(1):83-96.
27. Lisman T, Caldwell SH, Burroughs AK, Northup PG, Senzolo M, Stravitz RT, et al. Hemostasis and thrombosis in patients with liver disease: the ups and downs. *J Hepatol.* août 2010;53(2):362-71.
28. Lisman T, Bakhtiari K, Pereboom ITA, Hendriks HGD, Meijers JCM, Porte RJ. Normal to increased thrombin generation in patients undergoing liver transplantation despite prolonged conventional coagulation tests. *J Hepatol.* mars 2010;52(3):355-61.
29. Ewe K. Bleeding after liver biopsy does not correlate with indices of peripheral coagulation. *Dig Dis Sci.* mai 1981;26(5):388-93.
30. Terjung B, Lemnitzer I, Dumoulin FL, Effenberger W, Brackmann HH, Sauerbruch T, et al. Bleeding complications after percutaneous liver biopsy. An analysis of risk factors. *Digestion.* 2003;67(3):138-45.
31. Bosch J, Thabut D, Bendtsen F, D'Amico G, Albillos A, González Abraldes J, et al. Recombinant factor VIIa for upper gastrointestinal bleeding in patients with cirrhosis: a randomized, double-blind trial. *Gastroenterology.* oct 2004;127(4):1123-30.
32. de Boer MT, Molenaar IQ, Hendriks HGD, Slooff MJH, Porte RJ. Minimizing blood loss in liver transplantation: progress through research and evolution of techniques. *Dig Surg.* 2005;22(4):265-75.
33. Caldwell SH, Hoffman M, Lisman T, Macik BG, Northup PG, Reddy KR, et al. Coagulation disorders and hemostasis in liver disease: pathophysiology and critical assessment of current management. *Hepatology Baltim Md.* oct 2006;44(4):1039-46.

34. Garcia-Tsao G, Bosch J. Management of varices and variceal hemorrhage in cirrhosis. *N Engl J Med.* 4 mars 2010;362(9):823-32.
35. Tripodi A, Mannucci PM. The coagulopathy of chronic liver disease. *N Engl J Med.* 14 juill 2011;365(2):147-56.
36. Macfarlane RG, Biggs R. A thrombin generation test; the application in haemophilia and thrombocytopenia. *J Clin Pathol.* févr 1953;6(1):3-8.
37. Hemker HC, Wienders S, Kessels H, Béguin S. Continuous registration of thrombin generation in plasma, its use for the determination of the thrombin potential. *Thromb Haemost.* 18 oct 1993;70(4):617-24.
38. Hemker HC, Giesen P, AlDieri R, Regnault V, de Smed E, Wagenvoort R, et al. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb.* déc 2002;32(5-6):249-53.
39. Dillon A, Egan K, Kevane B, Galvin Z, Maguire P, Ní Áinle F, et al. Liver stiffness and thrombin generation in compensated cirrhosis. *Res Pract Thromb Haemost.* avr 2019;3(2):291-7.
40. Tripodi A, Salerno F, Chantarangkul V, Clerici M, Cazzaniga M, Primignani M, et al. Evidence of normal thrombin generation in cirrhosis despite abnormal conventional coagulation tests. *Hepatology.* mars 2005;41(3):553-8.
41. Tripodi A, Primignani M, Chantarangkul V, Dell'Era A, Clerici M, de Franchis R, et al. An imbalance of pro- vs anti-coagulation factors in plasma from patients with cirrhosis. *Gastroenterology.* déc 2009;137(6):2105-11.
42. Delahousse B, Labat-Debelleix V, Decalonne L, d'Alteroche L, Perarnau J-M, Gruel Y. Comparative study of coagulation and thrombin generation in the portal and jugular plasma of patients with cirrhosis. *Thromb Haemost.* oct 2010;104(4):741-9.
43. Gatt A, Riddell A, Calvaruso V, Tuddenham EG, Makris M, Burroughs AK. Enhanced thrombin generation in patients with cirrhosis-induced coagulopathy. *J Thromb Haemost JTH.* sept 2010;8(9):1994-2000.
44. Kremers RMW, Kleinegris M-C, Ninivaggi M, de Laat B, Ten Cate H, Koek GH, et al. Decreased prothrombin conversion and reduced thrombin inactivation explain rebalanced thrombin generation in liver cirrhosis. *PLoS One.* 2017;12(5):e0177020.
45. Russo FP, Zanetto A, Campello E, Bulato C, Shalaby S, Spiezia L, et al. Reversal of hypercoagulability in patients with HCV-related cirrhosis after treatment with direct-acting antivirals. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver.* déc 2018;38(12):2210-8.
46. Kleinegris M-C, Bos MHA, Roest M, Henskens Y, Ten Cate-Hoek A, Van Deursen C, et al. Cirrhosis patients have a coagulopathy that is associated with decreased clot formation capacity. *J Thromb Haemost JTH.* oct 2014;12(10):1647-57.
47. Youngwon N, Kim J-E, Lim HS, Han K-S, Kim HK. Coagulation proteins influencing global coagulation assays in cirrhosis: hypercoagulability in cirrhosis assessed by thrombomodulin-induced thrombin generation assay. *BioMed Res Int.* 2013;2013:856754.

