

12 DEMANDE DE BREVET D'INVENTION A1

22 Date de dépôt : 14.09.21.

30 Priorité :

43 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 17.03.23 Bulletin 23/11.

56 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

60 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

71 Demandeur(s) : DIAGNOSTICA STAGO Société par
actions simplifiée (SAS) — FR.

72 Inventeur(s) : BOURDIN Matthieu, Daniel, Luc,
MATHIEU Olivier, Frédéric, Lucien et GILES Charlotte.

73 Titulaire(s) : DIAGNOSTICA STAGO Société par
actions simplifiée (SAS).

74 Mandataire(s) : PLASSERAUD IP.

54 Mesure in vitro de la lyse d'un caillot de fibrine.

57 L'invention concerne une méthode de mesure in vitro
de la dégradation du caillot de fibrine à partir d'une courbe
de lyse d'un caillot de fibrine au cours du temps dans un
échantillon de sang ou de plasma préalablement obtenu
d'un patient susceptible d'avoir un déficit en au moins un
facteur de la coagulation, qui inclut la détermination d'une
valeur de niveau basal du caillot de fibrine à un temps t₁, et
la détermination d'une valeur de niveau dégradé du caillot
de fibrine à un temps t₂ ultérieur. La méthode peut com-
prendre une étape supplémentaire de classement de
l'échantillon testé dans un groupe reflétant un profil de lyse
d'un caillot de fibrine. L'invention concerne également une
méthode de suivi d'un traitement thérapeutique administré à
un patient susceptible d'avoir ou ayant un déficit en au
moins un facteur de coagulation, qui peut également com-
prendre en outre une étape d'ajustement du traitement thé-
rapeutique suivi par ledit patient, en fonction du classement
obtenu. L'invention concerne encore l'emploi d'acide
tranexamique (TXA) ou d'une composition en comprenant
pour son utilisation dans un traitement thérapeutique, ladite
utilisation comprenant la réalisation d'une méthode selon
l'invention, et des moyens pour la mise en œuvre de l'inven-
tion.



Description

Titre de l'invention : Mesure *in vitro* de la lyse d'un caillot de fibrine

Domaine technique

- [0001] La présente divulgation relève du domaine de l'hémostase. Elle a plus particulièrement trait à celui de l'hémophilie, et porte sur une méthode de réalisation d'une mesure *in vitro* d'une courbe de lyse d'un caillot de fibrine au cours du temps provenant d'un échantillon de sang ou de plasma, pour permettre la détermination de profils de patients susceptibles d'être hémophiles, d'être diagnostiqués hémophiles, ou hémophiles, en fonction des cinétiques de lyse desdits caillots. Selon un autre aspect, l'invention concerne la possibilité d'adapter un traitement ou le choix d'un traitement en fonction du paramètre physiologique observé selon l'invention, pour ces patients.
- [0002] L'invention concerne plus précisément une méthode de mesure *in vitro* de la dégradation du caillot de fibrine à partir d'une courbe de lyse d'un caillot de fibrine au cours du temps (courbe cinétique) dans un échantillon de sang ou de plasma préalablement obtenu d'un patient susceptible d'avoir un déficit en au moins un facteur de la coagulation, la méthode comprenant les étapes suivantes :
- a. mélange de l'échantillon préalablement obtenu dudit patient avec une composition de réactifs comprenant du facteur tissulaire, des phospholipides, du t-PA, et un ou plusieurs activateur(s) de la voie intrinsèque de la coagulation, notamment un ou plusieurs de ces activateurs choisi(s) parmi : l'acide ellagique, la silice, le FIXa, le FXIa, et optionnellement un ou plusieurs facteurs de la coagulation manquant chez le patient, notamment choisi(s) parmi: le FVIII, le FIX, le FXI ; puis
 - b. incubation du mélange obtenu en a., puis
 - c. déclenchement de la coagulation par ajout d'ions calcium au mélange incubé à l'étape b., pour permettre la formation d'un caillot de fibrine dans le mélange, puis la lyse du caillot formé, et
 - d. mesure de la cinétique de dégradation du caillot de fibrine pendant la lyse à l'étape c., et
 - e. détermination d'une valeur de niveau basal du caillot de fibrine à un temps t1, le temps t1 étant choisi pour être situé entre le Tmax et le TL de la courbe de lyse du caillot de fibrine, et d'une valeur de niveau dégradé du caillot de fibrine à un temps t2 ultérieur, le temps t2 étant choisi entre 300 à 900 secondes après t1.

Cette méthode inclut la détermination d'une valeur de niveau basal du caillot de

fibrine à un temps t1, et la détermination d'une valeur de niveau dégradé du caillot de fibrine à un temps t2 ultérieur.

- [0003] Selon un aspect, la méthode peut comprendre une étape supplémentaire f. de classement de l'échantillon testé dans un groupe reflétant un profil de lyse d'un caillot de fibrine, ledit profil de lyse étant déterminé sur la base des valeurs mesurées à t1 et t2 dans l'étape e., au regard d'un modèle de classification prédéfini sur la base de paramètres de classification obtenus avec des données d'apprentissage traitées dans les mêmes conditions expérimentales que celles de l'échantillon analysé.
- [0004] L'invention concerne également une méthode de suivi d'un traitement thérapeutique administré à un patient susceptible d'avoir ou ayant un déficit en au moins un facteur de coagulation, impliquant la mise en œuvre d'une méthode de réalisation d'une mesure *in vitro* d'une courbe de lyse d'un caillot de fibrine au cours du temps selon l'invention, sur un échantillon de sang ou de plasma obtenu dudit patient, à au moins un temps donné et éventuellement à un autre ou plusieurs temps ultérieur(s), ladite méthode incluant une étape f. de classement de l'échantillon testé dans un groupe reflétant un profil de lyse d'un caillot de fibrine, et sur la base du classement obtenu pour l'échantillon analysé dans un groupe, une conclusion concernant le déficit en facteur(s) de coagulation du patient analysé observé par la méthode de classification ou concernant l'état de santé dudit patient, et éventuellement conclusion concernant l'évolution dudit déficit en facteur(s) de coagulation du patient analysé ou de l'état de santé dudit patient si plusieurs classements effectués à des temps séparés et successifs sont disponibles. Une telle méthode peut également comprendre en outre une étape d'ajustement du traitement thérapeutique suivi par ledit patient, en fonction du classement obtenu.
- [0005] L'invention concerne encore l'emploi d'acide tranexamique (TXA) ou d'une composition en comprenant pour son utilisation dans le traitement thérapeutique d'un patient susceptible d'avoir ou ayant un déficit en au moins un facteur de coagulation, en particulier un patient diagnostiqué hémophile, ladite utilisation comprenant la réalisation d'une méthode selon l'invention de mesure *in vitro* de la dégradation du caillot de fibrine à partir d'une courbe de lyse d'un caillot de fibrine au cours du temps (courbe cinétique) dans un échantillon de sang ou de plasma préalablement obtenu d'un patient, le cas échéant pour un classement de l'échantillon, un suivi ou un ajustement du traitement thérapeutique dudit patient.
- [0006] L'invention concerne encore des moyens pour la mise en œuvre de l'invention, i.e., un système de traitement de données ou un dispositif comprenant des moyens particuliers pour la mise en œuvre d'une méthode selon l'invention, ou un programme d'ordinateur, ou un support d'enregistrement non transitoire lisible par un ordinateur sur lequel est enregistré un programme d'ordinateur pour la mise en œuvre, lorsque ce

programme est exécuté par un processeur, de la méthode selon l'invention de mesure *in vitro* de la dégradation du caillot de fibrine à partir d'une courbe de lyse d'un caillot de fibrine au cours du temps (courbe cinétique) dans un échantillon de sang ou de plasma préalablement obtenu d'un patient, ou un kit. Un système de traitement de données ou dispositif comprend des moyens pour mettre en œuvre au moins l'étape e. de la méthode de mesure *in vitro* de la dégradation du caillot de fibrine à partir d'une courbe de lyse d'un caillot de fibrine au cours du temps (courbe cinétique) selon l'invention, ou l'étape f. de classement de l'échantillon testé dans un groupe reflétant un profil de lyse d'un caillot de fibrine selon l'invention, et le cas échéant également au moins une autre des étapes de l'une des revendications de méthode selon l'invention, et optionnellement comprend des moyens pour fournir en entrée et/ou sortir les variables générées lors de ces étapes, pour rendre le résultat de classement prenant en compte les variables fournies en entrée, et optionnellement comprend également un appareil de mesure de cinétique(s) de dégradation d'un caillot de fibrine, ou fait appel à un appareil de mesure de cinétique(s) de dégradation d'un caillot de fibrine, notamment distant, et optionnellement comprend également un processeur adapté pour mettre en œuvre les dites étapes. Un programme d'ordinateur comprend des instructions de code de programme pour l'exécution des étapes de la méthode selon l'invention de mesure *in vitro* de la dégradation du caillot de fibrine à partir d'une courbe de lyse d'un caillot de fibrine au cours du temps (courbe cinétique) dans un échantillon de sang ou de plasma préalablement obtenu d'un patient, lorsque ledit programme est exécuté sur un ordinateur, notamment il comprend des instructions de code qui conduisent un système de traitement de données ou un dispositif selon l'invention, notamment un dispositif incluant un appareil de mesure de cinétiques ou un système de traitement de données ou un dispositif faisant appel à un tel appareil de mesure, notamment distant, à exécuter au moins l'étape e. de la méthode selon l'invention de mesure *in vitro* de la dégradation du caillot de fibrine à partir d'une courbe de lyse d'un caillot de fibrine au cours du temps (courbe cinétique) dans un échantillon de sang ou de plasma préalablement obtenu d'un patient, ou l'étape f. de classement de l'échantillon testé dans un groupe reflétant un profil de lyse d'un caillot de fibrine selon l'invention, et optionnellement également au moins une autre des étapes de la méthode selon l'invention de mesure *in vitro* de la dégradation du caillot de fibrine à partir d'une courbe de lyse d'un caillot de fibrine au cours du temps (courbe cinétique) dans un échantillon de sang ou de plasma préalablement obtenu d'un patient, par exemple l'étape d. de cette méthode. Un kit adapté pour la mise en œuvre d'une méthode selon l'invention de mesure *in vitro* de la dégradation du caillot de fibrine à partir d'une courbe de lyse d'un caillot de fibrine au cours du temps (courbe cinétique) dans un échantillon de sang ou de plasma préalablement obtenu

d'un patient comprend :

- a. un ou plusieurs des réactifs suivants : du facteur tissulaire, des phospholipides, du t-PA, un activateur de la voie intrinsèque de la coagulation choisi parmi : l'acide élagique, la silice, le FIXa, le FXIa, ou plusieurs de ces derniers, des ions calcium,
- b. Optionnellement, un facteur de coagulation choisi parmi le facteur VIII, le facteur IX, le facteur XI, ou plusieurs de ces derniers ,
- c. Optionnellement, un ou plusieurs tampons appropriés,
- d. Optionnellement des instructions pour la réalisation d'une ou de plusieurs cinétique(s) de dégradation d'un caillot de fibrine, et
- e. Optionnellement, un système et/ou dispositif et/ou programme d'ordinateur et/ou support de données lisible par ordinateur selon l'invention,
- f. Optionnellement, des instructions permettant de mettre en œuvre la méthode de mesure *in vitro* de la dégradation du caillot de fibrine à partir d'une courbe de lyse d'un caillot de fibrine au cours du temps (courbe cinétique) dans un échantillon de sang ou de plasma préalablement obtenu d'un patient selon l'invention,
- g. Optionnellement, des instructions relatives à l'utilisation d'un signal d'un support de données, pour la mise en œuvre d'une méthode de mesure *in vitro* de la dégradation du caillot de fibrine à partir d'une courbe de lyse d'un caillot de fibrine au cours du temps (courbe cinétique) dans un échantillon de sang ou de plasma préalablement obtenu d'un patient selon l'invention.

Technique antérieure

[0007] L'hémophilie est une maladie congénitale récessive caractérisée par des hémorragies spontanées ou prolongées dues à un déficit en un des facteurs de la coagulation (VIII, IX ou XI, également nommés « FVIII », « FIX » et « FXI » dans la présente description, pour « facteur VIII », « facteur IX » et « facteur XI », respectivement). Il existe trois types d'hémophilies : Hémophilie A, Hémophilie B ou Hémophilie C. On classe généralement les hémophiles selon 3 classes en fonction du dosage en facteur VIII (FVIII - pour les hémophiles A, FIX - pour les hémophiles B, FXI - pour les hémophiles C) :

- Hémophiles sévères (<1% de facteur – 1% de facteur est équivalent à 0,01 UI/mL par convention. L'unité UI/mL est également utilisée dans la présente description en lieu et place de pourcentages.) ;
- Hémophiles modérés (entre 1 et 5% de facteurs) ;
- Hémophiles mineurs (entre 5% et 40% de facteurs).

[0008] En particulier, la déficience en FVIII peut entraîner une production insuffisante de

fibrine lors de la coagulation. Ainsi, le caillot est moins résistant et se forme avec difficulté. L'équilibre coagulo-lytique est fragilisé par rapport à une personne saine. Un hémophile A va présenter un risque hémorragique plus élevé en cas de traumatisme (blessure) ou de façon spontanée au niveau des articulations et des muscles. Plus la maladie est sévère, plus les saignements sont fréquents. La fréquence des saignements est évaluée par l'Annual Bleeding Rate (ABR) qui correspond au nombre de saignements par an.

- [0009] Cependant, le risque hémorragique des hémophiles est très hétérogène : certains patients à très faible taux en FVIII vont avoir un faible ABR alors que des patients diagnostiqués comme hémophiles A modérés peuvent saigner davantage. Avec le traitement substitutif au FVIII, qui est le traitement de choix à ce jour, le but est d'élever la concentration plasmatique de FVIII à un niveau permettant de minimiser le temps passé en dessous d'un niveau seuil (through level). Or, ce seuil en FVIII optimal pour supprimer les saignements est incertain et n'est pas corrélé au phénotype clinique des patients.
- [0010] Il a été mis en avant que l'équilibre hémostatique et particulièrement le processus de lyse du caillot pouvaient être modifiés chez les patients hémophiles. L'association d'un faible taux en FVIII avec une hyperstimulation du système fibrinolytique entraînerait la prédisposition des hémophiles A, à saigner. Les protéines pro-/anti-thrombotiques ont également une influence (TFPI, Antithrombine, Protéines C et S). Ce sont ces multiples effets qui causent une différence entre le phénotype clinique et la concentration en FVIII. Leong et collaborateurs en 2017 (Leong et al. 2017 Research and practice in thrombosis and haemostasis) indiquent que la capacité à former un caillot hémostatique efficace dépend de plus que du taux de FVIII. Ils soulèvent la possibilité que la variation clinique de la réponse des patients au traitement substitutif par le FVIII peut être réduite, entre autre, en modulant la contribution de la fibrine, des plaquettes et des érythrocytes à l'hémostase. La formation du caillot de fibrine et sa fibrinolyse, particulière chez les patients hémophiles, pourrait influencer la gravité de la tendance hémorragique.
- [0011] Les études cliniques qui suggèrent d'adapter la posologie du traitement en FVIII selon des profils pharmacocinétiques adaptées n'ont pas atteint le zéro saignements. Le taux moyen ABR pendant la prophylaxie (1% de FVIII) est de 6.3 saignements/patient/an. L'étendue de la gamme de l'ABR [4.4 – 9.9] suggère que certains patients ont besoin d'une dose plus importante de FVIII pour prévenir les saignements spontanés. Il est reconnu qu'un taux compris entre 12 et 15% de FVIII permettrait d'éviter un maximum de saignements. Ce taux est difficilement envisageable en prophylaxie du fait de la faible $\frac{1}{2}$ vie et du coût des traitements.
- [0012] Le Test de Génération de Thrombine (TGT), le test Clot Waveform Analysis (CWA)

en aPTT ou les tests viscoélastiques (TEG / ROTEM) ont été utilisés dans l'application hémophilie A et sont reconnus comme sensibles aux variations en FVIII (Chitlur 2012 Thrombosis Research, Challenges in the laboratory analyses of bleeding disorders). Le through level basé sur l'ETP du patient peut être plus fiable que le taux de FVIII:C à 1% (Dargaud 2017) mais celui-ci n'est pas optimal pour surveiller les patients hémophiles A (Tarandowsky 2013). Il est à noter que Dargaud et collaborateurs ont trouvé que 4 patients parmi les 11 (soit 36%) ayant les ETP les plus faibles n'ont pas un phénotype hémorragique clinique (Dargaud 2017).

[0013] Les inventeurs notent ainsi que le test hémostatique idéal doit corrélérer le phénotype biologique des patients au phénotype hémorragique clinique et permettre de déterminer la sévérité des saignements. De telles caractéristiques permettraient de proposer une adaptation de la posologie du traitement aux patients. Aucun test à ce jour n'a été approuvé pour le suivi des patients hémophiles A et pour prédire la prédisposition des patients hémophiles à saigner (Tripodi 2019, Tarandowsky 2013). En effet, une large différence inter-patients existe dans la réponse à la thérapie au FVIII, les tests globaux actuels (TGT, CWA et TEG / ROTEM) ne sont pas suffisamment sensibles aux faibles variations de FVIII, en particulier dans la zone basse (Matsumoto 2009, Aghighi 2019). Le TGT activé par le FT (facteur tissulaire) seul a une sensibilité relativement faible aux déficiences en facteurs intrinsèques de la coagulation, il est nécessaire de le modifier (FT dilué, CTI, PRP) pour atteindre une sensibilité suffisante. Par ailleurs, d'autres facteurs, non explorés dans ces tests, contribuent à la sévérité du phénotype (Aghighi 2019, Leong 2017, He 2018).

[0014] En 2020, trois études NovoNordisk (Guardian) et trois études Bayer (Leopold) ont montré que la variabilité inter-patient du phénotype hémorragique reste importante et inexpliquée, que le risque de saignement peut changer avec le temps et qu'il est influencé par des facteurs indépendants de la pharmacocinétique du FVIII et du niveau seuil. Le besoin d'un outil d'individualisation du traitement tenant compte du risque hémorragique personnalisé reste à ce jour toujours nécessaire (Tiede 2020, Abrantes 2019).

[0015] A ce constat scientifique s'ajoutent des considérations clinico-économiques soulignant l'intérêt d'un test de lyse répondant aux problématiques exposées ci-dessus chez les hémophiles. En France, la prévalence de l'hémophilie A est d'environ 1/5000 (avec 50% d'hémophilie sévère). Le traitement par facteur anti-hémophilique correspond à environ 98% du coût de prise en charge d'un hémophile sévère. En sus, en France (en 2003) 7000 hospitalisations liées à l'hémophilie A par an ont été comptées. Au final, aujourd'hui, l'ensemble des coûts engendrés par un hémophile sévère est de 800 000 € par an en moyenne (Poster P190 ECTH 2018 B. Polack et al.) en France.

- [0016] En France, selon l'étude HAS 2019, 1944 patients sont traités en prophylactique : pour la molécule de type Advate® : 20 à 40 UI (Unité internationale) de FVIII/kg tous les 2 à 3 jours / Novoeight® : 20 à 40 UI de FVIII/kg tous les 2 jours jusqu'à 50 UI 3 fois/semaine ; en cas d'hémorragie toutes les 8h à tous les 2 jours. Pour l'Hemlibra®, la population cible 1410 à 1880 patients, 1 fois/semaine ou toutes les 2 semaines pendant 4 semaines ou toutes les 4 semaines (HAS 2019 site internet et Protocole national de diagnostic de soin hémophilie V3 de 2019). Par convention, 1 UI = 100% de FVIII (ou FIX ou FXI) tel que décrit dans le [0007] de la présente description (IU correspond à la même chose, en anglais).
- [0017] En Inde, il y aurait une estimation de 170 000 hémophiles dont 100 000 ayant la forme sévère de la maladie. Avec une prophylaxie de 3 UI/personne cela donnerait un volume nécessaire de 4 milliards d'UI à 0.25 dollar/UI. Le cout total serait amené à 1 milliard de dollars/an (GFHT CoMETH 2019 - Symposium « L'hémophilie dans le monde » « Données épidémiologiques » de Alok Srivastava).
- [0018] Dans le monde, en 2018, le marché du traitement des hémophiles A était de 9,8 milliard de dollars. Ce marché est en constante augmentation avec une estimation de 15,8 milliard de dollars en 2026 (EAHAD 2020 - Symposium « Ethical aspect of gene therapy in children » de Rieke van der Graaf et site internet Fortune Business Insights « Hemophilia Drug Market »).
- [0019] Ces exemples illustrent que l'amélioration de la balance coût-efficacité est un réel enjeu international pour le traitement des hémophiles et en particulier des hémophiles A.
- [0020] La présente invention concerne, selon un mode de réalisation particulier, une classification de patients hémophiles, basée sur la cinétique de lyse du caillot de fibrine se formant dans un échantillon obtenu à partir de ces patients, ouvrant la possibilité d'un choix ou d'une personnalisation du traitement de fond suivi par les patients. Il en découle que la présente invention ouvre la voie, au niveau des laboratoires, à une prédiction du traitement adapté à chaque patient. Pour les cliniciens, les avantages attendus sont une meilleure caractérisation des patients par leur prédisposition à saigner, intégrant la variable que constitue leur risque de saignement faible, modéré ou élevé d'une part, et d'autre part un réel outil pour adapter le traitement. Parmi les avantages globaux autorisés par la présente invention, figurent la diminution des coûts de traitement, l'amélioration de la qualité de vie des patients et potentiellement une réduction du taux annuel de saignement.
- [0021] Il est connu de WO 2016/012729 une méthode de détermination du profil de structure d'un caillot de fibrine reflétant sa stabilité, pour prédire le risque de saignement, de thrombose ou de re-thrombose. Cependant, le protocole divulgué ne prévoit pas la possibilité de réalisation d'un classement de patients, en particulier hé-

mophiles, par une méthode statistique ou d'apprentissage, et la lyse doit être interprétée en utilisant deux longueurs d'ondes lors du test turbidimétrique réalisé, ce qui ajoute à la complexité d'implémentation de la méthode. Enfin, les réactifs de départ diffèrent.

