



FACULTÉ
DE PHARMACIE



UNIVERSITÉ LIBRE DE BRUXELLES

Contribution des techniques de coagulation à la compréhension de la physiologie et de la physiopathologie de l'hémostase – Applications cliniques

Thèse présentée par Laurence ROZEN

en vue de l'obtention du grade académique de docteur en Sciences pharmaceutiques et biomédicales

Année académique 2020-2021

Sous la direction de la Professeur Anne DEMULDER, promotrice

Et de la Professeur Stéphanie POCHE, co-promotrice

Jury de thèse :

Professeur Jonathan Goole (Université libre de Bruxelles, Président)

Professeur Véronique Mathieu (Université libre de Bruxelles, Secrétaire)

Professeur Francis Corazza (Université libre de Bruxelles)

Professeur Frédéric Cotton (Université libre de Bruxelles)

Professeur Jonathan Douxfils (Université de Namur)

Professeur Kristin Jochmans (Vrije Universiteit Brussel VUB)



LABORATOIRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE BRUXELLES
LHUB-ULB
UNIVERSITAIR LABORATORIUM BRUSSEL

Remerciements

Je tiens à remercier, ma promotrice, le Professeur Anne Demulder. Elle m'a motivée, orientée tout au long de ce travail. Mais c'est surtout grâce à elle que j'ai atterri en laboratoire d'hématologie en 2009 et que j'ai pu acquérir connaissances et compétences. Son esprit scientifique et critique, sa rigueur, sa gestion humaine m'ont guidée. Je souhaite à tous de rencontrer une chef comme Anne.

Je remercie également ma co-promotrice, le Professeur Stéphanie Pochet pour son aide précieuse, ses conseils précis et avisés dans ce travail.

Mes remerciements vont aussi aux Professeurs Frédéric Cotton et Phu Quoc Lê pour leur accompagnement et leurs conseils tout au long de ce travail.

Le Professeur Jean-Paul Dehaye doit être particulièrement remercié ; il m'a encouragée à m'inscrire en doctorat et m'a accompagnée lors des débuts de ce dernier.

Lors de la défense privée, les questions, remarques et suggestions pertinentes des membres du jury de thèse, les Professeurs, Francis Corazza, Frédéric Cotton, Anne Demulder, Jonathan Douxfils, Jonathan Goole, Kristin Jochmans Véronique Mathieu et Stéphanie Pochet, m'ont permis d'améliorer le présent manuscrit. Je les en remercie vivement.

Je remercie tous mes collègues du laboratoire, spécialement ceux du service d'hématologie, et en particulier ceux du site Horta du LHUB-ULB, Myriam, Van, Sophie, Progene, Cengiz, Quentin, pour leur implication dans le travail, toujours dans la bonne humeur et la rigueur.

Ce travail est le fruit d'une étroite collaboration clinico-biologique avec les anesthésistes, les hématologues : en particulier merci aux Docteurs Laurence Dedeken, Philippe Vanderlinden, Ariane Willems et merci infiniment aux infirmières des salles 60 et 67 pour les prélèvements très réguliers et à Malou Ngalula qui gère toujours les projets d'une main de maître.

Je remercie évidemment aussi les patients ayant accepté de participer à ce projet.

Merci à la « Thrombin team », le Docteur Denis Noubouossie et France Debaugnies, pour les discussions commencées il y a maintenant 12 ans autour de la génération de thrombine et dont la présence me manque.

Merci à mes chefs de Service successifs, les Professeurs Brigitte Cantinieaux et Stéphane Eeckhoudt, pour le temps que j'ai pu consacrer à ce travail.

Merci à mes collègues, Danai, Phuong, Marie G, Marie D, Carole, Omar, Francis, Hanane, Nathalie, Isabelle, Malika, Barbara, Rong, pour les bons moments passés ensemble, autour de cas cliniques mais aussi autour d'un bon plat, d'une bonne partie de jeux de société ou de bons mots, grâce à eux le travail est aussi un plaisir !

Merci à mes amies, Nathalie, Catherine, Julie, Laura, Caroline, Fleur, Bhavna, France : seul on va vite, ensemble on va plus loin.

Ma famille, mes racines, mon tronc, mes fleurs, a été mon premier soutien.

Mes parents, qui m'ont montré le chemin, avec humour et tendresse.

Lionel, mon frère, dont la sagesse me surprend toujours.

Yves, mon partenaire d'amour et de vie, qui m'a encouragée à poursuivre un doctorat et peut maintenant soutenir une discussion sur l'asparaginase mieux que moi !

Dahlia, ma fleur, dont la curiosité et les connaissances m'émerveillent de jour en jour.

Anaëlle, ma princesse, dont la générosité et l'espièglerie me font fondre à chaque instant.

Table des matières

Remerciements.....	2
Table des illustrations.....	8
Liste des tableaux.....	9
Résumé.....	10
Liste des abréviations.....	11
1 Introduction.....	13
1.1 Généralités sur l'hémostase.....	13
1.1.1 Hémostase primaire ou agrégation plaquettaire.....	15
1.1.1.1 Les principaux acteurs.....	15
1.1.1.1.1 Le vaisseau sanguin.....	15
1.1.1.1.2 Les plaquettes.....	15
1.1.1.1.2.1 Les phospholipides.....	17
1.1.1.1.2.2 Le Glycocalyx plaquettaire.....	17
1.1.1.1.2.3 Le système canaliculaire ouvert.....	18
1.1.1.1.2.4 Le cytosquelette.....	18
1.1.1.1.2.5 Les granules α	19
1.1.1.1.2.6 Les granules denses.....	20
1.1.1.1.3 Le facteur von Willebrand.....	20
1.1.1.2 Formation du thrombus plaquettaire ou clou plaquettaire.....	20
1.1.1.2.1 Phase vasculaire.....	20
1.1.1.2.2 Phase plaquettaire.....	21
1.1.1.2.3 L'adhésion plaquettaire.....	21
1.1.1.2.4 L'activation plaquettaire.....	22
1.1.1.2.5 L'agrégation plaquettaire.....	24
1.1.1.2.6 Le contrôle de l'hémostase primaire.....	24
1.1.2 Coagulation plasmatique ou hémostase secondaire.....	25
1.1.2.1 Initiation.....	26
1.1.2.2 Amplification et propagation.....	27

1.1.3	Hémostase tertiaire.....	29
1.1.4	Fibrinolyse.....	30
1.2	Physiopathologie.....	32
1.2.1	Pathologies plaquettaires.....	32
1.2.2	Pathologies de la coagulation.....	34
1.2.3	Pathologies touchant la fibrinolyse.....	36
1.3	Tests de laboratoire pour évaluer des troubles de l'hémostase.....	36
1.3.1	Explorations au laboratoire ou tests de « routine ».....	36
1.3.1.1	Hémostase primaire.....	36
1.3.1.2	Coagulation plasmatique.....	36
1.3.1.2.1	Temps de prothrombine (PT).....	37
1.3.1.2.2	Temps de céphaline activé (aPTT).....	37
1.3.1.2.3	Temps de thrombine (TT).....	37
1.3.1.2.4	Dosages individuels de facteurs de la coagulation.....	37
1.3.1.3	Fibrinolyse.....	38
1.3.2	Les tests globaux.....	39
1.3.2.1	Test de génération de thrombine.....	39
1.3.2.1.1	Principe.....	41
1.3.2.1.2	Corrections des mesures.....	45
1.3.2.1.3	Analyse de la courbe de génération de thrombine.....	48
1.3.2.2	Tests viscoélastiques.....	49
1.3.2.2.1	Principe de la thrombo-élastométrie.....	50
1.3.2.2.2	Courbe et paramètres exploités.....	51
1.3.2.3	Autres tests globaux.....	53
2	Objectifs du projet.....	56
2.1	Évaluation du potentiel hémostatique chez les enfants atteints de leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) pendant le traitement par Asparaginase.....	56
2.2	Exploration de la balance hémostatique grâce au TGT suite à la greffe de moelle chez les patients drépanocytaires.....	57

2.3	Utilisation d'un test de viscoélasticité (ROTEM) en chirurgie cardiaque et plus précisément pédiatrique pour déterminer la dose minimale d'acide tranexamique nécessaire pour inhiber la fibrinolyse.....	59
3	Matériel et méthodes.....	61
3.1	Matériel.....	61
3.1.1	Appareillages.....	61
3.1.2	Produits, réactifs et consommables.....	61
3.2	Méthodes.....	63
3.2.1	Les tests de coagulation « classiques ».....	63
3.2.2	Quantification de paramètres biochimiques et hématologiques.....	63
3.2.3	Test de génération de thrombine TGT.....	64
3.2.4	Prélèvement et traitement des échantillons.....	64
3.2.5	Population contrôle pour les deux études avec TGT.....	64
3.2.6	Évaluation du potentiel hémostatique chez les enfants atteints de leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) pendant le traitement par Asparaginase	66
3.2.6.1	Patients.....	66
3.2.6.2	Analyses statistiques.....	68
3.2.7	Exploration de la balance hémostatique grâce au TGT suite à la greffe de moelle chez les patients drépanocytaires.....	69
3.2.7.1	Patients.....	69
3.2.7.2	Analyse statistique.....	69
3.2.8	Utilisation d'un test de viscoélasticité (thromboélastomètre ROTEM) en chirurgie cardiaque et plus précisément pédiatrique pour déterminer la dose minimale d'acide tranexamique nécessaire pour inhiber la fibrinolyse.....	71
3.2.8.1	Adultes sains.....	72
3.2.8.2	Enfants avec pathologie cardiaque congénitale.....	72
3.2.8.3	Test viscoélastique : le ROTEM.....	73
3.2.8.4	Analyses statistiques.....	73
4	Résultats et discussion.....	75
4.1	Évaluation du potentiel hémostatique chez les enfants atteints de leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) pendant le traitement par Asparaginase.....	75
4.1.1	Données démographiques et cliniques.....	75

4.1.2	Génération de thrombine sous Asp.....	77
4.1.3	Paramètres individuels hémostatiques.....	79
4.1.4	Discussion.....	81
4.1.5	Conclusion intermédiaire.....	85
4.2	Exploration de la balance hémostatique grâce au TGT suite à la greffe de moelle chez les patients drépanocytaires.....	86
4.2.1	Données démographiques.....	86
4.2.2	Données cliniques.....	86
4.2.3	Paramètres de TGT.....	87
4.2.4	Évolution de l'hémoglobine, de l'HbS et des LDH.....	92
4.2.5	Discussion.....	94
4.2.6	Conclusion intermédiaire.....	96
4.3	Utilisation d'un test de viscoélasticité (ROTEM) en chirurgie cardiaque et plus précisément pédiatrique pour déterminer la dose minimale d'acide tranexamique nécessaire pour inhiber la fibrinolyse.....	97
4.3.1	Données démographiques.....	97
4.3.2	Profil des courbes du ROTEM à différentes concentrations de TXA.....	98
4.3.3	Concentration effective en TXA inhibant une fibrinolyse maximale.....	100
4.3.4	L'effet de l'acide tranexamique sur la lyse du caillot.....	102
4.3.5	Discussion.....	103
4.3.6	Conclusion intermédiaire.....	106
5	Conclusion et perspectives.....	107
6	Bibliographie.....	119
7	Annexes.....	142
7.1	Évaluation du potentiel hémostatique chez les enfants atteints de leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) pendant le traitement par Asparaginase.....	142
7.2	Exploration de la balance hémostatique grâce au TGT suite à la greffe de moelle chez les patients drépanocytaires.....	150
7.3	Utilisation d'un test de viscoélasticité (ROTEM) en chirurgie cardiaque et plus précisément pédiatrique pour déterminer la dose minimale d'acide tranexamique nécessaire pour inhiber la fibrinolyse.....	160

Table des illustrations

Figure 1 : Schéma des différentes étapes de la formation du caillot d'après Cito.....	13
Figure 2 : Structure d'une plaquette et ses différents organites, d'après Watson.....	16
Figure 3 : Diagramme général des différentes étapes de la formation du thrombus plaquettaire, d'après Harrisson ⁸	21
Figure 4 : Schéma de la cascade de la coagulation, d'après Spadarella.....	26
Figure 5 : Monomère et polymère de fibrine, selon Medved.....	28
Figure 6 : Schéma illustrant la polymérisation de la fibrine selon Winter ⁴	29
Figure 7 : Schéma illustrant la fibrinolyse, d'après Faure.....	31
Figure 8 : Principaux désordres plaquettaires héréditaires, selon Salles.....	34
Figure 9 : Profils de génération de thrombine en fonction du profil hémostatique.....	40
Figure 10 : Formation de la thrombine et clivage du substrat fluorescent ⁸²	41
Figure 11 : Étapes de la génération de thrombine par méthode CAT.....	42
Figure 12 : Courbe de génération de thrombine.....	44
Figure 13 : Courbe de génération de thrombine détaillée, selon Lecompte.....	45
Figure 14 : Correction du signal.....	46
Figure 15 : Courbes obtenues pour le calibrateur et le patient.....	47
Figure 16 : Paramètres du thrombinogramme.....	49
Figure 17 : Principe de la thromboélastométrie avec le ROTEM ⁸⁹	50
Figure 18 : Courbe de réaction (thromboélastogramme) ⁸⁹	51
Figure 19 : Principe de la mesure Thrombodynamics.....	54
Figure 20 : Schéma d'administration des corticostéroïdes et de l'asparaginase pendant l'induction et l'intensification tardive.....	67
Figure 21 : Évolution des paramètres du test viscoélastique suite à l'ajout de t-PA..	71
Figure 22 : Paramètres de génération de thrombine sous Asp native et Peg Asp.....	78
Figure 23 : Comparaison des paramètres individuels d'hémostase entre les cohortes sous native et Peg Asp.....	80
Figure 24 : Comparaison des paramètres de TGT en présence de TM.....	88
Figure 25 : Modification des paramètres de TGT (médiane et intervalle) avant et après HSCT, en présence de TM.....	91
Figure 26 : Évolution de l'hémoglobine, de l'hémoglobine S et des LDH.....	93

Figure 27 : Courbes obtenues avec le réactif EXTEM et l'ajout de t-PA et de TXA...	99
Figure 28 : Index de lyse et amplitude en fonction des doses d'acide tranexamique	101
Figure 29 : Relation dose-effet entre la concentration d'acide tranexamique inhibant l'hyperfibrinolyse et l'index de lyse mesuré après 30 minutes (LI30).....	102

Liste des tableaux

Tableau 1 : Acteurs pro- et antithrombotiques de la balance hémostatique, selon Winter.....	14
Tableau 2 : Protéines stockées au sein d'un granule α , selon Flaumenhaft.....	19
Tableau 3 : Désordres plaquettaires héréditaires, selon Harrisson ⁸	33
Tableau 4 : Données démographiques des contrôles normaux et des patients sous Asp native ou PEG Asp.....	76
Tableau 5 : Données démographiques, cliniques et biologiques des 17 patients.....	87
Tableau 6 : Paramètres de TGT pour les NC et les patients avant et après greffe... .	89
Tableau 7 : Données cliniques et démographiques des adultes et enfants.....	97
Tableau 8 : Lyse et amplitude après 30 minutes.....	100

Résumé

Il existe actuellement plusieurs tests globaux permettant l'évaluation de l'hémostase. Ces outils ont l'avantage, contrairement aux dosages individuels de facteurs ou aux tests classiques de coagulation (temps de prothrombine, temps de thromboplastine partielle activée), d'explorer le potentiel de coagulation global d'un individu, résultant de l'action combinée des facteurs pro et anti coagulants. Parmi ces tests, le test de génération de thrombine et les tests viscoélastiques ont retenu notre attention. Ils ont été utilisés pour explorer trois pathologies.

La première partie de ce travail s'est focalisée sur l'évaluation du potentiel hémostatique chez les enfants atteints de leucémie aiguë lymphoblastique pendant le traitement par asparaginase native ou pégylée. L'asparaginase et les corticoïdes sont des molécules importantes du traitement, mais comportent différents effets indésirables, entre autre sur le système hémostatique avec l'apparition de thromboses. Le test de génération de thrombine a été exploré chez 56 enfants atteints de leucémie et a permis de mettre en évidence un potentiel de coagulation augmenté au diagnostic et pendant le traitement d'induction. Cet effet était moins marqué pour les patients sous asparaginase pégylée que sous asparaginase native.

La deuxième étude a exploré l'hémostase chez les patients drépanocytaires greffés. Ces derniers ayant un profil hypercoagulable, l'étude a évalué l'influence de la greffe sur la balance hémostatique. Dix-sept patients ont été inclus. Les résultats confirment un profil hypercoagulant en situation pré-greffe et une correction, certes incomplète, de ce profil vers un profil normal en situation post-greffe.

La troisième partie a étudié l'efficacité *in vitro* de l'acide tranexamique sur la fibrinolyse, particulièrement dans la chirurgie cardiaque pédiatrique. Pendant ce type d'intervention, le système vasculaire du patient est exposé à toute une série d'agressions qui conduisent à un risque non négligeable de saignement. Afin d'accroître la stabilité du caillot, l'acide tranexamique, agent antifibrinolytique, est largement utilisé. La concentration plasmatique minimale à cibler, permettant une inhibition complète de la fibrinolyse est peu renseignée surtout dans la population pédiatrique. Afin de répondre à cette interrogation, la dose minimale d'acide tranexamique nécessaire pour inhiber la fibrinolyse a été déterminée, après sensibilisation d'un test viscoélastique à la fibrinolyse.

Liste des abréviations

a2M : α 2-macroglobuline.

A30 : amplitude après 30 minutes.

ADP : adénosine diphosphate.

AR1 : average risk 1, risque intermédiaire 1.

AR2B : average risk 2 B, risque intermédiaire 2 B.

Asp : asparaginase.

CAT : calibrated automated thrombogram, thrombogramme calibré et automatisé.

CS : corticostéroïdes.

CT : clotting time, temps de coagulation.

CWA : clot wave analysis, analyse de la courbe du caillot.

DXM : dexaméthasone.

ET : événement thrombotique.

ETP : endogenous thrombin potential, potentiel endogène de thrombine.

FT : facteur tissulaire.

FVIII : facteur VIII.

FvW : facteur von Willebrand.

GVHD : graft versus host disease, maladie du greffon contre l'hôte.

HUDERF : hôpital universitaire des enfants Reine Fabiola.

IC : intervalle de confiance.

HSCT : transplantation de cellules souches hématopoïétiques.

LAL : leucémie aiguë lymphoblastique.

LI30 : index de lyse après 30 minutes.

MCF : maximum clot firmness, fermeté maximale du caillot.

NC : contrôles normaux.

PAI-1 : plasminogen activator inhibitor-1, inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 1.

PCP : pontage cardio-pulmonaire.

PDN : prednisolone.

PEG : polyéthylène glycol ou forme pégylée.

PPP : plasma pauvre en plaquettes.

PT : temps de Quick ou temps de prothrombine.

SCD : drépanocytose ou drépanocytaire.

SCO : système canaliculaire ouvert.

TAFI : thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, inhibiteur de la fibrinolyse activable par la thrombine.

TFPI : tissue factor pathway inhibitor, inhibiteur de la voie du facteur tissulaire.

TGT : test de génération de thrombine.

TM : thrombomoduline.

t-PA : tissue plasminogen activator, activateur tissulaire du plasminogène.

TXA : acide tranexamique.

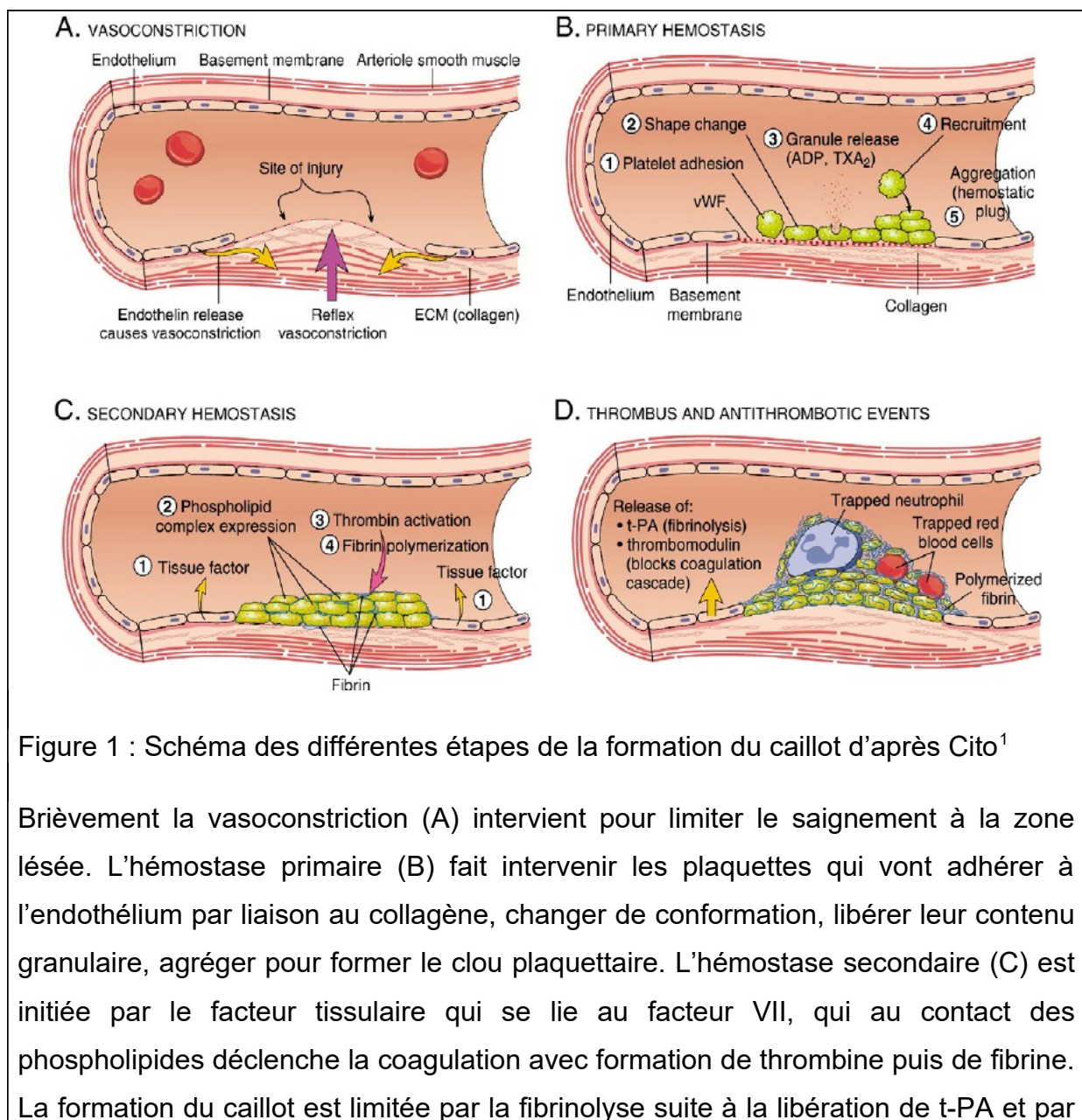
VLR : very low risk, risque très faible.

VHR : very high risk, risque très élevé.

1 Introduction

1.1 Généralités sur l'hémostase

L'hémostase représente le processus physiologique se mettant en place lors d'une brèche vasculaire, limitant le saignement. Ce processus fait intervenir une cascade de réactions aboutissant à l'obturation de la lésion, l'arrêt de l'hémorragie et le maintien de l'intégrité du système vasculaire. L'hémostase fait intervenir différents composants : les vaisseaux sanguins, leur endothélium, les protéines plasmatiques pro- et anticoagulantes et les cellules sanguines (principalement les plaquettes).



la thrombomoduline qui bloque la cascade de coagulation (D). ECM : matrice extracellulaire.

L'interaction entre ces différents composants conduit à la formation de thrombine, enzyme clé de la coagulation. La thrombine clive ensuite le fibrinogène en fibrine qui consolidera le clou plaquettaire.