48. Groeneveld D, Porte RJ, Lisman T. Thrombomodulin-modified thrombin generation testing detects a hypercoagulable state in patients with cirrhosis regardless of the exact experimental conditions. *Thromb Res.* sept 2014;134(3):753-6.
49. Lebreton A, Sinegre T, Pereira B, Lamblin G, Duron C, Abergel A. Plasma hypercoagulability in the presence of thrombomodulin but not of activated protein C in patients with cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol.* avr 2017;32(4):916-24.
50. Sinegre T, Duron C, Lecompte T, Pereira B, Massoulier S, Lamblin G, et al. Increased factor VIII plays a significant role in plasma hypercoagulability phenotype of patients with cirrhosis. *J Thromb Haemost JTH.* juin 2018;16(6):1132-40.
51. Talon L, Sinegre T, Lecompte T, Pereira B, Massoulié S, Abergel A, et al. Hypercoagulability (thrombin generation) in patients with cirrhosis is detected with ST-Genesia. *J Thromb Haemost JTH.* sept 2020;18(9):2177-90.
52. Potze W, Adelmeijer J, Porte RJ, Lisman T. Preserved clot formation detected by the Thrombodynamics analyzer in patients with cirrhosis. *Thromb Res.* mai 2015;135(5):1012-6.
53. Rassi AB, d'Amico EA, Tripodi A, da Rocha TRF, Migita BY, Ferreira CM, et al. Fresh frozen plasma transfusion in patients with cirrhosis and coagulopathy: Effect on conventional coagulation tests and thrombomodulin-modified thrombin generation. *J Hepatol.* janv 2020;72(1):85-94.
54. Wan J, Roberts LN, Hendrix W, Konings J, Ow T-W, Rabinowich L, et al. Whole blood thrombin generation profiles of patients with cirrhosis explored with a near patient assay. *J Thromb Haemost JTH.* avr 2020;18(4):834-43.
55. Bos S, van den Boom B, Kamphuisen PW, Adelmeijer J, Blokzijl H, Schreuder T, et al. Haemostatic Profiles are Similar across All Aetiologies of Cirrhosis. *Thromb Haemost.* févr 2019;119(2):246-53.
56. Chaireti R, Rajani R, Bergquist A, Melin T, Friis-Liby I-L, Kapraali M, et al. Increased thrombin generation in splanchnic vein thrombosis is related to the presence of liver cirrhosis and not to the thrombotic event. *Thromb Res.* août 2014;134(2):455-61.
57. Kurosawa S, Stearns-Kurosawa DJ, Hidari N, Esmon CT. Identification of functional endothelial protein C receptor in human plasma. *J Clin Invest.* 15 juill 1997;100(2):411-8.
58. Kurosawa S, Stearns-Kurosawa DJ, Carson CW, D'Angelo A, Della Valle P, Esmon CT. Plasma levels of endothelial cell protein C receptor are elevated in patients with sepsis and systemic lupus erythematosus: lack of correlation with thrombomodulin suggests involvement of different pathological processes. *Blood.* 15 janv 1998;91(2):725-7.
59. Xu J, Qu D, Esmon NL, Esmon CT. Metalloproteolytic release of endothelial cell protein C receptor. *J Biol Chem.* 25 févr 2000;275(8):6038-44.
60. Biguzzi E, Franchi F, Bucciarelli P, Colombo M, Romeo R. Endothelial protein C receptor plasma levels increase in chronic liver disease, while thrombomodulin plasma levels increase only in hepatocellular carcinoma. *Thromb Res.* 2007;120(2):289-93.