[0022] Par ailleurs, l'état de l'art ne rapporte aucune méthodologie permettant d'envisager la dégradation d'un caillot de fibrine due à sa lyse chez les hémophiles, en tant que seul outil d'aide à la personnalisation du traitement de type facteur manquant administré à un patient hémophile, associé ou non à un traitement anti-fibrinolytique. Par contraste, la présente invention autorise une telle réalisation.

Description détaillée

[0023] La présente divulgation se propose de répondre aux problèmes susmentionnés.

[0024] Il est proposé une méthode de mesure *in vitro* de la dégradation du caillot de fibrine à partir d'une courbe de lyse d'un caillot de fibrine au cours du temps dans un échantillon de sang ou de plasma préalablement obtenu d'un patient susceptible d'avoir ou ayant un déficit en au moins un facteur de la coagulation, la méthode comprenant les étapes suivantes :

- a. Mélange de l'échantillon préalablement obtenu dudit patient avec une composition de réactifs comprenant du facteur tissulaire, des phospholipides, du t-PA (activateur tissulaire du plasminogène), et un ou plusieurs activateur(s) de la voie intrinsèque de la coagulation, notamment un ou plusieurs de ces activateur(s) choisi(s) parmi : l'acide ellagique, la silice, le FIXa, le FXIa, et optionnellement un ou plusieurs facteur(s) de coagulation manquant chez le patient analysé, notamment choisi(s) parmi: le FVIII, le FIX, le FXI ou un mélange de deux ou plusieurs de ces facteurs;
- b. Incubation du mélange obtenu en a., puis
- c. Déclenchement de la coagulation par ajout d'ions calciums au mélange incubé à l'étape b. pour permettre la formation d'un caillot de fibrine dans le mélange, puis permettre la lyse du caillot formé, et
- d. mesure de la cinétique de dégradation du caillot de fibrine formé et dégradé pendant la lyse suite à l'étape c., et
- e. détermination d'une valeur de niveau basal du caillot de fibrine à un temps t1, le temps t1 étant choisi pour être situé entre le Tmax et le TL de la courbe de lyse du caillot de fibrine, et d'une valeur de niveau dégradé du caillot de fibrine à un temps t2 ultérieur, le temps t2 étant choisi pour être de 300 à 900 secondes après t1.

[0025] Les caractéristiques des moyens employés dans cette méthode vont être précisées ci-après.

[0026] Les caractéristiques exposées dans les paragraphes suivants peuvent, option-

nellement, être mises en œuvre, indépendamment les unes des autres ou en combinaison les unes avec les autres.

- [0027] Le Tmax d'une courbe de lyse d'un caillot de fibrine est une valeur aisément déterminable par l'homme du métier, et de façon conventionnelle. Lors de la formation d'un caillot de fibrine dans un échantillon, qui est naturellement suivie d'une fibrinolyse (processus de dégradation du caillot formé), une courbe reflétant l'état du caillot de fibrine dans l'échantillon passe nécessairement par un maximum (moment où la valeur mesurée, par exemple la variation de Densité Optique (DDO) maximale est atteinte, pendant toute la durée de mesure). Le temps pour atteindre ce maximum est noté Tmax. Dans la présente demande, on entend par « courbe de lyse d'un caillot de fibrine » la courbe mesurée et/ou tracée dans les temps indiqués dans la présente description, selon tout mode de réalisation, incluant la zone correspondant à la formation du caillot de fibrine et la zone correspondant à la dégradation du caillot de fibrine. La « courbe de lyse d'un caillot de fibrine » est ainsi synonyme, sauf si une interprétation différente découle du contexte, de la « courbe de génération et de lyse » ou de la « courbe mesurée » ou de la « courbe tracée », dans son intégralité.
- [0028] Le TL d'une courbe de lyse d'un caillot de fibrine est également une valeur aisément déterminable par l'homme du métier, et de façon conventionnelle. Il s'agit de la valeur de temps correspondant à 50% de la valeur maximale (mesurée à Tmax donc), déterminable une fois observé sur l'échantillon testé le retour à l'amplitude initiale de la valeur du caillot de fibrine, c'est-à-dire l'amplitude observable avant génération du caillot de fibrine.
- [0029] De la sorte, le temps t1 est un temps situé entre le Tmax et le TL de la courbe de lyse du caillot de fibrine, qui peut donc être situé soit dans le plateau (entre Tmax et T90% du max) de la courbe, ou après le plateau (entre T90% du max et TL).
- [0030] Selon l'invention, le temps t2 est choisi dans une plage de valeurs fixe après t1. Conventionnellement, une courbe de génération et de lyse d'un caillot de fibrine démarre après le déclenchement de la réaction par l'ajout d'ions calcium (ce qui correspond au temps t0).
- [0031] Le choix optimal des temps t1 et t2 dans les plages susmentionnées peut être fait par l'homme du métier par détermination des temps qui rendent les résultats de meilleure qualité en analyse discriminante quadratique. Les inventeurs ont par exemple déterminé le pourcentage de bonne classification en analyse discriminante quadratique avec, dans un premier temps, un seul paramètre, comme décrit en [Fig.15]. Puis, les inventeurs ont travaillé avec une combinaison de paramètres, comme décrit en [Fig.16]. L'on voit que la variation observée de pourcentages de bonne classification permet à l'homme du métier d'aisément vérifier si les temps t1 et t2 employés sont choisis de façon optimal.

[0032] Selon l'invention, la méthode peut être réalisée sur la base d'un échantillon de sang ou de plasma préalablement obtenu d'un patient susceptible d'avoir ou ayant un déficit en au moins un facteur de coagulation. Selon des modes de réalisation particuliers, le ou les facteur(s) de coagulation manquant(s) est(sont) choisi(s) parmi : le facteur VIII, le facteur IX, le facteur XI. Selon d'autres aspects, la méthode peut être réalisée sur un échantillon :

- i. Dont le patient est sous thérapie avec une supplémentation avec au moins un facteur de coagulation, recombinant ou non, choisi parmi : le facteur VIII (recombinant ou non), le facteur IX (notamment un concentré de facteur IX) (recombinant ou non), le facteur XI (recombinant ou non), et /ou
- ii. Dont le patient est sous thérapie avec un traitement aux anticorps bi-spécifiques, par exemple, l'emicizumab ou Hemlibra® (Roche) ou
- iii. Dont le patient est sous thérapie avec du facteur VIIa, recombinant ou non, par exemple, le NovoSeven® (NovoNordisk), ou
- iv. Dont le patient est sous thérapie avec un traitement dirigé à la fois contre l'hémophilie A et l'hémophile B, comme le Fitusiran® (Sanofi) ou le Concizumab® (NovoNordisk) ou le Marstacimab® (Pfizer), ou
- v. Dont le patient est sous thérapie avec un traitement anti-fibrinolytique, par exemple l'Exacyl® ou acide tranexamique (Cheplapharm).

[0033] Le Fitusiran® est un ARNi complémentaire de l'AT, inhibiteur de la coagulation.

[0034] Les Marstacimab® et Concizumab® sont des anticorps spécifiques du TFPI, également inhibiteur de la coagulation.

[0035] S'agissant d'un patient sous thérapie avec un traitement anti-fibrinolytique, ce type de traitement est chez un hémophile généralement envisagé aujourd'hui dans le cas d'extraction dentaire chez les hémophiles sévères, modéré et mineurs sans inhibiteurs (HAS 2019, Steve Chaplin 2016 DOI 10.17225/jhp00085). Ce traitement est par ailleurs connu pour éviter le saignement chez le patient polytraumatisé. La littérature rapporte l'emploi de l'acide tranexamique en clinique à des doses $\geq 1 \text{ g} / 3\text{x}$ par jour (Forbes et al. 1972 DOI 10.1136/bmj.2.5809.311) ce qui peut être considéré comme équivalent à une dose $\geq 15 \text{ mg/kg}$ chez un patient hémophile. Les données de pharmacocinétique de l'acide tranexamique montrent qu'à 15 mg/kg , la concentration plasmatique est de $2 \mu\text{g/mL}$ (Steve Chaplin 2016 DOI 10.17225/jhp00085).

[0036] S'il est anticipé qu'à cette concentration plasmatique de 15 mg/kg d'acide tranexamique chez un patient hémophile, une courbe de lyse d'un caillot de fibrine reste exploitable, selon un mode de réalisation particulier, il est préféré que la concentration plasmatique d'acide tranexamique dans l'échantillon testé ne dépasse pas $5 \mu\text{g/mL}$. On peut prévoir qu'un traitement au TXA conduisant à une concentration plasmatique de $5 \mu\text{g/mL}$ d'acide tranexamique dans l'échantillon conduirait à obtenir une DDO

(variation de densité optique) au temps t2 qui soit identique à la DDO (variation de densité optique) au temps t1. Si une courbe de lyse peut toujours être obtenue, cette situation rendrait l'exploitation de la courbe en vue d'une conclusion, difficile. Il reste cependant possible de réaliser un monitoring, notamment pour les posologies donnant de faibles concentrations plasmatiques de TXA, la méthode autorisant par ailleurs une variation appréciable de concentration plasmatique de TXA compte tenu des posologies généralement utilisées.

- [0037] Selon un mode de réalisation, les échantillons analysés proviennent de patients diagnostiqués hémophiles. Selon des modes de réalisation particuliers, les patients sont des hémophiles A (déficience en FVIII) ou hémophiles B (déficience en FIX) ou hémophiles C (déficience en FXI). La méthode de référence pour le diagnostic de l'hémophilie est le dosage du taux de Facteur VIII ou Facteur IX, qui permet de confirmer une hémophilie sévère lorsque le taux est inférieur à 1% du taux normal attendu, modérée lorsqu'il est compris entre 1% et 5% et mineure lorsqu'il est compris entre 5% et 40% (taux de facteur manquant présentés plus haut). Cependant, comme indiqué précédemment, le taux de facteur manquant ne préjuge pas du risque de saignement. Deux types de méthodes conventionnelles existent. La méthode de type « one stage clotting assay », qui est dérivée de la mesure du TCA, ou la méthode de type « chromogenic assay » qui se base sur la mesure indirecte du FVIII par génération de FXa et clivage d'un substrat spécifique. Il est renvoyé à la littérature : Srivastava et al. 2013 DOI 10.1111/hae.14046 et Srivastava et al. 2020 DOI 10.1111/hae.14046 - § Recommandation 3.2.9.
- [0038] Selon un mode de réalisation particulier, dans le cas où l'échantillon analysé provient d'un patient qui est sous thérapie avec un traitement anti-fibrinolytique qui est l'acide tranexamique, et en particulier, mais pas nécessairement, que ce patient a été diagnostiqué hémophile, l'échantillon analysé dans la méthode ici décrite est un échantillon dans lequel la concentration plasmatique d'acide tranexamique dans l'échantillon testé ne dépasse pas 5 µg/mL.
- [0039] Selon un mode de réalisation, l'échantillon de sang ou de plasma est un échantillon non dilué, de sang total ou de plasma, en particulier de plasma riche en plaquettes ou de plasma pauvre en plaquettes, de plasma contenant des microparticules plaquettaires, érythrocytaires ou toute autre cellule, de préférence est un échantillon de plasma pauvre en plaquettes.
- [0040] Selon un mode de réalisation particulier, si l'échantillon analysé est un échantillon de sang total, t2 est choisi 650 secondes après t1.
- [0041] Selon un mode de réalisation particulier, si l'échantillon analysé est un échantillon de plasma, t2 est choisi 600 secondes après t1.
- [0042] Selon un mode particulier de réalisation, à l'étape a) de la méthode, le facteur

tissulaire, les phospholipides, l'activateur de la voie intrinsèque de la coagulation, le t-PA (activateur tissulaire du plasminogène), et optionnellement du facteur de coagulation manquant chez le patient analysé sont préalablement mélangés, puis le tout est ajouté à l'échantillon de sang ou de plasma à analyser, lequel est non dilué.

- [0043] Selon un mode particulier de réalisation, l'échantillon ajouté l'est dans un volume de 200 μL , pour un volume final de mélange réactionnel de 300 μL .
- [0044] Selon un mode particulier de réalisation, dans l'étape a., le facteur tissulaire est présent dans la composition de réactifs en quantité telle que la concentration finale de facteur tissulaire dans le mélange sur lequel la mesure de la cinétique est réalisée dans l'étape d. est comprise entre 0,01 et 5,0 pM.
- [0045] Selon un mode particulier de réalisation dans lequel l'échantillon analysé est un échantillon de sang total, le facteur tissulaire est, dans l'étape a., présent dans la composition de réactifs en quantité telle que la concentration finale de facteur tissulaire dans le mélange sur lequel la mesure de la cinétique est réalisée dans l'étape d. est comprise entre 0,01 et 5,0 pM, ou entre 2,0 et 5,0 pM, en particulier est de 2,0 pM.
- [0046] Selon un mode particulier de réalisation dans lequel l'échantillon analysé est un échantillon de plasma, le facteur tissulaire est, dans l'étape a., présent dans la composition de réactifs en quantité telle que la concentration finale de facteur tissulaire dans le mélange sur lequel la mesure de la cinétique est réalisée dans l'étape d. est comprise entre 0,01 et 1,0 pM, ou entre 0,1 et 0,7 pM, plus préférentiellement entre 0,3 et 0,6 pM, en particulier est de 0,5 pM.
- [0047] Selon un mode particulier de réalisation, dans l'étape a., les phospholipides sont présents dans la composition de réactifs en quantité telle que la concentration finale de phospholipides dans le mélange sur lequel la mesure de la cinétique est réalisée dans l'étape d. est comprise entre 1 et 10 μM , ou entre 3 et 7 μM , plus préférentiellement entre 3 et 5 μM , en particulier est de 4 μM .
- [0048] Selon un mode particulier de réalisation, dans l'étape a., l'activateur de la voie intrinsèque de la coagulation, notamment choisi parmi un ou plusieurs de : l'acide ellagique, de la silice, le FIXa, le FXIa est présent dans la composition de réactifs en quantité telle que la concentration finale d'activateur dans le mélange sur lequel la mesure de la cinétique est réalisée dans l'étape d. est comprise entre 1 et 1000 pM, ou entre 10 et 200 pM, plus préférentiellement entre 75 et 200 pM, en particulier est de 100 pM, notamment l'activateur est le FXIa à 100 pM.
- [0049] Selon un mode particulier de réalisation, dans l'étape a., l'activateur de la voie intrinsèque de la coagulation, lorsqu'il est de l'acide ellagique ou de la silice, est présent dans la composition de réactifs en quantité telle que la concentration finale d'activateur dans le mélange sur lequel la mesure de la cinétique est réalisée dans l'étape d. est comprise entre 1 et 1000 pM, ou entre 10 et 900 pM, ou entre 20 et 800 pM, ou entre

30 et 700 pM, ou entre 40 et 600 pM, ou entre 50 et 500 pM, ou entre 60 et 400 pM, ou entre 70 et 300 pM, ou entre 80 et 200 pM, ou entre 90 et 100 pM, en particulier est de 1000 pM.

- [0050] Selon un mode particulier de réalisation, dans l'étape a., l'activateur de la voie intrinsèque de la coagulation, lorsqu'il est du FIXa ou du FXIa, est présent dans la composition de réactifs en quantité telle que la concentration finale d'activateur dans le mélange sur lequel la mesure de la cinétique est réalisée dans l'étape d. est comprise entre 1 et 200 pM, ou entre 10 et 200 pM, plus préférentiellement entre 75 et 200 pM, en particulier est de 100 pM, notamment l'activateur est le FXIa à 100 pM.
- [0051] Selon un mode particulier de réalisation, dans l'étape a., le t-PA (activateur tissulaire du plasminogène) est présent dans la composition de réactifs en quantité telle que la concentration finale de t-PA (activateur tissulaire du plasminogène) dans le mélange sur lequel la mesure de la cinétique est réalisée dans l'étape d. est comprise entre 0,01 et 5 µg/mL, ou entre 0,1 et 2 µg/mL, en particulier est de 0,13 µg/mL.
- [0052] Selon un mode particulier de réalisation, dans l'étape a., le facteur de coagulation manquant chez le patient analysé, notamment choisi parmi un ou plusieurs de : le FVIII, le FIX, le FXI, est présent le mélange sur lequel la mesure de la cinétique est réalisée dans l'étape d., dans une concentration comprise entre 0 et 0,4 UI/mL, ou entre 0 et 0,2 UI/mL, ou entre 0 et 0,1 UI/mL, ou entre 0 et 0,05 UI/mL, ou entre 0 et 0,025 UI/mL, en particulier dans une concentration de 0,015 UI/mL.
- [0053] On entend que le facteur manquant peut être présent ou non. En effet, bien qu'un « facteur manquant » soit en carence chez un patient, on comprendra qu'un patient diagnostiqué hémophile est généralement traité pour compenser cette absence, par administration de facteur manquant, de sorte qu'il est attendu que l'échantillon analysé puisse comprendre une concentration comme susmentionné sans démarche particulière à cet effet. A l'inverse, il est également possible, selon un mode de réalisation particulier, d'apporter une quantité de facteur manquant par apport extrinsèque dans le mélange à analyser, ou de systématiquement compléter les échantillons à analyser par apport extrinsèque dans le mélange à analyser. Sans être indispensable à la mise en œuvre de la méthode ici décrite, une supplémentation homogène peut en effet permettre de normaliser les résultats.
- [0054] Selon un mode de réalisation particulier, à l'étape b. l'incubation du mélange obtenu de l'étape a. est effectuée entre 20 et 39°C, de préférence à 37°C pendant 2 à 10 minutes, notamment 5 minutes, en particulier à 37°C pendant 5 minutes, puis l'ajout d'ions calciums au mélange incubé est réalisé dans une quantité permettant une concentration finale d'ions calciums entre 5 et 25 mM, de préférence 17 mM.
- [0055] Selon un mode de réalisation particulier, l'échantillon de sang ou de plasma obtenu du patient et utilisé pour la méthode a un volume compris entre 5 µL et 500 µL, de

préférence compris entre 50 μL et 400 μL , de préférence compris entre 50 μL et 300 μL , de préférence compris entre 100 μL et 300 μL , de préférence d'environ 200 μL .

[0056] Selon des modes de réalisation particuliers distincts, la cinétique de dégradation du caillot de fibrine due à sa lyse à l'étape d. de la méthode est obtenue par toute méthode de mesure d'une cinétique de dégradation dudit caillot de fibrine due à sa lyse, notamment une méthode choisie parmi : une méthode viscoélastique, une méthode rhéométrique, une méthode acoustique, une méthode optique, une méthode d'analyse d'un tracé d'onde (waveform analysis), une méthode fluorométrique, une méthode de résonance magnétique, une méthode turbidimétrique, en particulier est réalisée par turbidimétrie (absorbance et transmittance) ou par une méthode viscoélastique (par exemple ROTEM, ou Quantra).

[0057] L'évolution d'un caillot de fibrine formé suite à une génération de thrombine, comme mis en œuvre dans la présente méthode, est indépendante du type de méthode de mesure permettant de tracer sa cinétique d'évolution. L'évolution passe nécessairement par une étape de dégradation du caillot de fibrine due à sa lyse. La méthode ici décrite est basée sur la réalisation d'une cinétique de dégradation du caillot de fibrine pendant la lyse. On suit en général une courbe de lyse d'un caillot de fibrine au cours du temps jusqu'au retour à l'amplitude initiale, c'est-à-dire l'amplitude observable avant génération du caillot de fibrine. Il découle de ce qui précède que toute méthode permettant de suivre l'évolution de la lyse du caillot de fibrine, notamment pendant un temps suffisamment long pour observer un retour à l'amplitude initiale, peut convenir pour la mise en œuvre de l'invention ici décrite. La littérature comprend des exemples d'implémentation de diverses méthodes, de façon conventionnelle. Des exemples sont ici cités. La présente demande présente des exemples employant une méthode turbidimétrique permettant de mesurer la densité optique (encore appelée absorbance) de l'échantillon analysé au cours du temps. Sont également présentés des résultats obtenus par une méthode de mesure viscoélastique (où une amplitude de signal en millimètres est mesurée), en sang total. Ces modes de réalisation ne sont cependant pas limitatifs puisque le principe sur lequel est basé la présente invention, à savoir l'observation de la cinétique de lyse par le biais d'une telle courbe, et un traitement subséquent sur la base de valeurs qui en sont extraites, est indépendant de la méthode de mesure employée. De façon originale, la méthode de mesure de l'invention prend en compte comme paramètres pertinents non seulement la vitesse de dégradation d'un caillot de fibrine dans un échantillon analysé, mais également le niveau basal dudit caillot.

[0058] Comme indiqué ci-dessus, l'observation de la lyse du caillot se fait, de façon conventionnelle, sur un temps incluant le retour à l'amplitude initiale, le caillot étant alors totalement dégradé. Le temps de retour à l'amplitude initiale peut varier en fonction de la

méthode de mesure employée, est n'est donc pas limitatif. On prolongera l'observation pendant le temps nécessaire.