L'hémostase peut être décomposée en trois étapes : hémostase primaire, coagulation plasmatique ou hémostase secondaire et fibrinolyse. Cependant *in vivo*, la situation est plus complexe. En effet, ces trois aspects de l'hémostase sont intimement intriqués.

Ce processus est normalement à l'équilibre car tout en prévenant le saignement, il empêche la thrombose. Cet équilibre est régulé par l'interaction complexe d'activateurs et d'inhibiteurs plasmatiques, permettant une localisation de la formation du caillot à la zone lésée et évitant une extension à des zones non lésées^{2,3}. Les différents acteurs de cet équilibre sont repris dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Acteurs pro- et antithrombotiques de la balance hémostatique, selon Winter⁴

Prothrombotiques	Antithrombotiques
Stase	Flux sanguin
Lésion endothéliale	Intégrité endothéliale
Hypercoagulabilité	Héparane sulfate et antithrombine
	Thrombomoduline, protéine S, protéine C, inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI), antithrombine
α 2-antiplasmine, inhibiteur de l'activateur du plasminogène	Activateur tissulaire du plasminogène (t-PA)

(PAI)	
Thromboxane A2	Prostacycline

1.1.1 Hémostase primaire ou agrégation plaquettaire

Cette étape correspond principalement à l'interaction des plaquettes avec la paroi vasculaire lésée et aboutissant à la formation du clou plaquettaire^{5,6}.

1.1.1.1 Les principaux acteurs

1.1.1.1.1 Le vaisseau sanguin

Le vaisseau sanguin se compose de trois couches : l'intima, la media et l'adventice⁷. L'intima, ou couche interne des vaisseaux est appelée endothélium. La partie interne de l'endothélium, ou sous-endothélium, est entourée par le tissu conjonctif de l'intima et les cellules musculaires de la media.

Les cellules endothéliales produisent de puissants agents antiplaquettaires (oxyde nitrique (NO), prostacycline, ectonucléoside triphosphate diphosphorylase ou CD39) qui empêchent les interactions entre les plaquettes et la paroi vasculaire. Le contrôle de l'hémostase primaire est développé au point 1.1.1.2.6.

En cas de dommage vasculaire, la membrane basale du sous-endothélium expose des molécules impliquées dans l'adhésion plaquettaire (dont P-sélectine, facteur von Willebrand (FvW), collagène) permettant l'initiation de la formation du caillot.

De plus, l'endothélium permet l'action de protéines anticoagulantes telles que l'antithrombine, la protéine S (PS), la protéine C (PC), l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI) (voir Coagulation 1.1.2 et Fibrinolyse 1.1.4).

1.1.1.1.2 Les plaquettes

Les plaquettes ou thrombocytes sont de petites cellules qui jouent un rôle majeur dans l'hémostase primaire. En moyenne, 10^{11} plaquettes sont produites chaque jour. Dans les conditions physiologiques, les plaquettes ont une durée de vie de 10 jours dans la circulation sanguine, à un taux de 150 à 300 $10^3/\mu\text{L}$, sont inactives et

circulent dans les vaisseaux à l'état de repos. Ces plaquettes à l'état inactif sont caractérisées par leur forme discoïde dans le sang circulant⁸.

Lorsque les vaisseaux sanguins sont lésés, les thrombocytes, grâce à leur petite taille sont recrutés rapidement et de manière contrôlée au niveau de la lésion et sont activés permettant la formation d'un thrombus. Cette activation plaquettaire est caractérisée par la perte de leur forme discoïde : les plaquettes s'étalent et émettent des pseudopodes vers les plaquettes voisines⁹.

Les plaquettes contiennent toute une série de constituants intervenant dans l'hémostase : la bicouche phospholipidique, le glycocalyx, le système canaliculaire ouvert, le cytosquelette ainsi que les granules denses et granules α et résumés dans la Figure 2.

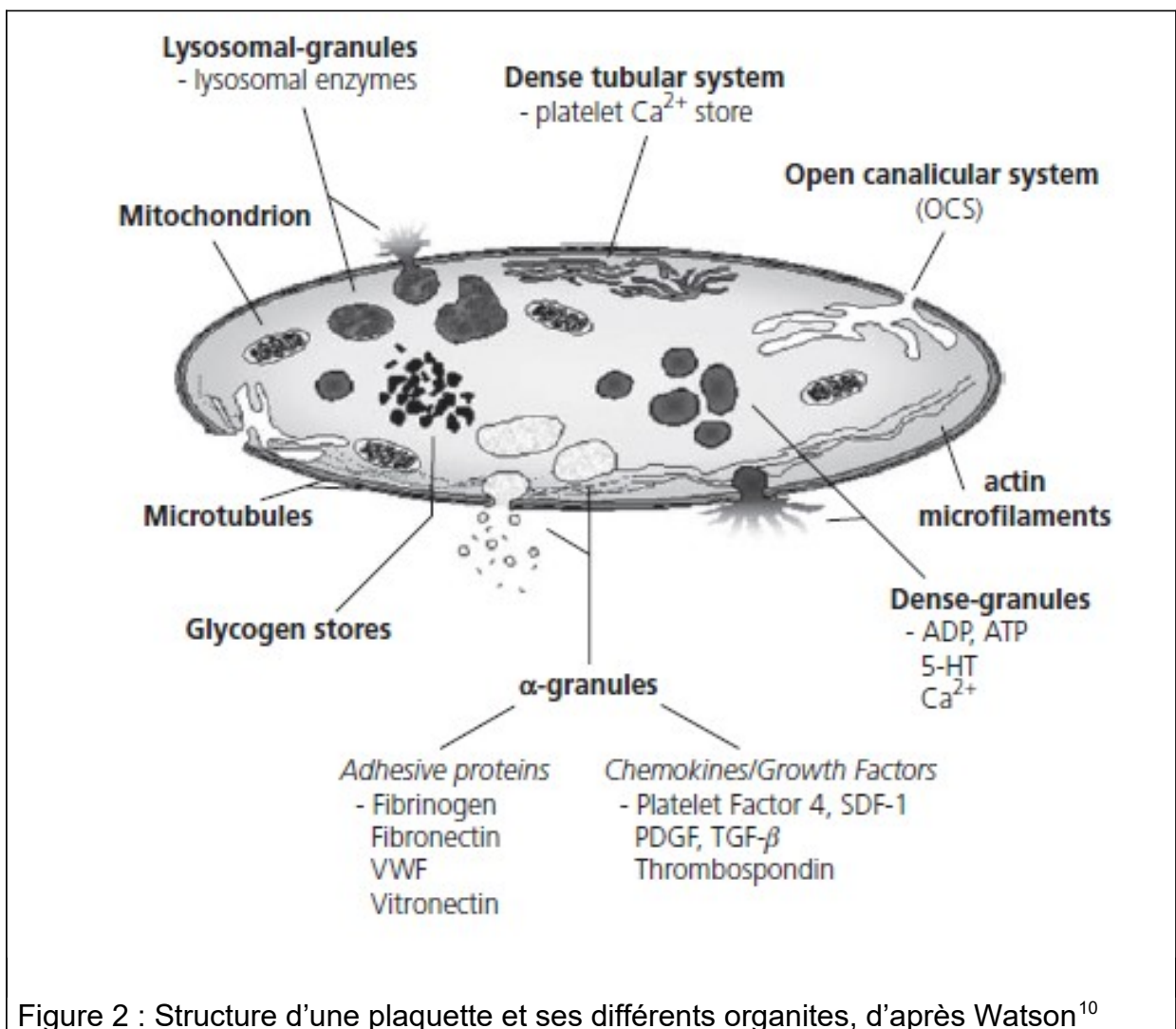


Figure 2 : Structure d'une plaquette et ses différents organites, d'après Watson¹⁰

Ce schéma reprend les différents éléments d'une plaquette : le système canaliculaire ouvert, le cytosquelette comprenant les microfilaments d'actine et les microtubules, les mitochondries, le glycogène, les granules denses contenant l'ADP, l'ATP, le calcium, les granules α contenant les protéines d'adhésion et les facteurs de croissance.

Le processus d'hémostase primaire est complexe car il implique de nombreuses cascades ou voies d'activation aboutissant à la formation du clou plaquettaire au niveau d'un vaisseau lésé. Ces cascades sont médiées par différents acteurs : les récepteurs membranaires plaquettaires, les glycoprotéines des vaisseaux sanguins, les protéines circulantes, les cascades biochimiques intracellulaires¹¹.

1.1.1.1.2.1 Les phospholipides

À l'état de repos, la membrane des thrombocytes est constituée d'une bicouche phospholipidique caractérisée par une répartition asymétrique de ses composants entre les feuilletts lipidiques externes et internes¹². Dans cet état, les phosphatidylsérines sont situées du côté interne.

Lors de l'activation plaquettaire, la concentration intra-cytoplasmique en calcium augmente fortement. Ceci va entraîner la modification de l'activité d'enzymes catalysant la répartition des phospholipides sur les deux couches membranaires. La scramblase va être activée, et les translocases (flippases et floppases) inhibées. Les phosphatidylsérines vont ainsi être transportées de la couche interne de la membrane vers la couche externe des plaquettes, exposant ainsi leur charge anionique et leur activité procoagulante vers l'extérieur. Les phosphatidylsérines ainsi exposées permettent de fixer différentes enzymes impliquées dans la cascade de coagulation afin d'aboutir à la formation d'un réseau de fibrine¹³.

1.1.1.1.2.2 Le Glycocalyx plaquettaire

Le glycocalyx (ou feutrage micro-fibrillaire) est un élément présent chez tous les types cellulaires eucaryotes, proposant une protection à la membrane de la cellule.

Dans les plaquettes, elle est composée des glycoprotéines permettant l'interaction avec le sous-endothélium, l'activation, l'adhésion et l'agrégation plaquettaire. Les

glycoprotéines GPIb-IX-V, GPVI et intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (ou GPIIb/IIIa) sont particulièrement importantes¹⁴ dans le bon déroulement de l'hémostase primaire.

Le complexe GPIb-IX-V agit comme récepteur à la surface plaquettaire et permet l'adhésion plaquettaire avec le sous-endothélium lésé, principalement par sa liaison avec le FvW, lui-même capable de se lier au collagène. Le complexe se lie aussi à la thrombospondine, permettant une adhésion plaquettaire en absence de FvW. Au-delà de ce rôle dans l'adhésion plaquettaire, ce complexe permet une activité coagulante à la surface des plaquettes en liant l' α -thrombine, et le facteur XI.

La GPVI est le récepteur majeur des plaquettes pour le collagène.

L'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (ou GPIIb/IIIa) s'active en fin d'activation plaquettaire et permet l'agrégation plaquettaire suite à sa liaison au fibrinogène et au FvW.

1.1.1.1.2.3 Le système canaliculaire ouvert

Le système canaliculaire ouvert (SCO) réalise des invaginations membranaires intracytoplasmiques permettant d'augmenter la surface de contact cellulaire avec le plasma, d'améliorer la libération du contenu granulaire en réponse à une lésion vasculaire, de favoriser le transport de molécules plasmatiques (fibrinogène) vers des zones internes de la cellule^{15,16}. Des protéines localisées au niveau du SCO favorisent la sécrétion plaquettaire suite à la fusion des membranes granulaires avec la membrane du SCO au niveau de la membrane plaquettaire.

1.1.1.1.2.4 Le cytosquelette

Le cytosquelette plaquettaire joue un rôle majeur dans la physiologie plaquettaire en maintenant une structure discoïde lorsque les plaquettes sont au repos et en permettant, lorsqu'elles sont activées, leur changement de forme, l'émission de filopodes, l'adhésion et l'agrégation, et en contribuant à l'exocytose de granules¹⁷.

Il est composé majoritairement d'actine et organisé en cytosquelette sous-membranaire constitué de courts filaments d'actine, stabilisé par la filamine (ou Actin Binding Protein ABP-280), la spectrine, la taline et la vinculine, et en cytosquelette cytoplasmique, stabilisé par d'autres protéines de liaison dont la filamine. Alors que le cytosquelette sous-membranaire est connecté à la membrane plasmique via son interaction avec certaines glycoprotéines de surface et des molécules de

signalisation, le cytosquelette cytoplasmique n'entrera en connexion avec les glycoprotéines de surface qu'après activation plaquettaire¹⁸. Le cytosquelette des plaquettes comporte également des microtubules agencés en une bande marginale circonférentielle interne, composée de polymères de tubuline, située directement sous la membrane plasmique. Son rôle est de maintenir la forme discoïde caractéristique des plaquettes au repos¹⁹.

1.1.1.1.2.5 Les granules α

Les granules α sont les organelles les plus abondants au sein des plaquettes²⁰. Le contenu protéique des granules α trouve son origine au cours de la formation des plaquettes par les mégacaryocytes via la synthèse des protéines et l'endocytose des protéines²⁰. Les granules α stockent des protéines associées à la membrane et des protéines solubles. Les protéines solubles se retrouvent dans le milieu extracellulaire lors de la sécrétion des granules tandis que les protéines associées à la membrane sont dispersées dans la membrane plaquettaire²⁰. Lors de l'activation plaquettaire, le contenu des granules est déversé dans le courant sanguin par un processus de fusion membranaire régulée par l'activité de protéines du SCO.

Les protéines stockées dans les granules α présentent des fonctions diverses dont certaines sont résumées dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Protéines stockées au sein d'un granule α , selon Flaumenhaft²¹

Fonctions	Protéines
Glycoprotéines membranaires	GPIb, GPIIb/IIIa, GPVI
Facteurs de coagulation	vWF, FV, FXI, FII, fibrinogène, HMWK
Inhibiteurs de coagulation	TFPI, protéine S, protéase nexin-2
Composants de la fibrinolyse	PAI-1, TAFI, α 2-antiplasminine, plasminogène, uPA
Autres inhibiteurs de protéase	α 1-antitrypsine, α 2-macroglobuline

Protéines inflammatoires, pro-athérogéniques, cicatrisantes, antimicrobiennes	P-sélectine, ligand de la P-sélectine PSGL-1, thrombospondine, CD40L, chémokines et cytokines, composants du complément (C3, C4, C1 inhibiteur, protéine H)
---	---

1.1.1.1.2.6 Les granules denses

Les corps denses ou granules δ sont des organelles dérivées du lysosome. Les corps denses sont formés au sein du mégacaryocyte et deviennent, avant leur maturation, des corps multivésiculaires²². Les corps denses présentent une concentration élevée en molécules telles que l'adénosine triphosphate, l'adénosine diphosphate (ADP), la guanosine diphosphate, l'uridine triphosphate, la sérotonine, l'histamine, des pyrophosphates, du calcium, du potassium²¹. Le corps dense maintient un milieu acide au pH de 5,4 grâce à l'action d'une pompe à proton dépendante de l'adénosine triphosphate²³. De plus les corps denses possèdent également des protéines membranaires telles que la GPIb ou encore l'intégrine $\alpha_2\beta_3$ ²⁴.

1.1.1.1.3 Le facteur von Willebrand

Le facteur von Willebrand (FvW) est une protéine plasmatique majeure de l'hémostase primaire. Cette glycoprotéine multimérique permet de recruter les plaquettes au niveau de la brèche vasculaire et d'y amener le facteur VIII²⁵. Au sein d'un flux sanguin physiologique, le FvW circule sous sa forme inactive dont la caractéristique principale est de présenter une faible affinité pour les plaquettes²⁶.

Lors d'une lésion vasculaire, une vasoconstriction réflexe réduit le calibre vasculaire et réduit le flux sanguin. L'augmentation des forces hydrodynamiques qui s'ensuivent permettent le changement de conformation du FvW, son activation et une augmentation de son affinité pour les plaquettes. Le FvW peut alors adhérer aux plaquettes via une partie du complexe GPIb-IX-V, la glycoprotéine GPIb α . Cette étape est appelée adhésion plaquettaire et est développée au point 1.1.1.2.3.

1.1.1.2 Formation du thrombus plaquettaire ou clou plaquettaire

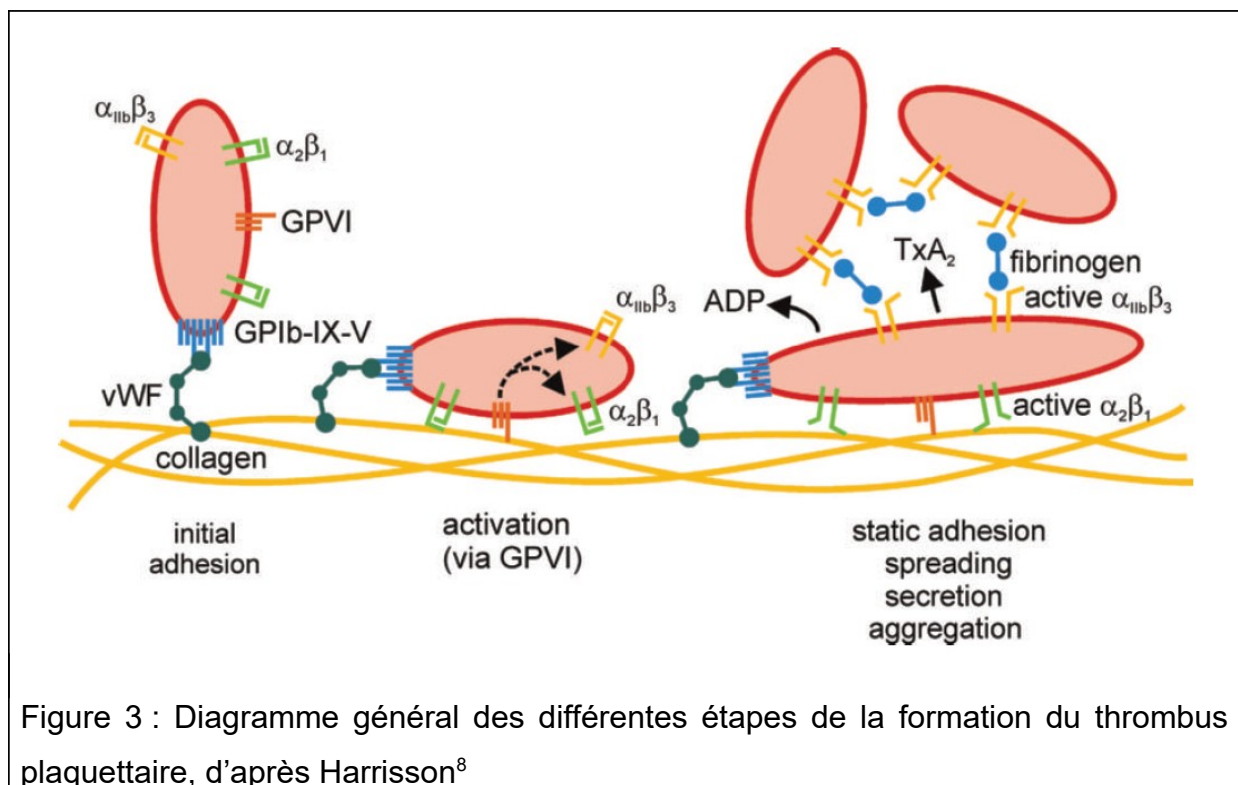
1.1.1.2.1 Phase vasculaire

Suite à la lésion d'un vaisseau sanguin, une vasoconstriction spontanée de celui-ci survient, diminuant le flux sanguin et facilitant l'accumulation locale des plaquettes et des facteurs de la coagulation. Cette vasoconstriction est le fruit de la contraction des cellules musculaires lisses provenant de la media.

La vasoconstriction peut durer 20 à 30 minutes mais elle n'est pas suffisante pour stopper à elle seule une hémorragie. La circulation sanguine produit une contrainte de cisaillement dont la force est maximale à proximité des parois vasculaires et minimale au centre du vaisseau. Cette contrainte joue un rôle fondamental pour l'adhésion plaquettaire en cas de lésion d'un vaisseau²⁷.

1.1.1.2.2 Phase plaquettaire

Il s'agit de l'adhésion, l'activation et l'agrégation, regroupés sous le nom « temps plaquettaire », qui se déroulent simultanément et conduisent à la formation du clou plaquettaire. Ces trois phases sont développées ci-dessous séparément et reprise à la Figure 3.



Les plaquettes sont capturées par le facteur von Willebrand FvW lié au collagène. Le collagène active les plaquettes via la GPVI entraînant une augmentation de l'affinité des intégrines pour le FvW/fibrinogène et le collagène. Les plaquettes adhèrent et l'activation plaquettaire est potentialisée par la libération d'ADP et de thromboxane A2.

1.1.1.2.3 L'adhésion plaquettaire

Le sous-endothélium du vaisseau est mis à nu lors d'une lésion d'un vaisseau et se retrouve exposé au flux sanguin. Deux acteurs importants dans l'adhésion des plaquettes sont le collagène et le FvW. Les plaquettes adhèrent au collagène par leurs récepteurs au collagène (glycoprotéine GPVI et intégrine $\alpha_2\beta_1$ GPIIb/IIIa). L'intervention du FvW est nécessaire pour « stopper » les plaquettes au niveau du collagène. Les molécules de FvW sont sécrétées depuis l'endothélium et les plaquettes activées et contenues dans le plasma. Elles vont se lier au collagène du sous-endothélium et favoriser ainsi l'adhésion plaquettaire en ralentissant le mouvement des plaquettes au cœur du flux sanguin²⁸. Le FvW se lie au collagène grâce au domaine A3. Le FvW est ensuite étiré suite aux forces de cisaillement du flux sanguin. Le FvW expose alors le domaine A1 et peut se lier au récepteur GPIIb des plaquettes^{29,30}. Les plaquettes établissent alors de multiples liaisons au FvW grâce à leurs récepteurs membranaires GPIIb (et dans une moindre mesure l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ GPIIb/IIIa) tandis que les molécules de FvW sont soutenues par les fibres de collagènes du tissu sous-endothélial. D'autres mécanismes d'adhésion, font intervenir d'autres récepteurs dont la P-sélectine.

1.1.1.2.4 L'activation plaquettaire

Plusieurs étapes peuvent à nouveau être identifiées : la signalisation précoce médiée par des récepteurs d'adhésion cellulaire, la convergence des voies d'activation intracellulaires, l'activation intracellulaire des récepteurs d'adhésion, l'activation extracellulaire des récepteurs d'adhésion, l'amplification de l'activation plaquettaire¹⁹. Les différents agonistes de l'activation plaquettaire regroupent : le collagène, la thrombine, l'ADP, le thromboxane A2. Ces voies d'activation mettent en jeu différentes cascades moléculaires telles que : des récepteurs couplés à la protéine G, l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ (GPIIb/IIIa), la voie des phosphoinositides 3-kinases. Toutes ces

molécules vont permettre d'activer les kinases intracellulaires jouant un rôle dans le changement conformationnel des plaquettes²⁸, la libération de calcium intracellulaire, la synthèse de thromboxane A2, favorisant le relargage du contenu plaquettaire vers l'extérieur et le recrutement des plaquettes environnantes.

Voici brièvement la description de l'activation plaquettaire : lorsque les plaquettes ont adhéré à l'endothélium lésé, via l'interaction collagène-FvW-GPIb, les plaquettes sont activées. Le premier acteur de cette activation est le GPVI entraînant la cascade de la tyrosine kinase menant à l'activation de la phospholipase C. Cette dernière clivant le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate en 1,4,5-inositoltrisphosphate et 1,2-diacylglycerol. Le 1,4,5-inositoltrisphosphate agit alors comme deuxième messenger et se lie à son récepteur sur le système tubulaire dense entraînant une autre série d'activations. L'influx de Ca^{2+} dans la plaquette induit aussi l'activation plaquettaire^{31,32} : activation de la phospholipase A2. Celle-ci clive alors les phospholipides avec libération de l'acide arachidonique. L'acide arachidonique est transformé en thromboxane A2 par la cyclo-oxygénase et la thromboxane synthase. Le thromboxane A2 agit à son tour comme activateur plaquettaire (et amplificateur) menant à une augmentation du Calcium intracellulaire.

