

CY-QUANT™ MV-TF Activity

Trousse pour l'évaluation de l'activité procoagulante TF-dépendante des microvésicules

Trousse de 96 Tests

Réf. 7503



A usage de Recherche Uniquement

1 - INTRODUCTION

Le facteur tissulaire (TF) est une glycoprotéine transmembranaire considérée comme le principal initiateur de la voie extrinsèque de la coagulation.

Différentes formes de TF ont été décrites ; cependant, le potentiel procoagulant est clairement associé à la forme membranaire. Le TF membranaire est retrouvé sur la plupart des cellules qui n'entrent pas en contact avec le sang, comme les cellules épithéliales ou les cellules nerveuses ; il est aussi exprimé sur certaines cellules sanguines activées (monocytes) ou sur des cellules cancéreuses et notamment sur les microvésicules (MVs) qui en dérivent (1).

La formation du complexe TF/FVII constitue la première étape de l'activation de la voie extrinsèque de la coagulation. Une fois le facteur VII fixé au TF, il est rapidement activé en VIIa. Le complexe TF/VIIa active, à son tour, le facteur X en Xa. Une fois le facteur Xa libéré du complexe TF/VIIa/Xa, il va se fixer au facteur Va à la surface des plaquettes ou des MVs plaquettaires conduisant à la formation du complexe prothrombinase qui transforme la prothrombine en thrombine. Le complexe TF/FVIIa peut également activer le facteur IX en IXa induisant une génération de thrombine et amplifiant ainsi la formation d'un caillot (2).

2 - PRINCIPE

Le CY-QUANT™ MV-TF activity consiste à mesurer la génération de facteur Xa (FXa) exclusivement liée à la concentration de TF dans l'échantillon (3) :

- l'échantillon est incubé 30 min à 37°C, en absence ou en présence d'un anticorps bloquant l'activité TF (R2a, R2b)
- après ajout du mélange de facteurs (FVII+FX ; R3), le FXa est généré pendant l'incubation de 2h à 37°C.
- la quantité de FXa produite est déterminée après arrêt de la réaction (R5) et ajout de substrat FXa (R6) (libération de pNA mesurée à 405nm)

La quantité de FXa générée est proportionnelle à la concentration en TF de l'échantillon.

3 - REACTIFS FOURNIS

- **Réactif R1** : 1 flacon de 15 mL de tampon de lavage 10X
- **Réactif R2a** : 1 flacon de 1,5 mL contrôle négatif (AcM non bloquant)
- **Réactif R2b** : 1 flacon de 1,5 mL contrôle anti-TF (AcM bloquant)
- **Réactif R3** : 2 flacons de « mix FVII + FX », lyophilisés
- **Réactif R4** : 1 flacon de 3 mL de tampon de dilution du R3
- **Réactif R5** : 1 flacon de 2,5 mL de solution d'arrêt
- **Réactif R6** : 1 flacon de 8 mL de substrat chromogène du FXa
- **Réactif R7** : 2 flacons de calibrant, lyophilisés
- **Réactif R8** : 2 flacons de contrôle bas, lyophilisés
- **Réactif R9** : 2 flacons de contrôle haut, lyophilisés

4 - PRECAUTIONS

- Respecter les bonnes pratiques de laboratoire.
- Se conformer à la réglementation locale en vigueur pour l'élimination des déchets.
- Considérer les échantillons biologiques comme potentiellement infectieux.
- Veillez à n'utiliser que des réactifs d'une même trousse ou d'un même lot.
- Afin d'obtenir des résultats comparables, veillez à utiliser le même type de plaques entre les manipulations

- Réactif 5 – Solution d'arrêt

H333 : Peut-être nocif par inhalation.