- [0059] Selon un mode de réalisation particulier impliquant une méthode de mesure par turbidimétrie, notamment par mesure de la variation de Densité Optique (DDO) de l'échantillon analysé (encore appelée Absorbance dans la littérature, avec des valeurs arbitraires car sans dimension, reliées au type d'appareil utilisé et un échantillon contrôle pour une calibration), la mesure de la cinétique de dégradation se fait à une longueur d'onde comprise entre 350 et 800 nm, de préférence à 540 nm, et pendant une durée entre 1400 et 3600 secondes, ou entre 1400 et 2400 secondes, à compter du déclenchement de la coagulation par ajout d'ions calcium. On note que dans la présente description, l'expression « DDO » est utilisée pour signifier cette « variation de densité optique » mesurée. Ceci nécessite la mesure d'une densité optique (DO) au niveau d'une courbe (de lyse) de façon à en déterminer la valeur sur la courbe. L'expression « paramètre de DDO » ou « paramètre de DDO à deux temps » sont également employées et signifient la même chose, c'est-à-dire la mesure d'une valeur de Densité Optique, l'invention étant basée sur la mesure de deux valeurs de Densité Optique (DO) à deux temps différents sur une courbe de lyse telle que mesurée dans la présente invention. La mesure d'un paramètre de densité optique à un temps donné correspond donc à la mesure d'un paramètre de « DDO » dans la présente description.
- [0060] Selon un mode de réalisation particulier impliquant une méthode de mesure par viscoélastométrie, notamment par mesure d'une amplitude de courbe en millimètres, la mesure de la cinétique de dégradation se fait pendant une durée entre 1400 et 3600 secondes à compter du déclenchement de la coagulation par ajout d'ions calcium.
- [0061] Selon l'invention, on détermine dans l'étape e. de la méthode, deux valeurs pendant cette durée d'observation : une valeur de niveau basal du caillot de fibrine à un temps t1 de la lyse et une valeur de niveau dégradé du caillot de fibrine à un temps t2, le temps t2 étant ultérieur au temps t1.
- [0062] La mesure faite au temps t1 correspond à une valeur reflétant la fin de la polymérisation du caillot (après sa stabilisation et avant ou au début de sa lyse), ou la phase initiale de la lyse du caillot de fibrine, t1 étant choisi dans la partie plateau ou au début de la courbe de lyse. En effet, t1 est un temps situé entre le Tmax et le TL de la courbe de lyse du caillot de fibrine, qui peut donc être situé soit dans le plateau (entre Tmax et T90% du max) de la courbe, ou après le plateau (entre T90% du max et TL).
- [0063] La mesure faite au temps t2 correspond à une valeur reflétant le caillot de fibrine dégradé ou partiellement dégradé.
- [0064] Il est renvoyé à la description plus haut s'agissant d'une détermination plus fine des temps t1 et t2 qu'il est possible de retenir. L'homme du métier peut aisément vérifier si les temps t1 et t2 choisis sont appropriés. t1 et t2 peuvent également varier en fonction

de la concentration de l'activateur t-PA (activateur tissulaire du plasminogène) utilisé *in vitro* dans la méthode et éventuellement du type de méthode employée (par exemple méthode turbidimétrique ou viscoélastique). Les temps t1 et t2 restent cependant choisis dans les plages de mesure ici décrites, et peuvent être optimisés en vérifiant les valeurs qui donnent les meilleurs pourcentages de classification en analyse discriminante quadratique, notamment dans les conditions de réalisation suivantes de mesure de l'échantillon :

- [0065] A) Pour une méthode turbidimétrique : le FT (facteur tissulaire) à 0.5 pM et les PPL (phospholipides) à 4 µM sont mélangés avec le FXIa à 100 pM, et du t-PA (activateur tissulaire du plasminogène) à 0.13 µg/mL (valeurs finales du test plasma),
- [0066] B) Pour une méthode viscoélastique : le FT (facteur tissulaire) à 2.2 pM et les PPL (phospholipides) à 8 µM sont mélangés avec le FXIa à 200 pM, et du t-PA (activateur tissulaire du plasminogène) à 0.07 µg/mL (valeurs finales du test sang total).
- [0067] Selon un mode de réalisation où la mesure est faite par turbidimétrie, le temps t1 est choisi dans la plage entre 700 et 900 secondes à compter du déclenchement de la coagulation par ajout d'ions calcium et le temps t2 est choisi dans la plage entre 1100 à 1400 secondes à compter du déclenchement de la coagulation par ajout d'ions calcium.
- [0068] Selon un mode de réalisation particulier, préféré en cas de turbidimétrie, t1 est défini entre 700 et 800 secondes, de préférence est défini à 750 secondes et t2 est défini entre 1300 et 1500 secondes, de préférence est défini à 1400 secondes.
- [0069] Dans un mode de réalisation particulier où la mesure est faite par turbidimétrie, t1 est défini à 750 secondes à compter du déclenchement de la coagulation par ajout d'ions calcium et t2 est défini à 1400 secondes à compter du déclenchement de la coagulation par ajout d'ions calcium.
- [0070] A noter, le choix des temps t1 et t2 peut se faire, dans une méthode de mesure viscoélastique, comme dans une méthode turbidimétrique comme précédemment décrit, sur la base de la bonne classification en analyse discriminante quadratique. En effet, comme indiqué en [Fig.17], le nombre de classements corrects obtenu est à 100% en prenant les mêmes valeurs de temps que celles utilisées en méthode turbidimétrique (750 sec et 1400 sec). De ce fait les temps indiqués ci-dessus pour une méthode où la mesure est faite par turbidimétrie, peuvent également être transposés à une méthode de mesure viscoélastique.
- [0071] Selon un mode de réalisation particulier où la mesure est faite par une méthode de mesure viscoélastique, le temps t1 est choisi dans la plage comprise de 900 à 1200 secondes à compter du déclenchement de la coagulation par ajout d'ions calcium et le temps t2 est choisi dans la plage comprise de 1500 à 1800 secondes à compter du déclenchement de la coagulation par ajout d'ions calcium.
- [0072] Selon un mode de réalisation particulier où la mesure est faite par une méthode de

mesure viscoélastique, t1 est défini à 900 secondes à compter du déclenchement de la coagulation par ajout d'ions calcium et t2 est défini à 1500 secondes à compter du déclenchement de la coagulation par ajout d'ions calcium.

- [0073] Selon un mode de réalisation particulier où la mesure est faite par une méthode de mesure viscoélastique, t1 est défini à 1200 secondes à compter du déclenchement de la coagulation par ajout d'ions calcium et t2 est défini à 1800 secondes à compter du déclenchement de la coagulation par ajout d'ions calcium.
- [0074] Les valeurs obtenues (mesurées sur la courbe, ou mesurées à t1 et t2) pour quantifier le niveau basal du caillot de fibrine et le niveau dégradé du caillot de fibrine, constituent des paramètres de la cinétique de la dégradation du caillot de fibrine, mesurés à deux temps. Les mesures effectuées à t1 et t2 permettent, quelle que soient leur expression (par exemple, l'absorbance pour une méthode turbidimétrique ou l'amplitude en millimètres pour une méthode viscoélastique), de fournir une information concernant à la fois la vitesse de la lyse mais également le niveau basal du caillot de fibrine, mesuré à t1, qui « reflète la fin de polymérisation du caillot » à l'état initial. En effet, comme montré en [Fig.2], les cinétiques de lyse expérimentalement observées permettent de distinguer plusieurs profils différents.
- [0075] Le groupe portant le chiffre 3 (Groupement 3) sur la [Fig.2] et dans la présente description, a un niveau basal de caillot de fibrine bas et une lyse raccourcie.
- [0076] Le groupe portant le chiffre 2 (Groupement 2) sur la [Fig.2] et dans la présente description, a un niveau basal de caillot de fibrine intermédiaire et une lyse normale.
- [0077] Le groupe portant le chiffre 1 (Groupement 1) sur la [Fig.2] et dans la présente description, a un niveau basal de caillot de fibrine élevé et une lyse retardée.
- [0078] En parallèle avec l'observation des différences de profil de lyse susmentionnées, les inventeurs ont pu mettre en évidence, statistiquement, trois groupes d'échantillons parmi ceux testés, sur la base des deux paramètres de DO (densité optique) à 2 temps ici rapportés, en utilisant une analyse hiérarchique centrée et normalisée, comme également indiqué dans la partie expérimentale. Enfin, une classification en 3 groupes de patients a été confirmée sur un autre set de données provenant de nouveaux patients sélectionnés dans un autre site.
- [0079] Il est cependant anticipé que ce nombre de 3 groupes retenu dans la présente demande au regard des sets d'échantillons analysés dont les résultats sont exposés, peut évoluer en fonction des échantillons retenus. Il est en effet envisageable, par exemple lorsque des échantillons ayant un taux de 0% de facteur manquant sont inclus, d'avoir plus de groupes afin de permettre de discriminer particulièrement les plasmas sans traitement.
- [0080] Par exemple, avec la base de données employée pour les résultats ici décrits, et un critère de 90% de similarités employé dans une analyse hiérarchique centrée

normalisée, un total de 8 groupes ont pu être mis en évidence. A l'inverse, la mise en œuvre d'une l'analyse hiérarchique complète normalisée en 2 groupes a permis de séparer le groupe n°3 (avec les concentrations 0% du groupe n°2) des 2 autres groupes.

- [0081] Les inventeurs ont ensuite obtenu un taux de classement correct de 100% en analyse discriminante quadratique et de 99% (3 erreurs) par la méthode des K-means normalisée (analyses réalisées sur Minitab).
- [0082] C'est ainsi que, outre le fait qu'ils permettent de caractériser un comportement (profil) d'un caillot de fibrine chez un patient, les couples de données constitués par les valeurs obtenues aux temps t1 et t2, et les temps t1 et t2 peuvent également, et selon un autre aspect de l'invention, servir de classificateurs aux fins de distinguer les différents profils susmentionnés. Les paramètres déterminés dans la présente invention peuvent donc permettre, selon un autre aspect de l'invention, de classer un échantillon analysé, en fonction du comportement du caillot lors de la lyse, et notamment en fonction de la vitesse de la lyse mais aussi du niveau basal du caillot de fibrine, mesuré à t1, qui « reflète la fin de polymérisation du caillot », par rapport à un groupe d'apprentissage construit dans les mêmes conditions.
- [0083] Dans le présent texte, les termes « classification » et « classement » peuvent être employés de façon interchangeable et sont synonymes.
- [0084] Selon l'invention, toute méthode d'analyse non supervisée peut être utilisée pour classer en groupes. Une telle méthode peut le cas échéant être complétée par toute méthode supervisée pour vérifier le classement. De même, toute méthode d'analyse supervisée peut être utilisée pour prédire un classement.
- [0085] A cet égard, lorsqu'une méthode statistique d'apprentissage non-supervisée est utilisée, le nombre de groupe est une donnée d'entrée pour la réalisation de la méthode, ce qui permet à l'homme du métier de moduler l'implémentation de la méthode ici décrite selon ses besoins d'investigation. Les éléments ici présentés permettent à l'homme du métier de choisir le mode de réalisation le plus approprié pour ses besoins d'investigation.
- [0086] Selon différents modes de réalisation indépendants, un modèle de classification peut être utilisé, le cas échéant, pour définir des groupes.
- [0087] Un modèle de classification est obtenu par une méthode d'apprentissage non supervisée ou supervisée entraînée sur des données d'apprentissage traitées dans les mêmes conditions expérimentales que celles qui sont appliquées à l'échantillon de sang ou de plasma dont l'analyse est recherchée par la méthode ici décrite.
- [0088] Selon l'invention, une méthode d'analyse non supervisée peut être choisie parmi : une analyse hiérarchique, notamment une analyse hiérarchique centrée et normalisée ou une méthode K-means.
- [0089] Les paramètres pertinents pour la mise en œuvre de telles méthodes non supervisées

sont :

- a. Le nombre de groupes ou similarité
- b. La méthode de liaison
- c. La mesure de la distance
- d. La normalisation

[0090] Dans la partie expérimentale de la présente demande, les paramètres qui ont été utilisés sont : a : 3 groupes, b : liaison centrée, c : distance euclidienne et d : valeurs normalisées. L'homme du métier peut se référer à la littérature, ou même simplement à la documentation du logiciel Minitab (Observations en groupes – Généralités) pour la mise en œuvre d'une telle méthode avec ses différents paramètres.

[0091] Selon l'invention, une méthode d'analyse supervisée peut être choisie parmi : une analyse discriminante (quadratique), la régression logistique ou une méthode « random forest ».

[0092] Les paramètres pertinents pour la mise en œuvre de telles méthodes supervisées sont :

- a. La fonction discriminante : Linéaire ou quadratique
- b. Méthode « random forest » : le nombre de facteur par arbres / nombre d'arbres
- c. Régression logistique : multinomiale (régression logistique) / groupement de référence

[0093] Dans la partie expérimentale de la présente demande, les paramètres qui ont été utilisés sont : a : analyse discriminante quadratique (référence bibliographique : documentation du logiciel Minitab (Généralités)), b : deux facteurs par arbre, 3000 arbres (référence bibliographique : Leo Breiman 2001 Random Forest, Machine Learning 45, 5-32), c : Régression logistique multinomiale avec le groupe n°2 choisi comme groupe de référence choisi n°2 (analyse similaire obtenue avec groupe de référence n°1 ou n°3) (référence bibliographique : logiciel R: Fit Multinomial Log-linear Models (r-project.org) et Venables and Ripley 2002 Modern Applied Statistics with S. Fourth edition).

[0094] L'homme du métier peut se référer à la littérature susmentionnée pour la mise en œuvre de ces méthodes, avec leurs différents paramètres.

[0095] Les groupes obtenus par apprentissage reflètent différents comportements de dégradation due à la lyse d'un caillot de fibrine chez des patients tels que représentés dans la base de données d'apprentissage.

[0096] Selon un mode particulier de réalisation, la méthode d'apprentissage supervisée utilisée est une méthode d'analyse discriminante, plus particulièrement, une méthode d'analyse discriminante quadratique. Les caractéristiques d'implémentation d'une telle méthode sont connues dans la littérature. Elle est implémentable par de nombreux

outils ou logiciels statistiques, par exemple *Minitab 18* et *R*.

[0097] L'analyse statistique de l'ensemble des échantillons est effectuée à l'aide d'un logiciel de statistique, de préférence, les logiciels *Minitab 18* et *R*.

[0098] Les données d'apprentissage peuvent être définies de façon conventionnelle par l'homme du métier. En l'espèce la partie expérimentale fournit des directives complètes pour l'échantillonnage retenu pour constituer la base de données de test.

[0099] La méthode statistique d'apprentissage non supervisée ou supervisée utilisée aboutit à la détermination d'un modèle ou de paramètres de classification qui sont ainsi définis et donc prédéterminés. En particulier, les deux paramètres à t_1 et t_2 sont utilisés pour l'analyse statistique. Ces modèles ou paramètres de classification prédéfinis permettent ensuite, le cas échéant, lors de la réalisation de l'étape de classement d'une méthode comme ici décrite, de classer l'échantillon analysé dans un groupe, au regard des valeurs mesurées à t_1 et t_2 dans l'étape e. pour l'échantillon analysé (qui servent de classificateurs).

[0100] L'on voit dans la partie expérimentale qu'il a été possible d'allouer, dans un contexte de prédiction sur la base d'un modèle ; chaque échantillon analysé à un groupe reflétant un comportement ou profil de lyse particulier du caillot de fibrine, avec fiabilité. En particulier, la [Fig.4] montre qu'il a été possible de définir trois groupes sans aucun chevauchement entre eux.

[0101] Les trois groupes notés de 1 à 3 qui ont été définis dans la partie expérimentale, au moyen d'une méthode de mesure turbidimétrique, dans les conditions de définition des temps t_1 et t_2 précitées, pour des plasmas de patients hémophiles A, correspondent à trois profils types de dégradation de la fibrine chez ce groupe de patients, comme montré en [Fig.2]. Ils ont chacun un taux de fibrinogène propre ([Fig.5] et [Fig.9]). Le groupe 3 ici défini est le groupe qui a un temps de lyse raccourci.

[0102] Selon un autre aspect, il est également envisagé de disposer d'une méthode de détermination d'un phénotype clinique d'un patient, basé sur son profil de dégradation de la fibrine, notamment de disposer d'un phénotype hémorragique clinique, qui indique la tendance hémorragique dudit patient. En effet, il est anticipé que la prédisposition d'un patient à saigner diffère selon les différents profils ici analysés. Selon cet aspect, la détermination du phénotype clinique, notamment du phénotype hémorragique clinique, prend avantage de la réalisation d'une méthode telle qu'ici décrite impliquant au moins une étape e. telle qu'ici décrite de détermination de valeurs aux temps t_1 et t_2 , comme développé dans la présente demande. Selon un aspect, la détermination du phénotype clinique, notamment du phénotype hémorragique clinique, prend également avantage de la réalisation d'un classement, comme ici décrit et développé dans la présente demande.

[0103] De fait, en fonction du classement qui peut être opéré sur la base de leur groupe de

profil de dégradation de leurs caillots de fibrine suite à la lyse desdits caillots, il est anticipé que les plasmas des patients analysés vont réagir différemment à un traitement thérapeutique (supplémentation en facteur manquant ou administration d'un anti-fibrinolytique) auquel sera soumis le patient. Il est en particulier fait références aux données expérimentales correspondant aux Figures 7A et 7B.

[0104] C'est ainsi que selon un autre aspect de l'invention, il est proposé une méthode de suivi d'un traitement thérapeutique administré à un patient susceptible d'avoir ou ayant un déficit en au moins un facteur de coagulation, comprenant les étapes suivantes :

- a. Mise en œuvre d'une méthode de réalisation d'une mesure in vitro d'une courbe de lyse d'un caillot de fibrine au cours du temps selon l'un quelconque des modes de réalisation ici décrits, notamment impliquant une mesure par turbidimétrie, sur un échantillon de sang ou de plasma obtenu dudit patient, à au moins un temps donné et éventuellement à un autre ou plusieurs temps ultérieur(s), ladite méthode incluant une étape f. de classement de l'échantillon testé dans un groupe reflétant un profil de lyse d'un caillot de fibrine ; et
- b. Sur la base du classement obtenu pour l'échantillon analysé dans un groupe reflétant un profil de lyse d'un caillot de fibrine chez ledit patient, conclusion concernant le déficit en facteur(s) de coagulation du patient analysé observé par la méthode de classement ou concernant l'état de santé dudit patient, et éventuellement conclusion concernant l'évolution dudit déficit en facteur(s) de coagulation du patient analysé ou de l'état de santé dudit patient si plusieurs classements effectués à des temps séparés et successifs sont disponibles.

[0105] Par « *patient susceptible d'avoir ou ayant un déficit en au moins un facteur de coagulation* » ou « *échantillon de sang ou de plasma obtenu dudit patient* » ou « *classement obtenu pour l'échantillon analysé dans un groupe reflétant un profil de lyse d'un caillot de fibrine chez ledit patient* » il est fait référence aux définitions et descriptions fournies plus haut dans le cadre de la méthode précédemment décrite. Les descriptions en rapport s'appliquent également au présent aspect, et les caractéristiques exposées tout au long de la présente description peuvent être intégrées indépendamment les unes des autres ou en combinaison les unes avec les autres, dans le présent aspect.

[0106] Les patients hémophiles sont généralement traités pour leur condition et suivent donc un traitement de fond, dont la posologie n'est pas nécessairement toujours optimisée, en particulier en vue de les amener dans un profil clinique limitant les risques comme par exemple le taux annuel de saignements, ou tout simplement pour leur assurer une amélioration de leur qualité de vie. C'est ici que le classement permis par la présente

invention permet de personnaliser soit le niveau seuil du traitement de fond, ou d'envisager un traitement complémentaire par anti-fibrinolytique, ou ajuster les deux types de traitement, à ces fins. Comme indiqué dans la partie expérimentale pour des patients hémophiles A.

- [0107] Les types de traitements de fond possibles pour les patients hémophiles A, B ou C consistent en l'administration de facteur VIII, IX ou XI, respectivement. Des formulations commerciales connues de facteur VIII incluent notamment les médicaments Advate® (Shire), Elocta® (Sanofi) et Jivi® (Bayer).
- [0108] Sont également connus des traitements anti-fibrinolytiques, notamment l'administration d'acide tranexamique (TXA), un dérivé synthétique de la lysine (médicaments Lysteda® ou Cyklokapron® (États-Unis), Transamin® ou Transcam® en Asie, Espencil® en Amérique du Sud et Exacyl® ou Spotof® en Europe), prescrit en cas de saignement excessif, en visant une inhibition du système fibrinolyse. L'acide tranexamique bloque la fixation du résidu lysine de la fibrine par la plasmine, l'enzyme responsable de la fibrinolyse. L'action normale de la plasmine, à savoir dissoudre le caillot (fibrinolyse) est ainsi bloquée. Il est prescrit dans l'hémophilie modérée à mineure sans inhibiteurs ou en cas de chirurgie (HAS 2019).
- [0109] On voit dans la partie expérimentale (Figure 7) que l'apport de TXA en complément d'un traitement de fond permet de modifier la cinétique de lyse d'un caillot de fibrine. En particulier, la cinétique de lyse suite à l'adjonction de TXA au traitement de fond, devient moins rapide. De ce fait, dans ce cas particulier c'est le groupe 3 de patients ici décrit, avec un temps de lyse raccourci, qui bénéficierait le plus d'un ajustement de son traitement avec l'apport de TXA. Il devient en effet possible de faire passer ces patients en groupe 2 suite à un ajustement de traitement (Figure 7). De même, l'invention permet d'envisager une personnalisation du niveau seuil du traitement de fond, en fonction d'un classement de départ ou à un temps donné dans un protocole thérapeutique.
- [0110] Par « *conclusion concernant l'état de santé dudit patient* » il est ainsi fait référence aux conclusions rendues possibles à partir d'une classification dans un groupe reflétant le profil de lyse d'un caillot de fibrine chez un patient, notamment concernant la question de savoir si le comportement de lyse du caillot est anormal.
- [0111] Alternativement, la méthode ici décrite permet simplement de qualifier par un classement dans un groupe, le profil de lyse d'un caillot de fibrine chez un patient en tant que paramètre physiologique, permettant le cas échéant de proposer des ajustements de posologie de traitement pour faire varier ce paramètre physiologique, notamment par rapport à des critères pré-établis.
- [0112] Par « *conclusion concernant l'évolution de l'état de santé dudit patient si plusieurs classements effectuées à des temps séparés sont disponibles* » il est fait référence à la

réitération du classement à un ou plusieurs temps d'intervalle chez un même patient, pour, par comparaison avec les données antérieures disponibles, évaluer l'évolution de la situation dudit patient, au regard le cas échéant d'une modification de son traitement, ou d'une absence de modification de son traitement. Par exemple, suite à un traitement, un patient peut changer de groupe, ou non. De même, suite à une absence de traitement, un patient peut changer de groupe, ou non.