Les autres molécules libérées sont l'ADP et la 5-hydroxytryptamine (sérotonine) activant les plaquettes via des récepteurs couplés à la protéine G. La thrombine, quant à elle, n'est pas libérée des plaquettes mais est un puissant activateur plaquettaire via les récepteurs PAR-1 et PAR-4³³. Les plaquettes peuvent donc s'activer elles-mêmes et recruter d'autres plaquettes au site d'agrégation.

Le récepteur à l'ADP le plus connu est le récepteur métabotrope P2Y12.

Ceci mène :

- À un changement de conformation avec entre autre activation de la scramblase changeant la composition de la bicouche lipidique plaquettaire et exposant alors les phosphatidylsérines sur la surface externe de la membrane, chargées négativement et permettant la liaison du Ca^{2+} . Lui-même se liant à des molécules chargées négativement comme les facteurs vitamines K dépendant activés, entraînant la formation de

thrombine et l'augmentation de l'activation plaquettaire et la coagulation^{34,35}.

- À la formation de pseudopodes.
- À la libération des granules plaquettaires via le système canaliculaire ouvert et la synthèse et le relargage du thromboxane A2.
- Au changement de conformation du récepteur GPIIb/IIIa et son activation, lui permettant alors de se lier à son ligand, le fibrinogène (voir point suivant agrégation plaquettaire).

1.1.1.2.5 L'agrégation plaquettaire

L'agrégation plaquettaire correspond à la constitution de ponts interplaquettaires, résultat de la fixation du fibrinogène, plasmatique ou sécrété, à l'intégrine α IIb β 3 activée présente à la surface des plaquettes. L'intégrine α IIb β 3 est activée, via entre autre le taux élevé de Ca^{2+} et de 1,2-diacylglycerol. Cette activation consiste en un changement de conformation de type « inside-out » de l'intégrine et permet la liaison du fibrinogène au FvW^{36,37}. Le fibrinogène permet de constituer un réseau reliant les différentes plaquettes activées entre elles²⁸.

L'agrégation et la sécrétion plaquettaire de substances proagrégantes, procoagulantes et vasomotrices vont contribuer à l'amplification du processus d'hémostase primaire et à la création de conditions favorables à la coagulation plasmatique. L'exposition des phospholipides chargés négativement (phosphatidylsérine) permet la fixation des facteurs de la coagulation et la génération de grande quantité de thrombine. La thrombine est elle-même un puissant activateur plaquettaire, elle va à la fois activer d'autres plaquettes mais aussi stabiliser le clou plaquettaire par la formation de fibrine. En parallèle, les cellules endothéliales sont activées et expriment des protéines prothrombotiques (telles que le facteur tissulaire et les phospholipides) qui participeront également à la coagulation.

On remarque dans l'agrégat plaquettaire un gradient : le centre renferme des plaquettes étroitement entassées, stable avec des dépôts de fibrine ; l'extérieur est plus lâche, moins stable et contient peu de fibrine³⁸.

1.1.1.2.6 Le contrôle de l'hémostase primaire

Le système d'auto-amplification de l'activation plaquettaire est contrôlé et limité au site lésé. Les inhibiteurs plaquettaires sont l'oxyde nitrique (NO), les prostacyclines, l'enzyme ecto-ADPase (ou CD39). Ils sont sécrétés par les cellules endothéliales. L'ecto-ADPase permet de transformer l'ADP (activateur plaquettaire) en AMP. L'oxyde nitrique est un inhibiteur plaquettaire ainsi qu'un vasodilatateur provenant des cellules endothéliales et des plaquettes³⁹. La production de l'oxyde nitrique est assurée par une enzyme catalysant la transformation de l'arginine en oxyde nitrique : l'oxyde nitrique synthase. L'oxyde nitrique sécrété par les cellules endothéliales permet d'inhiber l'adhésion et l'agrégation plaquettaire en diffusant à travers la membrane plasmique des plaquettes. Il y a alors production de guanosine 5-monophosphate cyclique intracellulaire (cGMP) à partir de GTP, entraînant une inhibition de différentes voies d'activation plaquettaire, via la protéine kinase G, et donc une diminution de la concentration intracellulaire en ion Ca^{2+} . La diminution du calcium intracellulaire inhibe l'adhésion et l'activation plaquettaire. L'autre molécule permettant de limiter l'adhésion et l'activation plaquettaire est la prostacycline. Elle est synthétisée à partir d'un acide gras insaturé, l'acide arachidonique, via la cyclo-oxygenase COX. La prostaglandine G2 produite est réduite sous une forme instable : la prostaglandine H2, qui sera transformée par la prostacycline synthase en prostacycline au sein des cellules endothéliales³⁹. La prostacycline possède des propriétés vasodilatatrices et antithrombotiques. Elle interagit avec les plaquettes grâce à son récepteur couplé à la protéine G, active l'adénylate cyclase situé dans la membrane plasmique des plaquettes. Il y a alors formation de l'AMPc à partir d'adénosine triphosphate qui active la protéine kinase A PKA. Cette PKA phosphoryle alors différentes protéines comme le récepteur de l'inositol triphosphate, la kinase des chaînes légères de myosine (MLCK), la phosphoprotéine vasodilatatrice stimulée (VASP). L'activation par phosphorylation de chacune de ces protéines induit l'inhibition des voies telles que la sécrétion des granules plaquettaires, l'activation de la GPIIb-IIIa, la protéine kinase C (PKC), et diminue le

calcium intracellulaire (par stimulation des pompes à Ca^{2+}). La sécrétion de prostacycline induit donc l'inactivation des plaquettes afin de réguler l'homéostasie vasculaire dans les conditions physiologiques³⁹.

Ces systèmes inhibiteurs agissent de concert en diminuant le taux de Ca^{2+} intra-plaquettaire.

1.1.2 Coagulation plasmatique ou hémostasie secondaire

La deuxième étape du processus hémostatique est la coagulation plasmatique ou hémostasie secondaire et a pour rôle la solidification du caillot par la formation d'une matrice de fibrine parmi les plaquettes. Elle correspond à une cascade de réactions enzymatiques à la surface de cellules exposant des phospholipides chargés négativement et menant à la formation de fibrine⁴⁰. La coagulation se décompose en étapes (l'initiation, l'amplification et la propagation) et fait intervenir différentes protéines. La thrombine en est une protéine assez centrale et essentielle. Les facteurs de coagulation II, VII, IX et X sont des facteurs vitamine K dépendants, la vitamine K permet l'addition de groupes gamma carboxylate aux acides glutamiques de ces facteurs. En présence d'un taux insuffisant de vitamine K, la synthèse et la fonction de ces facteurs est réduite.

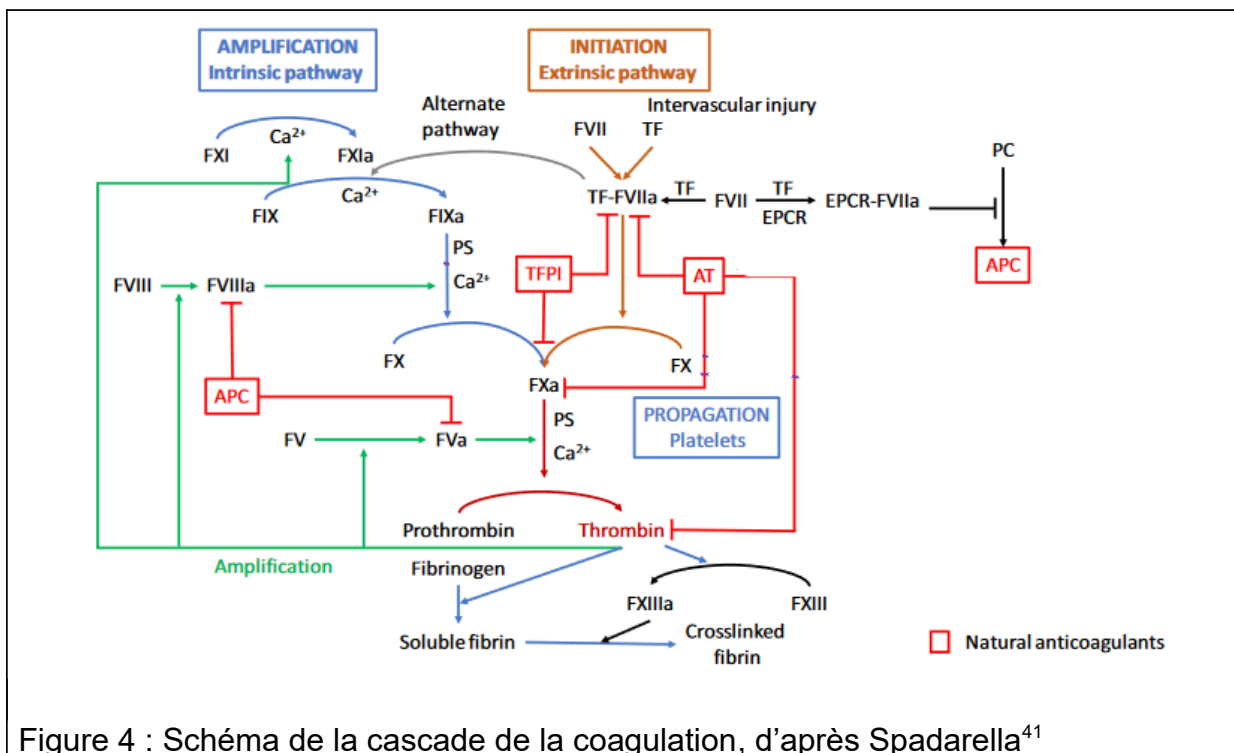


Figure 4 : Schéma de la cascade de la coagulation, d'après Spadarella⁴¹

La coagulation est initiée par la liaison du facteur tissulaire au facteur VII (FVII) (initiation). Ce complexe va alors activer le facteur X (FX) et le facteur IX (FIX). Ceci génère déjà de la thrombine (propagation). La thrombine amplifie sa propre production en activant les facteurs XI (FXI), VIII (FVIII) et V (FV) entraînant une production exponentielle de thrombine (amplification). La thrombine formée transforme le fibrinogène en fibrine soluble et active le facteur XIII (FXIII) qui va polymériser la fibrine en fibrine insoluble.

La coagulation est à l'équilibre grâce à l'action des anticoagulants naturels (en rouge sur le schéma). L'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI) inhibe le complexe FT-FVII ainsi que le FX activé. L'antithrombine (AT) inhibe la thrombine mais aussi le FXa et le FT-FVII. La protéine C activée (APC) inhibe le FVIIIa et FVa.

1.1.2.1 Initiation

Les cellules endothéliales lésées, les cellules sous-endothéliales libèrent le facteur tissulaire (FT) qui, en contact avec le facteur VII (FVII), des phospholipides et du calcium, forme un complexe FT-FVII qui va activer d'une part le facteur IX (FIX) en FIXa, et le facteur X (FX) en FXa, avec formation de traces de thrombine (FIIa) à partir de prothrombine (FII). Le FT est une protéine transmembranaire exprimée sur les cellules sous-endothéliales. Une fois lié au FT, le FVII subit une autocatalyse en FVIIa. Le complexe FT-FVII est neutralisé par son inhibiteur, le TFPI couplé au FX et à la protéine S.

1.1.2.2 Amplification et propagation

La thrombine formée à l'état de traces amplifie alors sa propre formation en activant en feed-back le facteur XI (FXI) en FXIa, les cofacteurs du FIX et du FX, respectivement les facteurs VIII (FVIII) en FVIIIa et le facteur V (FV) en FVa.

Les complexes de coagulation ténase (FIXa-FVIIIa-PL-Ca²⁺) et prothrombinase (FXa-FVa-PL-Ca²⁺) se forment et conduisent à une formation exponentielle (ou « explosion ») de thrombine. La thrombine, en plus d'amplifier sa propre formation, convertit le fibrinogène en fibrine. Le fibrinogène est une glycoprotéine composée de 3 paires de chaînes polypeptidiques α , β et γ , liées par des ponts disulfures. La molécule est organisée sous la forme d'un dimère symétrique allongé avec 3

domaines globulaires. Le domaine central E réunit les régions N-terminales des 6 chaînes et contient les fibrinopeptides A et B. Les domaines D sont situés aux extrémités et contiennent les portions C-terminales des chaînes β et γ , et une partie des chaînes α ⁴².

La thrombine convertit le fibrinogène soluble en fibrine soluble, constituant alors le squelette du caillot. La thrombine clive l'extrémité N terminale des chaînes α et β et sépare ainsi les fibrinopeptides A et B des monomères de fibrine. Ces derniers s'apparient entre eux sous forme de protofibrilles qui vont ensuite former un réseau fibrillaire.

Le « crosslinking » de la fibrine soluble en fibrine insoluble intervient au niveau de l'hémostase tertiaire (voir point 1.1.3).

En plus des sites de liaison à la GPIIb/IIIa, le fibrinogène comporte des sites de liaison pour la thrombine, le facteur XIII, le plasminogène et l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA).

Comme vu plus haut la thrombine stimule aussi les plaquettes (voir hémostase primaire).

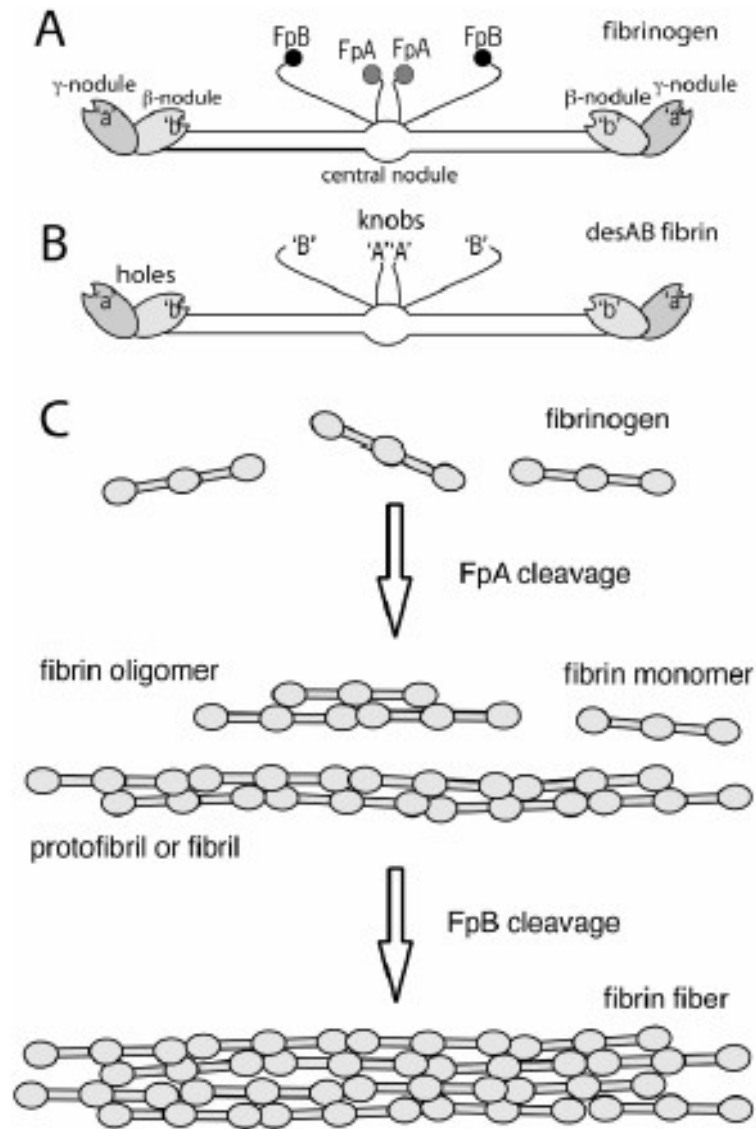


Figure 5 : Monomère et polymère de fibrine, selon Medved⁴³

A : schéma du fibrinogène montrant les fibrinopeptides A et B ;

B : schéma d'un monomère de fibrine ;

C : étapes initiales de la polymérisation de la fibrine. Suite au clivage des fibrinopeptides A, il y a formation de monomères et l'oligomères de fibrine qui s'apparient en protofibrilles. Suite au clivage des fibrinopetides B, les protofibrilles s'apparient en fibre de fibrine.

Comme pour chaque étape de l'hémostase, la production de thrombine est régulée par l'intervention des systèmes inhibiteurs :

- L'héparane sulfate, exprimée sur les surfaces endothéliales, active l'antithrombine. Cette dernière inhibe la thrombine et le FX et dans une moindre mesure le FIX et FXI.
- La thrombine se lie avec son récepteur endothélial, la thrombomoduline et active son propre inhibiteur, la protéine C. La protéine C activée se lie avec son cofacteur, la protéine S pour dégrader les FVIII et V, détruisant ainsi les complexes de coagulation ténase et prothrombinase.

Toute cette cascade est résumée à la Figure 4.

1.1.3 Hémostase tertiaire

L'hémostase tertiaire commence par l'action du FXIII, activé en facteur XIIIa par la thrombine en présence de calcium et de fibrine⁴⁴.

Le facteur XIIIa crée des liaisons covalentes entre les résidus lysine et glutamine localisés sur 2 monomères de fibrine adjacents, stabilisant le réseau de fibrine. Ce crosslinking ou polymérisation de la fibrine a lieu au niveau des domaines D (voir Figure 6).

Ceci solidifie encore plus le thrombus et empêche sa dissolution rapide.

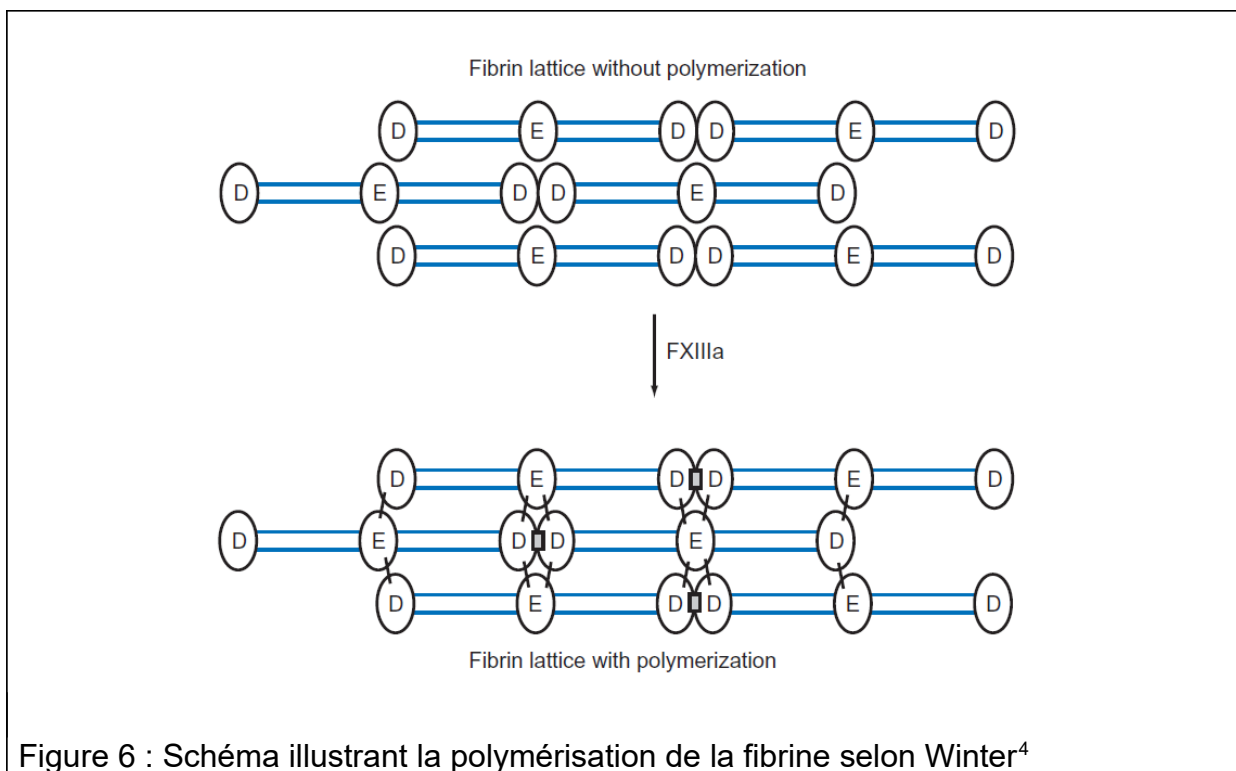


Figure 6 : Schéma illustrant la polymérisation de la fibrine selon Winter⁴

L'image du haut montre la fibrine soluble, avant la polymérisation par le FXIIIa. Suite à l'action du FXIIIa, les domaines D et E sont polymérisés, solidifiant le thrombus (image du bas).

1.1.4 Fibrinolyse

La dernière étape du processus hémostatique est la fibrinolyse. Elle permet de limiter tout le processus de formation du caillot, de protéger les vaisseaux, en dégradant la fibrine en produit de dégradation de la fibrine, restaurant la perméabilité vasculaire et contribuant au processus de cicatrisation⁴⁵.

La dégradation spécifique de la fibrine ou fibrinolyse est le mécanisme réactionnel à la formation de fibrine⁴⁶. L'enzyme fibrinolytique est la plasmine, formée à partir du plasminogène inactif. Le plasminogène se transforme en plasmine sous l'influence des activateurs du plasminogène dont l'activateur principal est l'activateur du plasminogène (t-PA), issu de l'endothélium vasculaire et dans une moindre mesure la prourokinase transformée en urokinase (UK) grâce notamment au système contact de la coagulation⁴⁷. Dans la circulation, la plasmine est neutralisée par l' α 2-antiplasmine, rapidement et spécifiquement, ce qui limite son activité fibrinolytique et localise la fibrinolyse au niveau de la fibrine. Au niveau du thrombus, la plasmine dégrade la fibrine en divers produits.

La fibrine régule l'initiation et la propagation de la fibrinolyse. Elle présente une surface d'ancrage pour les intervenants du système fibrinolytique (t-PA et plasminogène), créant un environnement favorable à la formation de la plasmine⁴⁸, qui reste ainsi localisée au caillot. La structure physique de la fibrine conditionne sa susceptibilité à la fibrinolyse. Le mode d'association entre les fibrilles induit la formation de fibres plus ou moins épaisses et un réseau plus ou moins dense.

Le t-PA est libéré des tissus lésés. Il convertit le plasminogène en plasmine. La plasmine dégrade la fibrine en produits de dégradation (D-dimères). La fibrinolyse est aussi régulée par des inhibiteurs, les antiplasmines dont le principal est l' α 2-antiplasmine qui neutralise toute plasmine libre (non liée au caillot). Citons les autres inhibiteurs l' α 2-macroglobuline (α 2M), l'inhibiteur de la C1-estérase et la glycoprotéine riche en histidine. Les autres inhibiteurs sont les inhibiteurs de l'activateur du plasminogène (PAI-1 et le PAI-2). Le PAI-1 est présent dans le

plasma, les cellules endothéliales et les granules plaquettaires α (forme inactive). C'est une serpine capable d'inhiber le t-PA et l'urokinase avec lesquels il forme un complexe inactif, réversible dans un premier temps, puis irréversible. Le PAI-2 est indétectable dans le plasma de sujets sains, son taux s'élève en cours de grossesse. Il inhibe essentiellement l'urokinase. Citons également l'inhibiteur de la fibrinolyse activable par la thrombine (TAFI). La liaison de la thrombine à la thrombomoduline (TM) active la PC mais aussi le TAFI qui clive les résidus de lysines sur la fibrine et empêche ainsi l'assemblage du complexe t-PA-plasminogène-fibrine. La génération de thrombine est limitée par la PC activée qui exerce indirectement une activité pro-fibrinolytique.

