

SUJETS ABORDÉS

- ✓ Temps de lyse du caillot de plasma induit par le tPA
- ✓ Test de génération de plasmine

La fibrinolyse est une série de réactions enzymatiques qui dégradent la fibrine insoluble, et dépend de la quantité et de la qualité de diverses enzymes fibrinolytiques, telles que l'activateur du plasminogène de type tissulaire (tPA) et la plasmine, leurs inhibiteurs respectifs, l'inhibiteur des activateurs du plasminogène de type 1 (PAI-1) et l'alpha-2-antiplasmine (α 2AP), ainsi que de la structure du caillot (Longstaff et Kolev, 2015). En contexte clinique, l'augmentation du taux de fibrinolyse sert à inverser l'occlusion thrombotique (p. ex. tPA recombinant pour le traitement immédiat de l'accident vasculaire cérébral, de l'infarctus du myocarde ou de l'embolie pulmonaire), tandis que l'abaissement du taux de fibrinolyse est employé pour atténuer les saignements (acide tranexamique pour le traitement immédiat de l'accident vasculaire cérébral, de l'infarctus du myocarde ou de l'embolie pulmonaire entre autres) (Draxler et Medcalf, 2015 ; Ilich *et al.*, 2017 ; Kwaan *et al.*, 2017). Récemment, dans l'hémophilie, on a eu recours à des tests mesurant la formation de caillots et la fibrinolyse pour faciliter les comparaisons directes et fonctionnelles entre les agents hémostatiques nouveaux et émergents qui présentent différents mécanismes d'action (Holle *et al.*, 2024). Les tests généraux visant à identifier le potentiel fibrinolytique d'une personne ne sont toutefois pas largement mis en œuvre. En revanche, la recherche fondamentale sur la fibrinolyse repose généralement sur la quantification des différents facteurs fibrinolytiques. Les concentrations totales sont mesurées à l'aide de dosages à base d'antigènes et de tests fonctionnels spécifiques pour déterminer leur activité. Malgré la variété des dosages disponibles, il reste difficile d'assigner les facteurs fibrinolytiques individuels qui contribuent au résultat fibrinolytique global, et ce en raison de la nature dynamique de l'environnement entourant le caillot (Longstaff, 2018). Pendant des décennies, le temps de lyse du caillot avec surveillance de la turbidité a été utilisé comme méthode standard pour quantifier le potentiel fibrinolytique global d'un échantillon, et des variations de ce test global et simpliste ont été développées pour traiter la ou les fonctions des facteurs fibrinolytiques. Ainsi, deux dosages ont été étudiés dans le contexte de la pratique clinique et montrent des résultats prometteurs pour l'évaluation du potentiel fibrinolytique global.

Temps de lyse du caillot de plasma induit par le tPA : les temps de lyse du caillot de plasma induits par l'activateur du plasminogène sont fréquemment rapportés pour évaluer et quantifier la propriété fibrinolytique globale d'un échantillon (Longstaff, 2018). Ce test est pratiqué en ajoutant simultanément au plasma citraté des agonistes pour initier la coagulation (facteur tissulaire et Ca^{2+} par exemple) et la fibrinolyse (tPA notamment). Sinon, des caillots peuvent être générés en premier, puis recouverts de tPA pour imiter le scénario clinique dans lequel le tPA est perfusé pour dégrader les thrombus ischémiques existants (Longstaff *et al.*, 2011). La simplicité du système de réaction et le traitement minimal des échantillons font de ce dosage une méthode idéale pour étudier la sensibilité des caillots de plasma à la fibrinolyse (Holle *et al.*, 2024). En outre, le test est sensible aux molécules inhibitrices qui ciblent des facteurs spécifiques, tels que PAI-1 et α 2AP, qui peuvent être inclus pour inférer les rôles respectifs de PAI-1 et d' α 2AP dans la fibrinolyse générale (Zheng *et al.*, 2023).