[0113] Selon un mode de réalisation particulier, la méthode de suivi comprend en outre une étape d'ajustement du traitement thérapeutique suivi par ledit patient, en fonction du classement obtenu.

[0114] A titre d'exemple, l'administration d'un traitement anti-fibrinolytique peut être proposé à un patient dont l'échantillon a été classé en groupe 3, avec pour objectif de prolonger le temps de lyse du caillot de fibrine chez ce patient. Dans le cas de patients du groupe 1 ou 2, un ajustement du traitement de fond (posologie d'administration du facteur manquant) peut être proposé, pour optimiser le traitement au regard des effets obtenus sur la lyse des caillots de fibrine. Selon un autre exemple, à la fois un traitement anti-fibrinolytique et un ajustement du traitement de fond peut être proposé.

[0115] Selon des modes de réalisation particuliers, l'ajustement du traitement thérapeutique suivi par ledit patient, en fonction du classement obtenu peut consister :

- a. Si le classement révèle un risque élevé de saignements : évaluation de l'opportunité de ou passage à un traitement de fond complété par un traitement anti-fibrinolytique, par exemple de l'acide tranexamique (TXA) ;
- b. Si le classement révèle un faible risque de saignements : évaluation de l'opportunité de ou ajustement du traitement de fond pour en réduire la posologie ;
- c. Si le classement révèle un risque modéré de saignements : évaluation de l'opportunité de ou ajustement du traitement de fond pour en augmenter la posologie.

[0116] Un exemple particulier présentant des propositions d'ajustements spécifiques est inclus dans la partie expérimentale (Table 3) : les traitements proposés peuvent être combinés à la présentation générale faite ci-dessus.

[0117] Selon un autre aspect, il est proposé l'emploi d'acide tranexamique (TXA) ou d'une composition comprenant de l'acide tranexamique (TXA) pour son utilisation dans le traitement d'un patient susceptible d'avoir ou ayant un déficit en au moins un facteur de coagulation, en particulier un patient diagnostiqué hémophile, ladite utilisation comprenant la réalisation d'une méthode de mesure sur un échantillon dudit patient selon l'un quelconque des modes de réalisation ici décrits, le cas échéant avec un classement de l'échantillon, ou un suivi ou ou un ajustement du traitement thérapeutique dudit patient.

- [0118] Les définitions précitées s'appliquent à l'identique dans le cadre de cet aspect.
- [0119] Selon un mode de réalisation particulier, l'utilisation d'acide tranexamique (TXA) ou d'une composition comprenant de l'acide tranexamique (TXA) dans le traitement d'un patient sur l'échantillon de sang ou de plasma duquel une méthode de classement ou de suivi selon l'un quelconque des modes de réalisation ici décrits a été mise en œuvre, s'applique au cas où ledit échantillon de sang ou de plasma testé a été classé dans un groupe indiquant un temps de lyse d'un caillot de fibrine réduit, de type groupe 3 ici décrit (détermination d'un risque élevé de saignements – voir partie expérimentale, combinable avec la présentation générale ici faite).
- [0120] Par ailleurs, on remarque que l'étape impliquant la réalisation d'une cinétique de lyse d'un caillot de fibrine des méthodes ici décrites peut être avantageusement réalisée sur un automate de diagnostic, de préférence un analyseur de coagulation. Un tel dispositif peut également englober des moyens informatiques de traitement des données, permettant ainsi de réaliser avec un seul automate ou via des moyens appropriés, le cas échéant distants, également au moins une autre étape des méthodes ici décrites pouvant être mise en œuvre au travers d'un programme d'ordinateur ou d'un processeur.
- [0121] Selon un autre aspect, il est ainsi proposé un système de traitement de données ou un dispositif comprenant des moyens pour mettre en œuvre au moins l'étape e. de la méthode ici décrite ou l'étape f. de la méthode de classement ici décrite, selon l'un quelconque des modes de réalisation décrits, et le cas échéant également au moins une autre des étapes décrites dans un mode de réalisation de la présente description, et optionnellement comprenant des moyens pour fournir en entrée et/ou sortir les variables générées lors de ces étapes, pour retourner le résultat de classement prenant en compte les variables fournies en entrée, et optionnellement comprenant également un appareil de mesure de cinétique(s) de dégradation d'un caillot de fibrine, ou faisant appel à un appareil de mesure de cinétique(s) de dégradation d'un caillot de fibrine, notamment distant, et optionnellement comprenant également un processeur adapté pour mettre en œuvre lesdites étapes.
- [0122] Selon un autre aspect, il est proposé un programme d'ordinateur comprenant des instructions de code de programme pour l'exécution des étapes d'une méthode selon l'un quelconque des modes de réalisation ici décrits lorsque ledit programme est exécuté sur un ordinateur. Selon un mode particulier, le programme d'ordinateur permet de contrôler l'implémentation des étapes de la méthode et/ou de réaliser au moins en partie les opérations de calcul pour un classement ou une conclusion relative au suivi.
- [0123] Selon un mode de réalisation, le programme d'ordinateur comprend des instructions qui, lorsque le programme est exécuté par un ordinateur, conduisent celui-ci à mettre en œuvre au moins l'étape e. de la méthode ici décrite ou l'étape f. de la méthode de classement ici décrite, selon un quelconque mode de réalisation, et le cas échéant au

moins une autre des étapes de la méthode ici décrite, et optionnellement des instructions permettant également de récupérer en entrée et/ou fournir en sortie les variables générées lors de de ces étapes.

- [0124] Selon un mode de réalisation, le programme d'ordinateur comprend des instructions qui conduisent un système de traitement de données ou un dispositif comme ici décrit, notamment un dispositif incluant un appareil de mesure de cinétiques telles que définies dans l'un quelconque des modes de réalisation ici décrits ou un système de traitement de données ou un dispositif faisant appel à un tel appareil de mesure, notamment distant, à exécuter au moins l'étape e. de la méthode ici décrite ou l'étape f. de la méthode de classement ici décrite, et le cas échéant également au moins une autre des étapes de la méthode ici décrite, selon un quelconque mode de réalisation, notamment l'étape d. de la méthode ici décrite, selon un quelconque mode de réalisation.
- [0125] Selon un autre aspect, il est proposé un support d'enregistrement lisible par ordinateur comprenant des instructions qui, lorsqu'elles sont exécutées par un ordinateur, conduisent celui-ci à mettre en œuvre au moins l'étape e. de la méthode ici décrite ou l'étape f. de la méthode de classement ici décrite, et le cas échéant également au moins une autre des étapes de de la méthode ici décrite, selon un quelconque mode de réalisation, et optionnellement comprenant des moyens pour fournir en entrée et/ou sortir les variables générées lors de ces étapes, et/ ou pour retourner le résultat de classement prenant en compte les variables fournies en entrée, et optionnellement comprenant également des moyens pour donner des instructions à un appareil de mesure de cinétiques, notamment distant, pour la mise en œuvre d'une méthode ici décrite, selon un quelconque mode de réalisation
- [0126] Selon un autre aspect, il est proposé un support de données lisible par ordinateur sur lequel est enregistré le programme d'ordinateur ici décrit, ou un signal d'un support de données portant le programme d'ordinateur ici décrit.
- [0127] Selon un autre aspect, il est proposé un support d'enregistrement non transitoire lisible par un ordinateur sur lequel est enregistré un programme pour la mise en œuvre du méthode ici décrite, selon un quelconque mode de réalisation, lorsque ce programme est exécuté par un processeur.
- [0128] Selon un autre aspect, il est proposé un kit, en particulier adapté pour la mise en œuvre d'une méthode de mesure, de classement ou de suivi ici décrite, selon un quelconque mode de réalisation, comprenant:
- a. un ou plusieurs des réactifs suivants : du facteur tissulaire, des phospholipides, un activateur de la voie intrinsèque de la coagulation choisi parmi : l'acide ellagique, de la silice, le FIXa, du FXIa, ou plusieurs de ces derniers, du t-PA (activateur tissulaire du plasminogène), des ions calciums,

- b. Optionnellement, un facteur de coagulation choisi parmi le facteur VIII, le facteur IX, le facteur XI, ou plusieurs de ces derniers ,
- c. Optionnellement, un ou plusieurs tampons appropriés,
- d. Optionnellement des instructions pour la réalisation d'une ou de plusieurs cinétique(s) de dégradation d'un caillot de fibrine, et
- e. Optionnellement, un système et/ou dispositif et/ou programme d'ordinateur et/ou support de données lisible par ordinateur selon l'un quelconque des modes de réalisation ici décrits,
- f. Optionnellement, des instructions permettant de mettre en œuvre la méthode de mesure, de classement ou de suivi selon l'un quelconque des modes de réalisation ici décrits,
- g. Optionnellement, des instructions relatives à l'utilisation d'un signal d'un support de données, pour la mise en œuvre d'une méthode de mesure, de classement ou de suivi selon l'un quelconque des modes de réalisation ici décrits.

[0129] Dans la cadre d'un tel kit, toutes les caractéristiques divulguées dans d'autres parties de la présente description peuvent, isolément ou en combinaison, être intégrées.

Brève description des dessins

[0130] D'autres caractéristiques, détails et avantages apparaîtront à la lecture de la description détaillée ci-après, et à l'analyse des dessins annexés, sur lesquels :

Fig. 1

[0131] [Fig.1] montre un schéma explicatif de la méthode du test Coag-Lyse selon l'invention, commentée dans les Exemples. 1. 200µL plasma pur. 2. 50µL réactif FT t-PA FXIa. 3. Incubation à 37°C. 4. 50µL réactif calcique ; T0 du test. 5. Mesures de la DO. 6. Logiciel de post-traitement et analyse statistique

Fig. 2

[0132] [Fig.2] montre des profils types de dégradation de la fibrine de trois plasmas hé-mophiles A différents.

Fig. 3

[0133] [Fig.3] montre un schéma d'analyse des échantillons pour l'étude rapportée dans les exemples. Légende : 1. 26 gammes de 10 niveaux de FVIII [0-100%]. 2. Analyse non supervisée et supervisée. 3. Echantillons patients. 4. Analyse supervisée

Fig. 4

[0134] [Fig.4] montre une classification des patients selon le paramètre de DDO (variation de densité optique) à deux temps (Résultats par groupement).

Fig. 5

[0135] [Fig.5] montre le taux de fibrinogène en fonction de chacun des groupements.

Fig. 6

[0136] [Fig.6] montre l'écart de turbidité à deux temps en présence des plasmas hémophiles A sévères.

Fig. 7A et Fig. 7B

[0137] [Fig.7A] et [Fig.7B] montrent l'effet combiné du TXA 1 µg/mL en association au facteur manquant pour un plasma hémophile A avec une lyse raccourcie.

Fig. 8

[0138] [Fig.8] montre l'écart de turbidité à deux temps (étude phénotypique).

Fig. 9

[0139] [Fig.9] montre le taux de fibrinogène par groupement (étude phénotypique).

Fig. 10

[0140] [Fig.10] montre le taux de fibrinogène versus la valeur de DDO (variation de densité optique) au temps 1 (étude phénotypique).

Fig. 11

[0141] [Fig.11] montre le temps de lyse par groupement (étude phénotypique).

Fig. 12

[0142] [Fig.12] montre la vitesse de lyse par groupement (étude phénotypique).

Fig. 13A, Fig. 13B et Fig. 13C

[0143] [Fig.13A], [Fig.13B] et [Fig.13C] montrent un test sur l'automate ROTEM (méthode viscoélastique) à une concentration de 20% de FVIII (0.2 UI/mL) (Groupements 3, 2, et 1, respectivement).

Fig. 14A

[0144] [Fig.14A] montre l'écart d'amplitude à deux temps avec paramètres ROTEM A15 et A25.

Fig. 14B

[0145] [Fig.14B] montre l'écart d'amplitude à deux temps à 20 minutes et 30 minutes (méthode viscoélastique).

Fig. 15

[0146] [Fig.15] montre le pourcentage de bonne classification en analyse discriminante quadratique avec un seul paramètre (Densité Optique mesurée à un seul temps avec une méthode de mesure turbidimétrique).

Fig. 16

[0147] [Fig.16] montre les pourcentages de bonne classification en analyse discriminante quadratique avec deux paramètres (Densités Optiques mesurées à deux temps avec une méthode de mesure turbidimétrique), par rapport à un seul paramètre.

Fig. 17

[0148] [Fig.17] montre le pourcentage de bonne classification en analyse discriminante qua-

dratique avec un seul paramètre (Densité Optique mesurée à un seul temps avec une méthode de mesure viscoélastique).

Exemples

[0149] A. Le test Coag-Lyse

- [0150] La mesure dynamique de la formation et de la dégradation du caillot de fibrine est réalisée sur un ensemble d'échantillons. Le test, appelé test « Coag-Lyse » est un test turbidimétrique, automatisé et global de mesure de la formation et de la lyse du caillot de fibrine. L'invention prend avantage de la seule partie « lyse » de la courbe de formation et de lyse du caillot de fibrine, pour l'analyse. Le test est effectué en mélangeant l'échantillon plasmatique, non dilué, avec un réactif intermédiaire contenant une très faible concentration de facteur tissulaire (FT), des phospholipides (PPL), un activateur du plasminogène (t-PA) et un activateur de la voie intrinsèque, de préférence le facteur XIa (FXIa). Après incubation du mélange, le réactif calcium déclenche la génération de thrombine et la formation du caillot de fibrine qui commence rapidement à être dégradé par le t-PA (activateur tissulaire du plasminogène).
- [0151] Le test peut être effectué par tout instrument existant et notamment par un turbidimètre ou spectrophotomètre. Selon un mode de réalisation avantageux, les étapes de la méthode sont mises en œuvre sur un automate de type STA-R Max ou STA-R. Selon un mode de réalisation, l'échantillon de sang ou de plasma est un échantillon de plasma pauvre en plaquette. Il est notamment obtenu par centrifugation d'un tube citraté comprenant l'échantillon de sang de patient, pendant 15 minutes à une vitesse de 2000 à 2500 g, à une température comprise entre 18 et 22°C. L'échantillon peut également subir une seconde centrifugation pendant 15 minutes, à une vitesse de 2000 à 2500 g, à une température comprise entre 18 et 22°C. Ce traitement est conventionnel.
- [0152] Comme indiqué en [Fig.1], le FT (facteur tissulaire) et les PPL (phospholipides) sont mélangés avec un activateur de la voie intrinsèque, de préférence le FXIa, et le t-PA (activateur tissulaire du plasminogène). Selon un mode de réalisation, le FT (facteur tissulaire), les PPL (phospholipides), le FXIa et le t-PA (activateur tissulaire du plasminogène) sont mélangés aux concentrations suivantes : 0.5 pM, 4 µM, 100 pM et 0.13 µg/mL final test.
- [0153] Une quantité du facteur manquant peut être ajouté afin de permettre d'avoir une concentration final test compris entre 1,5 et 200 %. A cette fin, en fonction de la quantité initiale de facteur de l'échantillon (déterminable), le facteur manquant peut être ajouté par le réactif intermédiaire.
- [0154] L'échantillon de plasma, de préférence 200 µL, non dilué, est mélangé avec le réactif intermédiaire, de préférence 50 µL.
- [0155] Suit une étape d'incubation à 37°C du mélange puis d'ajout du réactif déclenchant à

base d'ions calciums dans le mélange ([Fig.1]), de préférence 50µL à 102 mM final réactif (17 mM final test), pour initier la génération de thrombine et la formation du caillot de fibrine ([Fig.1]).

- [0156] Puis, la variation de densité optique est lue ([Fig.1]) à une seule longueur d'onde comprise entre 350 et 800 nm, de manière dynamique (toutes les 2 secondes), de préférence à 540nm et pendant une durée de préférence de 1986 secondes (33 minutes).
- [0157] Le Fibrinogramme est la courbe qui montre l'évolution des propriétés physiques du caillot, de préférence l'évolution des propriétés optiques du caillot, au cours de la formation de fibrine jusqu'à sa lyse. Seule la lyse du caillot est nécessaire pour analyser un profil dans le cadre de la présente invention.
- [0158] La lyse est suivie en DDO (variation de densité optique) au cours du temps jusqu'au retour à l'amplitude initiale. La cinétique de DDO (variation de densité optique) au cours du temps ainsi obtenue permet de calculer des paramètres en DDO (variation de densité optique) aux deux temps.
- [0159] Dans le cadre de la présente partie expérimentale, les paramètres ou étapes qui ont été précisément employés ou réalisées pour obtenir les résultats exposés sont comme suit :
 - a. Le FT (facteur tissulaire) et les PPL (phospholipides) sont mélangés avec un activateur de la voie intrinsèque, le FXIa, et le t-PA (activateur tissulaire du plasminogène), aux concentrations suivantes : 0.5 pM, 4 µM, 100 pM et 0.13 µg/mL final test.
 - b. Incubation à 37°C du mélange puis ajout du réactif déclenchant à base d'ions calciums dans le mélange, 50µL à 102 mM final réactif (17 mM final test), pour initier la formation du caillot de fibrine.
 - c. La variation de densité optique est lue à une seule longueur d'onde de manière dynamique (toutes les 2 secondes), à 540nm et pendant une durée de 1986 secondes (33 minutes).
 - d. La base de données est constituée de tous les delta de densité optique aux différents temps de mesure et pour chacun des paramètres de la méthode (Tmax ; T09D – 90% de la DDO max ; TL – 50% de la DDO max – DDO max est une mesure de densité optique).
 - e. Ces résultats sont analysés en analyse discriminante quadratique pour déterminer le % de bonne classification à t1 et t2.
 - f. Cette base de données est utilisée comme base d'apprentissage sur au moins 70% des échantillons surchargés pris au hasard, et comme base test sur les échantillons surchargés restants (30%) puis comme base de validation sur les échantillons de patients.

[0160] La [Fig.2] montre à quoi ressemblent des profils types de dégradation de la fibrine de trois plasmas hémophiles A différents. Cette [Fig.2] illustre que les paramètres de DDO (variation de densité optique) aux temps 1 et 2 varient en fonction de l'hyper/hypo-fibrinolyse du plasma de patient hémophile.

[0161] **B. Etude de l'ensemble des échantillons et base d'apprentissage**

[0162] L'ensemble d'échantillons peut comprendre des plasmas hémophiles et en particulier des plasmas hémophiles A avec ou sans inhibiteurs et des échantillons de patients traités à la demande ou en prophylaxie. La méthode est possible avec l'ensemble des traitements commerciaux et de préférence Advate®, Elocta® et Jivi®. Les raisons pour lesquelles ces différents traitements n'induisent aucun biais dans l'analyse au regard des échantillons utilisés, sont liées aux autorisations de mise sur le marché desdits médicaments avec différents mécanismes d'action (rFVIII et « long-acting FVIII »).

[0163] En particulier :

- a. Advate® (Takeda) est une molécule recombinante leader du marché à ce jour;
<https://www.fortunebusinessinsights.com/industry-reports/hemophilia-drugs-market-100068>
- b. Elocta® (Sanofi) et Jivi® (Bayer) sont des « Long-Acting FVIII ». Elocta® est le seul produit de longue demi-vie autorisé en France et présente une fusion avec un fragment FC d'immunoglobuline ; Environ 20% du marché :
<https://www.lesechos.fr/2018/01/sanofi-fait-son-entree-sur-le-marche-de-lhemophilie-982460>. Jivi® est une molécule pegylée (polyéthylène glycol) de Bayer ; une molécule qui est considérée représentative des 3 molécules autorisées sur le marché.

[0164] Les données ici rapportées reposent sur l'utilisation de 9 patients hémophiles A sévères surchargés avec 3 molécules de FVIII (Advate®, Elocta® et Jivi®) ([Fig.3]). Des échantillons de patients hémophiles A avant et après traitement au Jivi® ou à l'Elocta® (le type de traitement a été réalisé en aveugle) ont été analysés.

[0165] La base d'apprentissage a été réalisée à l'aide de plasmas hémophiles A sévères (< 1%) surchargé en molécules à différentes concentrations. Un total de 250 échantillons (et résultats) de patients non surchargés et surchargés ont été analysés en tant que groupe d'apprentissage et de test. Puis 47 échantillons de patients supplémentaires ont été analysés en tant que groupe de validation. En général, un échantillonnage d'entraînement comprend généralement entre 50% et 80% des données et un échantillonnage de test comprend entre 20% et 40% des données, lesquelles peuvent être ou sont séparées aléatoirement. Ainsi, pour la présente étude, un total de 250 échantillons

de patients surchargés et non surchargés ont été analysés en tant que groupe d'apprentissage (70%) et de test (30%) puis 47 échantillons de patients supplémentaires ont été utilisés pour la validation du modèle.

[0166] Les plasmas de patients surchargés ont été obtenus en suivant le protocole :

- Plusieurs aliquotes de 1mL de plasma de patient sont décongelées pendant 5 minutes à 37°C et mélangées ensemble. La surcharge à 100% de FVIII est obtenue en respectant la dilution maximale de 2% du plasma. Le taux de FVIII obtenu après surcharge du plasma est évalué grâce à un test chromogénique automatisé, sensible au FVIII.
- Après ajustement du niveau à 100%, les gammes de plasmas sont obtenues en diluant le niveau à 100% dans le plasma bas de niveau à 0% pour obtenir l'ensemble des niveaux suivants : 0% ; 1% ; 2% ; 5% ; 7% ; 10% ; 15% ; 20% ; 60% ; 80% ; 100% de FVIII. Remarque : certains niveau intermédiaire (Ex : 15 ; 80%) n'ont pas été fabriqués pour toutes les gammes de surcharges.