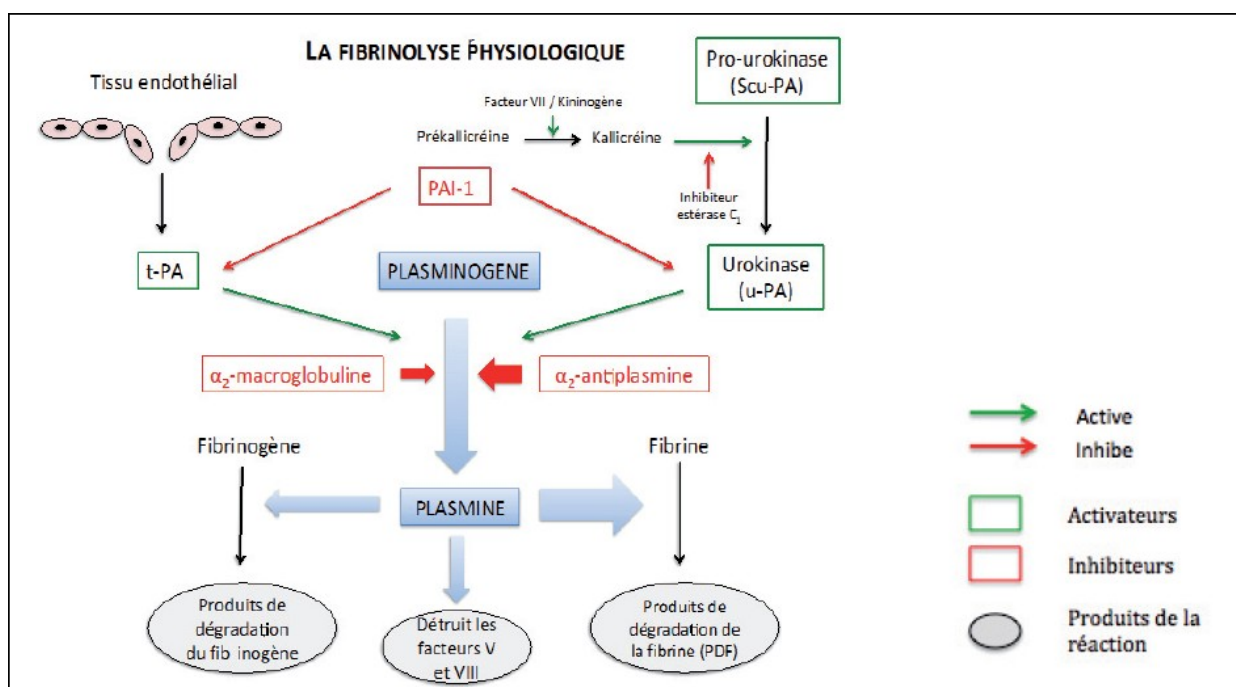


Figure 7 : Schéma illustrant la fibrinolyse, d'après Faure⁴⁹

Suite à la libération du t-PA par les cellules endothéliales, le plasminogène est métabolisé en plasmine. La plasmine clive le fibrinogène et la fibrine en produits de dégradation et détruit les facteurs V et VIII. La fibrinolyse est en équilibre suite à l'action du PAI-1 qui inhibe l'action du t-PA. L' α_2 -macroglobuline et surtout l' α_2 -antiplasmine limitent la formation de plasmine.

1.2 Physiopathologie

La régulation de la coagulation est essentielle pour à la fois prévenir le saignement et la thrombose. Les troubles de l'hémostase se manifestent soit par des hémorragies soit par des thromboses, dont la cause peut trouver son origine à chaque étape du processus hémostatique et ce y compris au niveau vasculaire. Les trois facteurs influençant la thrombose sont l'endothélium lésé, l'hypercoagulabilité et la stase dont l'interaction est connue sous le nom de triade de Virchow^{50,51}.

Par opposition, les facteurs protégeant de la thrombose sont le flux continu sanguin à l'intérieur des vaisseaux, l'intégrité de l'endothélium vasculaire, la production de prostacycline par les cellules endothéliales, l'expression de l'héparane sulfate à la surface des cellules endothéliales et les protéines plasmatiques circulantes régulant la coagulation comme l'antithrombine, la protéine S, la protéine C.

Les anomalies des vaisseaux peuvent être à l'origine de manifestations hémorragiques. Elles ne seront pas abordées dans ce travail, étant difficilement explorables au laboratoire. Ainsi, une fragilité vasculaire accrue peut s'observer lors du vieillissement, ou lors de traitement médicamenteux (corticostéroïdes) ou d'alcoolisme. Les carences en vitamine C (scorbut), les malformations vasculaires comme les angiomes sont des causes de saignements d'origine vasculaire.

Nous nous centrerons sur les anomalies de l'hémostase explorables au laboratoire : les pathologies plaquettaires, les troubles de la coagulation et de la fibrinolyse.

1.2.1 Pathologies plaquettaires

Il existe des défauts plaquettaires quantitatifs (nombre anormal de plaquettes) et qualitatifs (fonction anormale). Les défauts quantitatifs incluent les thrombocytopénies (destruction d'origine immune ou non-immune ou défaut de production) et les thrombocytoses. Les défauts qualitatifs peuvent être acquis (secondaires à une maladie, à la prise de médicament) ou innés.

Les maladies héréditaires des plaquettes comprennent les thrombocytopénies congénitales, les défauts dans un récepteur plaquettaire, les défauts dans une protéine d'adhésion ou d'agrégation, les défauts dans le stockage ou le relargage des granules plaquettaires, les défauts dans les voies de transduction plaquettaires,

les anomalies du cytosquelette, les défauts dans l'exposition des charges négatives des phospholipides. Le Tableau 3 résume brièvement la classification des différents troubles plaquettaires héréditaires et sont illustrés à la Figure 8.

Tableau 3 : Désordres plaquettaires héréditaires, selon Harrisson⁸

Défaut	Maladie
Adhésion plaquettaire	Syndrome de Bernard-Soulier Maladie de von Willebrand
Agrégation plaquettaire	Thrombasthénie de Glanzmann, afibrinogénémie congénitale
Activation plaquettaire (défauts de récepteur)	Défauts dans les récepteurs au Collagène : déficience en GPVI et $\alpha_2\beta_1$ Défaut dans les récepteurs à l'ADP : déficience P2Y ₁₂ Défaut dans les récepteurs du Thromboxane
Défauts de sécrétion	Maladie du pool vide Syndrome d'Hermansky-Pudlak Syndrome Chediak-Higashi Syndrome des plaquettes grise Syndrome plaquettaire du Québec Syndrome de Wiskott-Aldrich
Voies de signalisation	Déficience en cyclooxygénase Déficience en phospholipase C Déficience en thromboxane synthase Déficience en lipoxygénase Défaut dans la mobilisation du calcium
Taille plaquettaire	Macrothrombocytopenie héréditaire
Phospholipides membranaires	Syndrome de Scott

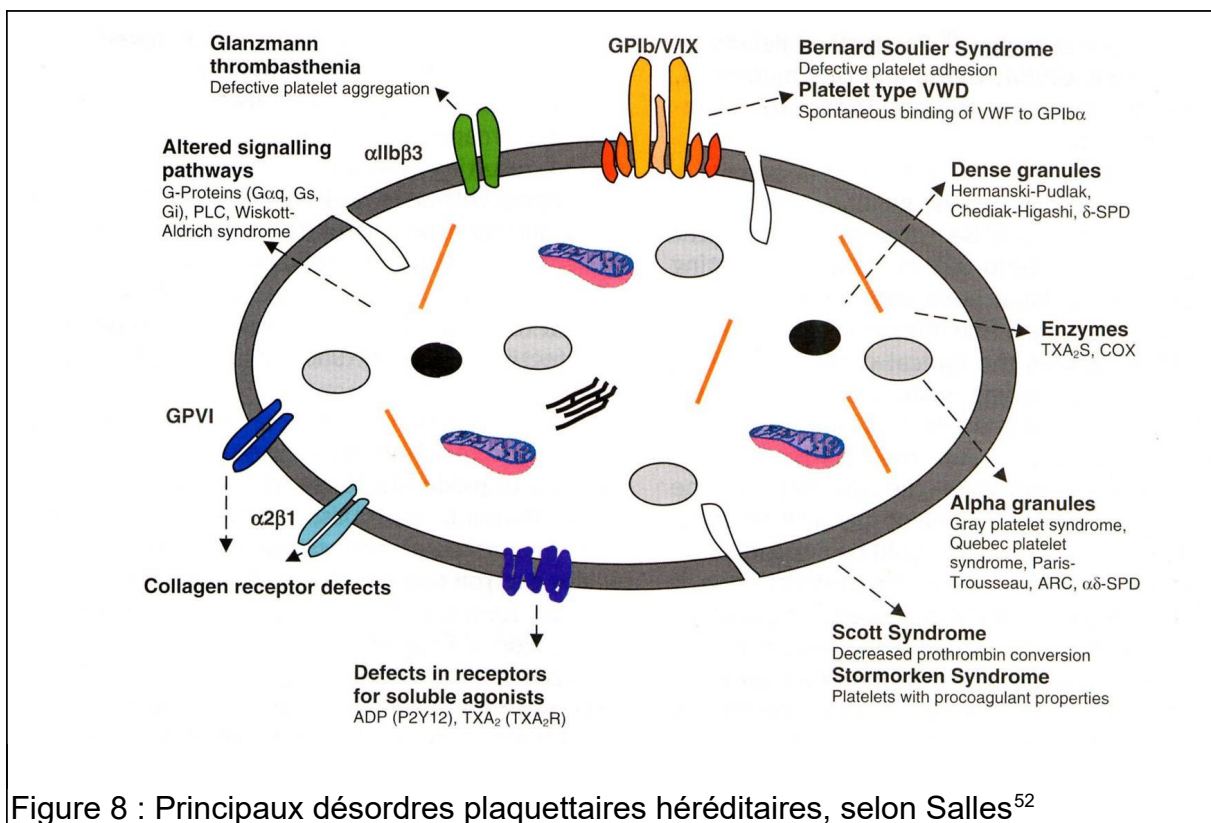


Figure 8 : Principaux désordres plaquettaires héréditaires, selon Salles⁵²

1.2.2 Pathologies de la coagulation

Les pathologies constitutionnelles touchant à la coagulation se répartissent en pathologie hémorragique, lors d'un déficit en facteur procoagulant et en pathologie thrombotique, lors d'un déficit en facteur anticoagulant ou d'un excès de procoagulant.

À côté de multiples pathologies acquises menant au déséquilibre de l'hémostase, il existe des défauts congénitaux en facteurs procoagulants dont le phénotype clinique varie très fort selon le facteur impacté et l'importance du déficit entre asymptomatique et hémorragique spontanée⁵³.

Les déficits les plus fréquents sont la maladie de von Willebrand avec une prévalence estimée de 1%^{54,55} et les déficits en FVIII ou FIX, appelés aussi hémophilie A ou B, avec une prévalence rapportée de 17 pour 100 000 garçons et de 3,8 pour 100 000 garçons respectivement⁵⁶. L'hémophilie prédispose aux saignements spontanés surtout dans les cas sévère définis par un taux de facteur inférieur à 1% et dans les cas modérés où il est entre 1 et 5%⁵⁷. Les déficits rares dont la prévalence est comprise entre 1/500000 et 1/2000000, comprennent les

déficits en fibrinogène, en FII, FV, FVII, FX, FXI, FXIII, le déficit combiné en FV et FVIII⁵⁸. La prévalence de ce déficit augmente en cas de mariages consanguins.

Les épisodes hémorragiques sont classés selon leur gravité, basée sur la localisation, l'impact clinique potentiel, le saignement spontané ou secondaire à un traumatisme, un acte invasif, la chirurgie ou un traitement médicamenteux. Le phénotype clinique n'est pas toujours corrélé au taux de facteurs. Cela est particulièrement vrai pour le déficit en FXI. Par contre, il y a une forte association entre le taux de facteur résiduel et la sévérité clinique pour les déficiences en fibrinogène, les déficits combinés en FVIII et FV, pour le déficit en FX et pour le déficit en FXIII. Il y a une faible association pour les déficiences en FV et FVII⁵⁹.

La déficience en fibrinogène est hétérogène et comprend l'afibrinogénémie, l'hypofibrinogénémie et la dysfibrinogénémie⁶⁰. Les patients avec hypo ou dysfibrinogénémie sont généralement asymptomatiques alors que les patients avec afibrinogénémie ont une clinique de saignement dès la période néonatale⁶¹.

Le déficit en FXII ne prédispose pas au saignement.

Il existe aussi des déficits congénitaux en facteurs anticoagulants (protéine S, protéine C, antithrombine) ainsi que des mutations génétiques (FV Leiden, FII Leiden) associées à un risque thrombotique. Le risque relatif de premier événement thrombotique (ET) associé à ces anomalies est inférieur à 10, sauf pour la mutation FV Leiden à l'état homozygote ou la double hétérozygotie FV Leiden/FII Leiden, avec un risque relatif rapporté supérieur à 20⁶². Les déficits en antithrombine, protéine C et protéine S sont surtout associés à des thromboses veineuses spontanées avant l'âge de 55 ans. Cependant un déficit sévère, congénital ou acquis dans une de ces protéines peut entraîner un purpura fulminans nécrotique, particulièrement en pédiatrie⁶³.

À côté des déficits congénitaux, il existe toute une série de situations cliniques acquises, parfois létales, menant à une altération de la balance hémostatique coagulation : le trauma, la coagulation intravasculaire disséminée (CIVD), les microangiopathies thrombotiques (purpura thrombocytopénique thrombotique, syndrome hémolyse urémique ou HELLP syndrome) dans lesquelles une anémie

hémolytique microangiopathique et une thrombocytopénie profonde sont présentes, les cirrhoses hépatiques.

1.2.3 Pathologies touchant la fibrinolyse

Les pathologies touchant la fibrinolyse ne seront pas exploitées dans ce travail. Ces pathologies sont très rares (prévalence inférieure à 1/1000000). L'hyperfibrinolyse (acquise, constitutionnelle) est rare, elle est liée à une production excessive de t-PA ou à une déficience en inhibiteur physiologique : α 2-antiplasmine entraînant des hémorragies sévères. À l'inverse, l'hypofibrinolyse entraînera des thromboses. Elle est liée au statut post-opératoire par excès de PAI-1 secondaire aux lésions vasculaires et tissulaires.

1.3 Tests de laboratoire pour évaluer des troubles de l'hémostase

1.3.1 Explorations au laboratoire ou tests de « routine »

1.3.1.1 Hémostase primaire

L'exploration de l'hémostase primaire accessible au laboratoire comprend la numération du taux de plaquettes, la détermination de la taille des plaquettes, l'étude de leur morphologie, l'agrégation plaquettaire, le dosage du FvW. Les tests de première intention pour le diagnostic de la maladie de von Willebrand sont les dosages de l'activité et de l'antigène du FvW. Les tests plus spécialisés comprennent entre autres la microscopie électronique des plaquettes, le dosage des glycoprotéines de surface, l'électrophorèse du FvW ou la biologie moléculaire pour l'identification d'un trouble constitutionnel.

1.3.1.2 Coagulation plasmatique

La coagulation est évaluée par des tests de laboratoire évaluant le taux de formation du caillot par le temps mis pour activer la cascade de coagulation. Elle s'évalue classiquement sur plasma pauvre en plaquettes par les tests dits de routine, c'est-à-dire principalement le temps de prothrombine (PT) et le temps de thromboplastine partielle activée (aPTT).

1.3.1.2.1 Temps de prothrombine (PT)

Le PT appelé aussi temps de Quick est un test de coagulation qui mesure l'ensemble des facteurs de coagulation de la voie extrinsèque et commune. Il est déclenché par l'addition au plasma pauvre, du réactif thromboplastine composée de facteur tissulaire, de phospholipides et de calcium. Le PT est prolongé en cas de déficience isolée ou combinée en facteur II, V, VII ou X, ou en fibrinogène, en cas de prise d'antagoniste de la vitamine K (AVK), en cas de déficience en vitamine K, d'insuffisance hépatique. Le PT est souvent exprimé en INR (International Normalized Ratio), et permet de standardiser les résultats et d'ainsi comparer les résultats entre laboratoires pour le suivi des traitements par AVK.

1.3.1.2.2 Temps de céphaline activé (aPTT)

Le temps de céphaline activée ou temps de thromboplastine partielle activée, communément appelé aPTT, explore la voie intrinsèque et commune. Il inclut les étapes depuis l'activation du facteur XII jusqu'à la formation de fibrine soluble. L'aPTT est déclenché par l'addition au plasma pauvre d'un réactif contenant des phospholipides, un activateur de la phase contact (kaolin, silice, acide ellagique) en présence de calcium souvent ajouté séparément au mélange. La déficience isolée ou combinée en facteurs VIII, IX, XI ou XII, X, V, II, de fibrinogène, l'insuffisance hépatique, la prise d'héparine, la présence d'un anticoagulant lupique prolonge l'aPTT.

1.3.1.2.3 Temps de thrombine (TT)

Le temps de thrombine (TT) est utilisé pour l'évaluation de la conversion du fibrinogène en fibrine. Le TT mesure le temps pour former un caillot lorsque de la thrombine est ajoutée au plasma citraté. Cela catalyse la formation de fibrine en court-circuitant les voies extrinsèque, intrinsèque et commune. Il permet de détecter des hypofibrinogénémies, des dysfibrinogénémies et la présence d'inhibiteur de la thrombine.

1.3.1.2.4 Dosages individuels de facteurs de la coagulation

Les différents facteurs procoagulants peuvent être dosés individuellement.

Les facteurs procoagulants (FII, FV, FVII, FX, FVIII, FIX, FXI, FXII, FXIII, fibrinogène) peuvent être dosés individuellement par méthode coagulante ou chromogénique. Une déficience dans un de ces facteurs prédispose le patient plutôt vers un risque hémorragique, en fonction du facteur déficient et de son taux.

Les différents inhibiteurs de la coagulation, l'antithrombine, la protéine S et la protéine C, peuvent aussi être dosés par méthode chromogénique : la protéine C qui inhibe le facteur VIII et V en présence de thrombomoduline et de protéine S, l'antithrombine qui inhibe les facteurs IIa, Xa, VIIa, IXa et XIa. La mise en évidence d'une déficience d'un de ces facteurs ou l'identification d'une résistance à la protéine C activée (APCR), d'un anticoagulant lupique, de la présence d'anticorps anticardiolipine ou anti-B2GPI identifie un facteur de risque procoagulant.

1.3.1.3 Fibrinolyse

Les méthodes disponibles pour l'étude de la fibrinolyse présentent des inconvénients importants. Ceux-ci sont techniquement délicats, prennent du temps et ne peuvent être aisément automatisés, expliquant ainsi leur sous-utilisation dans les laboratoires cliniques. Dans des circonstances physiologiques, la fibrinolyse se met en place entre plusieurs heures et plusieurs jours après la formation du caillot, ce qui limite les possibilités d'une évaluation rapide de la fibrinolyse. Les tests explorant la fibrinolyse sont peu accessibles dans les laboratoires de routine. Il existe des dosages de protéines individuelles comme le PAI-1, l' α 2-antiplasmine, le TAFI dont un taux élevé plaiderait en faveur d'une situation prothrombotique et un taux bas pourrait être incriminé dans le développement d'une situation hémorragique. En pratique, l'exploration de ces facteurs est limitée car ils sont soumis à des conditions préanalytiques très strictes, peu accessibles en routine^{64,65}. En effet, ils sont peu stables à température ambiante ; ils sont influencés négativement par l'hémolyse⁶⁶ et positivement par l'activation de la phase contact⁶⁷. Par exemple, le dosage du PAI-1 est délicat en raison d'un taux variable qui suit un rythme circadien (taux élevé le matin)⁶⁸. De plus, il a une très grande variabilité inter-laboratoire, avec différentes variables préanalytiques qui influencent son taux (l'intervalle de temps entre le prélèvement sanguin et l'analyse, l'anticoagulant utilisé dans les tubes d'échantillons et la température de stockage)⁶⁹.

Des anticorps spécifiques des produits de dégradation de la fibrine, ne réagissant pas avec le fibrinogène, ont été développés⁷⁰. De ces divers produits de dégradation de la fibrine, le dosage des D-dimères est le plus utilisé en routine de biologie clinique. Il témoigne donc de l'activité fibrinolytique secondaire à l'activation de la coagulation.

Bien que diverses méthodes aient été proposées pour mesurer la fibrinolyse dans le sang ou le plasma, il n'y a pas de test « gold-standard » permettant l'évaluation globale de l'activité fibrinolytique⁷¹. L'hyperfibrinolyse peut être évaluée par le test de lyse des euglobulines (ECLT). Cependant ce test est fastidieux et peu utilisé en laboratoire de routine^{72,73}. Récemment une équipe a décrit une version modifiée de ce test, le rendant sensible à des états d'hypofibrinolyse et d'hyperfibrinolyse (sensible à des taux faibles de PAI-1 et des taux élevés de t-PA)⁷⁴.

1.3.2 Les tests globaux

1.3.2.1 Test de génération de thrombine

Comme décrit au paragraphe 1.1.2, la thrombine (ou facteur II activé) est produite par le clivage de deux sites de la prothrombine par la prothrombinase et joue un rôle clé dans toutes les étapes de l'hémostase : elle catalyse la transformation de fibrinogène en fibrine, active le facteur FXIII stabilisateur de la fibrine, inhibe sa propre formation par le système anticoagulant de la protéine C, active les plaquettes, protège la fibrine de la dégradation en retardant la fibrinolyse.

Les multiples propriétés de cette enzyme, déjà mentionnées plus haut, expliquent l'intérêt qu'a eu Coen Hemker et son équipe pour le test de génération de thrombine (TGT), déjà connu au milieu du XX^{ème} siècle, d'en simplifier et d'en améliorer considérablement l'usage pour le rendre plus accessible aux laboratoires^{75,76,77}.

Le concept de génération de thrombine est basé sur la loi de la coagulation formulée par Hemker : « The more thrombin the less bleeding but the more thrombosis, the less thrombin the less thrombosis but the more bleeding »⁷⁸ et illustré à la Figure 9.

Une nouvelle version du test actuellement connue sous le nom de « Calibrated Automated Thrombinography » (CAT) est capable de mesurer en continu la thrombine générée après l'activation de la coagulation dans un plasma recalcifié^{76,79}.

Le TGT mesure en continu l'activité thrombinique au cours de la coagulation du sang *in vitro*. La méthode est basée sur les propriétés enzymatiques de la thrombine qui va cliver un substrat fluorogène. C'est donc une mesure de fluorescence en fonction du temps⁸⁰.

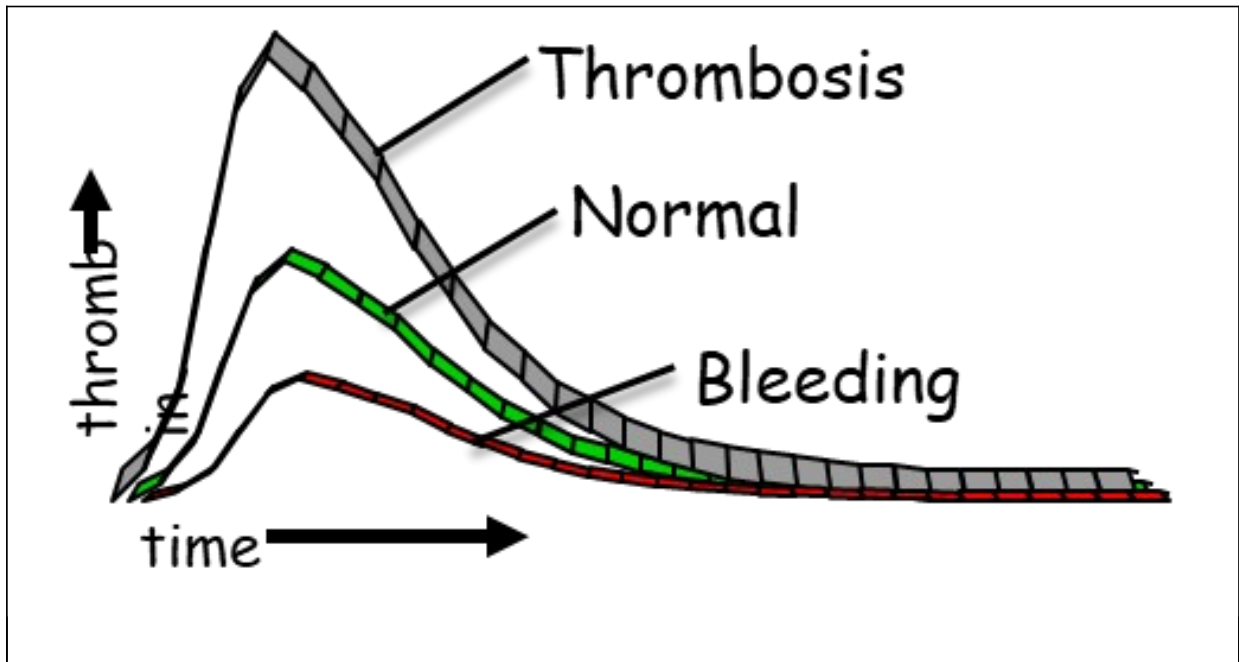


Figure 9 : Profils de génération de thrombine en fonction du profil hémostatique

La courbe chez un patient avec tendance hémorragique est plus basse que chez l'individu normal. La courbe chez un patient avec tendance prothrombotique est quant à elle plus élevée.