Réactifs et méthode :

- Phospholipides [4 μ M final]
 - CaCl_2 [10 mM final]
 - Facteur tissulaire [dilution 1/15 000 d'Innovin, facteur tissulaire final 1 pM]
 - Solution saline tamponnée à l'HEPES (HEPES 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM)
 - tPA (0,5 μ g/ml final)
- 1) Dans une plaque à 96 puits à fond en U, pipeter 10 μ l de facteur tissulaire/phospholipides/rtPA dans chaque puits (pipetage inversé au fond du puits)
 - 2) Ajouter 40 μ l de PPP dans chaque puits (pipetage inversé sur le côté du puits en haut)
 - 3) Préchauffer la plaque dans l'incubateur pendant cinq minutes
 - 4) Après cinq minutes de préchauffage, utiliser une pipette multicanaux pour transférer 10 μ l de Ca, bien mélanger et éviter la formation de bulles
 - 5) Mettre rapidement la plaque dans le lecteur et commencer la lecture
 - 6) Surveiller la réaction pendant deux heures en mesurant la turbidité à 405 nm toutes les 12 secondes à l'aide d'un lecteur de plaques

Test de génération de plasmine : les tests de génération de plasmine développés par différents groupes ont certains éléments en commun (Longstaff, 2018 ; Zheng *et al.*, 2023). De manière générale, l'activité procoagulante est initiée par l'ajout de facteur tissulaire exogène au plasma recalcifié, et l'activité fibrinolytique est déclenchée par l'ajout de tPA exogène. La génération de plasmine est détectée par le clivage d'un substrat fluorogène, et les paramètres sont définis à partir de l'accumulation de fluorescence ou par une dérivée mathématique de cette courbe de fluorescence. Les différences subtiles entre ces tests comprennent les concentrations de facteur tissulaire et de tPA utilisées et l'utilisation ou non de plasma dilué. Certaines variations de ces tests détectent simultanément la thrombine et la plasmine, tandis que d'autres effectuent ces mesures séparément, mais en parallèle. Des études montrent que ces tests sont spécifiques pour la plasmine et sensibles à l' α 2AP, l'activité mesurée représentant la plasmine libre. La génération de plasmine est également sensible à l'acide tranexamique. Compte tenu des concentrations élevées de tPA requises pour déclencher une génération de plasmine mesurable, le test n'est pas sensible aux concentrations plasmatiques de PAI-1 (Miszta *et al.*, 2021). Cependant, la génération de plasmine en réponse à l'ajout de tPA exogène est dose-dépendante. Un nombre croissant de travaux suggèrent que les tests de génération de plasmine, en particulier lorsqu'ils sont utilisés avec les tests de génération de thrombine et de mesure de la turbidité, produisent une vue multidimensionnelle des effets intégrés des activités procoagulantes et fibrinolytiques chez les sujets sains et malades (Miszta *et al.*, 2021 ; Zheng *et al.*, 2023).

Réactifs et méthode :

- Tampon TBS, contenant du Tris 66 mM et du NaCl 130 mM
 - CaCl_2 34 mM
 - facteur tissulaire 10 pM (facteur tissulaire humain recombinant lipidé, Innovin, Siemens Healthcare, Erlangen, Allemagne)
 - tPA 900 ng/ml (activateur tissulaire du plasminogène à deux chaînes recombinant, Actylise, Boehringer Ingelheim, Biberach an der Riss, Allemagne)
 - Alpha-thrombine (BOC-VAL-PrO-ARG-MCA, Peptides International, 5 mg)
 - Plasmine (BOC-GLU-LYS-LYS-MCA, Peptides International, 5 mg)
- 1) Préparer la solution de réactif de CaCl_2 34 mM, facteur tissulaire 10 pM et tPA 900 ng/ml dans la solution de TBS. La concentration finale des réactifs dans le plasma était de 5 pM pour le facteur tissulaire et 450 ng/ml pour le tPA.
 - 2) Deux substrats ont été préparés avec une concentration finale de 100 μ M et utilisés pour la détection des enzymes : l' α -thrombine et la plasmine.