[0167] Après un minimum de 24 heures de congélation à -80°C, chaque gamme est testée avec le test Coag-Lyse.

[0168] Les plasmas de patients hémophiles A testés pour l'invention ont été prélevés selon deux profils pharmacocinétiques : pré-dose et 0.25h, 0.5h, 1h post dose. Chaque échantillon est testé grâce à un test chromogénique automatisé, sensible au FVIII et avec le test Coag-Lyse.

[0169] L'analyse statistique de l'ensemble des échantillons est effectuée à l'aide d'un logiciel de statistique, de préférence, les logiciels *Minitab 18* et *R*.

[0170] **C. Analyse statistique sur les paramètres de DDO (variation de densité optique) à deux temps**

[0171] L'analyse statistique est effectuée sur le paramètre de DDO (variation de densité optique) à deux temps.

[0172] Dans un premier temps, des différences de profil de lyse ont été observées (Figures 2).

[0173] Puis, trois groupes ont été mis en évidence statistiquement sur les deux paramètres de DDO (variation de densité optique) à 2 temps en analyse hiérarchique centrée et normalisée. L'analyse hiérarchique (centrée et normalisée) – ou observation en groupes – a ainsi aussi servi à classer les données d'apprentissage, qui ont été confirmées par analyse discriminante quadratique.

[0174] Enfin, les inventeurs ont obtenu un taux de classement correct de 100% en employant comme modèle d'apprentissage une analyse discriminante quadratique et de 99% (3 erreurs) par la méthode des K-means normalisée (analyses réalisées sur Minitab) – les résultats obtenus par la méthode des K-means normalisée ne sont pas représentés sur les Figures de la présente demande, seuls les résultats obtenus en analyse discriminante

quadratique le sont. Par ailleurs, le taux de classement correct de 100% obtenu en analyse discriminante quadratique a été obtenu avec des échantillons où le Facteur FVIII était supérieur ou égal à 1,5% (10 erreurs sinon, si les taux à 0% sont inclus), quand toutes les données (250 résultats + 47 patients) sont considérées.

- [0175] Le groupe d'appartenance est déterminé à l'aide des deux paramètres DDO (variation de densité optique). Pour la méthode turbidimétrique employée, les temps sont définis dans les plages [700 – 900] sec pour le temps t1 et [1100 – 1400] sec pour le temps t2. De préférence le temps t1 a été défini à 750 sec et le temps t2 a été défini 1400 sec. Plus précisément, les résultats exposés dans les Figures ont été obtenus avec t1 = 750 sec et t2 = 1400 sec. Le choix de ces paramètres a été fait conformément à la méthode de choix optimal ou de vérification de ces paramètres, exposée dans la présente description. De fait, la plage de [700 - 900] sec est la plage de résultats qui a montré la meilleure discrimination lorsque tous les résultats ont été pris en compte avec 1 seul paramètre. La plage pour le temps t2 a été définie en combinaison avec les résultats obtenus au temps t1.
- [0176] Chaque patient est classé avec ces paramètres mesurés à deux temps en fonction de la lyse, par rapport au groupe d'apprentissage, construit en analyse discriminante quadratique dans les mêmes conditions ([Fig.4] : Résultats par groupement).
- [0177] **Remarque :** Le patient n°5 n'a pas montré la même classification en fonction de ses profils pharmacocinétiques au Jivi® ou Elocta®. Il est passé du groupement n°1 au groupement n°2. Cette différence est liée au niveau basal du caillot de fibrine (DDO temps t1). A cet égard, on précise ici que l'attribution à un groupe peut se faire d'abord par une méthode d'apprentissage non supervisée. Une inspection visuelle des résultats peut s'avérer utile dans certains cas précis (exemple ici du patient n°5). La [Fig.4] montre que le patient n°5 est bien classé à la fois dans les groupes n°2 et 3 (légende carrés vides). En fait, le patient n°5 a été prélevé à deux moments différents. Dans le premier cas, il avait un fibrinogène à 3 g/L et à faible risque hémorragique. Dans le deuxième cas, il a sans doute eu un événement hémorragique qui a augmenté son inflammation d'où l'augmentation du fibrinogène à 4.2 g/L ce qui explique son changement de classification. Ce cas particulier n'interfère cependant pas avec l'exposé général de la présente demande, compte-tenu des risques d'erreur inhérent au type de méthode ici exposé, qui peut d'ailleurs être calculé, comme détaillé ici.
- [0178] Les patients du groupe n°1 ([Fig.4]) ont un niveau basal de caillot de fibrine élevé (DDO au temps t1 > 1.1). Ce qui a été vérifié avec la mesure du taux de fibrinogène, qui est supérieur à la zone normale (de 4.0 à 5.0 g/L). En outre, les patients du groupe n°1 ont une lyse significativement plus rapide (de -1.2 mDDO/sec à -2.5 mDDO/sec).
- [0179] Les patients du groupe n°2 ([Fig.4]) ont un niveau basal de caillot de fibrine et

niveau de fibrine dégradé modéré. Ce groupe constitue le groupe de référence. Il possède un temps de lyse compris entre 1100 sec et 1900 sec et une pente de lyse comprise entre -2.2 mDDO/sec et -0.7 mDDO/sec.

[0180] Les patients du groupe n°3 ([Fig.4]) ont un niveau basal de caillot de fibrine et un niveau de fibrine dégradé réduits (une DDO réduite sur les temps t1 et t2). Ce qui a été vérifié avec la mesure du temps de lyse, qui est significativement réduite (de 840 sec à 1300 sec).

[0181] **Analyse complémentaire : Random Forest**

[0182] Nous avons fait l'analyse avec 2 paramètres par arbre et 3000 arbres.

[0183] Sur les données d'apprentissage, nous avons obtenus un taux de classement correct de 100% et 68% (13 erreurs) sur les données de validation (patients) par rapport à la classification de référence. Ces valeurs concernent des taux de FVIII > 1.5. La première valeur correspond à la base de données résultats en surcharge et la seconde aux résultats patients. Il est par ailleurs possible de regrouper ces valeurs en un seul chiffre de 95% de classements corrects.

[0184] **Analyse complémentaire : Régression logistique**

[0185] Nous avons fait l'analyse en régression logistique multinomiale en prenant comme référence le groupement 2 (l'analyse est similaire en prenant en référence les groupements 1 ou 3).

[0186] Sur les données d'apprentissage, nous avons obtenus un taux de classement correct de 100% et 93% (3 erreurs) sur les données de validation (patients) par rapport à la classification de référence. Ces valeurs concernent des taux de FVIII > 1.5. La première valeur correspond à la base de données résultats en surcharge et la seconde aux résultats patients. Il est par ailleurs possible de regrouper ces valeurs en un seul chiffre de 99% de classements corrects.

[0187] **D. Validité du modèle d'apprentissage**

[0188] Selon un aspect, une quantité de FVIII minimum dans l'échantillon analysé est nécessaire pour sensibiliser la méthode du test de Coag-Lyse. Cependant, la classification proposée est ensuite, en soi, indépendante du taux en FVIII et de la molécule utilisée. En effet, dans la base de données d'apprentissage utilisée, les mêmes plasmas ayant été surchargés à différentes concentrations, et le « classement » étant patient dépendant, il est possible de prévoir le classement du patient pour toutes les concentrations testées et en particulier la concentration à 0%.

[0189] A noter, les patients hémophiles étant généralement traités pour leur condition par administration de facteur manquant, le cas où un échantillon testé ne remplirait pas la condition de FVIII minimum requis serait l'exception plus que la règle dans le domaine de l'invention. Le cas échéant, un apport exogène de facteur manquant peut être prévu lors de la mise en œuvre de la méthode selon l'invention, au niveau de

l'échantillon à tester.

- [0190] En présence de tous les échantillons (incluant les niveaux $< 1.5\%$ et Niveaux $\geq 1.5\%$, i.e., population $N \times 0$), il a été observé un chevauchement des groupements n°3 et n°2 ([Fig.6]). Le niveau de « chevauchement » en utilisant une analyse discriminante quadratique sur l'ensemble de la base de données (quand les niveaux 0% sont inclus) a été déterminé être de 97% (10 erreurs de classification) par rapport au classement de référence constitué par le classement initial réalisé avec les concentrations $\geq 1.5\%$ - le chevauchement est ici évalué en termes de « nombre de classements corrects » par rapport au classement initial réalisé avec les concentrations $\geq 1.5\%$. A cet égard, le classement initial a été fait en méthode d'apprentissage non supervisée avec un taux de Facteur FVIII $> 1.5\%$. Par extension, les niveaux 0 provenant de mêmes patients ont été classés dans les mêmes groupements.
- [0191] L'on voit que si une sensibilisation (rendue par l'étude des Niveaux $\geq 1.5\%$), a permis d'atteindre 100% de classements corrects et de supprimer les 10 erreurs de classifications (faux positifs), l'observation des résultats incluant les niveaux 0% de Facteur FVIII montrent possiblement que les patients du groupement n°2 peuvent être classés en n°3 lorsqu'ils ont une très faible quantité de Facteur FVIII trouvée dans les échantillons correspondants. Cela reste intéressant pour identifier un taux de Facteur FVIII seuil ou « through level » pour le groupement n°2 et éventuellement ajuster le traitement en FVIII substitutif au regard de ce seuil. De ce fait, la présente invention n'est pas limitée à une mise en œuvre sur des échantillons avec un taux de Facteur FVIII supérieur ou égal à 1,5%.
- [0192] En outre, une limite à se fixer sur le taux d'erreur relève principalement de la gravité du phénomène étudié. On peut par exemple, selon un mode de réalisation particulier, considérer comme objectif de limiter le nombre de patients appartenant au groupement 3 qui se retrouveraient dans le groupement 2. En effet, les patients appartenant au groupement 3 ont un traitement insuffisant : il peut donc s'agir d'un groupe d'intérêt à dégager en priorité.
- [0193] Selon un aspect de l'invention, on peut évaluer un résultat rendu par une analyse discriminante ou un autre type d'analyse, par le « Nombre de classements corrects », un objectif de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de classement correct étant un critère de succès du test.
- [0194] En l'espèce, le nombre de classements corrects peut, conventionnellement, être obtenu à partir de la mesure de sensibilité / spécificité dérivée d'un tableau de contingence, comme dans le cas des courbes ROC. Ici, le nombre de classements corrects a été obtenu à partir de la mesure de sensibilité / spécificité dérivée du tableau de contingence montré en Table 1.
- [0195] Sur la base de données incluant les niveaux à 0% de Facteur FVIII, le tableau de

contingence est le suivant (Table 1):

[0196] [Tableaux1]

Récapitulatif du classement

Mettre dans groupe	Groupe vrai		
	1	3	2
1	80	0	0
3	0	59	6
2	1	3	148
Nombre total	81	62	154
N correct	80	59	148
Sensibilité	0.988	0.952	0.961
Spécificité	1.000	0.974	0.972

[0197] Dans ce tableau de contingence (Table 1) : 6 résultats classés dans le Groupe n°2 se retrouvent dans le groupe n°3.

[0198] Selon un mode de réalisation précis mais non limitatif de l'invention, notamment dans lequel un Groupe 3 est apparent des résultats comme exposé ici, on peut évaluer un résultat rendu par une analyse discriminante ou un autre type d'analyse, par le « Nombre de classements corrects », un objectif de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de classement correct des patients du Groupement 3 étant un critère de succès du test.

[0199] **E. L'intérêt du regroupement pour les échantillons**

[0200] Selon un aspect, l'invention permet de classer les échantillons en fonction des groupements observés cliniquement ([Fig.7A] et [Fig.7B]).

- 1 - En fonction de leur classification et de leur regroupement, les plasmas de patients hémophiles A vont réagir différemment à la présence du FVIII et au TXA. Cela permet l'étude des patients de manière individuelle et des groupements auxquels ils appartiennent, afin d'identifier un comportement anormal en lyse et de choisir le bon traitement. Le test permet de mettre en évidence l'effet du TXA pour réduire la lyse. Dans l'exemple ici exposé, c'est les patients du groupe n°3 avec un temps de lyse réduit qui nécessitent ce traitement en association au facteur FVIII manquant (Figure 7).
- 2 - La classification peut également permettre d'envisager de personnaliser le

niveau seuil du traitement au FVIII manquant et/ou TXA (« optimal through level ») en fonction du groupe d'appartenance.

[0201] Les groupes de patients n°1 et n°2 (Figure 7) ne nécessitent pas de TXA mais nécessitent un ajustement du traitement au facteur manquant seul, avec deux sous-groupes d'ajustement.

[0202] Plus précisément, on peut déduire que les groupements n°1 et 2 n'auraient pas besoin de TXA contrairement au groupement n°3, comme présenté dans le tableau ci-dessous (Table 2) :

[0203] [Tableaux2]

Groupe de patient	Traitement*	Commentaire
Groupe 3 Patient à risque élevé de saignement	Substitutif + TXA	Le TXA évite d'augmenter les doses du traitement substitutif
Groupe 2 Patient à faible risque de saignement	Confort	Réduction potentielle du traitement substitutif
Groupe 1 Patient à risque modéré de saignement	Substitutif	Augmentation potentielle des doses déjà prescrites

[0204] * Prophylactique : type Advate® : 20 à 40U de FVIII/kg tous les 2 à 3 jours / Novoeight® : 20 à 40U de FVIII/kg tous les 2 jours jusqu'à 50U 3 fois/semaine ; en cas d'hémorragie toutes les 8h à tous les 2 jours / Hemlibra® : population cible 1410 à 1880 patients, 1 fois/semaine ou toutes les 2 semaines pendant 4 semaines ou toutes les 4 semaines (HAS 2019).

[0205] **F. Etude de patients phénotypés**

[0206] Sur la base de données de patients phénotypés, sont également présentés des résultats d'échantillons de patients différents des 47 échantillons de patients supplémentaires susmentionnés, qui ont été analysés.

[0207] **1. Caractéristique des échantillons**

- a. 15 échantillons de 12 patients hémophiles A sévères (8), modérés (2) et mineurs (2)
- b. Traités à la demande (3), en prophylaxie (7) ou non traités (2)
- c. Répartition des molécules commerciales par échantillons :
 - FVIII recombinants : Advate® (2), Novoeight® (5), Kogenate® (2) ;
 - FVIII dérivé plasmatique : Factane® (2) ;
 - FVIII recombinant à ½ vie prolongée : Elocta® (2)
- d. Le taux de saignement annuel (ABR) pour ces patients est égal à 0 (5), 1 (2), 3

(1), 5 (2), 12 (1), 24 (1)

e. Un patient a été écarté de l'étude car hors spécification analytique (turbide)

[0208] **2. Etude des patients**

[0209] Comme avec les 47 échantillons de patients précédemment susmentionnés, les 14 nouveaux échantillons ont été testés selon la méthode ici décrite.

[0210] Cela a permis de classer les échantillons en fonction des DDO (variation de densité optique) aux temps t1 750 secondes et t2 1400 secondes.

[0211] Il est observé que les échantillons prélevés d'un même patient sont classés dans le même groupe ([Fig.8] et Table 3)

[0212] [Tableaux3]

Groupe n°1		
Traitement	N	ABR
<u>prophylactique</u>	3	7 (+/- 5)
<u>à la demande</u>	0	NA
<u>aucun</u>	1	24
Total	4	11 (+/- 9)

Groupe n°2		
Traitement	N	ABR
<u>prophylactique</u>	3	0
<u>à la demande</u>	3	2 (+/- 2)
<u>aucun</u>	1	0
Total	7	1 (+/- 2)

[0213] Aucun patient n'est classé dans le groupe n°3, considéré comme le groupe à risque de saignement élevé. Ceci peut s'expliquer par le fait que ce groupe ne représente que 10% des patients (3/27) et donc n'est pas représentatif sur 11 patients.

[0214] Pour les patients classés dans le groupe n°1, 4 patients sur 4 ont un ABR ≥ 3 (Table 3). Ce groupe est donc à risque modéré de saignement bien que traité en prophylaxie. Ces patients présentent des saignements réguliers dont l'acteur clé est l'inflammation (Vulpen et al. 2018 DOI 10.1111/hae.13449.). Cette inflammation est traduite en biologie par une augmentation du fibrinogène, comme trouvé chez ces patients (4.21 g/L groupe 1 vs 2.83 et 2.79 g/L groupes 2 et 3 respectivement, voir [Fig.9] et aussi de la DDO au temps 1 ([Fig.10])). Bien que le taux de fibrinogène soit bien plus élevé que celui des autres groupes et qu'il augmente le temps de lyse (TL : 1668 sec vs 1460 et 1100 sec respectivement), c'est-à-dire que la lyse intervient plus tardivement, celui-ci ne les protège pas contre le saignement car ils lysent plus vite (pente au temps de lyse – PTL : -1.92 mDDO/sec vs -1.40 et -1.13 mDDO/sec respectivement) (Figures 11 et 12).

[0215] Pour les patients classés dans le groupe n°2, 5 patients sur 7 ont un ABR = 0 (Table 3). Cela signifie que ces patients ont un risque de saignement faible. Les 2 patients dont l'ABR > 0 sont traités à la demande, c'est-à-dire en traitement curatif. Ces patients bénéficieraient d'un ABR plus faible en passant en traitement prophylactique personnalisé.

[0216] **3. Conclusion**

[0217] Les résultats précédents sont confirmés car la classification est retrouvée sur ces nouveaux patients. Le saignement modéré du groupe 1 par rapport au saignement faible du groupe 2 est expliqué. Le groupe 3 reste le groupe prioritaire à risque de saignement élevé car il présente à la fois une DDO au temps 1 la plus faible et un temps de lyse très raccourci (1100 sec vs 1460 et 1668 sec).

[0218] **G. Mise en œuvre d'une méthode viscoélastique de mesure**

[0219] En utilisant un automate ROTEM sur du sang total, voici les résultats obtenus.

[0220] En passant en sang total, les concentrations des différents activateurs ont été modifiées comme suit :

- Le réactif TF de Coag. Lyse a été concentré (2.2 pM TF et 8 µM Phospholipide)
- Le FXIa a été concentré x2 (200 pM de FXIa)
- Le réactif tPA de Coag. Lyse a été dilué x2 (0.07 µg/mL de t-PA)
- Le buffer calcique n'a pas été modifié
- Les proportions (2/3) entre échantillons et réactifs ont été respectées pour un volume final cuvette plus important (340 µL).

[0221] Les inventeurs ont testé un plasma de chaque groupement 1, 2 et 3, à différentes concentrations de FVIII dans ces conditions. Les résultats d'un test sur l'automate ROTEM à une concentration de 20% de FVIII (0.2 UI/mL) sont montrés en Figures 13A (Groupement 3), 13B (Groupement 2) et 13C (Groupement 1). Sur la [Fig.13C], le changement en niveaux de gris sort automatiquement à partir de 10 mm d'amplitude ; il permet de calculer le paramètre ROTEM CFT (Clot formation time), non utilisé dans la présente invention.

[0222] Pour ce faire, les inventeurs ont utilisé les paramètres rendus par le ROTEM A15 et A25 (15 minutes ou 25 minutes après le temps de coagulation – CT) qui correspondent à des paramètres comparables à ceux utilisés dans la méthode de l'invention préalablement exposée en utilisant une méthode de mesure de densité optique ([Fig.14A]). Les inventeurs ont également retraité les résultats en prenant les t1 et t2 fixe à 20 minutes et 30 minutes ([Fig.14B]). Ce retraitement des résultats a été réalisé en utilisant un logiciel d'exploitation de l'image de la courbe rendue (Logiciel développé en interne ou [http:// www.graphreader.com](http://www.graphreader.com)) car le ROTEM ne donne pas de donnée brutes pour chaque temps. Il donne uniquement les paramètres A5, A10, A15, A20,

A25, LY30, LY45, soit respectivement 5 à 45 minutes après le temps de coagulation. Or, selon la méthode ici exposée, le traitement du résultat se fait à un temps fixe après le déclenchement au calcium. Lors de ce retraitement, les inventeurs se sont assurés au préalable que les résultats rendus étaient les mêmes que ceux du ROTEM (+/- 1 mm).

- [0223] Il en découle que la méthode selon l'invention est également implémentable en utilisant une méthode de mesure viscoélastique en sang total, notamment sur automate ROTEM.

Application industrielle

- [0224] Les présentes solutions techniques peuvent trouver à s'appliquer notamment dans le domaine du suivi de l'hémostase via des dispositifs dédiés, ou la clinique en ce qui concerne le suivi de patients.

- [0225] La présente divulgation ne se limite pas aux exemples décrits ci-avant seulement à titre d'exemple, mais elle englobe toutes les variantes que pourra envisager l'homme de l'art dans le cadre de la protection recherchée.

Liste des documents cités

Documents brevets

- [0226] À toute fin utile, le document brevet suivant est cité :
- patcit1 : WO 2016/012729 (numéro de publication).