Le TGT appelé aussi thrombinographie est un test d'évaluation globale de la coagulation. Ce test permet d'étudier dans sa globalité le potentiel hémostatique des patients. Il est le résultat final de l'interaction entre facteurs pro ou anticoagulants intervenant dans le processus hémostatique. Les tests de coagulation classiques reflètent seulement la formation initiale de 5% de l'ensemble de la thrombine formée lors du processus hémostatique, après l'apparition des traces de fibrine⁷⁶. En conséquence, ces tests ne permettent que la mise en évidence d'une déficience significative en facteurs, ne sont pas sensibles aux déficits mineurs et n'explorent pas du tout les états prothrombotiques.

Le test de génération de thrombine explorant la phase d'initiation, d'amplification et de neutralisation de la totalité de la thrombine formée au cours du processus

hémostatique, permet de mettre en évidence des états hypo- et hyper-thrombotiques⁸¹ : un excès de formation de thrombine suggèrera un état prothrombotique, tandis qu'un défaut de formation de thrombine une tendance aux saignements. Ainsi, le TGT permet d'évaluer le potentiel hémostatique global d'un individu. Le TGT a déjà été exploré dans différentes pathologies⁸², hémorragiques⁸³ ou thrombotiques⁸¹ (hémophilie, les pathologies cancéreuses, présence d'anticoagulant lupique, les états de thrombophilie, la drépanocytose, etc.) ainsi que dans l'évaluation de médicaments antithrombotiques^{84,85} ou anti-hémorragiques.

Le TGT a ainsi permis de mettre en évidence des profils plus élevés chez les patients avec thrombophilie, avec thrombose artérielle et de guider leur prise en charge thérapeutique. Le TGT a aussi montré des avantages dans le suivi individualisé des patients hémophiles⁸⁶.

1.3.2.1.1 Principe

Le TGT permet de mesurer en temps réel la fluorescence produite par l'activité de la thrombine générée *in vitro* sur un substrat spécifique fluorogène, pendant les trois phases de la coagulation plasmatique (initiation, propagation et terminaison), après son activation par un activateur approprié et calibré⁷.

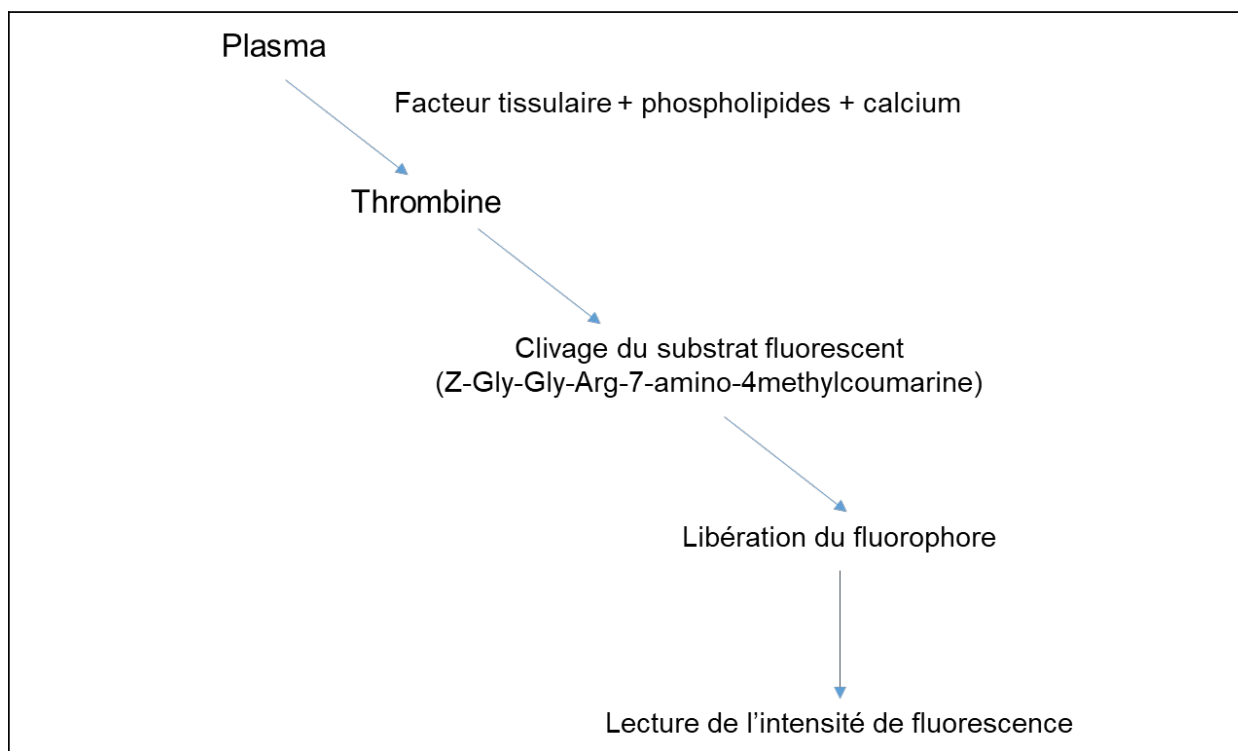


Figure 10 : Formation de la thrombine et clivage du substrat fluorescent⁸²

Classiquement la coagulation est déclenchée dans un plasma pauvre en plaquettes (PPP) par l'ajout d'un mélange de petite quantité de facteur tissulaire et de phospholipides synthétiques. La cascade des réactions de la coagulation plasmatique aboutit à la formation de thrombine active par conversion de la prothrombine. Celle-ci va cliver le substrat fluorogène et la fluorescence ainsi générée est mesurée par un fluorimètre toutes les 20 secondes pendant une heure (voir Figure 10). La fluorescence mesurée est convertie en unités de thrombine active grâce à un calibrant analysé en parallèle (voir Figure 11). Ce calibrant contient une concentration connue et stable de thrombine bovine liée à l'a2M qui garde son activité sur le substrat fluorogène mais pas sur ses substrats naturels. La solution du calibrant contient également 100 nM d'antithrombine et de l'héparine à 2 U/mL afin d'inhiber toute interférence avec une éventuelle génération de thrombine *in vitro* dans le calibrant.

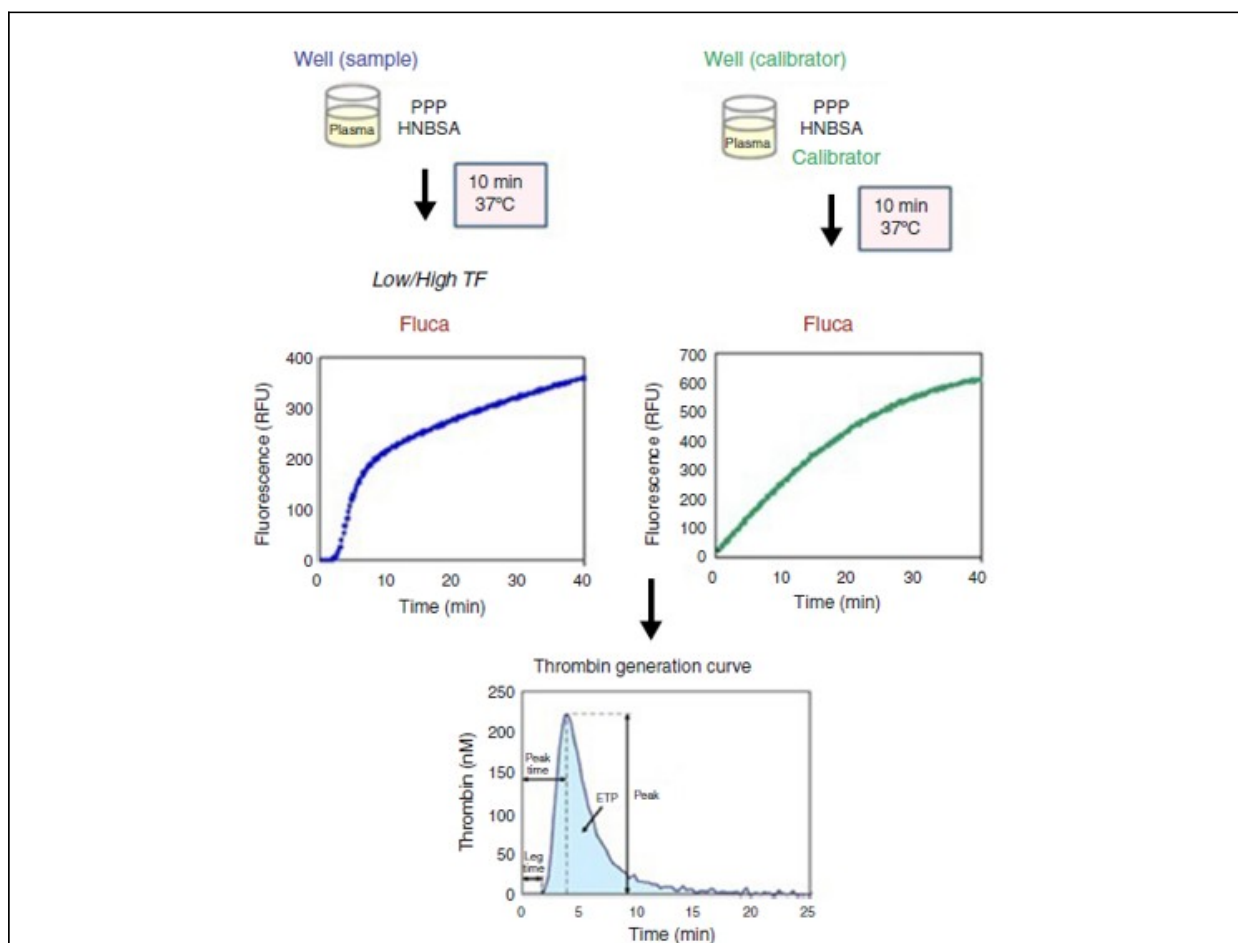


Figure 11 : Étapes de la génération de thrombine par méthode CAT

À gauche est reprise la réaction dans le puits de réaction. L'échantillon est incubé 10 minutes en présence de facteur tissulaire, de phospholipides, de chlorure de sodium, de tampon et d'albumine. La thrombine est générée par ajout de calcium et mesurée en temps réel par clivage du substrat fluorogène.

À droite est reprise la réaction dans le puits calibrateur. L'échantillon est incubé 10 minutes en présence d'une concentration connue de thrombine, de chlorure de sodium, de tampon et d'albumine. Il va ensuite convertir le substrat en fluorescence. Il permet de calibrer l'activité amydo-lytique de la réaction.

Le substrat fluorogène utilisé est le Z-Gly-Gly-Arg-7-Amino-4methylcoumarine (Bachem, Bubendorf, Suisse) dilué dans une solution de DMSO. Le substrat est mélangé à une autre solution de tampon (Hepes 20 nM, pH 7,35) contenant du chlorure de calcium à 1 M et de l'albumine de sérum bovin à 60 g/L. Le fluorimètre généralement utilisé est le Fluoroskan Ascent (Labsystems, Helsinki, Finlande). La lecture se fait à une longueur d'onde d'excitation de 390 nm et d'émission de 460 nm à 37 °C de température. La conversion de la fluorescence en unités de thrombine active est automatiquement réalisée par un logiciel dédié Thrombinoscope™ (Synapse BV, Maastricht, Hollande). La concentration de thrombine générée est la dérivée première de la fluorescence mesurée à chaque instant pendant le test. Cette méthode fournit une courbe qui représente la quantité de thrombine générée au cours du temps et caractérisée par trois phases (voir Figure 12 et Figure 13). La phase d'initiation conduit à l'apparition d'une faible quantité de thrombine suite à l'ajout de facteur tissulaire, de calcium et de phospholipides dans du plasma. La phase de propagation et d'amplification s'enchainent ensuite, la faible quantité de thrombine générée amplifiant sa propre génération. Finalement la phase de neutralisation prend place lorsque les facteurs anticoagulants interviennent et inhibent la formation de thrombine.

Ce schéma colle au plus près de la cascade la coagulation décrite *in vivo*⁸⁷.

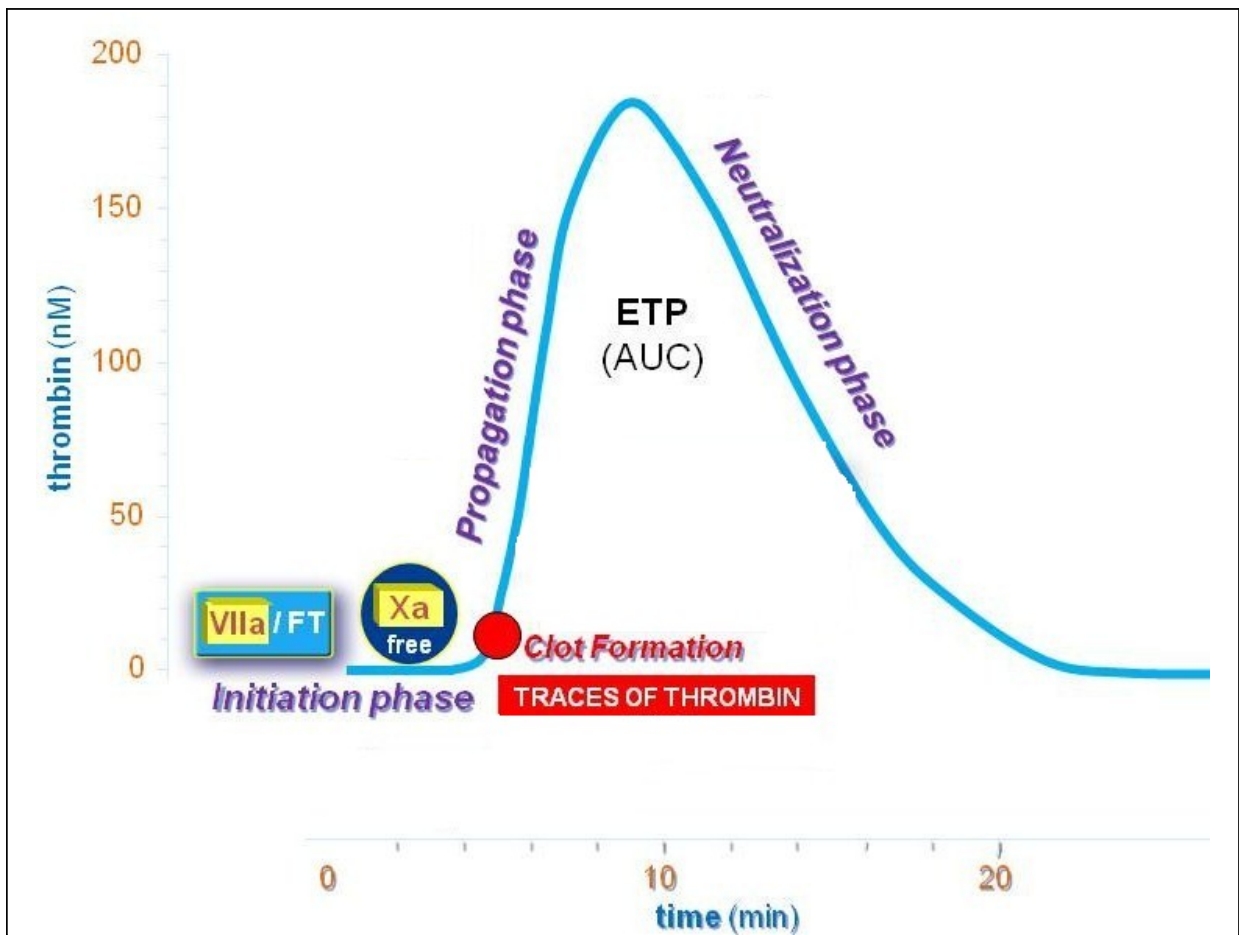


Figure 12 : Courbe de génération de thrombine

La phase d'initiation est initiée par la liaison du facteur tissulaire au facteur VII, menant à la formation d'une trace de thrombine. La propagation et l'amplification mènent à une formation exponentielle de thrombine. La phase de neutralisation limite la formation de thrombine suite à l'action des facteurs anticoagulants.

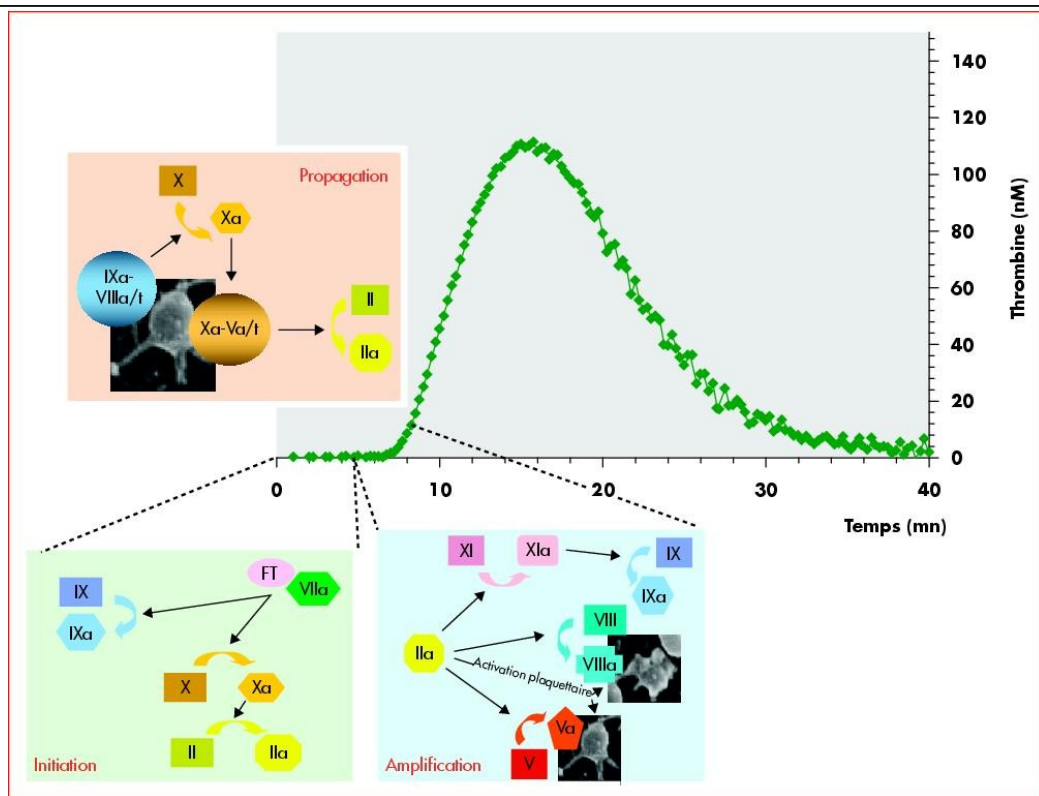


Figure 13 : Courbe de génération de thrombine détaillée, selon Lecompte⁸⁸

La première partie de la courbe ou temps de latence correspond à l'initiation de la coagulation générant une trace de thrombine. La thrombine amplifie ensuite sa propre formation en activant le FXI, le FVIII et le FV. La thrombine est ensuite générée exponentiellement (ou propagation) suite à l'action des systèmes enzymatiques tenase et prothrombinase. La propagation correspond à la phase ascendante de la courbe. La phase descendante correspond à la neutralisation de la génération de thrombine par les anticoagulants.

1.3.2.1.2 Corrections des mesures

Différentes corrections doivent être réalisées pour obtenir une mesure fiable du taux de thrombine générée. En effet, des erreurs peuvent modifier significativement la relation existant entre l'intensité de fluorescence et la concentration de thrombine⁸⁰.

La première correction concerne l'effet des propriétés intrinsèques du plasma. L'intensité initiale de fluorescence est plus basse lorsqu'elle est mesurée dans du plasma comparée au tampon pour la même concentration de thrombine active. Ceci indique que le plasma absorbe une partie de la fluorescence. Pour corriger cet effet,

le plasma à tester est également introduit dans le puits contenant le calibrant, les deux étant mesurés en parallèle.

La deuxième correction est à appliquer car l'intensité de fluorescence diminue avec le temps pour une concentration fixe de thrombine active au cours de la mesure. Cette décroissance est due à l'effet de la consommation du substrat et de l'effet de filtre interne (voir Figure 14). Durant la réaction, la concentration en substrat diminue ce qui diminue la vitesse de conversion du substrat par la thrombine. La quantité de thrombine est donc sous-estimée. L'effet de filtre interne provient de l'absorption (ou quenching) d'une partie de la fluorescence par le produit fluorescent lui-même. Ces deux effets entraînent une variation du facteur de conversion de la fluorescence en unités de thrombine active au cours de la mesure. Pour corriger ces effets, le test réalise une calibration individuelle continue. Pour chaque plasma à tester, la fluorescence du calibrant est mesurée en parallèle et en continu. Le facteur de conversion est calculé à chaque point de la mesure en tenant compte de ces effets par des formules mathématiques appropriées intégrées dans le logiciel.