P261 : Éviter de respirer les vapeurs

P280 : Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage

- Réactif 6 – Substrat chromogène du FXa

H317 : Peut provoquer une allergie cutanée

H412 : Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme

H402 : Nocif pour les organismes aquatiques

P273 : Éviter le rejet dans l'environnement

P280 : Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage

P302+P352 : EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : laver abondamment à l'eau

5 - MATERIELS AUXILIAIRES NECESSAIRES NON FOURNIS

- Lecteur de microplaques de 96 puits équipé d'un filtre à 405 nm et permettant de réaliser une cinétique de lecture à 37°C.
- Eau déionisée ou distillée équilibrée à température ambiante, stérile de préférence.
- Chronomètre.
- Pipettes multicanaux, pipettes à embouts jetables.
- Agitateur type Vortex.
- Microplaques de 96 puits à fond plat adaptées, type référence 655101 (Greiner)
- Micro-tubes 1 mL en polypropylène adaptés aux systèmes 96 puits, type référence E1720-8000 (Starlab).
- Film plastique pour sceller la microplaque
- Enceinte thermostatée à 37°C
- Réservoir à réactif pour pipette multicanaux

6 - RECONSTITUTION ET CONSERVATION DU REACTIF

Conservés à 2-8°C sous leur état d'origine, les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'emballage.

Avant utilisation, tous les réactifs doivent être équilibrés à température ambiante (TA, 18-24°C) pendant au moins 30 minutes.

Note : Ne pas congeler les réactifs.

● Réactif R1 :

Stabilité après ouverture 2 mois à 2-8°C dans son flacon d'origine et en dehors de toute contamination.

Préparer une dilution au 1/10 en eau déionisée ou distillée (R1-1X).

Préparer le volume nécessaire pour la série à tester.

Stabilité après dilution : 2 mois à 2-8°C.

● Réactifs R2a, R2b, R4, R5 et R6 :

Prêts à l'emploi.

Stabilité après ouverture : 2 mois à 2-8°C dans leur flacon d'origine et en dehors de toute contamination.

● Réactif R3 :

Reconstituer chaque flacon avec 1,5 mL de réactif R4 et homogénéiser le contenu à l'aide d'un agitateur de type vortex pendant 5 secondes.

Stabilité après reconstitution : 4 heures à 18-24°C, dans son flacon d'origine.

● Réactifs R7, R8 et R9 :

Reconstituer chaque flacon avec 0,5 mL d'eau déionisée ou distillée et homogénéiser le contenu à l'aide d'un agitateur de type vortex pendant 5 secondes.

Stabilité après reconstitution : 4 heures à 18-24°C, dans son flacon d'origine.

7 - TRAITEMENT DE L'ÉCHANTILLON

Le protocole du test CY-QUANT™ MV-TF activity est réalisable sur une suspension de MVs purifiées et lavées à partir de plasma, de surnageant de culture ou de tout autre matériel biologique ou synthétique susceptible de porter du TF membranaire.

Les dosages sur MVs plasmatiques sont réalisés à partir de PFPs (Platelet-Free Plasma), prélevés sur tubes citrate.

8 - MODE OPERATOIRE

8.1 - Préparation de l'échantillon

Exemple de préparation d'un échantillon à partir du PFP

- Diluer 500 µL de PFP au demi avec 500 µL de réactif R1-1X
- Centrifuger 1 heure, à 24000 g.
- Prélever le surnageant (SN) avec précaution (laisser environ 50 µL au-dessus du culot).
- Reprendre le culot avec 1 mL de réactif R1-1X, et homogénéiser à l'aide d'un vortex.
- Centrifuger 1 heure, à 24000 g.
- Prélever le SN avec précaution en asséchant le culot.
- Reprendre le culot avec 125 µL de réactif R1-1X.

Le dosage est réalisé sur les MVs récupérées dans le culot de centrifugation.

Note : les échantillons ainsi préparés sont concentrés 4 fois (500/125). Ce facteur devra être pris en compte pour la détermination de l'activité de l'échantillon.

8.2 - Protocole

Calibration

Une gamme de calibration de 8 points est réalisée par dilution du calibrant R7 avec le réactif R1-1X. A partir de la condition non diluée, 7 points sont réalisés par dilution au demi en cascade.

2 points de **blanc** sont réalisés avec le réactif R1-1X.

Préparation de la gamme de calibration

Sur un portoir, disposer 8 tubes numérotés D1 à D8.

- Dans chacun des tubes D2 à D8, ajouter 200 µL de réactif R1-1X.
- Dans les tubes D1 et D2, ajouter 200 µL de réactif R7 (calibrant).
- Homogénéiser le tube D2 à l'aide d'un agitateur de type Vortex et pipeter 200 µL vers le tube D3.
- Effectuer les dilutions suivantes en répétant cette dernière étape, comme indiqué dans le tableau ci-dessous jusqu'à la dilution D8.