- 3) Les deux premiers puits de la plaque (Grelner, 96 puits, fond plat, noir/transparent) doivent être utilisés comme blanc, et les échantillons ont été analysés en double dans des rangées parallèles pour chaque substrat, en évitant les interférences et/ou les interactions potentielles dans la détection des signaux.
- 4) Ajouter les solutions de substrat (20 µl) dans les puits de la plaque, puis 90 µl des échantillons et du blanc (solution de TBS).
- 5) À l'aide d'une pipette automatisée à pointes multiples, ajouter 90 µl de la solution de réaction préchauffée (37 °C pendant trois minutes) dans chaque puits de la plaque.
- 6) Enfin, la plaque doit être lue dans le fluoromètre à une longueur d'onde d'excitation de 340 nm et d'émission de 450 nm pendant quatre heures à des intervalles de 45 secondes.
- 7) L'analyse des données pourrait être effectuée à l'aide du logiciel Microsoft® Excel®. Il y a lieu de générer les courbes pour la thrombine et la plasmine en calculant la moyenne à chaque point temporel pour les puits de plasma dupliqués, en soustrayant les valeurs de lecture du blanc (pour la thrombine et la plasmine séparément). Paramètres à calculer dans les deux tests, à l'aide des outils de l'application Shiny : début (temps jusqu'au point d'inflexion avant l'augmentation de la turbidité), vitesse maximale (pente d'une ligne ajustée à la vitesse maximale d'augmentation de la turbidité en utilisant 5 à 10 points pour déterminer la ligne), temps jusqu'au plateau/pic (temps jusqu'au plateau de turbidité [formation d'un caillot] ou au pic [fibrinolyse]), variation de la turbidité (turbidité maximale du caillot moins la turbidité de départ) et aire sous la courbe (AUC) (calculée comme la somme des trapézoïdes formés par les courbes de turbidité).

Références

- Draxler DF, Medcalf RL. The fibrinolytic system-more than fibrinolysis? *Transfus Med Rev* 2015; 29(2): 102-109.
- Holle LA, Pantazis JC, Turecek PL, Wolberg AS. Clot formation and fibrinolysis assays reveal functional differences among hemostatic agents in hemophilia A plasma. *Res Pract Thromb Haemost* 2024; 8(1): 102337.
- Ilich A, Bokarev I, Key NS. Global assays of fibrinolysis. *Int J Lab Hematol* 2017; 39(5): 441-447.
- Kwaan H, Lisman T, Medcalf RL. Fibrinolysis: Biochemistry, clinical aspects, and therapeutic potential. *Semin Thromb Hemost* 2017; 43(2): 113-114.
- Longstaff C. Development of Shiny app tools to simplify and standardize the analysis of hemostasis assay data: Communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2017; 15(5): 1044-1046.
- Longstaff C. Measuring fibrinolysis: From research to routine diagnostic assays. *J Thromb Haemost* 2018; 16(4): 652-662.
- Longstaff C, Kolev K. Basic mechanisms and regulation of fibrinolysis. *J Thromb Haemost* 2015; 13 Suppl 1: S98-105.
- Longstaff C, Thelwell C, Williams SC, Silva MM, Szabó L, Kolev K. The interplay between tissue plasminogen activator domains and fibrin structures in the regulation of fibrinolysis: Kinetic and microscopic studies. *Blood* 2011; 117(2): 661-668.
- Miszta A, Huskens D, Donkervoort D, Roberts MJM, Wolberg AS, de Laat B. Assessing plasmin generation in health and disease. *Int J Mol Sci* 2021; 22(5): 1-17.
- Zheng Z, Mukhametova L, Boffa MB, Moore EE, Wolberg AS, Urano T, Kim PY. Assays to quantify fibrinolysis: Strengths and limitations. Communication from the International Society on Thrombosis and Haemostasis Scientific and Standardization Committee on fibrinolysis. *J Thromb Haemost* 2023; 21(4): 1043-1054.