Littérature non-brevet

- [0227] À toute fin utile, les éléments non-brevets suivants sont cités :
- nplcit1 : Matsumoto et al. 2009 Int J Hematol, A modified thrombin generation test for investigating very low levels of factor VII activity in hemophilia A, 10.1007/12185-009-0450;
 - nplcit2 : Tarandovskiy et al. 2013 Thrombosis Research, Investigation of the phenotype heterogeneity in severe hemophilia A using thromboelastography, thrombin generation, and thrombodynamics, 10.1016/j.thromres.2013.04.004;
 - nplcit3 : Leong et al. 2017 Research and practice in thrombosis and haemostasis, Clot stability as a determinant of effective factor VIII replacement in hemophilia A, 10.1002/rth2.12034;
 - nplcit4 : He et al. 2018 Thrombosis Research, A ROTEM method using APTT reagent and tissue factor as the clotting activators may better define bleeding heterogeneity in moderate or severe haemophilia A, 10.1016/j.thromres.2018.09.041;
 - nplcit5 : Dargaud et al. 2017 Haemophilia, Individual thrombin generation and spontaneous bleeding rate during personalized prophylaxis with Nuwiq® (human-cl rhFVIII) in previously treated patients with severe haemophilia A, 10.1111/hae.13493;
 - nplcit6 : Chitlur 2012 Thrombosis Research, Challenges in the laboratory analyses of bleeding disorders, 10.1016/j.thromres.2012.03.011;

- nplcit7 : Tripodi et al. 2019 Clinical Chemistry, Advances in the Treatment of Hemophilia: Implications for Laboratory Testing, 10.1373/clinchem.2017.284356;
- nplcit8 : Aghighi et al. 2019 Research and practice in thrombosis and haemostasis, Global coagulation assays in hemophilia A: A comparison to conventional assays, 10.1002/rth2.12295;
- nplcit9 : Tiede et al. 2020 Haematologica, Factor VIII activity and bleeding risk during prophylaxis for severe hemophilia A: a population pharmacokinetic model, 10.3324/haematol.2019.241554;
- nplcit10 : Abrantes et al. 2019 Haematologica, Relationship between factor VIII activity, bleeds and individual characteristics in severe hemophilia A patients, 10.3324/haematol.2019.217133

Revendications

[Revendication 1]

Méthode de mesure *in vitro* de la dégradation du caillot de fibrine à partir d'une courbe de lyse d'un caillot de fibrine au cours du temps dans un échantillon de sang ou de plasma préalablement obtenu d'un patient susceptible d'avoir un déficit en au moins un facteur de la coagulation, la méthode comprenant les étapes suivantes :

- a. mélange de l'échantillon préalablement obtenu dudit patient avec une composition de réactifs comprenant du facteur tissulaire, des phospholipides, du t-PA, et un ou plusieurs activateur(s) de la voie intrinsèque de la coagulation, notamment un ou plusieurs de ces activateurs choisi(s) parmi : l'acide ellagique, la silice, le FIXa, le FXIa, et optionnellement un ou plusieurs facteurs de la coagulation manquant chez le patient, notamment choisi(s) parmi: le FVIII, le FIX, le FXI ; puis
- b. incubation du mélange obtenu en a., puis
- c. déclenchement de la coagulation par ajout d'ions calcium au mélange incubé à l'étape b., pour permettre la formation d'un caillot de fibrine dans le mélange, puis la lyse du caillot formé, et
- d. mesure de la cinétique de dégradation du caillot de fibrine pendant la lyse à l'étape c., et
- e. détermination d'une valeur de niveau basal du caillot de fibrine à un temps t_1 , le temps t_1 étant choisi pour être situé entre le T_{max} et le TL de la courbe de lyse du caillot de fibrine, et d'une valeur de niveau dégradé du caillot de fibrine à un temps t_2 ultérieur, le temps t_2 étant choisi entre 300 à 900 secondes après t_1 .

[Revendication 2]

Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que dans l'étape a. :

- i. Le facteur tissulaire est présent dans la composition de réactifs en quantité telle que la concentration finale de facteur tissulaire dans le mélange sur lequel la mesure de la cinétique est réalisée dans l'étape d., est comprise entre 0,01 et 5,0 pM, ou entre 2,0 et 5,0 pM, en particulier est de 2,0 pM.
- ii. Les phospholipides sont présents dans la composition de réactifs en quantité telle que la concentration finale de phos-

- pholipides dans le mélange sur lequel la mesure de la cinétique est réalisée dans l'étape d., est comprise entre 1 et 10 μM , ou entre 3 et 7 μM , plus préférentiellement entre 3 et 5 μM , en particulier est de 4 μM .
- iii. L'activateur de la voie intrinsèque de la coagulation, notamment choisi parmi un ou plusieurs de : l'acide ellagique, la silice, le FIXa, le FXIa est présent dans la composition de réactifs en quantité telle que la concentration finale d'activateur intrinsèque dans le mélange sur lequel la mesure de la cinétique est réalisée dans l'étape d., est comprise entre 1 et 1000 pM, ou entre 10 et 200 pM, plus préférentiellement entre 75 et 200 pM, en particulier est de 100 pM, notamment l'activateur est le FXIa à 100 pM,
 - iv. Le t-PA est présent dans la composition de réactifs en quantité telle que la concentration finale de t-PA dans le mélange sur lequel la mesure de la cinétique est réalisée dans l'étape d., est comprise entre 0,01 et 5 $\mu\text{g/mL}$, ou entre 0,1 et 2 $\mu\text{g/mL}$, en particulier est de 0,13 $\mu\text{g/mL}$.
 - v. le facteur de coagulation manquant chez le patient analysé, notamment choisi parmi un ou plusieurs de : le FVIII, le FIX, le FXI, est présent dans le mélange sur lequel la mesure de la cinétique est réalisée dans l'étape d. dans une concentration comprise entre 0 à 0,4 UI/mL, en particulier dans une concentration de 0.015 UI/mL.

[Revendication 3] Méthode selon l'une des revendications 1 à 2, caractérisée en ce qu'à l'étape b. l'incubation du mélange obtenu en a. est effectuée entre 20 et 39°C, de préférence à 37°C, pendant 2 à 10 minutes, notamment 5 minutes, en particulier à 37°C pendant 5 minutes puis l'ajout d'ions calcium au mélange incubé est réalisé dans une quantité permettant une concentration finale d'ions calcium entre 5 et 25 mM, de préférence 17 mM.

[Revendication 4] Méthode selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que l'échantillon est un échantillon non dilué, de sang total ou de plasma, en particulier de plasma riche en plaquettes ou de plasma pauvre en plaquettes, de plasma contenant des microparticules plaquettaires, érythrocytaires ou toute autre cellule, de préférence de plasma pauvre en

- plaquettes.
- [Revendication 5] Méthode selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que :
- a. Si l'échantillon est un échantillon de sang total, t2 est choisi 650 secondes après t1, et
 - b. Si l'échantillon est un échantillon de plasma, t2 est choisi 600 secondes après t1.
- [Revendication 6] Méthode selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que l'échantillon a un volume compris entre 5 μ L et 500 μ L, de préférence compris entre 50 μ L et 400 μ L, de préférence compris entre 50 μ L et 300 μ L, de préférence compris entre 100 μ L et 300 μ L, de préférence d'environ 200 μ L.
- [Revendication 7] Méthode selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce qu'à l'étape d., la réalisation d'une cinétique de dégradation du caillot de fibrine due à sa lyse est effectuée par une méthode de mesure notamment choisie parmi : une méthode viscoélastique, une méthode rhéométrique, une méthode acoustique, une méthode optique, une méthode d'analyse d'un tracé d'onde, une méthode fluorométrique, une méthode de résonance magnétique, une méthode turbidimétrique, en particulier est réalisée par turbidimétrie ou par une méthode visco-élastique.
- [Revendication 8] Méthode selon l'une des revendications 1 à 7, dans laquelle la cinétique de dégradation du caillot de fibrine dans l'étape d. est réalisée par turbidimétrie, en particulier par mesure de densité optique (DO) à une longueur d'onde comprise entre 350 et 800 nm, de préférence à 540 nm, et pendant une durée entre 1400 et 3600 secondes à compter du déclenchement de la coagulation par ajout d'ions calcium, et dans laquelle le temps t1 est choisi dans la plage comprise de 700 à 900 secondes à compter du déclenchement de la coagulation par ajout d'ions calcium et le temps t2 est choisi dans la plage comprise de 1100 à 1400 secondes à compter du déclenchement de la coagulation par ajout d'ions calcium.
- [Revendication 9] Méthode selon la revendication 8, dans laquelle t1 est défini à 750 secondes à compter du déclenchement de la coagulation par ajout d'ions calcium et t2 est défini à 1400 secondes à compter du déclenchement de la coagulation par ajout d'ions calcium.
- [Revendication 10] Méthode selon l'une des revendications 1 à 9, dans laquelle la cinétique de dégradation du caillot de fibrine dans l'étape d. est réalisée par une

méthode de mesure viscoélastique, en particulier par la mesure d'une amplitude de courbe en millimètres, et pendant une durée entre 1400 et 3600 secondes à compter du déclenchement de la coagulation par ajout d'ions calcium, et dans laquelle le temps t_1 est choisi dans la plage comprise de 900 à 1200 secondes à compter du déclenchement de la coagulation par ajout d'ions calcium et le temps t_2 est choisi dans la plage comprise de 1500 à 1800 secondes à compter du déclenchement de la coagulation par ajout d'ions calcium.

[Revendication 11]

Méthode selon la revendication 10, dans laquelle :

- a. t_1 est défini à 900 secondes à compter du déclenchement de la coagulation par ajout d'ions calcium et t_2 est défini à 1500 secondes à compter du déclenchement de la coagulation par ajout d'ions calcium, ou
- b. t_1 est défini à 1200 secondes à compter du déclenchement de la coagulation par ajout d'ions calcium et t_2 est défini à 1800 secondes à compter du déclenchement de la coagulation par ajout d'ions calcium.

[Revendication 12]

Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, comprenant une étape supplémentaire f. de classement de l'échantillon testé dans un groupe reflétant un profil de lyse d'un caillot de fibrine, ledit profil de lyse étant déterminé sur la base des valeurs mesurées à t_1 et t_2 dans l'étape e., au regard d'un modèle de classification prédéfini sur la base de paramètres de classification obtenus avec des données d'apprentissage traitées dans les mêmes conditions expérimentales que celles de l'échantillon analysé.

[Revendication 13]

Méthode selon la revendication 12, dans laquelle le classement de l'échantillon testé dans un groupe reflétant un profil de lyse d'un caillot de fibrine est réalisé sur la base d'un modèle de classification obtenu par apprentissage non supervisé ou supervisé.

[Revendication 14]

Méthode selon la revendication 13, caractérisée en ce que le modèle de classification est obtenu par une méthode d'apprentissage choisie parmi : une analyse hiérarchique, en particulier une analyse hiérarchique centrée et normalisée, une méthode K-means, une analyse discriminante quadratique, la régression logistique ou une méthode « random forest ».

[Revendication 15]

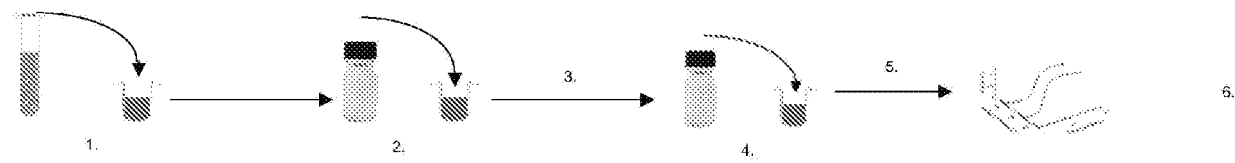
Système de traitement de données ou dispositif comprenant des moyens pour mettre en œuvre au moins l'étape e. de la revendication 1, et le cas

échéant également au moins une autre des étapes de l'une des revendications de méthode 1 à 14, et optionnellement comprenant des moyens pour fournir en entrée et/ou sortir les variables générées lors de ces étapes, pour rendre le résultat de classement prenant en compte les variables fournies en entrée, et optionnellement comprenant également un appareil de mesure de cinétique(s) de dégradation d'un caillot de fibrine, ou faisant appel à un appareil de mesure de cinétique(s) de dégradation d'un caillot de fibrine, notamment distant, et optionnellement comprenant également un processeur adapté pour mettre en œuvre les dites étapes.

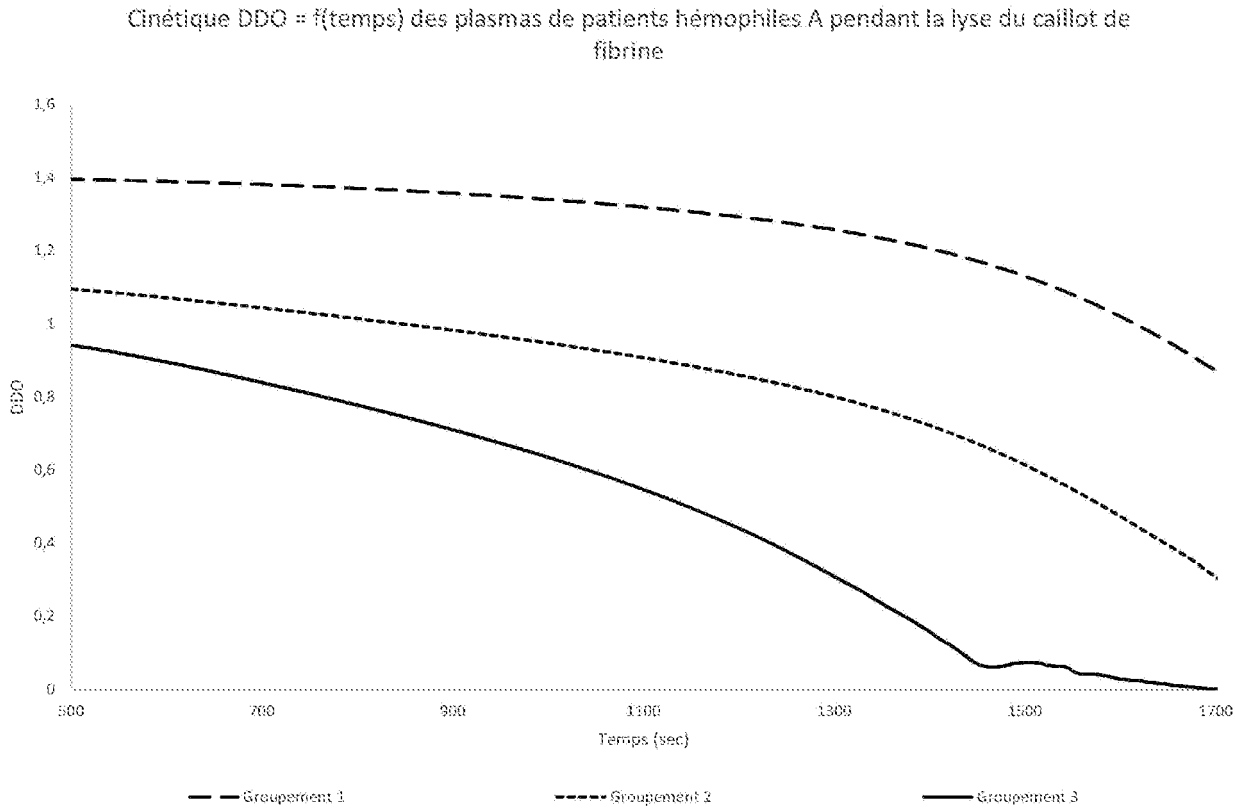
- [Revendication 16] Programme d'ordinateur comprenant des instructions de code de programme pour l'exécution des étapes de la méthode selon l'une des revendications 1 à 14 lorsque ledit programme est exécuté sur un ordinateur, notamment un programme d'ordinateur comprenant des instructions de code qui conduisent un système de traitement de données ou un dispositif selon la revendication 15, notamment un dispositif incluant un appareil de mesure de cinétiques ou un système de traitement de données ou un dispositif faisant appel à un tel appareil de mesure, notamment distant, à exécuter au moins l'étape e. de la méthode selon l'une des revendications 1 à 14, et optionnellement également au moins une autre des étapes de la méthode selon les revendications 1 à 14, par exemple l'étape d. de la méthode selon l'une des revendications 1 à 14.
- [Revendication 17] Support d'enregistrement non transitoire lisible par un ordinateur sur lequel est enregistré un programme pour la mise en œuvre de la méthode selon l'une des revendications 1 à 14 lorsque ce programme est exécuté par un processeur.
- [Revendication 18] Kit adapté pour la mise en œuvre d'une méthode selon l'une des revendications 1 à 14, comprenant :
- a. un ou plusieurs des réactifs suivants : du facteur tissulaire, des phospholipides, du t-PA, un activateur de la voie intrinsèque de la coagulation choisi parmi : l'acide élagique, la silice, le FIXa, le FXIa, ou plusieurs de ces derniers, des ions calcium,
 - b. Optionnellement, un facteur de coagulation choisi parmi le facteur VIII, le facteur IX, le facteur XI, ou plusieurs de ces derniers,
 - c. Optionnellement, un ou plusieurs tampons appropriés,

- d. Optionnellement des instructions pour la réalisation d'une ou de plusieurs cinétique(s) de dégradation d'un caillot de fibrine, et
- e. Optionnellement, un système et/ou dispositif et/ou programme d'ordinateur et/ou support de données lisible par ordinateur selon l'une des revendications 15 à 17,
- f. Optionnellement, des instructions permettant de mettre en œuvre la méthode selon l'une des revendications 1 à 14,
- g. Optionnellement, des instructions relatives à l'utilisation d'un signal d'un support de données, pour la mise en œuvre d'une méthode selon l'une des revendications 1 à 14.

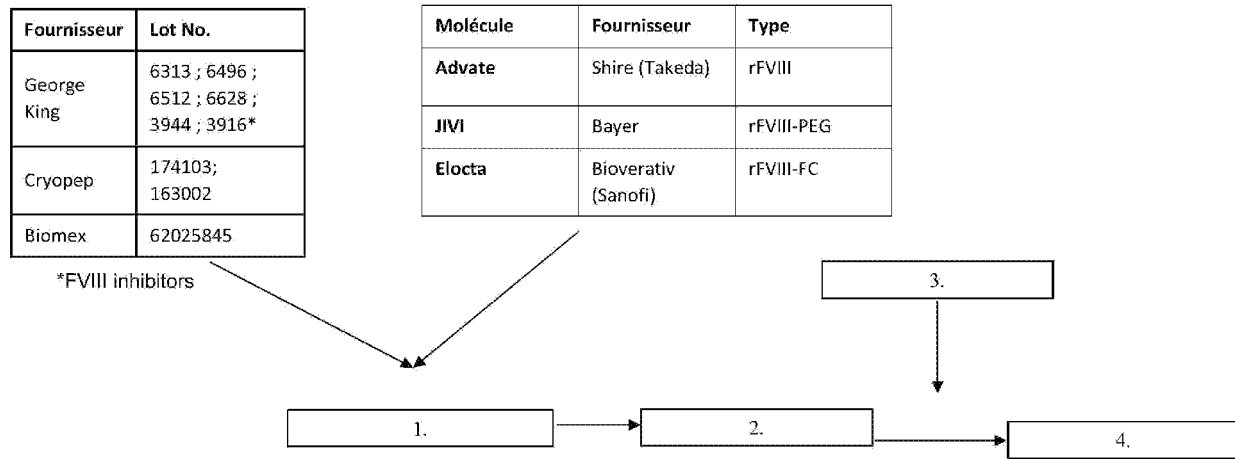
[Fig. 1]



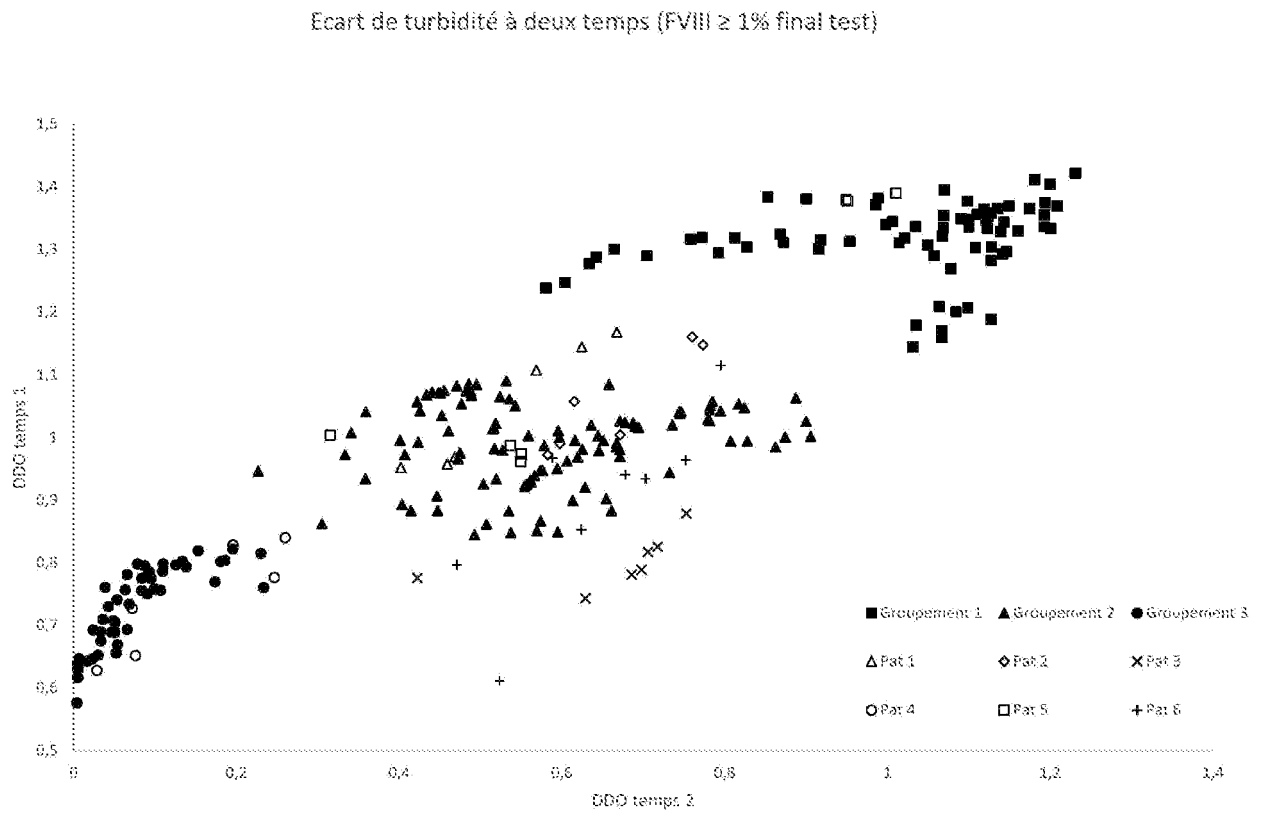
[Fig. 2]