Changer les embouts après chaque pipetage pour éviter toute contamination.

Dilutions	Volume	Volume R1-1X
D1	200 µL de R7	-
D2	200 µL de R7	200 µL
D3	200 µL de D2	200 µL
D4	200 µL de D3	200 µL
D5	200 µL de D4	200 µL
D6	200 µL de D5	200 µL
D7	200 µL de D6	200 µL
D8	200 µL de D7	200 µL

Contrôles

Les contrôles haut et bas seront traités comme les échantillons mais sans leur appliquer la phase de préparation de l'échantillon décrite au paragraphe 8.1 ci-dessus.

Echantillons

Les échantillons à tester sont utilisés purs. Une concentration trop élevée en TF impliquerait d'appliquer une dilution adéquate avant le dosage.

Dosage

	Gamme de calibration	Echantillon / Contrôles	Volumes
Dépôt de la gamme de calibration et des échantillons / contrôles	Déposer les 8 points (D1 à D8) + les 2 puits blancs (R1-1X)	Déposer l'échantillon (ou contrôle) dans 2 puits	60 µL
Blocage de l'activité TF spécifique	Réactif R2a dans les 8 points (D1 à D8) + les 2 puits blancs	Réactif R2a dans le 1 ^{er} puits & Réactif R2b dans le 2 nd puits	20 µL
	Mélanger précautionneusement le contenu de chaque puits par 3 pipetages (aspiration/refoulement)		
Incubation	Couvrir les puits avec un film plastique et incubé 30 minutes à 37°C		
Génération de FXa	Réactif R3		20 µL
	Mélanger précautionneusement le contenu de chaque puits par 3 pipetages (aspiration/refoulement)		
	Couvrir la plaque avec un film plastique et incubé 2 heures à 37°C		
Arrêt de la réaction	Réactif R5		20 µL
	Mélanger précautionneusement le contenu de chaque puits par 3 pipetages (aspiration/refoulement)		
Révélation	Réactif R6		80 µL
Lecture	Mesurer la DO à 405nm en cinétique à 37°C, pendant 15 minutes (1 mesure par minute)		

Note :

Tout au long des étapes du dosage, éviter la formation de bulles dans les puits. Si celles-ci sont présentes avant lecture, les faire disparaître avec des embouts propres, avant la lecture.

9 - RESULTATS

9.1 - Calibration et dosage des échantillons

Certains lecteurs sont dotés d'un logiciel permettant d'exprimer le résultat directement en vitesse maximale V_{max} exprimée en milli Unité de Densité Optique par minute (mUDO/min).

Si ce n'est pas le cas du lecteur utilisé, les cinétiques de DO405nm sont exportées et les V_{max} sont calculées sur les 15 points de la cinétique selon la formule Excel : « PENTE(y_connu ; x_connu) ».

Le traitement des résultats est réalisable grâce à une trame de calcul informatique disponible sur simple demande auprès de BioCytex ou sur www.biocytex.fr.

Il est également possible de traiter les résultats indépendamment de la trame en suivant les étapes décrites ci-après :

9.1.1 - Calibration :

- Récupérer les résultats directement exprimés en V_{max} par le logiciel ou déterminés via Excel
- Ces V_{max} sont ensuite corrigées par soustraction du V_{max} correspondant au bruit de fond réactionnel (moyenne des 2 puits blancs).

$$V_{max \text{ corrigée}} = V_{max} - V_{max \text{ blanc}}$$

- Sous Excel, tracer un graphique à double échelle LOG x LOG, en reportant en abscisse les valeurs de V_{max} corrigées des 8 points de calibration et en ordonnée les concentrations correspondantes en TF (fM), issues de la concentration du calibrant R7 indiquée sur le papillon de calibration.

- Tracer la droite de calibration, en ajoutant une courbe de tendance « puissance » sur la série de données où $x = V_{max}$ et $y =$ concentration TF (fM).