61. Liaw PC, Neuenschwander PF, Smirnov MD, Esmon CT. Mechanisms by which soluble endothelial cell protein C receptor modulates protein C and activated protein C function. *J Biol Chem.* 25 févr 2000;275(8):5447-52.
62. Sassi M, Chakroun T, Mbemba E, Van Dreden P, Elalamy I, Larsen AK, et al. The Antithrombotic Potential of Tinzaparin and Enoxaparin Upon Thrombin Generation Triggered In Vitro by Human Ovarian Cancer Cells IGROV1. *Clin Appl Thromb Off J Int Acad Clin Appl Thromb.* mars 2017;23(2):155-63.
63. Catieau B, Devos V, Chtourou S, Borgel D, Plantier J-L. Endothelial cell surface limits coagulation without modulating the antithrombin potency. *Thromb Res.* juill 2018;167:88-95.
64. Coll E, Robles-Carrillo L, Reyes E, Francis JL, Amirkhosravi A. Assessment of protein C anticoagulant pathway by thrombin generation assay in the presence of endothelial cells. *J Thromb Haemost JTH.* oct 2013;11(10):1916-9.
65. Adesanya MA, Maraveyas A, Madden L. Differing mechanisms of thrombin generation in live haematological and solid cancer cells determined by calibrated automated thrombography. *Blood Coagul Fibrinolysis Int J Haemost Thromb.* déc 2017;28(8):602-11.
66. Gierczak RF, Pepler L, Bhagirath V, Liaw PC, Sheffield WP. Alpha-1 proteinase inhibitor M358R reduces thrombin generation when displayed on the surface of cells expressing tissue factor. *Thromb Res.* nov 2014;134(5):1142-9.
67. Pepler L, Wu C, Dwivedi DJ, Wu C, Kim PY, Liaw PC. The impact of the endothelial protein C receptor on thrombin generation and clot lysis. *Thromb Res.* avr 2017;152:30-7.
68. AmraneDjedidi R, Rousseau A, Larsen AK, Elalamy I, Van Dreden P, Gerotziafas GT. Extracellular vesicles derived from pancreatic cancer cells BXPC3 or breast cancer cells MCF7 induce a permanent procoagulant shift to endothelial cells. *Thromb Res.* mars 2020;187:170-9.
69. Billoir P, Miranda S, Damian L, Richard V, Benhamou Y, Le Cam Duchez V. Development of a thrombin generation test in cultured endothelial cells: Evaluation of the prothrombotic effects of antiphospholipid antibodies. *Thromb Res.* sept 2018;169:87-92.
70. Geenen ILA, Post MJ, Molin DGM, Schurink GWH, Maessen JG, van Oerle R, et al. Coagulation on endothelial cells: the underexposed part of Virchow's Triad. *Thromb Haemost.* nov 2012;108(5):863-71.
71. Rousseau A, Van Dreden P, Mbemba E, Elalamy I, Larsen A, Gerotziafas GT. Cancer cells BXPC3 and MCF7 differentially reverse the inhibition of thrombin generation by apixaban, fondaparinux and enoxaparin. *Thromb Res.* déc 2015;136(6):1273-9.
72. BiostaTGV - Statistiques en ligne [Internet]. [cité 3 oct 2021]. Disponible sur: <https://biostatgv.sentiweb.fr/>
73. Dargaud Y, Luddington R, Gray E, Negrier C, Lecompte T, Petros S, et al. Effect of standardization and normalization on imprecision of calibrated automated thrombography: an international multicentre study. *Br J Haematol.* oct 2007;139(2):303-9.
74. Perrin J, Depasse F, Lecompte T, De Raucourt E, Planche V, Ajzenberg N, et al. Large external quality assessment survey on thrombin generation with CAT: further evidence for the

usefulness of normalisation with an external reference plasma. *Thromb Res.* 1 juill 2015;136(1):125-30.