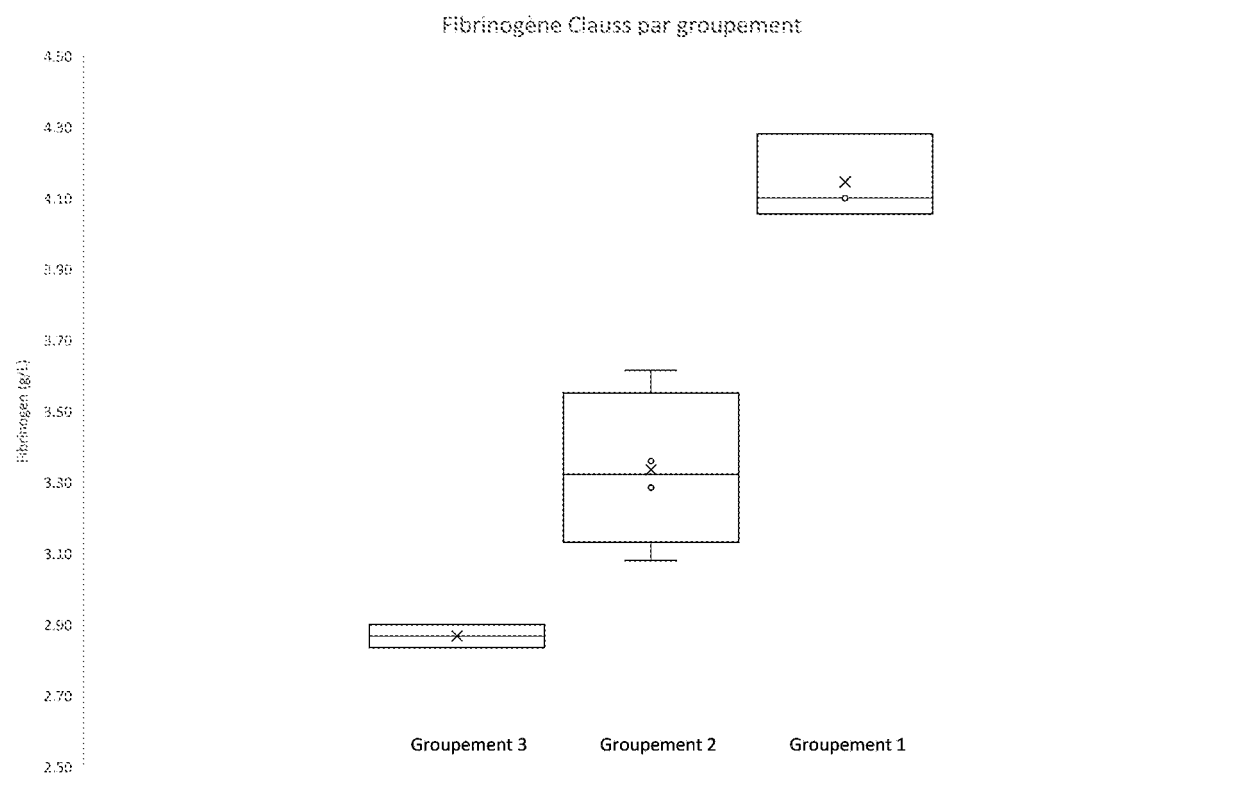
[Fig. 3]



[Fig. 4]

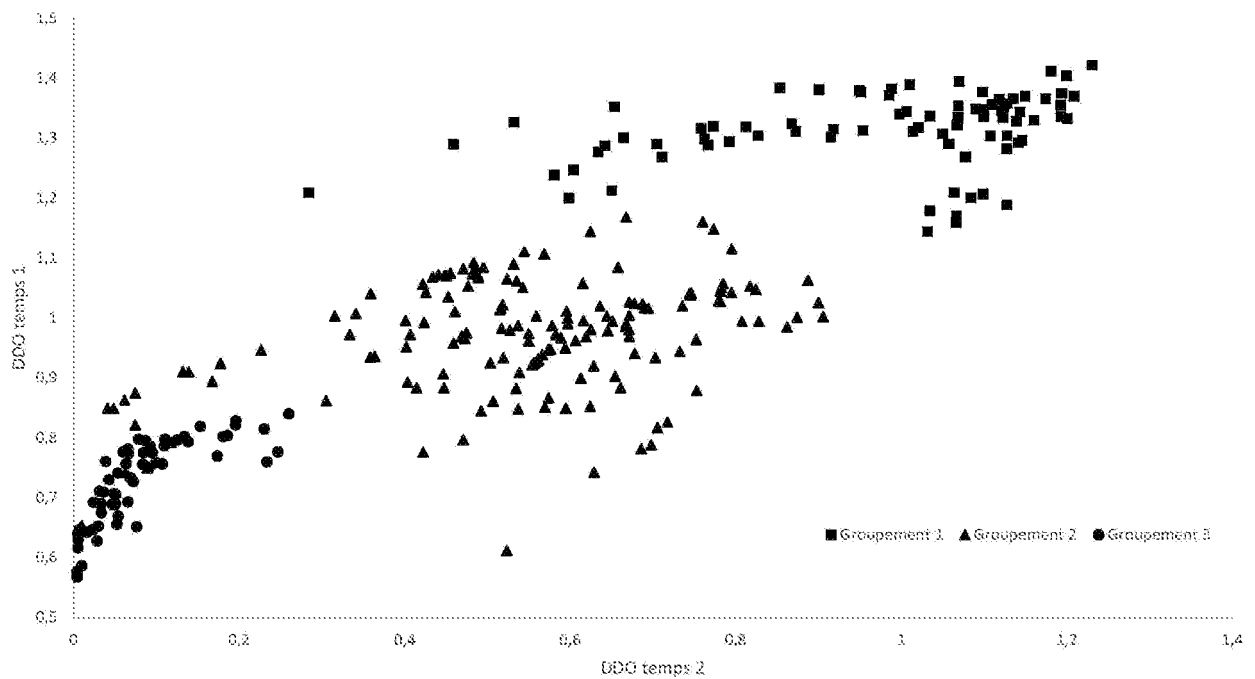


[Fig. 5]



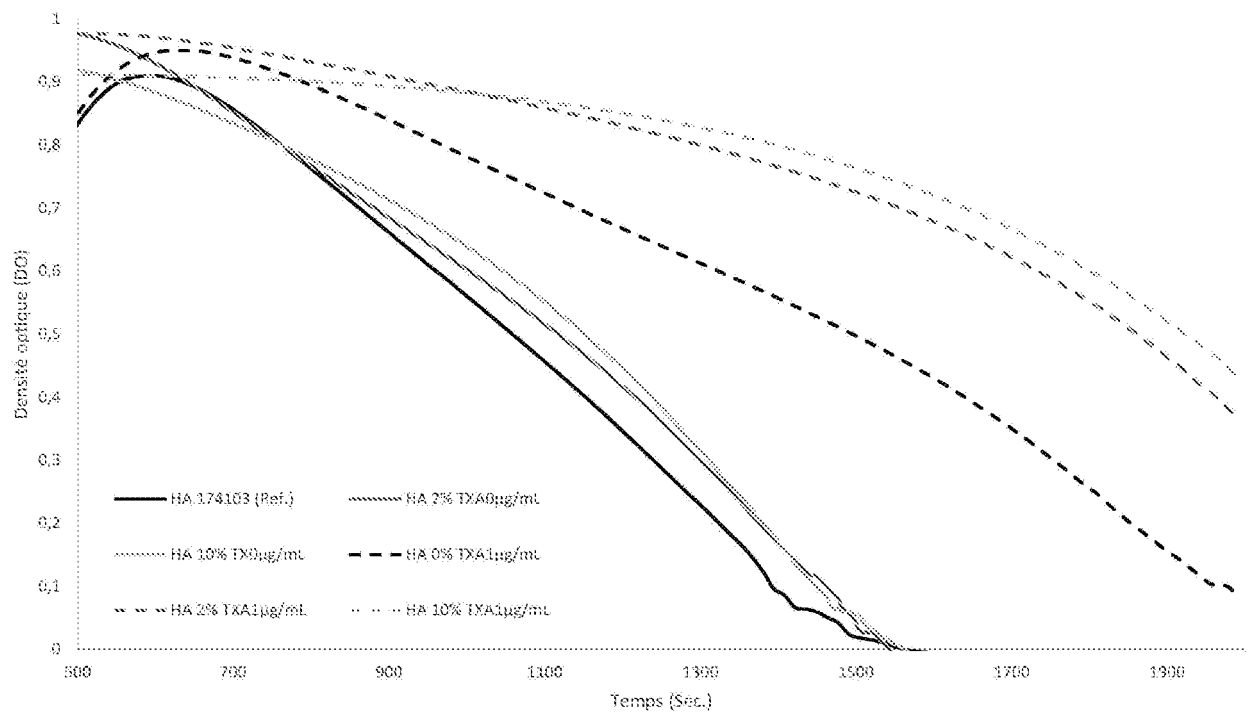
[Fig. 6]

Ecart de turbidité à deux temps sur l'ensemble de la base de donnée (avec et sans FVIII)

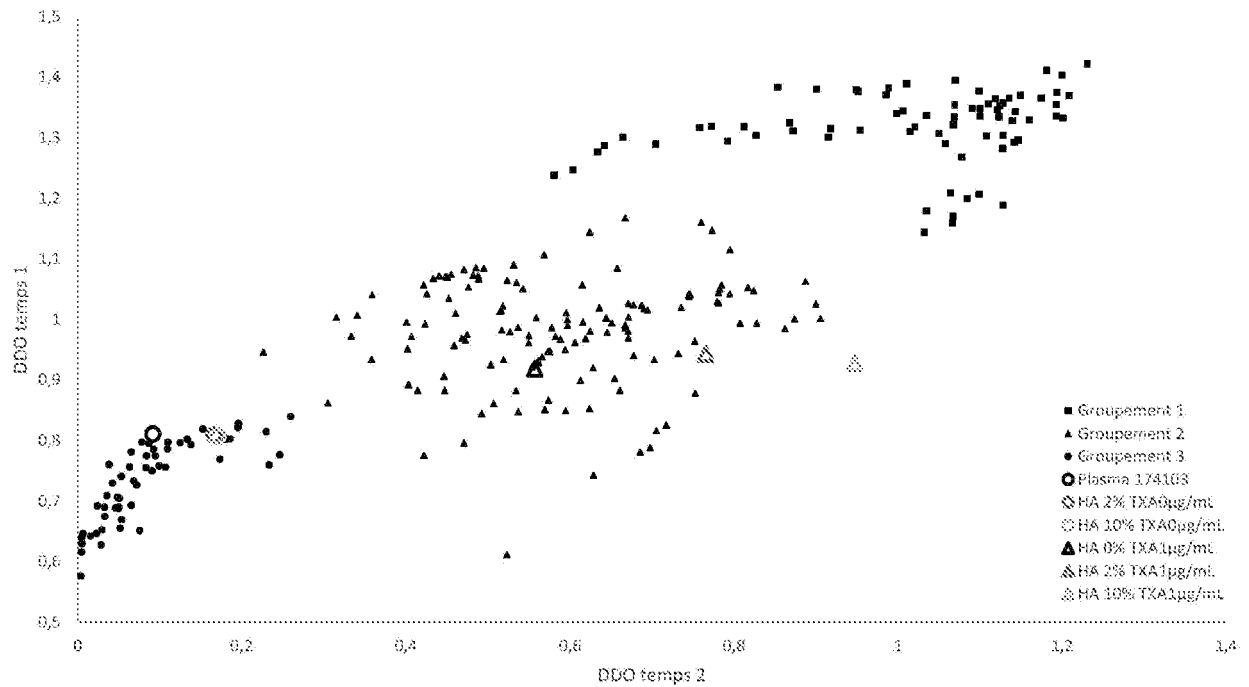


[Fig. 7A]

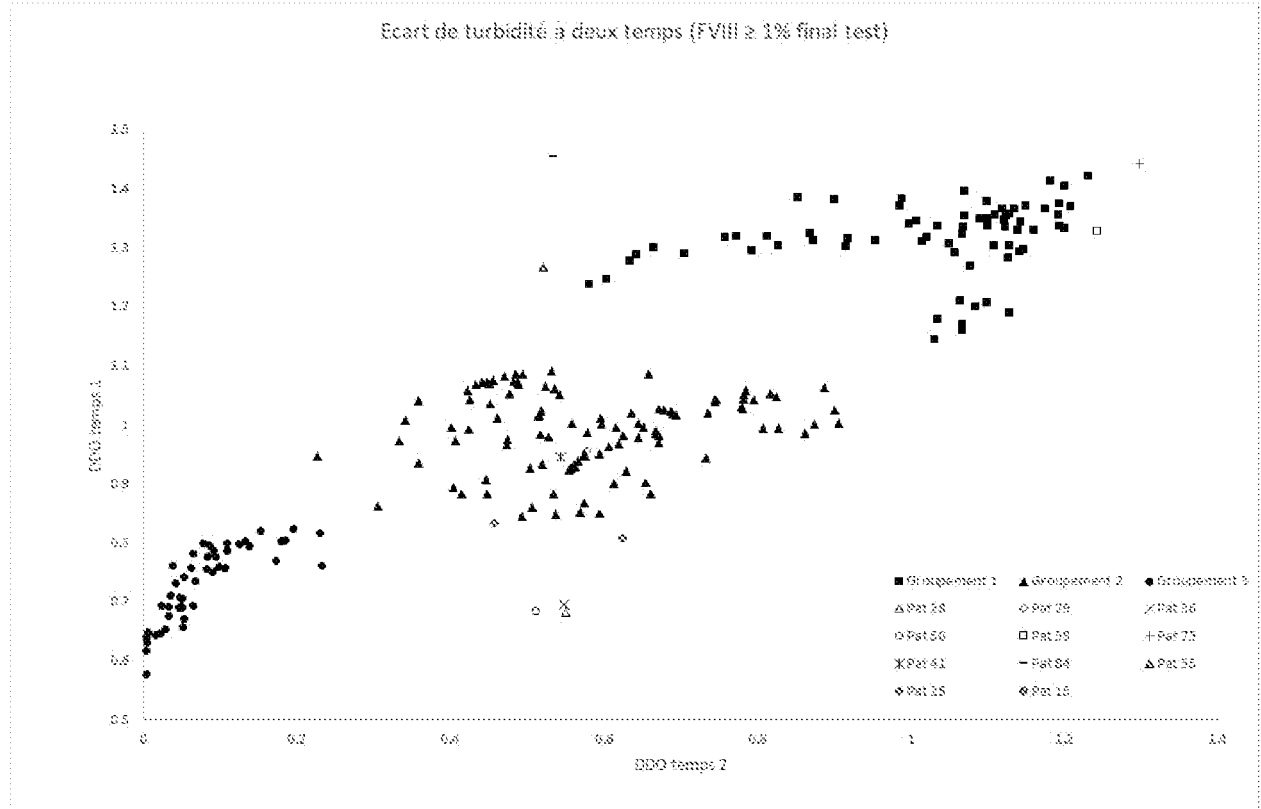
Surcharge d'Advate du plasma 174103, en présence de TXA à 1 µg/mL



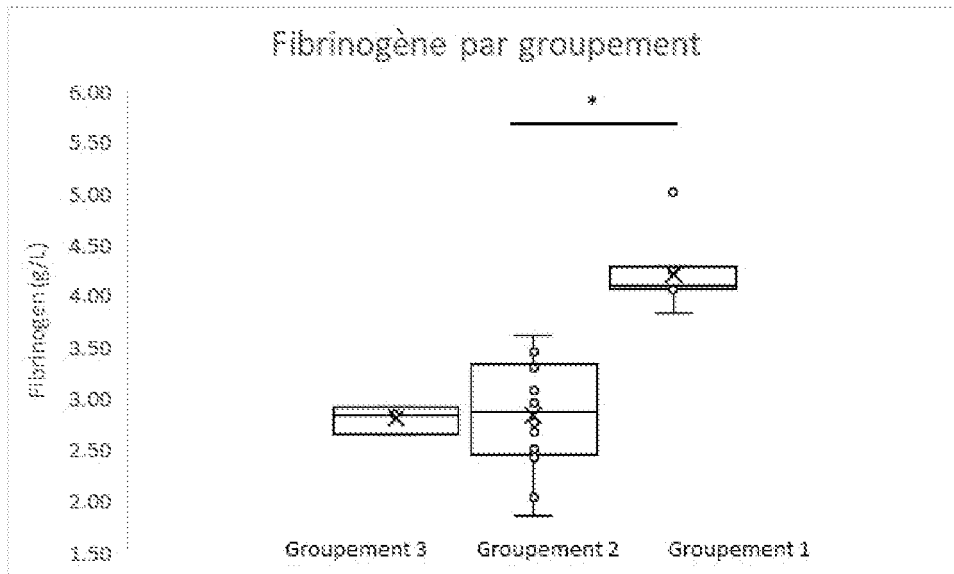
[Fig. 7B]

Effet du TXA 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sur la classification d'un plasma du groupement 3

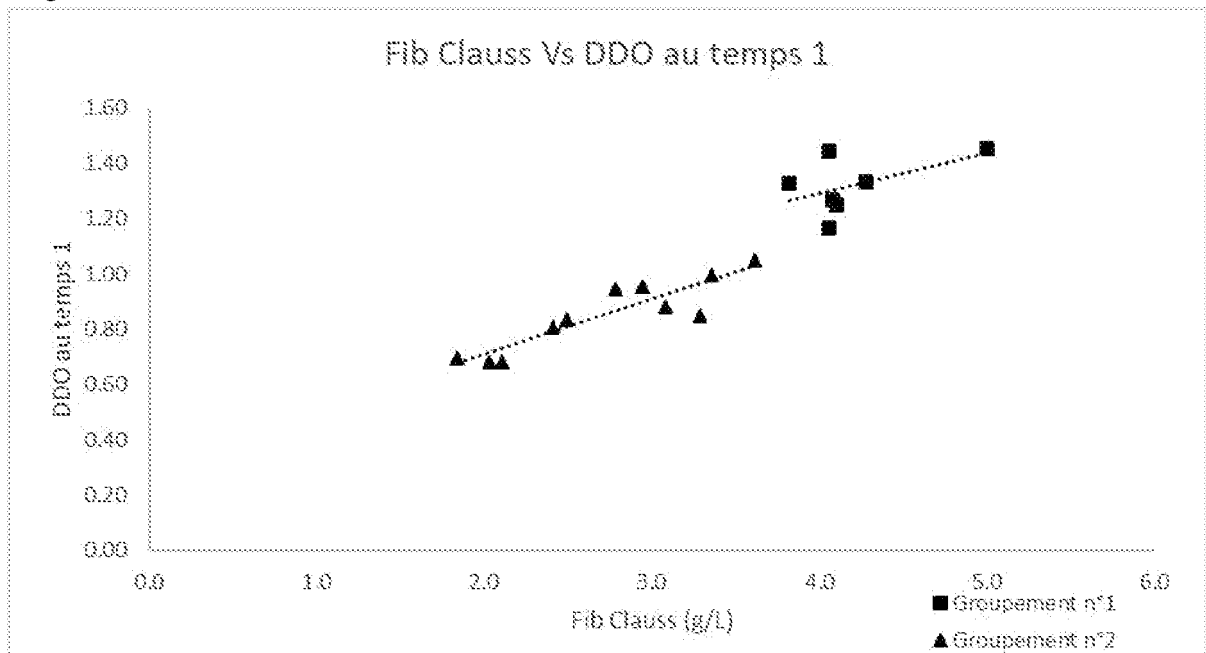
[Fig. 8]

Ecart de turbidité à deux temps (FVIII $\geq 1\%$ final test)

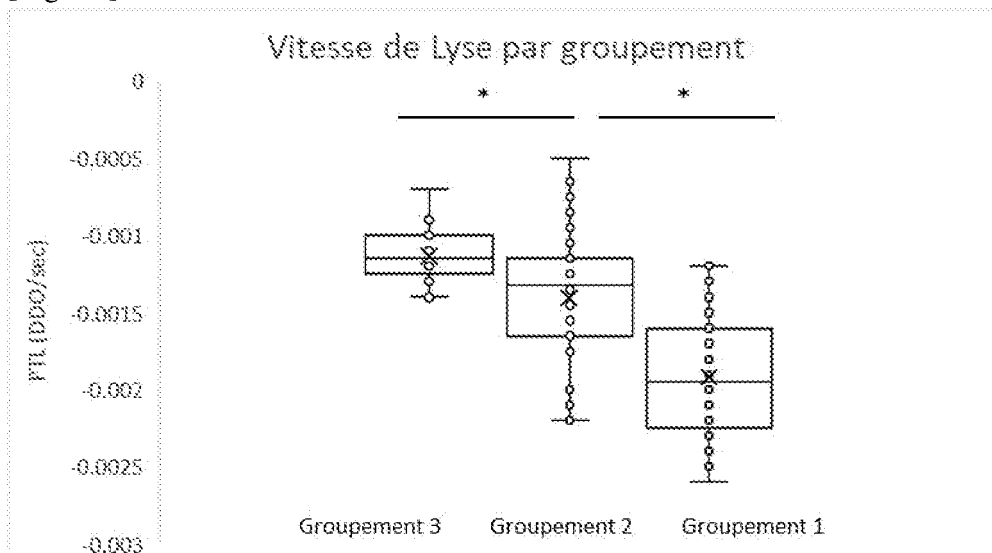
[Fig. 9]