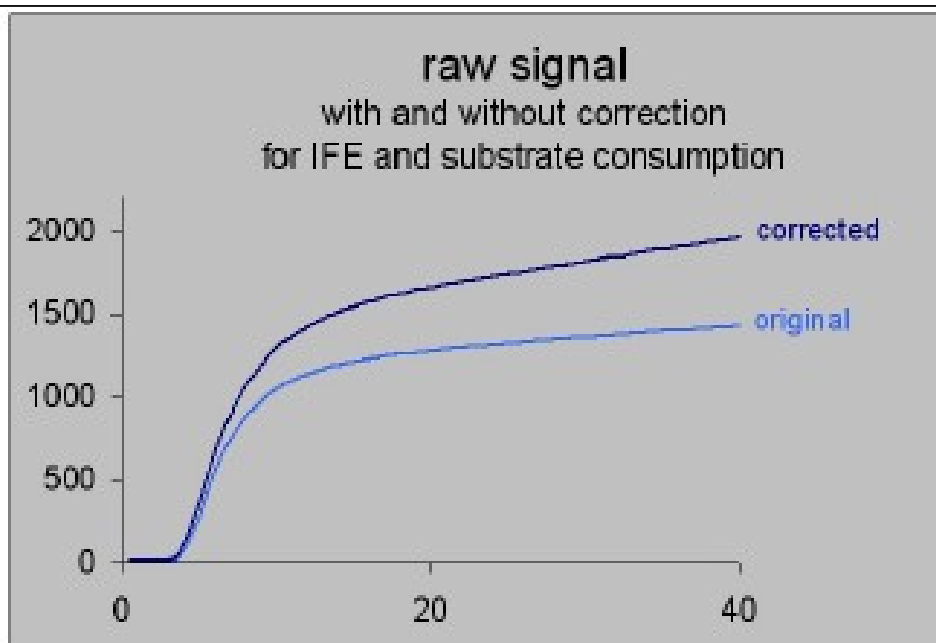
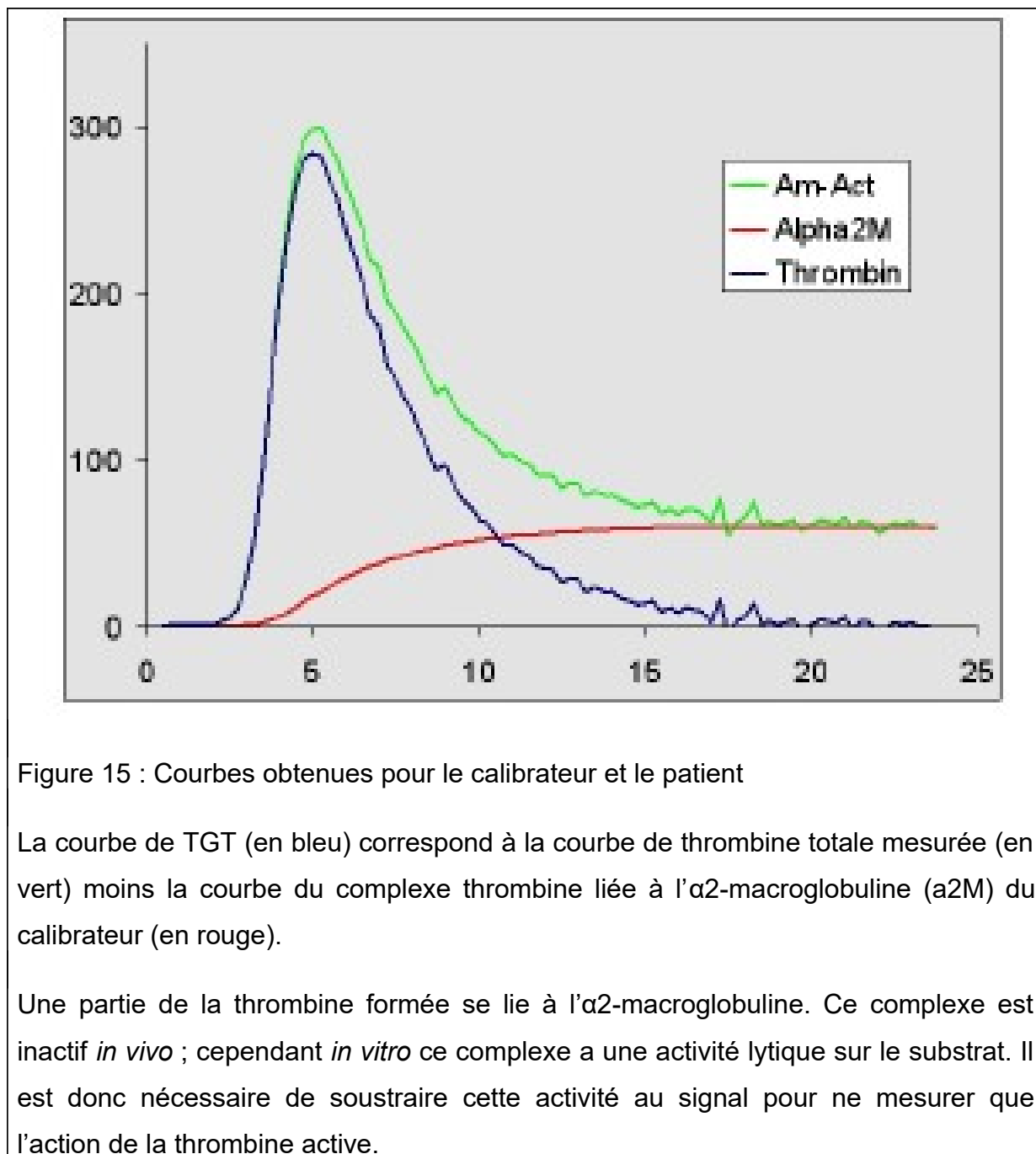


Figure 14 : Correction du signal

Le signal mesuré est corrigé afin de prendre en compte de l'effet de filtre interne (le substrat fluorescent peut absorber une partie du rayonnement) et de la consommation du substrat sur les signaux émis.

L'autre correction concerne l'effet de la thrombine liée à l' α 2-macroglobuline. Une fluorescence résiduelle persiste lorsque la formation de thrombine est terminée dans le plasma test. Celle-ci est due à la liaison d'une partie de la thrombine générée à l' α 2-macroglobuline du plasma test. Cette liaison dépend surtout de la concentration plasmatique de l' α 2-macroglobuline⁸⁹. Cet effet est pris en compte et corrigé par des formules mathématiques introduites dans le logiciel (voir Figure 15)^{85,90}.



Les différentes corrections sont réalisées par le logiciel informatique fourni avec l'automate de TGT. On obtient alors la courbe de thrombine (nM) générée en fonction du temps (min).

1.3.2.1.3 Analyse de la courbe de génération de thrombine

La courbe et les valeurs numériques de ses paramètres sont automatiquement générées par le logiciel dédié.

Les différents paramètres de la courbe de TGT, ou « thrombogram » sont (voir Figure 16) :

- Lagtime ou temps de latence : délai avant la formation de thrombine (en min) et correspondant au temps de coagulation des tests de routine.
- Peak height ou pic : correspondant à la quantité maximale de thrombine générée (en nM).
- Endogenous Thrombin Potential ou potentiel endogène de thrombine (ETP) ou aire sous la courbe (en nM.min), représente la quantité totale de thrombine formée à la suite de l'intervention des facteurs pro et anticoagulants. Quel que soit l'objectif des études, le paramètre ETP est en général le plus utilisé et le mieux corrélé au phénotype clinique⁹¹.
- Velocity index ou vélocité : pente de génération de thrombine c'est-à-dire la vitesse de génération de thrombine (en nM/min) et représente le taux de formation de thrombine.
- Time to peak (TTP) ou temps pour atteindre le pic de formation de thrombine (en min).

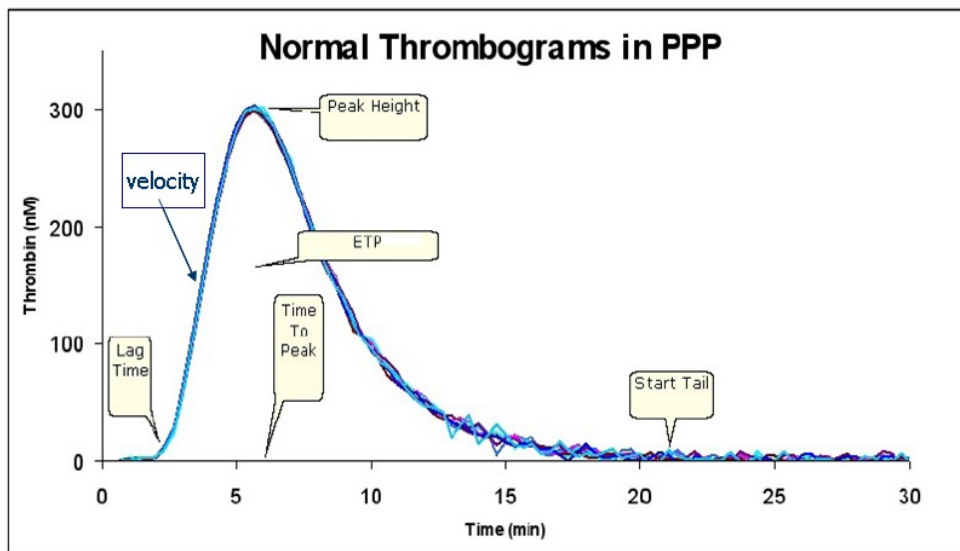


Figure 16 : Paramètres du thrombinogramme

LagTime ou temps de latence, correspondant à l'initiation ; velocity ou vélocité, correspondant à la vitesse de formation de la thrombine ; Peak height ou pic, correspondant à la concentration maximale de thrombine générée ; time to peak ou temps pour atteindre le pic ; ETP ou potentiel endogène de thrombine.

1.3.2.2 Tests viscoélastiques

Les tests viscoélastiques se pratiquent en sang total. Ils utilisent les propriétés viscoélastiques du caillot pour permettre un diagnostic rapide des troubles de l'hémostase. Tous les composants sanguins y sont impliqués, tant les éléments figurés du sang que les composants plasmatiques. Ces tests sont utilisés principalement dans le but de réduire la consommation de produits sanguins labiles⁹² afin de diminuer le coût de la prise en charge et d'améliorer le pronostic des patients. Ils ont suscité un grand intérêt auprès des urgentistes et anesthésistes. Ils permettent un diagnostic ciblé des troubles de l'hémostase dans les situations de traumatologies⁹³, d'hémorragies du post-partum⁹⁴ et en chirurgie cardiaque⁹⁵. L'utilisation de tests viscoélastiques dans ces situations cliniques sévères fait actuellement l'objet de recommandations internationales^{96,97}.

Parmi les dispositifs disponibles sur le marché citons la thromboélastographie TEG (Haemoscope, États-Unis), le Quantra (Stago Asnières, FR), le Clot Pro

(Haemonetics ALL) et la thromboélastométrie ROTEM (Pentapharm, Munich, Allemagne). Leurs performances sont assez similaires⁹⁸. Ces automates mesurent la formation maximale de fibrine après initiation de la coagulation par ajout d'un activateur dans du sang total. Le ROTEM ayant été utilisé dans ce travail, est détaillé ci-dessous.

1.3.2.2.1 Principe de la thrombo-élastométrie

La technologie brevetée ROTEM est basée sur une cuvette stationnaire thermostatisée et un axe vertical oscillant en permanence (Figure 17)⁹⁹.

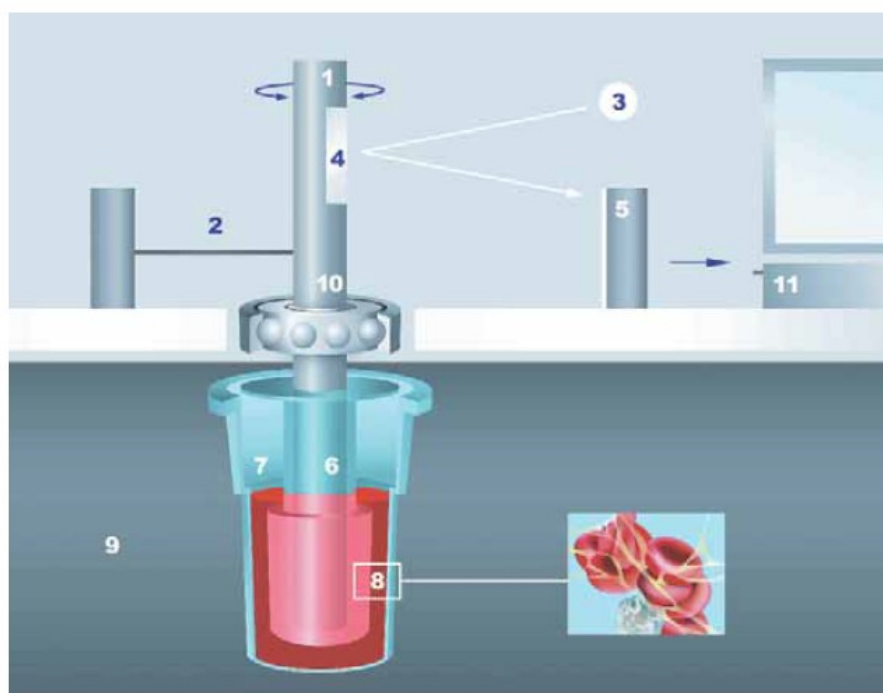


Figure 17 : Principe de la thromboélastométrie avec le ROTEM⁸⁹

L'axe rotatif (1) est plongé dans la cuvette (7) contenant l'échantillon sanguin. Suite à l'ajout d'un activateur, des fils de fibrine et des agrégats plaquettaires se forment (8). Ceux-ci sont détectés suite à la modification de l'amplitude de l'oscillation de l'axe.

1 axe rotatif ($\sim 4,75^\circ$) ; 2 Ressort ; 3 Source lumineuse / diode ; 4 Miroir ; 5 Unité de détection (caméra électronique) ; 6 Goupille de capteur (Pin) ; 7 Cuvette (Cup) remplie de sang ; 8 Fils de fibrine et agrégats de thrombocytes ; 9 Support de cuvette chauffé ; 10 Roulement à billes ; 11 Traitement de données.

Tant qu'aucune coagulation ne se produit, le mouvement de la goupille n'est pas entravé. Dès qu'un caillot se forme entre la goupille et la cuvette, le mouvement oscillant est alors limité. Le résultat obtenu correspond à l'équilibre entre la tension du ressort et la tension du caillot. Plus le caillot est ferme, plus l'amplitude de rotation de l'axe est petite. C'est l'amplitude de rotation en fonction du temps qui est enregistrée.

Les données sont exploitées grâce à un logiciel connecté à l'appareil de mesure. On obtient ainsi la courbe ROTEM ainsi que ses paramètres. Cette courbe prend une forme de diapason. Les données de mesure sont exploitées à l'aide d'un logiciel spécial permettant la génération d'une courbe de réaction et le calcul des différents paramètres numériques (cinétiques et de fermeté du caillot).

L'amplitude de rotation de la goupille est transformée en amplitude graphique : l'amplitude graphique de 0 mm, ou libre rotation de la goupille, correspond à l'absence de coagulation ; l'amplitude graphique de 100 mm ou absence de rotation de la goupille, correspond à la fermeté maximale du caillot.

1.3.2.2 Courbe et paramètres exploités

La Figure 18 reprend une courbe de réaction, aussi appelée thromboélastogramme et les différents paramètres mesurés qui peuvent être exploités.

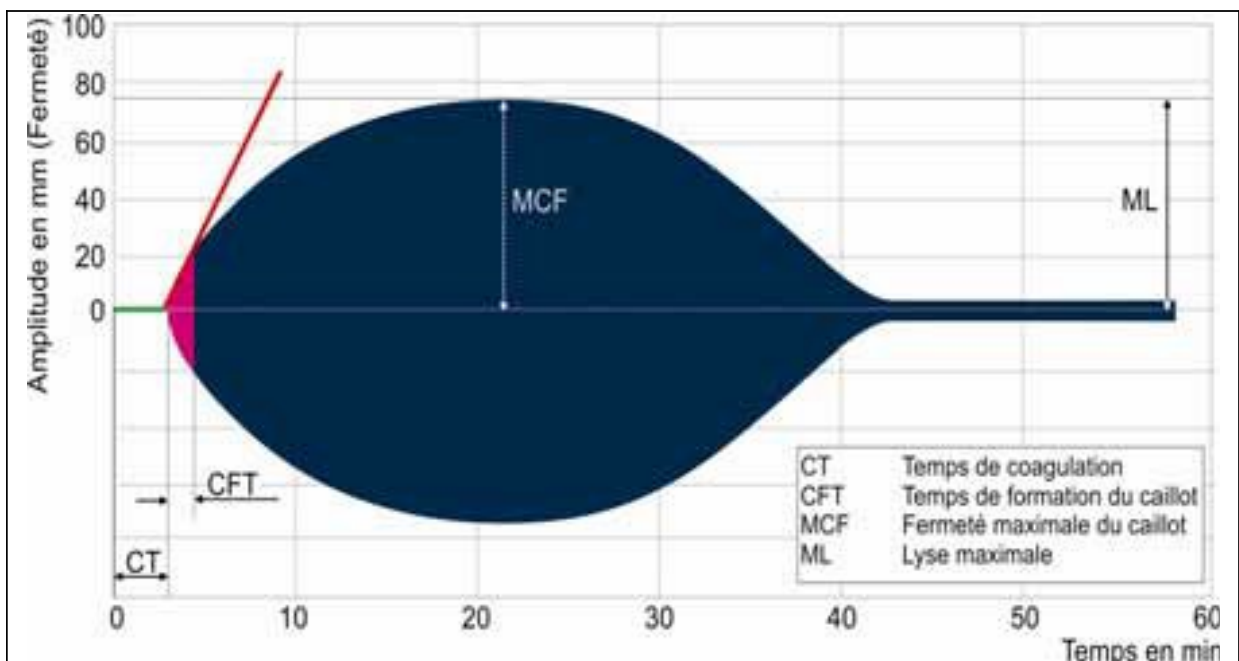


Figure 18 : Courbe de réaction (thromboélastogramme)⁸⁹

La courbe correspond à l'amplitude du caillot formé en fonction du temps suite à l'ajout d'un activateur à l'échantillon sanguin. Les différents paramètres mesurés sont l'amplitude, le temps de coagulation, le temps de formation du caillot, la fermeté maximale du caillot ou amplitude maximale, la lyse maximale.

Les paramètres mesurés, leur définition et leur interprétation sont :

- Le temps de coagulation (Clotting Time, CT) : il correspond au temps mis depuis le démarrage d'un test après ajout d'un activateur de coagulation jusqu'au moment où une amplitude de 2 mm est atteinte. Le CT décrit la vitesse avec laquelle la formation de fibrine commence. Ce paramètre est analogue au temps de coagulation lors d'un test de coagulation laboratoire classique. Il n'y est cependant pas identique car davantage de fibrine doit être formée et stabilisée pour atteindre un certain degré de fermeté du caillot qui suffit pour relier les deux parties mobiles d'une cellule de mesure. Le CT est influencé par les taux en facteurs pro et anticoagulants.
- Le temps de formation du caillot : il correspond au temps écoulé entre une amplitude 2 mm et une amplitude 20 mm du signal de caillot. Il décrit la phase suivante de la formation du caillot : la cinétique de formation d'un caillot stable via l'intervention des plaquettes sanguines activées et la fibrine. Il est donc influencé par le nombre de plaquettes et leur contribution à la fermeté du caillot, le taux de fibrinogène et sa capacité de polymérisation. Un temps de formation du caillot raccourci indique un état hypercoagulable. Pour les échantillons caractérisés par une formation de caillot très faible, il est possible que le temps de formation de caillot ne soit pas atteint et donc pas affiché.
- L'angle Alpha : il correspond à l'angle entre la ligne médiane et la tangente à la courbe de coagulation passant par le point d'amplitude 2 mm. Il décrit la cinétique de la formation des caillots. L'information diagnostique du paramètre est identique à celle du paramètre « temps de formation du caillot ». Un angle Alpha réduit indique un état hypocoagulable.

- La fermeté maximale du caillot (MCF) : elle correspond à l'indice de fermeté du caillot sanguin et donc de sa qualité. Ce paramètre correspond à l'amplitude maximale atteinte avant dissolution du caillot par fibrinolyse et diminution de sa fermeté. Il est influencé par les thrombocytes, le fibrinogène (concentration et aptitude à la polymérisation), le FXIII, le statut de la fibrinolyse. Un MCF faible indique une fermeté faible du caillot et donc un risque potentiel d'hémorragie. Un MCF élevé peut indiquer un état hypercoagulable.
- Valeurs d'amplitude A(x) : les valeurs A(x) sont un indice de fermeté du caillot. La valeur A(x) correspond à l'amplitude au terme d'un certain temps x après CT (par exemple A10 après 10 min). Il est influencé par les thrombocytes, le fibrinogène (concentration, aptitude à la polymérisation), le FXIII.
- Index de lyse pour 30 min (LI30) : LI30 est un index de fibrinolyse 30 min après CT. Elle correspond au rapport de l'amplitude par rapport à la fermeté maximale du caillot (pourcentage de fermeté de caillot restante). Les paramètres LI45 et LI60 décrivent les fermetés de caillot restantes 45 et 60 min après CT. Dans les échantillons sains, il est quasiment impossible d'observer une fibrinolyse en raison de la concentration importante d'inhibiteurs de fibrinolyse. Une valeur LI30 anormale indique souvent une hyperfibrinolyse.
- Lyse maximale : il décrit le degré de fibrinolyse en mesurant le pourcentage de fermeté du caillot perdue. Une lyse maximale de 5% signifie que le paramètre MCF a diminué de 5% durant la période considérée.

1.3.2.3 Autres tests globaux

Il existe d'autres tests globaux décrits dans la littérature.

Un de ces tests prometteur est le test mesurant simultanément la génération de thrombine et de plasmine. Ce test permet d'étudier les interactions entre la fibrinoformation et la fibrinolyse. Il a été mis au point par l'équipe de Van Geffen¹⁰⁰. La coagulation est activée suite à l'ajout de facteur tissulaire, de calcium et de phospholipides ou d'une faible quantité de thrombine. La fibrinolyse quant à elle est

initiée par l'ajout de t-PA. Ce test permet d'évaluer les états hyper- et hypo-coagulables et permet d'explorer la fibrinolyse, non étudiée dans le TGT^{101,102,103}. Il n'est cependant pas aisé de l'implémenter, ce test opérateur-dépendant ce qui implique une maîtrise rigoureuse de la technique, en raison des très faibles quantités de réactifs manipulées. De plus, un traitement lourd mathématique des données est nécessaire et actuellement aucun logiciel n'est disponible permettant d'exploiter les résultats obtenus.

Un autre test global appelé Thrombodynamics mesure la génération de thrombine et la fermeté du caillot. Cette méthode permet une visualisation *in vitro* en temps réel de la formation du caillot à partir de la surface de l'activateur qui mime les conditions *in vivo*. Elle mesure les caractéristiques spatio-temporelles du caillot de fibrine en formation dans un petit volume de plasma sans agitation. La coagulation commence à la surface d'un insert dit « activateur » recouvert de FT. Le FT immobilisé sur la surface de l'insert reproduit un vaisseau lésé. Quand l'échantillon plasmatique entre en contact avec le FT, la coagulation débute et le caillot commence à croître dans la cuvette. Contrairement aux autres méthodes explorant la formation du caillot, la méthode s'intéresse à la dimension spatiale du caillot.

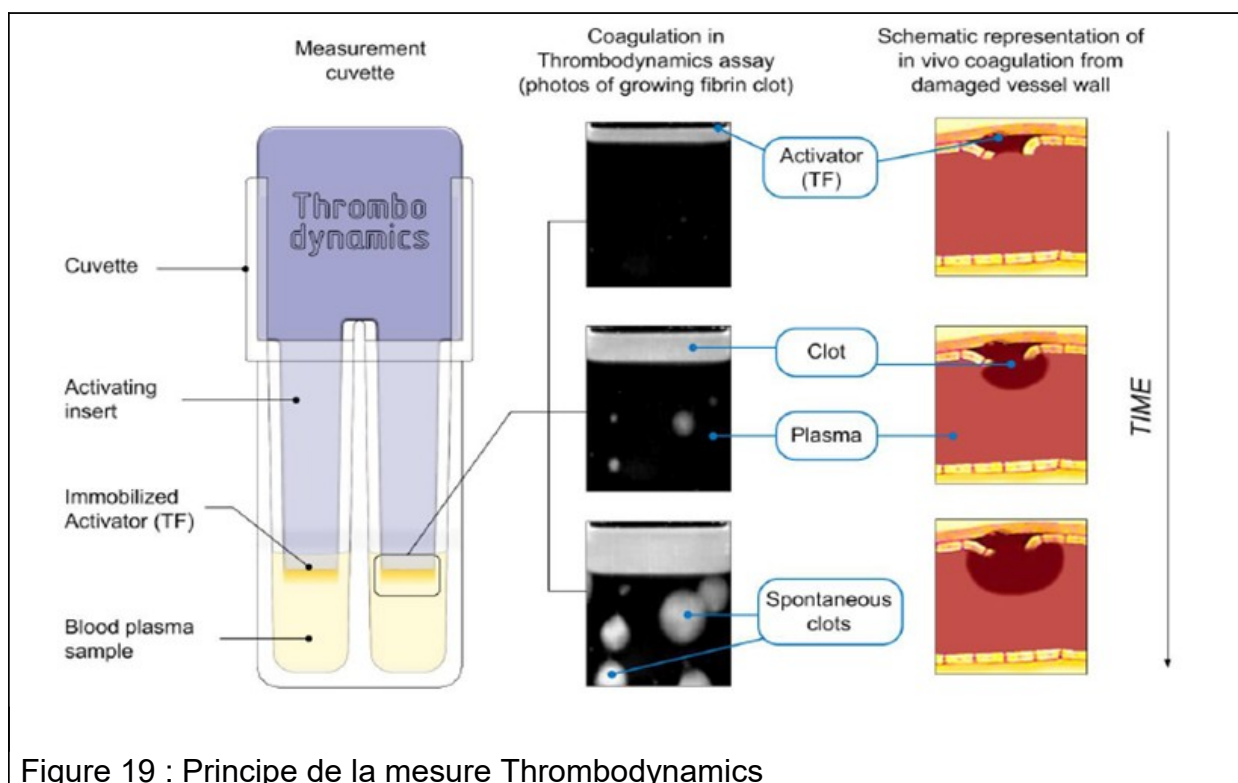


Figure 19 : Principe de la mesure Thrombodynamics

À gauche est représenté l'insert recouvert de phospholipides plaquettaires et de FT mis en contact avec du plasma. Cette face reproduit un dommage tissulaire dans un vaisseau sanguin. Dès que l'échantillon plasmatique entre en contact avec le FT, le processus de coagulation est initié et la formation du caillot de fibrine commence à la surface de la face terminale de l'insert. La progression du caillot est enregistrée par une caméra qui analyse l'opacification du milieu à intervalles réguliers. Les photos prises sont représentées au milieu du schéma. À partir de la série de photos prises, un logiciel calcule les paramètres spatio-temporels de la formation dynamique du caillot de fibrine.