75. Machlus KR, Colby EA, Wu JR, Koch GG, Key NS, Wolberg AS. Effects of tissue factor, thrombomodulin and elevated clotting factor levels on thrombin generation in the calibrated automated thrombogram. *Thromb Haemost.* nov 2009;102(5):936-44.

## SERMENT D'HIPPOCRATE

Au moment d'être admis(e) à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis(e) dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu(e) à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré(e) et méprisé(e) si j'y manque.

## SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette FACULTE et de mes chers CONDISCIPLES, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'Honneur et de la Probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et je n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes MAÎTRES, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les HOMMES m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'OPPROBRE et méprisé de mes confrères si j'y manque.

## Développement d'un test de génération de thrombine en présence de cellules : Application à une population cirrhotique

### Résumé :

**CONTEXTE :** La cirrhose provoque de multiples modifications de l'hémostase. L'utilisation du test de génération de thrombine (TGT) en présence de thrombomoduline (TM) a montré que les patients atteints de cirrhose généraient plus de thrombine que les témoins sains. Plusieurs facteurs ont été mis en évidence : diminution du taux de protéine C, taux de facteur VIII élevé. Cependant les cellules endothéliales sont impliquées dans l'hémostase notamment par leur expression membranaire de TM et du récepteur endothélial à la protéine C (EPCR).

**OBJECTIF :** L'objectif de ce travail est le développement d'un TGT en présence de cellules pour étudier l'hémostase en intégrant la participation cellulaire chez les patients cirrhotiques.

**METHODE :** Le TGT a été réalisé en présence de cellules HEK293, n'exprimant ni TM ni EPCR, avec des pools de plasmas normaux et des plasmas de patients cirrhotiques. Une adaptation de la méthode CAT avec du PPP Reagent® avec ou sans TM a permis d'utiliser les cellules en configuration adhérente ou en suspension dans le mélange réactif/plasma.

**RESULTATS :** La reproductibilité du TGT en présence de cellules était comparable à celle réalisée sans cellules (Coefficient de variation < 12%). Le potentiel endogène de thrombine (ETP) moyen (nM.min) sans cellules est à  $1752 \pm 139$ , n'est pas modifié par la présence de cellules en suspension  $1877 \pm 50$  ( $p=0,06$ ) et diminue lorsqu'elles sont adhérentes à  $1569 \pm 92$  ( $p=0,01$ ). Les mêmes résultats sont observés lorsque le TGT est réalisé avec ajout de TM. Enfin l'utilisation de plasmas de patients cirrhotiques montre une résistance à la TM, grâce au calcul du ratio (%) ETP+TM/ETP-TM moyen qui est augmenté en l'absence de cellules à  $97,3 \pm 3,1$  et en présence de cellules : adhérentes à  $92,7 \pm 4,8$  ( $p=0,10$ ) ou suspension à  $92,6 \pm 0,0$  ( $p=0,12$ ).

**CONCLUSION :** Les performances du TGT en présence de cellules sont satisfaisantes et semblent permettre l'utilisation de ce test pour l'étude de l'hémostase chez les patients atteints de cirrhose. En revanche, des manipulations en présence de cellules endothéliales seront nécessaires pour déterminer quelle condition sera la plus adaptée à l'étude du TGT sur plasmas cirrhotiques.

### Mots-clés :

- Cirrhose
- Test de génération de thrombine
- HEK293
- Hypercoagulabilité
- Thrombomoduline
- EPCR