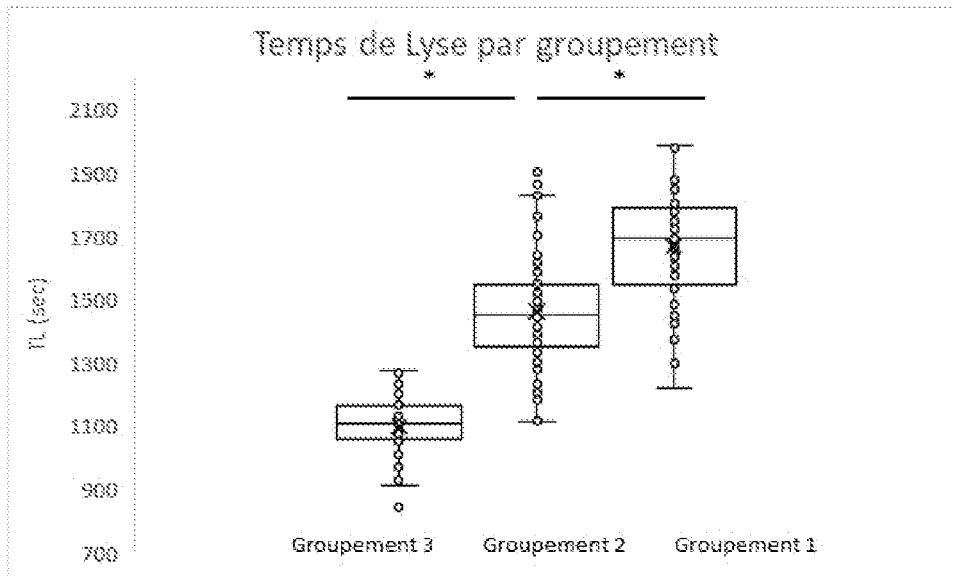
[Fig. 10]



[Fig. 11]

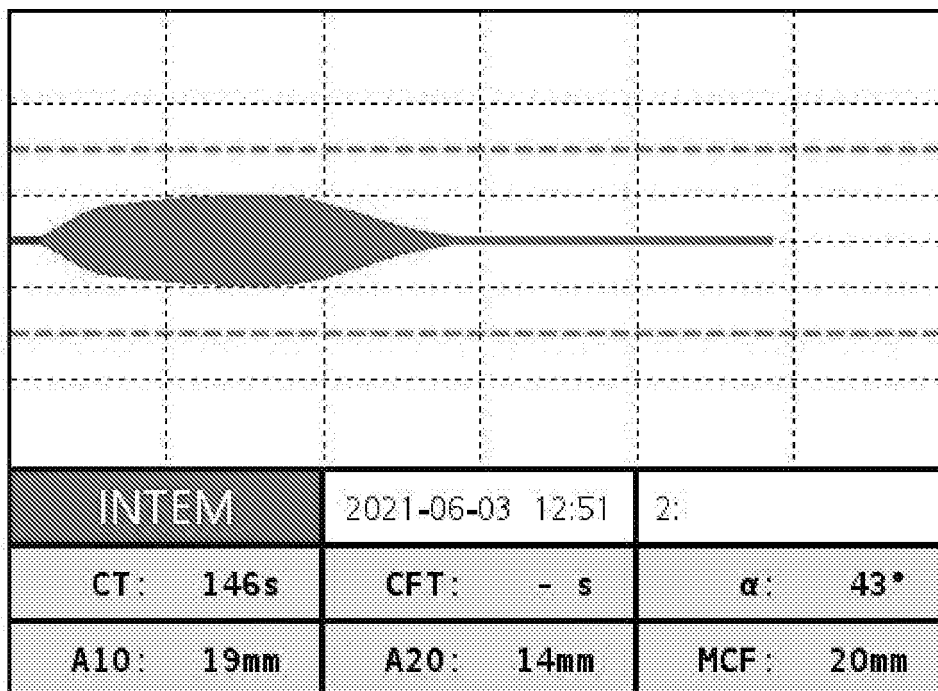


[Fig. 12]



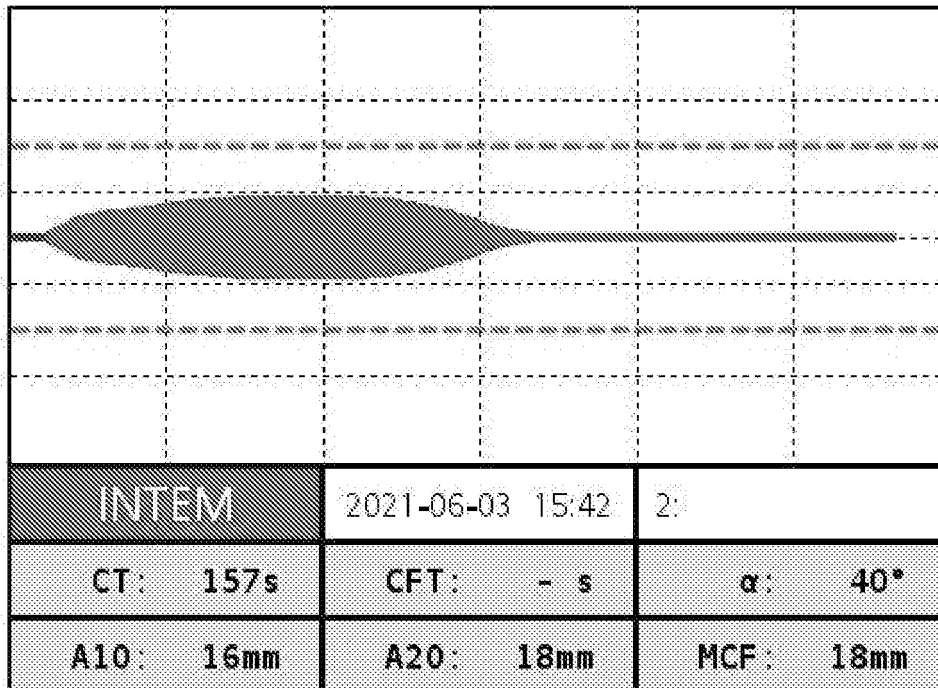
[Fig. 13A]

6352 20%



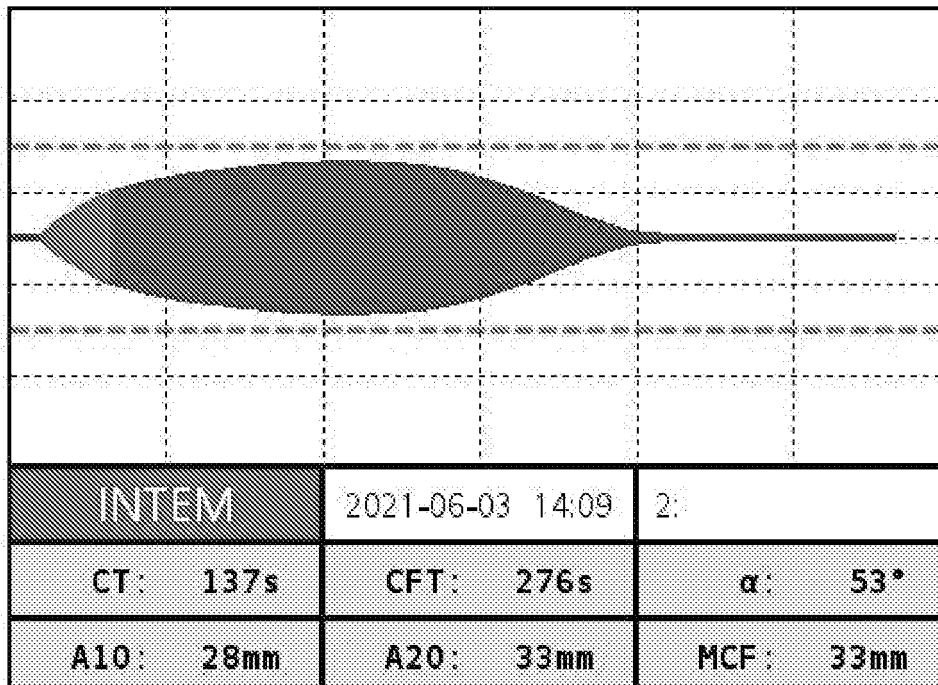
[Fig. 13B]

6202 20%

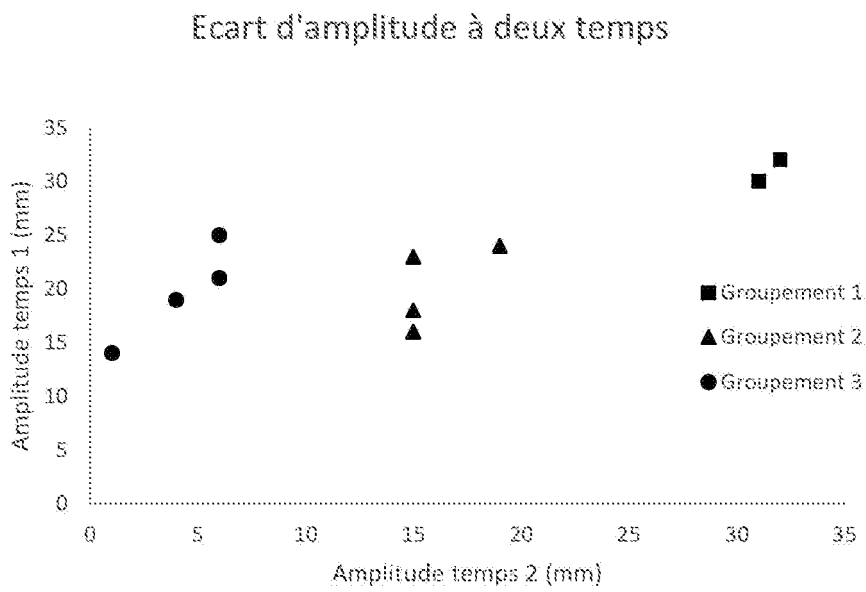


[Fig. 13C]

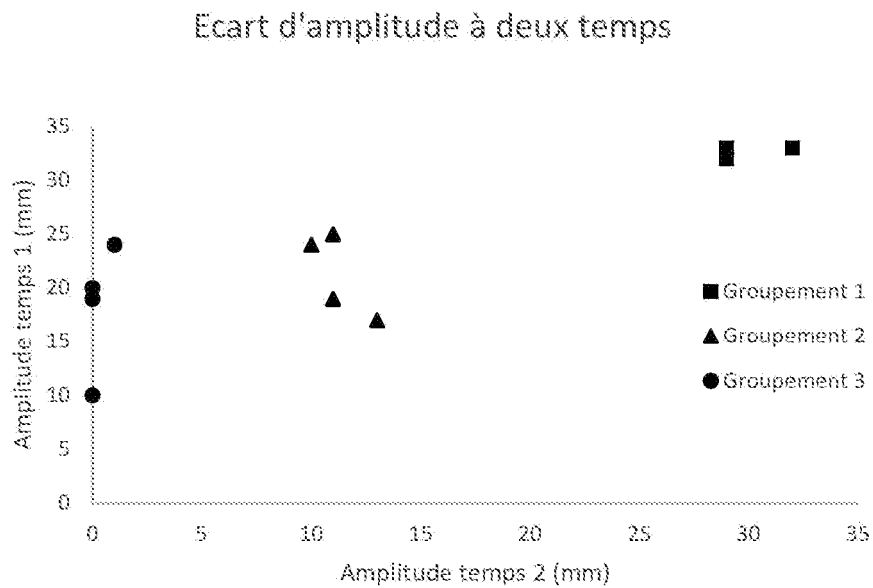
6496 20%



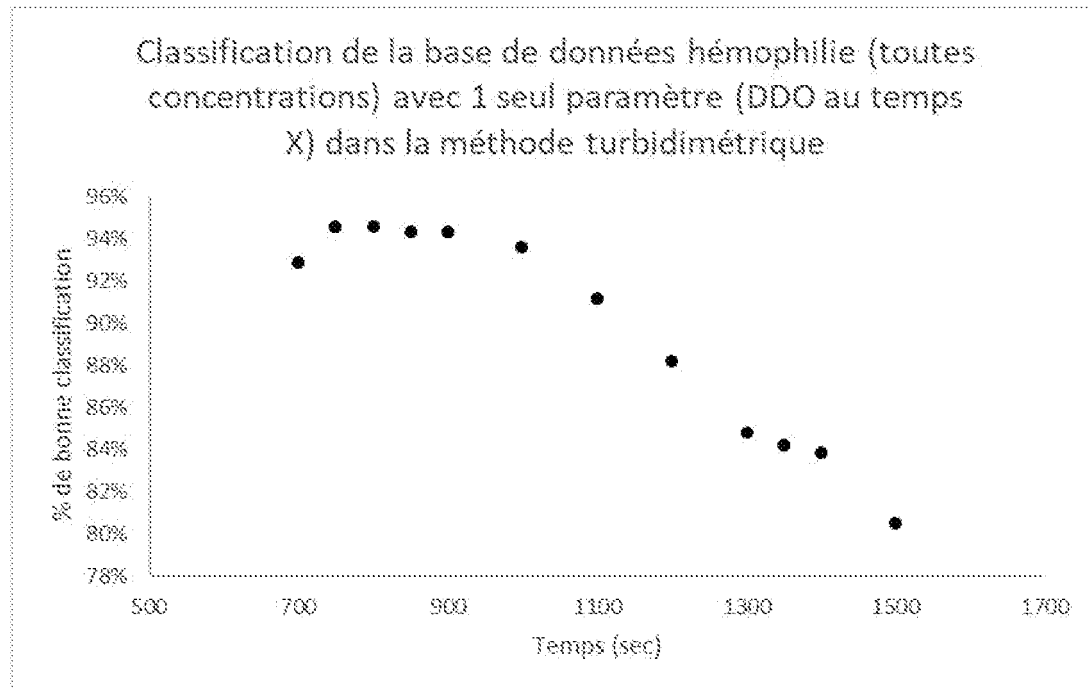
[Fig. 14A]



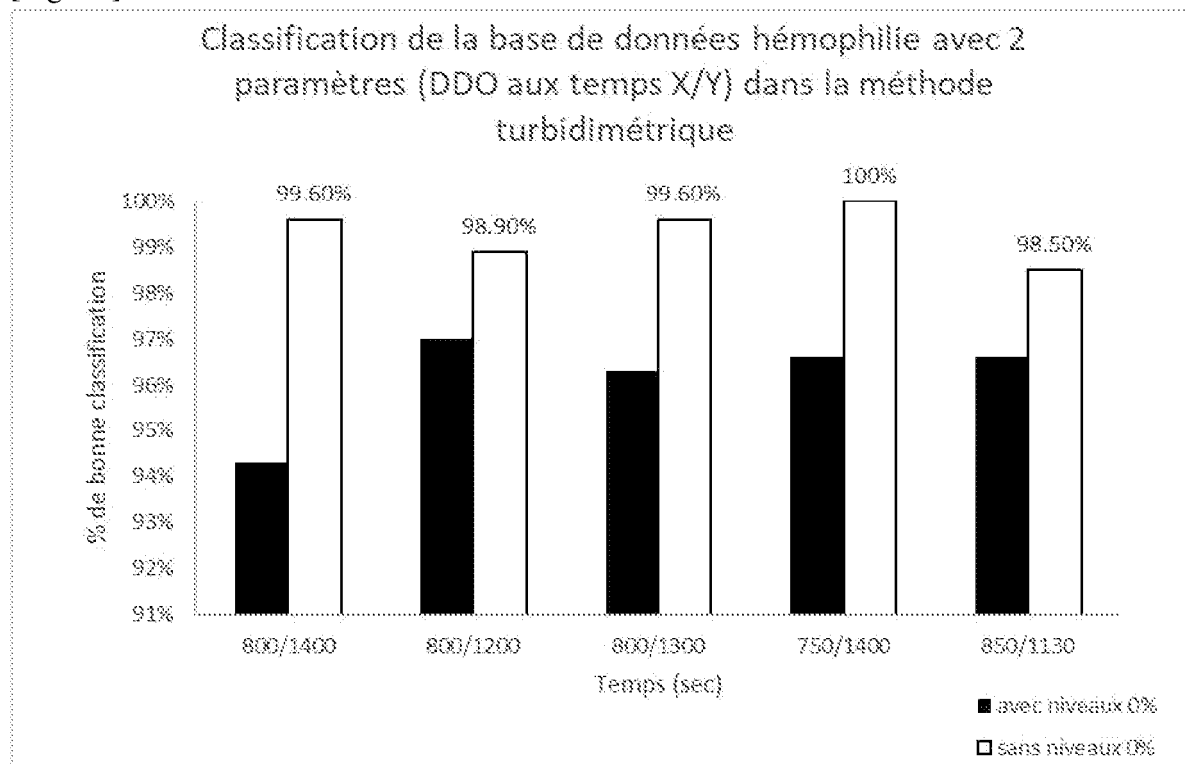
[Fig. 14B]



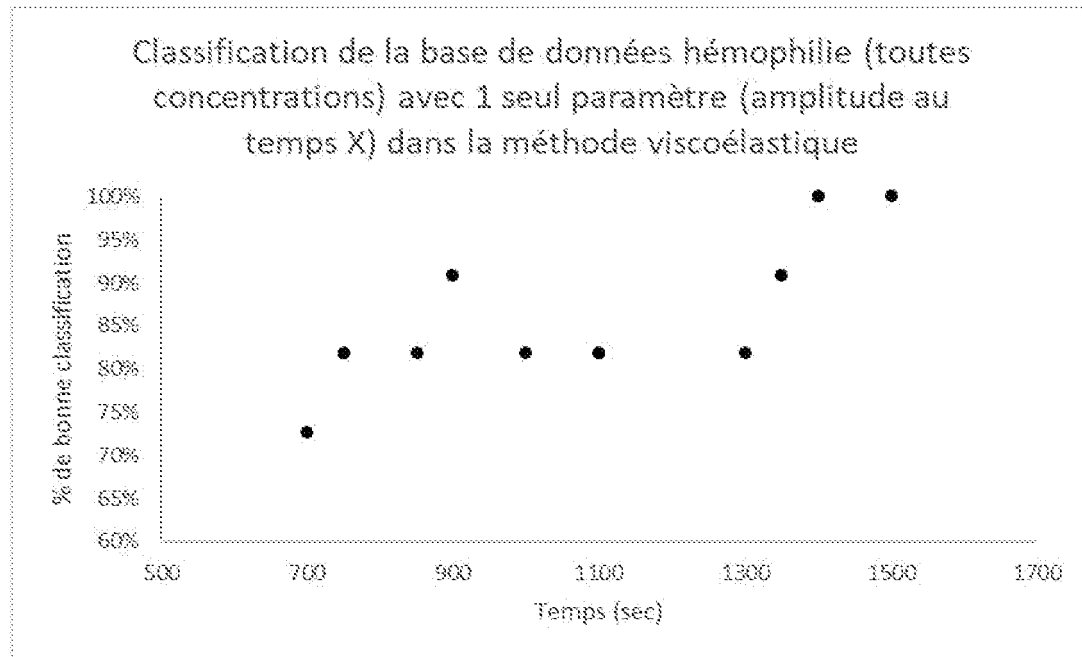
[Fig. 15]



[Fig. 16]



[Fig. 17]



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 904327
FR 2109634

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	KEIJI NOGAMI ET AL: "A novel simultaneous clot-fibrinolysis waveform analysis for assessing fibrin formation and clot lysis in haemorrhagic disorders", BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY, JOHN WILEY, HOBOKEN, USA, vol. 187, no. 4, 23 juillet 2019 (2019-07-23), pages 518-529, XP071169769, ISSN: 0007-1048, DOI: 10.1111/BJH.16111 * abrégé ; pg 519, col 2, para 1 ; pg 519, col 2, para continuant sur pg 520 ; Fig 1 * -----	1-3,5-18	G01N33/86 C12Q1/56
X	US 2017/234853 A1 (CONTANT GENEVIÈVE [FR] ET AL) 17 août 2017 (2017-08-17) * para 23-24, 66, 72, 154-157 ; exemple 1 ; revendication 18 * -----	1-3,5-18	
X	KAMRAN BAKHTIARI ET AL: "Clot lysis phenotype and response to recombinant factor VIIa in plasma of haemophilia A inhibitor patients", BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY, JOHN WILEY, HOBOKEN, USA, vol. 162, no. 6, 25 juillet 2013 (2013-07-25), pages 827-835, XP071169043, ISSN: 0007-1048, DOI: 10.1111/BJH.12470 * abrégé ; pg 828, col 2, para 1 ; Fig 2 ; pg 831, col 1, para continuant sur la col 2 * ----- -/--	1,3,6-8, 12-18	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) G01N C12Q
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
19 août 2022		Vadot-Van Geldre, E	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 904327
FR 2109634

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	TUTWILER VALERIE ET AL: "Blood clot contraction differentially modulates internal and external fibrinolysis", JOURNAL OF THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, vol. 17, no. 2, 1 février 2019 (2019-02-01), pages 361-370, XP055952824, GB ISSN: 1538-7933, DOI: 10.1111/jth.14370 Extrait de l'Internet: URL: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full-xml/10.1111/jth.14370 * pg 363, col 1, para 1 ; Fig 3 ; fig S4 *	1, 3, 4, 7, 8, 12-18	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
X	& Tutwiler V ET AL: "Supplemental Information Blood clot contraction differentially modulates internal and external fibrinolysis Short title: Clot contraction modulates fibrinolysis", / 1 février 2019 (2019-02-01), pages 1-5, XP055952853, Extrait de l'Internet: URL: https://onlinelibrary.wiley.com/action/downloadSupplement?doi=10.1111/jth.14370&file=jth14370-sup-0001-FigS1-S4.docx [extrait le 2022-08-18] -----	1, 3, 4, 7, 8, 12-18	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
19 août 2022		Vadot-Van Geldre, E	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

1

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 2109634 FA 904327

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **19-08-2022**

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

US	2017234853	A1	17-08-2017	BR	112017001492	A2	05-12-2017
				EP	3177921	A1	14-06-2017
				FR	3024237	A1	29-01-2016
				JP	2017523413	A	17-08-2017
				US	2017234853	A1	17-08-2017
				WO	2016012729	A1	28-01-2016