Cet automate a permis d'investiguer des situations prothrombotiques¹⁰⁴ mais aussi hémorragiques et d'évaluer la fibrinolyse chez les patients cirrhotiques¹⁰⁵. Au sein de notre labo, nous avons eu l'occasion d'étudier l'effet des anticoagulants par cette méthode. Ce travail a fait l'objet d'un poster au congrès de la société de thrombose et d'hémostase en 2015¹⁰⁶.

Cependant contrairement au TGT ou aux tests viscoélastiques, ces deux tests globaux sont fastidieux et de manipulation peu aisée. Ils n'ont pas été explorés dans ce travail.

2 Objectifs du projet

Les différents objectifs de ce travail s'articulent autour de l'application des tests de coagulation globaux à diverses situations cliniques. Parmi ces tests, le test de génération de thrombine et les tests viscoélastiques retiennent notre attention. Ils ont déjà été utilisés dans différentes pathologies rencontrées en pratique clinique hospitalière et pourrait s'avérer utiles afin de caractériser différentes pathologies rencontrées au sein de services cliniques hospitaliers avec lesquels notre laboratoire de biologie clinique collabore. Nous présentons dans ce travail 3 études centrées autour de l'application des tests globaux d'hémostase à des situations cliniques particulières.

2.1 Évaluation du potentiel hémostatique chez les enfants atteints de leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) pendant le traitement par Asparaginase

L'incidence des thromboses pendant un traitement de LAL pédiatrique est d'environ 5%¹⁰⁷. L'étiologie est multifactorielle et inclut la maladie elle-même, les défauts de la coagulation induite par le traitement (principalement les corticostéroïdes (CS) et l'asparaginase (Asp)), la présence d'une voie centrale, l'infection et la prédisposition génétique^{108,109,110,111}.

Depuis quelques années, les protocoles de traitement des LAL pédiatriques ont évolué, faisant progresser le pronostic, en utilisant des agents chimiothérapeutiques de plus en plus ciblés. L'asparaginase est un médicament capital dans le traitement des LAL mais avec des effets secondaires sur les cellules saines et responsable d'une altération des synthèses protéiques avec réduction des facteurs de coagulation, procoagulants comme FV, FVIII et fibrinogène, et anticoagulants comme l'antithrombine, la protéine C et la protéine S¹¹².

De plus, les corticoïdes qui font partie intégrante du traitement d'induction en association avec l'asparaginase, induisent un état prothrombotique¹⁰⁸ en augmentant les facteurs procoagulants (comme le FVIII, le FvW, FXI, FV, FII) et le PAI-1.

Les traitements de LAL incluent donc cette combinaison de Asp et CS avec un effet cumulatif sur l'altération de la coagulation et menant cliniquement à un état hypercoagulable.

Quelques études ont étudié l'altération du système hémostatique chez ces patients mais en dosant les protéines de manière indépendante^{113,114}. L'évaluation du potentiel global de coagulation chez les enfants en traitement de LAL n'avait pas été caractérisée. Dans cette étude, le TGT a été utilisé afin d'évaluer le phénotype global hémostatique des enfants atteints de LAL et de cerner les effets des corticostéroïdes et de l'asparaginase sur la coagulation. Les données du TGT ont été analysées en fonction des complications thrombotiques développées par les patients.

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication¹¹⁵, cette dernière est reprise en annexe (7.1).

2.2 Exploration de la balance hémostatique grâce au TGT suite à la greffe de moelle chez les patients drépanocytaires

La drépanocytose (SCD) est considérée comme un état clinique hypercoagulable^{116,117}. L'activation de la coagulation est présente, avec une coagulopathie de consommation ainsi que des taux élevés de marqueurs *in vivo* de génération de thrombine et de fibrine^{118,119}. Plusieurs composants du système de coagulation sont modifiés vers l'hypercoagulabilité. Des études ont rapporté que les patients atteints de SCD présentent des altérations individuelles des facteurs procoagulants et anticoagulants (taux élevés de FVIII, diminution des protéines C et S). De plus, une augmentation du potentiel hémostatique à l'aide de tests globaux de coagulation a été mise en évidence chez les enfants atteints de SCD en état stable, en dehors de tout événement clinique^{120,121}. Cette augmentation du TGT chez les enfants SCD a été décrite comme étant liée au jeune âge ainsi qu'à l'intensité de l'hémolyse et un lien entre TGT et vasculopathie cérébrale chez ces patients a été mentionné¹²².

Le traitement des patients SCD s'est considérablement amélioré avec l'introduction de l'hydroxyurée et avec une gestion médicale mondiale bien meilleure, au moins dans les pays développés^{123,124}. Cependant, la drépanocytose reste associée à une morbidité sévère et à une diminution de la survie (défaillance organique, lésions chroniques). À ce jour, la transplantation de cellules souches hématopoïétiques (HSCT) de donneurs frères et sœurs HLA identiques est le seul traitement curatif

validé de la drépanocytose¹²⁵ même si d'autres types de greffes font l'objet d'études pilotes.

La HSCT est principalement envisagée pour les enfants atteints d'une maladie clinique grave caractérisée par des antécédents d'accident vasculaire cérébral, de crises vaso-occlusives répétées, de syndromes thoraciques aigus répétés et d'ostéonécrose multiple ou d'allo-immunisation¹²⁶. Les patients atteints d'une maladie pulmonaire ou rénale qui se détériorent bénéficient également de la transplantation¹²⁷ ainsi que les enfants à risque d'AVC¹²⁸.

La survie globale et la survie sans événement après greffe de donneurs apparentés varient de 93% à 97% et de 82% à 86%^{129,130,131,132,133}. Malgré ces résultats cliniques impressionnants, l'évolution de l'équilibre hémostatique après HSCT est encore inconnue.

Selon une étude de Langstrom et al.¹³⁴, la HSCT affecte le système de coagulation principalement dans les premières semaines après la transplantation. Cette étude met en évidence un déséquilibre vers un état procoagulant avec une augmentation des marqueurs d'activation de la coagulation (FvW, fragments de prothrombine 1 + 2), l'augmentation du turn-over de la fibrine (D-dimères) et l'augmentation de l'ETP. Ces anomalies précoces de la coagulation peuvent entraîner une augmentation du taux de morbi-mortalité¹³⁵, avec la microangiopathie thrombotique associée à la greffe, principalement en raison de lésions endothéliales induites par la chimiothérapie^{136,137}.

La SCD et la HSCT étant donc deux situations cliniques potentiellement prothrombotiques, l'objectif de cette étude est de caractériser la balance hémostatique chez les enfants SCD bénéficiant d'une HSCT. Le TGT a été utilisé pour comparer le potentiel hémostatique des enfants SCD avant et après HSCT.

Les résultats de cette partie du projet ont été publiés dans *Journal of Clinical Medicine*¹³⁸. L'article est inséré en annexe (7.2).

2.3 Utilisation d'un test de viscoélasticité (ROTEM) en chirurgie cardiaque et plus précisément pédiatrique pour déterminer la dose minimale d'acide tranexamique nécessaire pour inhiber la fibrinolyse

Pendant les interventions cardiaques, le patient est exposé à toute une série de stimuli qui conduisent à un risque non négligeable de saignement et de transfusion de produits sanguins labiles. La circulation extracorporelle va induire une hémodilution mais aussi une activation de la coagulation par contact direct entre le sang et une surface non-endothéliale, le circuit. De plus, la dissection du péricarde et les lésions chirurgicales vont augmenter le risque de saignement, qui à son tour, favorise le développement d'une coagulopathie. D'autres facteurs entraînant un risque de saignement sont l'administration d'héparine, l'administration de protamine, l'hémodilution, la consommation des facteurs de coagulation, la dysfonction plaquettaire et l'augmentation de la fibrinolyse^{139,140}.

Dans ce cadre, les agents antifibrinolytiques sont largement utilisés en chirurgie cardiaque adulte^{141,142} et pédiatrique¹⁴³ car ces molécules ont montré leur efficacité dans la réduction du saignement et des besoins transfusionnels.

Parmi ces agents antifibrinolytiques, l'acide tranexamique (TXA), un analogue synthétique de la lysine, limite la fibrinolyse en inhibant la dégradation de la fibrine par la plasmine¹⁴⁴. Il est utilisé régulièrement en prophylaxie du saignement ou dans des situations hémorragiques (trauma, chirurgie cardiaque, hémorragie du postpartum) limitant les pertes sanguines et le recours aux transfusions^{143,145,146}.

Les doses utilisées actuellement sont essentiellement basées sur une approche empirique, ne tenant pas compte de la pharmacocinétique du produit. Celle-ci a fait l'objet d'études^{147,148,149} en particulier chez l'enfant^{150,151}. Cependant la concentration plasmatique optimale à cibler, permettant une inhibition complète de la fibrinolyse est inconnue, particulièrement dans la population pédiatrique.

Il existe peu de tests explorant la fibrinolyse de manière aisée. Après sensibilisation du test de viscoélasticité Rotem à la fibrinolyse par ajout de t-PA, nous avons déterminé une concentration idéale d'acide tranexamique capable d'inhiber la fibrinolyse induite *in vitro* chez des enfants avec maladies cardiaques congénitales et chez l'adulte sain.

Cette partie du projet a fait l'objet d'une publication¹⁵² qui est annexée à ce manuscrit (7.3).

3 Matériel et méthodes

3.1 Matériel

3.1.1 Appareillages

- Automate de coagulation : STA-EVO (Stago, Asnières, France).
- Fluorimètre (Fluoroscán Ascent, Thermolabsystems OY, Helsinki, Finlande).
- Logiciel d'analyse : Thrombinoscope software (Thrombinoscope B.V., Maastricht, Pays-Bas).
- Thromboelastomètre (ROTEM, Tem-International, Munich, Allemagne).
- Automate de chimie : COBAS 8000 (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Suisse).
- Automate d'hématologie : Sysmex XN 9000 (Sysmex Corporation TM, Kobe, Japon).
- Automate d'électrophorèse capillaire en milieu alcalin (Capillarys Systems, Sebia, Benelux).
- Centrifugeuse Sigma (Sigma-Aldrich, distribué par Analis, Belgique).
- Centrifugeuse à tubes Eppendorff (Eppendorff, Allemagne).
- Congélateur Eppendorff F740hi (Eppendorff, Allemagne).
- Bain-marie Julabo Pura 10 (Julabo, Allemagne).
- Étuve (Analis, Belgique).

3.1.2 Produits, réactifs et consommables

- Tubes de prélèvement : tubes citratés 0,109M, tubes EDTA et tube héparine lithium avec gel séparateur – Vacutainer tubes (Becton Dickinson, Plymouth, Royaume-Uni).
- Kit de dosage du fibrinogène STA-Fibrinogen (Diagnostica Stago, Asnières, France).

- Kit de dosage de la protéine S libre STA-Liatest Free Protein S (Diagnostica Stago, Asnières, France).
- Kit de dosage de la protéine C (Coamatic Protein C, Chromogenix, Milan, Italie).
- Kit de dosage de l'antithrombine (Coamatic Antithrombin, Chromogenix, Milan, Italie)
- Kit de dosage de la LDH LDHI2 (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Suisse).
- Kit de réactifs utilisés pour le TGT (PPP low +/- TM, Thrombinoscope BV, Pays-Bas).
- Kit calibrateur pour le TGT (Thrombin Calibrator, Thrombinoscope BV, Pays-Bas).
- Kit substrat pour TGT contenant le substrat, le calcium et le tampon (FluCa kit, Thrombinoscope BV, Pays-Bas).
- Contrôle utilisé pour le TGT (Poolnorm, Diagnostica Stago, Asnières, France).
- Tubes en plastique (5 mL).
- Tubes en verre (5 mL).
- Tubes Eppendorf en polypropylène 1,2 mL (Nuova Aptaca).
- Tips et pipette Rainin (Mettler-Toledo).
- Plaque 96 puits (VWR).
- Eau pour injection B.Braun.
- Produits pharmaceutiques pour dilutions dans les plasmas après reconstitution en solution saline (0,9% NaCl) :
 - Alteplase (Actilyse, Boehringer Ingelheim Internation GmbH, Ingelheim am Rhein, Allemagne).

- Acide tranexamique (Exacyl, Sanofi Aventis, France).

3.2 Méthodes

3.2.1 Les tests de coagulation « classiques »

Les tests ont été réalisés sur l'automate STA-R-EVO.

- Le fibrinogène a été dosé par la méthode coagulante de référence (méthode Claus¹⁵³) consistant en l'ajout d'une quantité en excès de thrombine dans le plasma dilué du patient.
- L'activité de la protéine C a été mesurée par méthode chromogénique. La protéine C du plasma à doser est activée par une enzyme spécifique issue du venin de vipère. La quantité de protéine C activée est déterminée par le taux d'hydrolyse d'un substrat chromogène entraînant la libération de p-nitroanilline (pNA) mesurée à 405 nm.
- La protéine S libre a été dosée par test immuno-turbidimétrique. Ce dosage mesure par photométrie l'augmentation de la turbidité d'une suspension de microparticules de latex, sur lesquelles sont fixées des anticorps monoclonaux spécifiques de la protéine S libre, suite à leur liaison à la protéine S libre du plasma.
- L'antithrombine a été dosée par méthode chromogénique. Dans ce dosage, le plasma est incubé avec un excès de facteur Xa (FXa) en présence d'héparine. La quantité résiduelle de FXa est déterminée par le taux d'hydrolyse d'un substrat chromogène libérant de la pNA mesurée à 405 nm est inversement proportionnelle au taux d'antithrombine.

3.2.2 Quantification de paramètres biochimiques et hématologiques

La concentration en hémoglobine a été déterminée sur l'automate Sysmex XN 9000 par méthode photométrique.

La lactate déshydrogénase (LDH) a été dosée sur les COBAS 8000.

L'hémoglobine S a été mesurée par électrophorèse capillaire en milieu alcalin.

3.2.3 Test de génération de thrombine TGT

Le TGT a été évalué par la méthode CAT, décrite par Hemker⁷⁹. Le TGT est initié par l'addition de 1 pM de facteur tissulaire et 4 µM de phospholipides, avec et sans ajout de thrombomoduline, pour sensibiliser le test au système anticoagulant protéine C/protéine S.

Après reconstitution des réactifs et thermostatisation de la plaque à 37 °C, 80 µL de PPP sont ajoutés à 20 µL de réactif en absence de thrombomoduline (TM-) ou en présence de thrombomoduline (TM+) (puits réactifs) ou de calibrateur (puits calibrateur).

Après une incubation de 15 minutes à 37 °C, la réaction est déclenchée par ajout de 20 µL du mélange substrat fluorogène-calcium.

La génération de thrombine est mesurée par la méthode CAT. La fluorescence est mesurée (longueur d'onde d'excitation 390 nm et longueur d'onde d'émission 460 nm) par un fluorimètre.

Toutes les mesures sont faites en duplicats (deux puits réactifs et deux puits calibrateurs pour un même échantillon).

Un contrôle qualité interne est ajouté sur chaque plaque de TGT.

3.2.4 Prélèvement et traitement des échantillons

Le sang périphérique veineux des patients et contrôles a été prélevé dans des tubes citratés pour les analyses de coagulation.

Les plasmas pauvres en plaquettes (PPP) sont préparés après double centrifugation à 2500 g pendant 15 minutes. Les PPP sont conservés à -80 °C jusqu'à analyse. Avant analyse, le PPP est rapidement décongelé au bain marie à 37 °C pendant 5 minutes.

3.2.5 Population contrôle pour les deux études avec TGT

23 enfants, âgés de 2 à 14 ans et 31 patients, âgés de 3 à 17 ans, admis pour bilan préopératoire pour intervention chirurgicale mineure ont été considérés comme contrôles normaux (NC) si leur numération sanguine, leur coagulation, leurs tests évaluant la fonction rénale et hépatique, la CRP et LDH étaient normaux. Le plasma

citraté résiduel après leur bilan de coagulation préopératoire a été congelé à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à analyse.

3.2.6 Évaluation du potentiel hémostatique chez les enfants atteints de leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) pendant le traitement par Asparaginase

3.2.6.1 Patients

Cette étude a reçu l'approbation du Comité d'éthique de l'hôpital universitaire des enfants Reine Fabiola HUDERF (CEH n°49/10).

Entre décembre 2009 et septembre 2013, les patients, âgés de 1 à 18 ans, traités selon le protocole CLG-EORTC de première ligne ont été inclus^{154,155}. Les patients ont été classifiés dans 4 groupes de traitement (VLR, AR1, AR2B or VHR) selon leur risque de rechute. Tous les patients ont reçu des CS durant l'induction (prednisolone PDN ou dexaméthasone DXM pour le groupe AR2B) et durant l'intensification tardive (DXM).

Les patients avec thrombophilie au diagnostic (déficience en protéine S, protéine C ou antithrombine, présence d'un anticoagulant lupique, d'une résistance à la protéine C, d'une mutation du FV Leiden ou une mutation G20210A de la prothrombine-FII Leiden) ont été exclus de l'étude en raison de l'instauration chez eux d'une prophylaxie antithrombotique systématique par héparine de bas poids moléculaire pendant les phases de traitements avec asparaginase.

Concernant la formulation de l'Asp administrée, les patients ont reçu, entre décembre 2009 et décembre 2012, 8 infusions intraveineuses d'Asp native (10000 U/m²) deux fois par semaines du jour 12 au jour 35 de l'Induction et 4 infusions intraveineuses deux fois par semaine du jour 8 au jour 18 pendant l'intensification tardive.

Depuis janvier 2013, et la disponibilité en Belgique de la PEG Asp (asparaginase pégylée de longue durée d'action), les patients ont reçu la PEG Asp à la place de l'Asp native, à raison de deux PEG Asp (2500 U/m² en intraveineux) aux jours 12 et 26 en induction et au jour 1 et 8 en intensification tardive.

Le temps de demi-vie de l'Asp native est de 12 heures alors que pour la forme pégylée, il est de 5 à 13 jours¹⁵⁶.

En cas d'allergie avec l'Asp native ou pégylée, ce traitement était substitué par l'Erwiniase (asparaginase extraite de la bactérie *Erwinia chrysanthemi*) à des doses calculées pour tenter de produire le même effet biologique (20000 U/m² 3 fois par semaine).

Les patients recevaient des corticostéroïdes du jour 1 au jour 28 en induction et du jour 1 au jour 21 en intensification tardive. En induction, les patients recevaient principalement de la prednisolone, sauf les patients inclus dans le bras de traitement AR2B qui recevaient de la dexaméthasone. En intensification tardive, tous les patients recevaient de la dexaméthasone.

Les échantillons sanguins des patients ont été obtenus à différents moments pendant le traitement (voir Figure 20) : au diagnostic (jour 1), avant chaque administration de Asp native (A1 à A8 et A9 à A12) et à distance de tout traitement par Asp ou CS (F1, F2 et F3). Les patients sous PEG ou Erwiniase étaient prélevés aux mêmes moments que pour la cohorte sous Asp native (même s'ils recevaient la PEG seulement en A1, A5 et A9). Aux temps de prélèvements A1 et A9, les patients étaient déjà sous CS.

Le TGT et le dosage des protéine S, protéine C, antithrombine et fibrinogènes ont été réalisés sur ces différents échantillons.

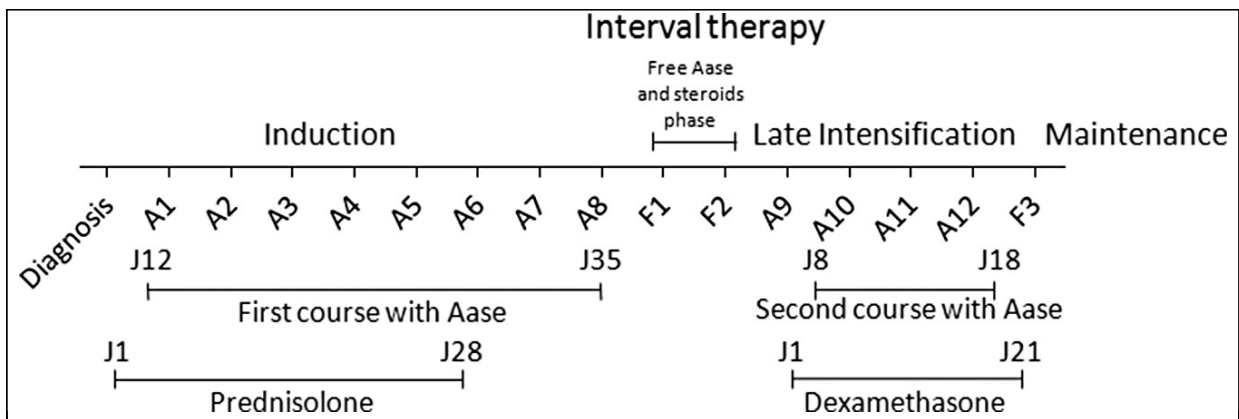


Figure 20 : Schéma d'administration des corticostéroïdes et de l'asparaginase pendant l'induction et l'intensification tardive

Après le diagnostic, le patient est traité pendant 28 jours par corticostéroïdes. À partir du jour 12 et jusqu'au jour 35, le patient reçoit de l'asparaginase. Pendant la phase d'intervalle, le patient ne reçoit ni asparaginase ni corticostéroïdes. Lors de

l'intensification tardive, le patient reçoit pendant 21 jours de la dexaméthasone et pendant 10 jours de l'asparaginase. Les différents prélèvements sont le diagnostic, les moments (A) lorsque le patient est sous asparaginase et/ou corticostéroïde et F lorsque le patient ne reçoit ni asparaginase ni corticostéroïde.

3.2.6.2 Analyses statistiques

Les deux paramètres analysés étaient le pic et l'ETP. Le pourcentage de réduction en présence de TM (RETP) a été calculé pour chaque échantillon.

Les résultats des patients ont été exprimés en médiane et range interquartile à chaque moment de prélèvement.

Pour les données démographiques, les comparaisons concernant l'âge et le sexe entre les NC et les patients soit sous Asp native soit sous PEG Asp ont été faites respectivement par test ANOVA soit par test Chi-carré.

Pour les comparaisons entre les deux cohortes de patients (Asp native et PEG Asp), les variables continues ont été analysées par le test de Mann-Whitney, les variables discrètes ont été analysées par le test exact de Fischer.