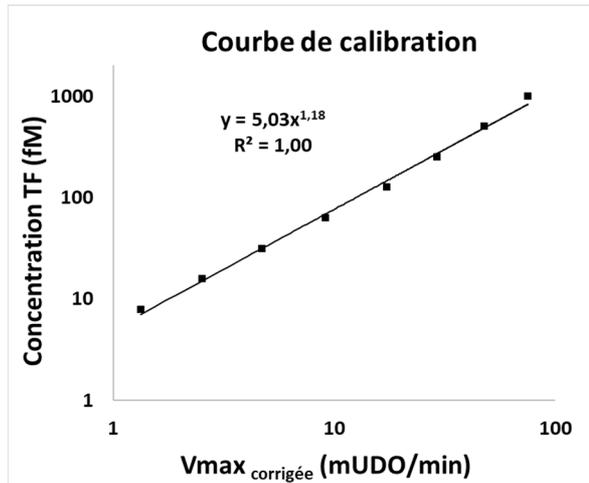
- Afficher l'équation de la courbe : $y = ax^b$

Avec : $1,0 \leq b \leq 1,30$ et $r^2 \geq 0,98$

Note :

Si b et/ou r^2 sont en dehors des valeurs annoncées, les résultats doivent être interprétés avec précaution.

Exemple de courbe de calibration :



9.1.2 - Echantillons :

- Calculer la valeur de V_{max} spécifique des échantillons / contrôles en soustrayant la valeur de V_{max} indépendante du TF (obtenue dans le puits traité avec l'anticorps bloquant anti-TF) à la valeur de V_{max} totale (obtenue dans le puits traité avec l'anticorps contrôle non bloquant) :

$$V_{max\ spécifique} = V_{max\ totale} - V_{max\ indépendante\ du\ TF}$$

- Reporter les V_{max} spécifiques des échantillons / contrôles sur la droite de calibration et en déduire la concentration en TF (fM).

Les résultats sont arrondis à l'entier le plus proche.

Dans le cas où l'échantillon serait préparé selon le §8.1, il conviendra d'ajuster l'activité mesurée en tenant compte du facteur de concentration (cf. note au §8.1).

9.2 - Contrôles internes

La correspondance des concentrations obtenues, pour les contrôles haut et bas, avec les fourchettes indiquées sur le papillon de calibration atteste de l'exactitude des résultats.

10 - CARACTERISTIQUES DE LA METHODE

La zone de mesure de la méthode s'étend de 10 fM à 1500 fM. En tenant compte du facteur de concentration appliqué, celle-ci correspondrait à une zone s'étendant de 2,5 fM à 375 fM, pour un échantillon plasmatique préparé tel que décrit dans le paragraphe 8.1

11 - LIMITATIONS

Liées au dosage

- Eviter toute contamination bactérienne des réactifs ou de la plaque.
- Température : pendant les durées d'incubation la température doit être maintenue et contrôlée à $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$.
- Une teneur élevée de l'échantillon en phospholipides peut engendrer une surestimation de la concentration en TF. Ceci se traduit par une inhibition plus faible du signal par l'AcM bloquant.
- Une concentration initiale forte en TFPI dans l'échantillon peut impacter le résultat du dosage malgré l'extraction des MVs et les lavages.

Liées à la préparation de l'échantillon plasmatique

- Le dosage peut être impacté par les conditions pré-analytiques (prélèvement, transport, vieillissement...).
- Le dosage peut être impacté par le protocole de préparation des PFPs.
- Le dosage peut être impacté par le protocole de préparation des culots.

11 - REFERENCES

- 1) Morrissey JH. 2003. Tissue factor: in at the start...and the finish? Journal of Thrombosis and Haemostasis; 5: 878-80.
- 2) Mackman, N. 2004. Role of Tissue Factor in Hemostasis, Thrombosis, and Vascular Development. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology; 24:1015-1022
- 3) Vallier, L. et al. 2019. Increasing the sensitivity of the human microvesicle tissue factor activity assay. Thrombosis Research 182; 64-74.

BIOCYTEX
140 ch. DE L'ARMEE D'AFRIQUE
13010 MARSEILLE
FRANCE
TEL : +33 (0) 4 96 12 20 40
FAX : +33 (0) 4 91 47 24 71

CPB0161
Version novembre 2023