Les résultats des paramètres de TGT ont été comparés à l'intervalle allant du percentile 2,5 au percentile 97,5 des NC. Les taux de protéine S et de protéine C ont été comparés au seuil du percentile 2,5 des NC (57% et 65% respectivement). Pour l'antithrombine, les valeurs seuils étaient supérieures à 75% et comprises entre 160 et 400 mg/dL pour le fibrinogène.

La comparaison des résultats de TGT entre patients sous native Asp et PEG Asp aux différents temps a été faite par analyse ANOVA à deux voies avec le test de Bonferroni comme post-test.

Les tests statistiques ont été réalisés en utilisant le logiciel GraphPad Prism Version 5 (GraphPad Software Inc., États-Unis). Une p-value inférieure à 0,05 a été considérée comme significative.

3.2.7 Exploration de la balance hémostatique grâce au TGT suite à la greffe de moelle chez les patients drépanocytaires

3.2.7.1 Patients

Cette étude a reçu l'accord du Comité d'éthique de l'HUDERF (n°25/09).

De novembre 2014 à mars 2018, les enfants souffrant de drépanocytose SCD sévère et étant greffés ont été inclus après signature du consentement éclairé de chaque parent ou tuteur légal.

Les échantillons pour TGT ont été obtenus avant et 3, 6, 9, 12 et 15 mois après HSCT.

De plus, l'évaluation du taux d'hémoglobine, des LDH et de l'HbS ont été reprises des bilans de suivi de routine de ces patients, avant, 6 et 15 mois après HSCT.

3.2.7.2 Analyse statistique

Les différents paramètres de TGT ont été analysés (ETP, pic, vitesse, time to peak, lag time). Le pourcentage de réduction en présence de TM (RETP) a été calculé pour chaque échantillon.

Les résultats des patients ont été exprimés en médiane et étendue des mesures à chaque moment de prélèvement et comparés à l'intervalle allant du percentile 2,5 au percentile 97,5 des NC.

Le test de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer :

- Les résultats obtenus chez les patients avant HSCT et les NC.
- Les résultats obtenus chez les patients de moins de 10 ans avec ceux de plus de 10 ans.
- Les résultats du TGT après 15 mois au regard du statut normal AA ou hétérozygote AS du donneur.

Le test de Wilcoxon a permis de comparer le TGT des patients avant et 3 mois après greffe.

Les taux d'Hb, HbS et LDH ont été comparés avant, 6 et 15 mois après greffe avec le test de Friedman. Si ce dernier était significatif, un post-test de Dunn a comparé les paires de groupes.

Les tests statistiques ont été réalisés en utilisant le logiciel GraphPad Prism Version 5 (GraphPad Software Inc., États-Unis). Une p-value inférieure à 0,05 a été considérée comme significative.

3.2.8 Utilisation d'un test de viscoélasticité (thromboélastomètre ROTEM) en chirurgie cardiaque et plus précisément pédiatrique pour déterminer la dose minimale d'acide tranexamique nécessaire pour inhiber la fibrinolyse

Cette étude a été approuvée par le Comité d'étude de l'HUDERF (CEH n°09/13). Un consentement éclairé a été obtenu soit directement des adultes inclus soit des parents s'il s'agissait d'enfants.

La première étape de l'étude a consisté à créer un modèle *in vitro* d'hyperfibrinolyse induite par t-PA. Brièvement des concentrations croissantes de t-PA (0, 102, 255, 512, 1024, 1535, 2539 U/mL ; 1 U/mL correspondant à environ 2 ng/mL) ont été ajoutées au sang total citraté de 20 enfants avant et après circulation extracorporelle, lorsque les patients étaient sous TXA. Un test Extem sur ROTEM a été réalisé.

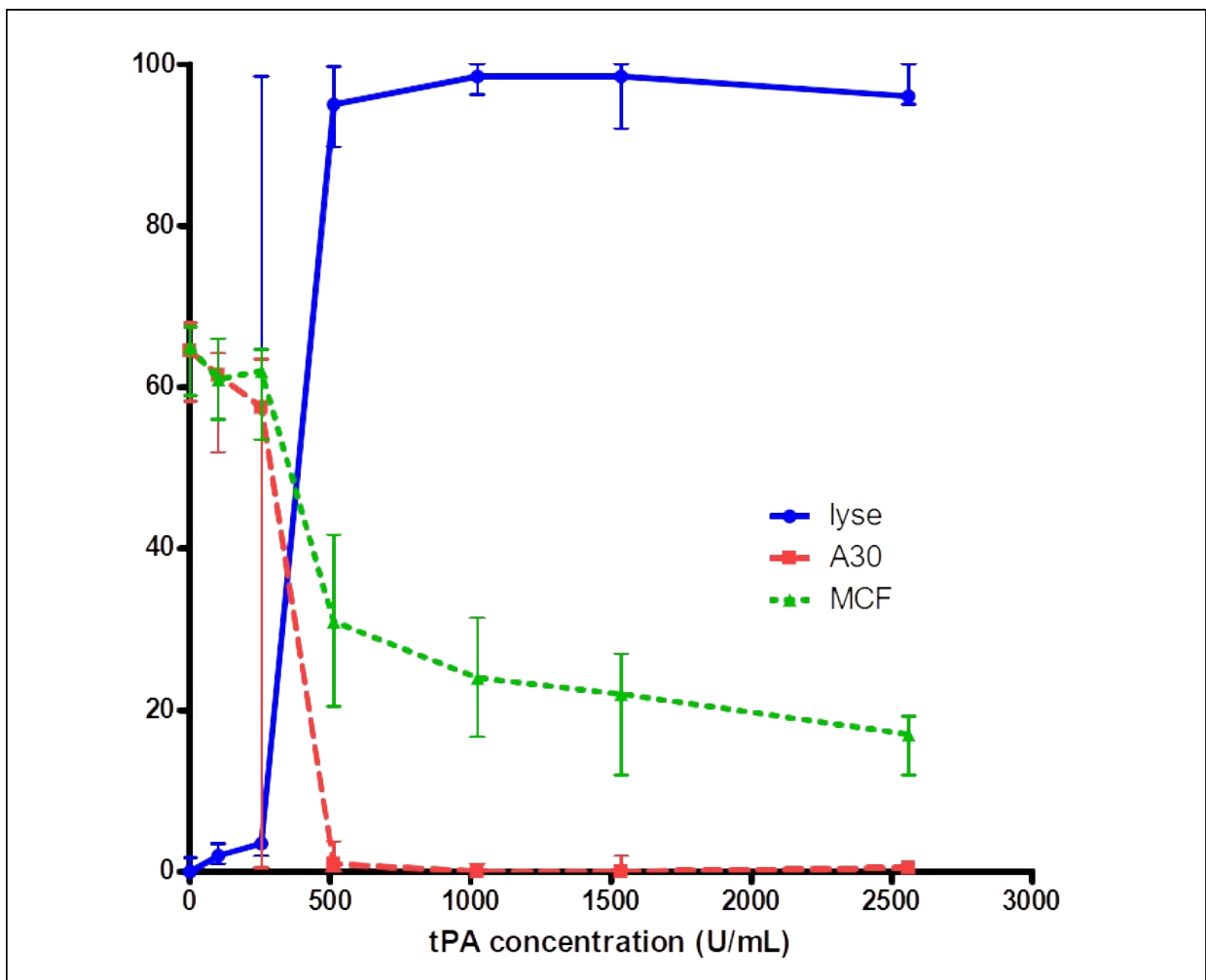


Figure 21 : Évolution des paramètres du test viscoélastique suite à l'ajout de t-PA

Le graphe reprend les médianes et ranges interquartiles pour la lyse après 30 minutes, l'amplitude après 30 minutes et la fermeté du caillot.

Suite à l'ajout de doses croissantes de t-PA, l'amplitude après 30 minutes (A30) diminue, ainsi que la fermeté maximale du caillot. La lyse après 30 minutes est maximale dès l'ajout de 500 U t-PA/mL, entraînant une situation d'hyperfibrinolyse. Après addition de concentration croissante de t-PA, l'amplitude du caillot et la fermeté du caillot diminuent. La lyse maximale est déjà observée avec une concentration de 500 U t-PA/mL. À des doses plus élevées (1535 U t-PA/mL), on observe que le MCF est minimal et constante avec les différents échantillons testés. Les résultats de cette première partie ont été publiés¹⁵⁷.

La deuxième étape, qui sera détaillée ici, a consisté à ajouter des doses croissantes de TXA (0 ; 2,5 ; 5 ; 7,5 ; 10 ; 12,5 ; 15 ; 17,5 ; 20 ; 50 ; 100 µg/mL) et d'une haute concentration en t-PA (1535 U/mL) au sang total citraté.

La concentration élevée de 1535 U t-PA/mL a été retenue à la première étape car elle permet de mimer une situation d'hyperfibrinolyse maximale chez les adultes et les enfants.

Des concentrations différentes de solutions de t-PA et de TXA (en solution saline) ont été utilisées afin d'ajouter un volume faible au sang total et de limiter, à maximum 5%, l'hémodilution du sang total par les réactifs.

3.2.8.1 Adultes sains

Dix adultes sains (5 femmes et 5 hommes) ont été inclus dans l'étude. Ils ne présentaient pas de pathologie de la coagulation, ne prenaient pas de médicament interférant avec la fonction plaquettaire ou avec la coagulation.

3.2.8.2 Enfants avec pathologie cardiaque congénitale

Vingt enfants, âgés de 1 à 10 ans, admis à l'HUDERF pour un cathétérisme cardiaque diagnostique ou interventionnel dans le cadre de leur pathologie cardiaque congénitale (10 pathologies cyanogènes et 10 pathologies non cyanogènes) ont été inclus dans l'étude.

Les critères d'exclusion étaient :

- Les patients moribonds dont la survie est improbable sans intervention ou ASA 5, qualifiés ainsi suivant le score de statut physique préopératoire ASA édité par la société américaine d'anesthésie¹⁵⁸.
- Les témoins de Jéhovah.
- La présence d'une coagulopathie préopératoire définie comme un taux de plaquettes inférieur à 150000 par μL , PT inférieur à 70% ou INR supérieur à 1,31, aPTT supérieur à 33 secondes (norme du couple automate/réactif utilisé au moment de l'étude) ou un fibrinogène inférieur à 150 mg/dL.

3.2.8.3 Test viscoélastique : le ROTEM

Le sang total citraté a été analysé dans les conditions suivantes :

- Sans ajout ni de t-PA ni de TXA.
- Après ajout de 1535 U/mL de t-PA et de concentrations croissantes de TXA (0 ; 2,5 ; 5 ; 7,5 ; 10 ; 12,5 ; 15 ; 17,5 ; 20 ; 50 ; 100 mg/mL).

La voie extrinsèque est activée par l'ajout de facteur tissulaire en utilisant le réactif ex-tem sur le thromboélastomètre ROTEM (Tem Innovations GmbH, Munich, Allemagne).

Les paramètres suivants ont été analysés : l'amplitude du caillot formé après 30 minutes (A30) et l'index de lyse après 30 minutes (LI30) et correspondant au pourcentage de stabilité restante du caillot par rapport à la valeur de fermeté maximale du caillot (MCF) 30 minutes après la détection du temps de coagulation (CT).

3.2.8.4 Analyses statistiques

Les données démographiques continues sont rapportées en médiane et intervalle interquartile. Des tests non paramétriques ont été utilisés suite à la faible cohorte analysée. Le test de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer les paramètres des enfants et des adultes. Les données discrètes ont été exprimées en nombre et pourcentage. Une analyse de variance à deux voies (ANOVA) pour mesures

répétées a été utilisée pour comparer les différentes conditions expérimentales et la différence entre adultes, enfants avec pathologies cardiaques. Des séquences concentration-effet ont été utilisées pour déterminer la concentration de TXA conduisant à l'inhibition de l'hyperfibrinolyse induite par le t-PA. Après transformation logarithmique et normalisation, le LI30 a été modélisé en fonction de la concentration de TXA en utilisant une régression non linéaire. La probabilité d'efficacité de 50% (ED50) et les intervalles de confiance (IC) à 95% ont été obtenus, tandis que l'ED95 et son IC à 95% ont été calculés à partir de l'ED50. Ces paramètres ont été utilisés pour calculer la concentration de TXA requise pour atteindre le retour des paramètres ROTEM à la ligne de base dans respectivement 50% et 95% de la population étudiée. Les tests statistiques ont été réalisés en utilisant le logiciel GraphPad Prism Version 5 (GraphPad Software Inc., États-Unis). Une p-value inférieure à 0,05 a été considérée comme significative.

4 Résultats et discussion

4.1 Évaluation du potentiel hémostatique chez les enfants atteints de leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) pendant le traitement par Asparaginase

4.1.1 Données démographiques et cliniques

Après exclusion de 3 patients pour thrombophilie au diagnostic, 56 enfants avec une LAL B, âgés de 1 à 14 ans ont été inclus. 36 ont été traités par Asp native et 20 par PEG Asp. Les données démographiques sont reprises au Tableau 4.

Aucune différence statistique n'a été observée tant pour l'âge que pour le sexe entre la population normale et les patients. Les globules blancs, l'infection prouvée à l'induction, l'incidence de thrombose et la classification de la LAL étaient similaires dans les deux groupes de patients.

Malgré un pourcentage de patients recevant de la DXM en induction plus élevé (20% versus 8,3%) dans la cohorte PEG et un pourcentage de patients dans le groupe VHR plus élevé dans la cohorte PEG (5,6% versus 0%), aucune différence significative n'a été identifiée entre les deux groupes.

Tous les patients étaient en rémission cytologique à la fin de l'induction. De plus, la maladie résiduelle était inférieure à 10^{-3} chez 31/36 patients (86%) dans le groupe Asp native et 20/20 (100%) dans le groupe PEG Asp ($p = 0,1438$).

Quatre patients ont développé une réaction allergique et ont dû être traités par Erwiniase (3 sous Asp native et 1 sous PEG Asp initialement).

Trois patients ont souffert de thrombose symptomatique (deux sous Asp native, un sous PEG Asp), ce qui correspond à un taux de thrombose de 5,6 et 5,0% respectivement. Deux patients de 2 et 3 ans, ont développé une thrombose de la veine sous-clavière en même temps qu'une infection de cathéter veineux central, respectivement au jour 22 de l'induction et après la fin de l'induction (13 jours après la dernière dose d'Asp). Un de ces deux patients a également développé ultérieurement une thrombose au niveau du sinus longitudinal supérieur, lors de la phase d'intensification tardive. Le troisième patient sous PEG Asp a également

présenté une thrombose du sinus longitudinal supérieur lors de la phase d'induction, après la deuxième injection de PEG Asp.

Tableau 4 : Données démographiques des contrôles normaux et des patients sous Asp native ou PEG Asp

	Contrôles normaux	Asparaginase native	PEG asparaginase	p-value
Nombre d'enfants	23	36	20	-
Âge médian, en années (étendue des mesures)	5 (2-14)	3,7 (1-14)	3 (1,5-13)	p = 0,0704#
Garçon / fille	11/12	20/16	14/6	p = 0,3331##
Groupes de traitement		VLR :2 AR1 :29 AR2B :3 VHR :2	VLR :2 AR1 :14 AR2B :4 VHR :0	
Patients avec thrombose		2 (5,6%) VLR :1 et AR1:1	1 (5%) AR1 :1	p = 1 NS**
Patients avec infection documentée au diagnostic		4	1	p = 0,6449**
Patient ayant dû passer à l'Erwiniase		3	1	p = 1 NS**
Passage pendant l'induction		2	0	p = 0,5325 NS**
AR2B (%)		3 (8,3%)	4 (20%)	p = 0,2336**
Leucocytose au diagnostic, en 10 ⁹ cellules/L (étendue des mesures)		11,60 (0,86-89,31)	12,20 (0,94-92,36)	p = 0,8877*
Maladie minimale résiduelle à la fin de l'induction > 10 ⁻³		5	0	p = 0,1438**

ANOVA : pour comparaison entre les contrôles normaux et les deux cohortes de patients.

Chi-square : pour comparaison entre les contrôles normaux et les deux cohortes de patients.

* Test de Mann-Whitney : pour la comparaison entre les deux cohortes de patients.

** Test exact de Fischer.

4.1.2 Génération de thrombine sous Asp

La Figure 22 montre la comparaison du profil de TGT sous Asp aux différents temps étudiés. Les valeurs de l'ETP des patients sont plus élevées que les l'ETP des NC, au diagnostic et pendant toute l'induction. Pendant la période sans CS et sans Asp, les médianes pour l'ETP ont des taux comparables aux NC. Pendant l'intensification tardive, l'ETP ré-augmente à nouveau. Cette observation est similaire en présence et en l'absence de TM. Lors des moments avec uniquement des CS et pas encore d'Asp, en A1 et A9, les médianes d'ETP sont pratiquement comprises dans le range des NC ou très légèrement augmentées. Les valeurs pour le Pic suivent la même tendance mais de manière moins marquée.

ETP et pic sont significativement plus bas ($p < 0,001$) chez les patients sous PEG que sous native Asp. Le post-test de Bonferroni met en évidence des différences significatives ($p < 0,01$) pour : ETP avec TM aux temps A1 et A11, pour le pic sans TM aux temps A1 et A12 et pour le pic avec TM aux points A1, A9, A11 et A12.

Comme l'âge, le sexe, le type de CS administré affectent le profil hémostatique, d'autres analyses ont été faites. L'ETP n'était pas significativement différent entre les patients de plus et de moins de 5 ans ($p = 0,8550$), ni entre les patients recevant de la DXM ou de la PDN en induction ($0,8023$) et entre les filles et les garçons ($p = 0,0577$).

Le RETP était significativement plus bas chez les patients par rapport aux NC ($p < 0,001$) (médiane de 39%, 15% et 21% pour NC, native et PEG). La population de NC présentait une diminution de l'ETP en présence de TM inférieure à 50%.

Les patients ayant souffert d'un événement thrombotique pendant le traitement par Asp native montraient un ETP et un pic plus élevés que les autres patients. Leurs ETP et pic avec et sans TM étaient au-dessus des médianes des patients sans thrombose.

Cependant pour le patient sous PEG et ayant thrombosé, l'ETP et le pic n'étaient pas augmentés par rapport aux NC ou à la cohorte PEG. Le pic en présence de TM restait même dans le range du percentile 2,5 au percentile 97,5 des NC.

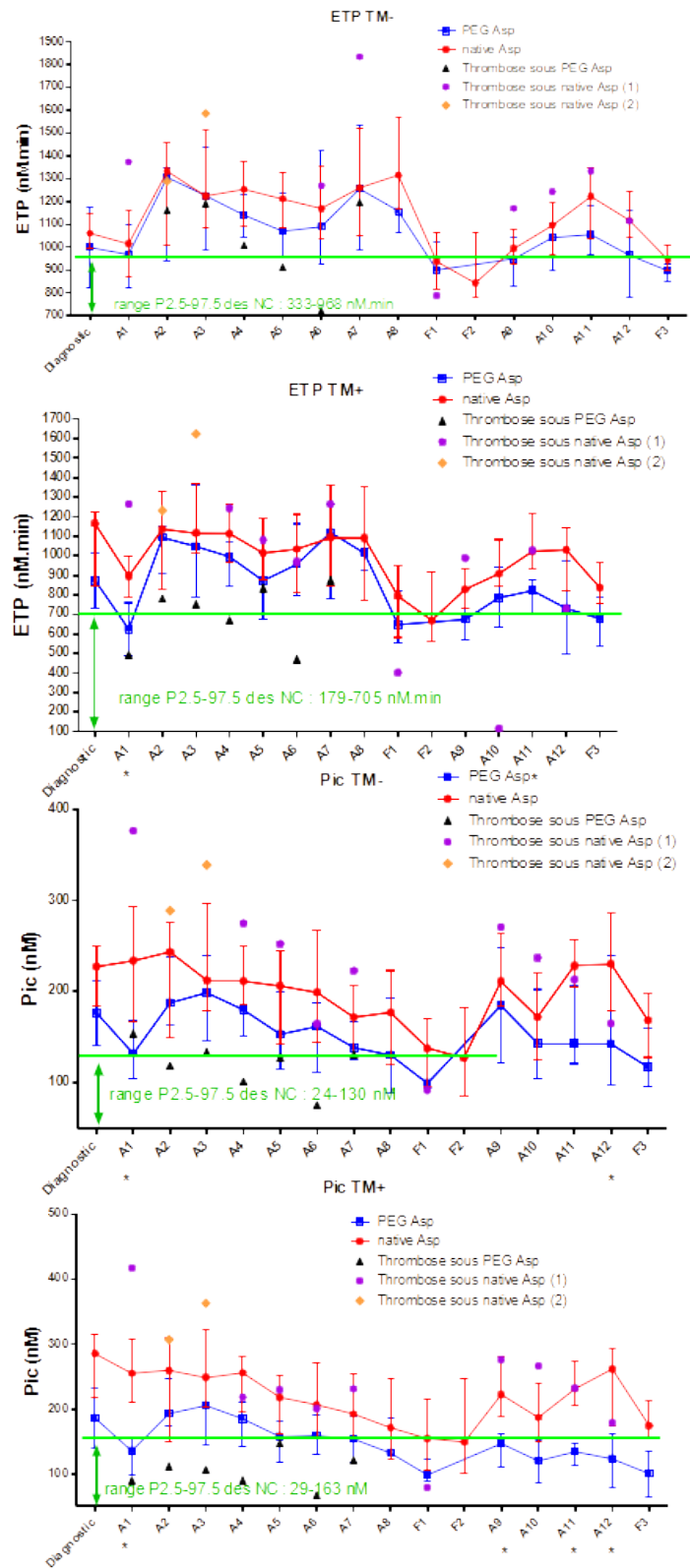


Figure 22 : Paramètres de génération de thrombine sous Asp native et Peg Asp

ETP et Pic, sans thrombomoduline (TM-) et avec (TM+) aux différents temps pour la cohorte sous Asp native (rouge) et PEG Asp (bleu).

Les barres d'erreur représentent la médiane et l'intervalle des mesures des patients.

Losanges oranges : valeurs d'un patient avec thrombose sous-clavière au jour 22 de l'induction d'Asp native.

Losanges mauves : valeurs d'un patient ayant développé une thrombose de la veine jugulaire au jour 50 lors de l'induction et une thrombose cérébrale lors de l'intensification tardive d'Asp native.

Triangle noirs : valeurs d'un patient ayant développé une thrombose du sinus longitudinal supérieur sous PEG Asp.

Astérisque * représente les temps où le test de Bonferroni met en évidence une différence significative ($p < 0,01$) entre les deux cohortes.

4.1.3 Paramètres individuels hémostatiques

La Figure 23 reprend l'évolution des taux plasmatiques d'antithrombine, de protéine S, de protéine C et de fibrinogène. Ils sont similaires et suivent les mêmes tendances sous Asp native et PEG Asp. Ils diminuent tous pendant l'induction. Pratiquement toutes les valeurs pour la protéine S et la protéine C restent au-dessus des valeurs seuils. L'antithrombine quant à elle descend en-dessous du seuil normal avec le taux le plus bas observé à la fin de l'induction. Au diagnostic, le fibrinogène est significativement plus élevé dans le groupe Asp native. La valeur médiane du fibrinogène est en-dessous du seuil entre les jours 15 et 29 de l'induction.

En période libre de tout CS ou Asp, en F1 et F2, les valeurs d'AT, PS, PC et fibrinogène augmentent et sont comprises dans les valeurs normales. En A9, à un moment où le patient est sous DXM mais n'a pas encore reçu d'Asp, les valeurs d'AT, PS et PC se maintiennent élevées.

Les résultats d'antithrombine sont plus bas sous PEG que sous native Asp pendant l'induction. On observe globalement une différence significative entre les deux cohortes ($p < 0,001$) sans différence significative mise en évidence par le post-test de Bonferroni).

Les protéine S, protéine C et fibrinogène ne montrent pas de différence significative entre les deux cohortes.

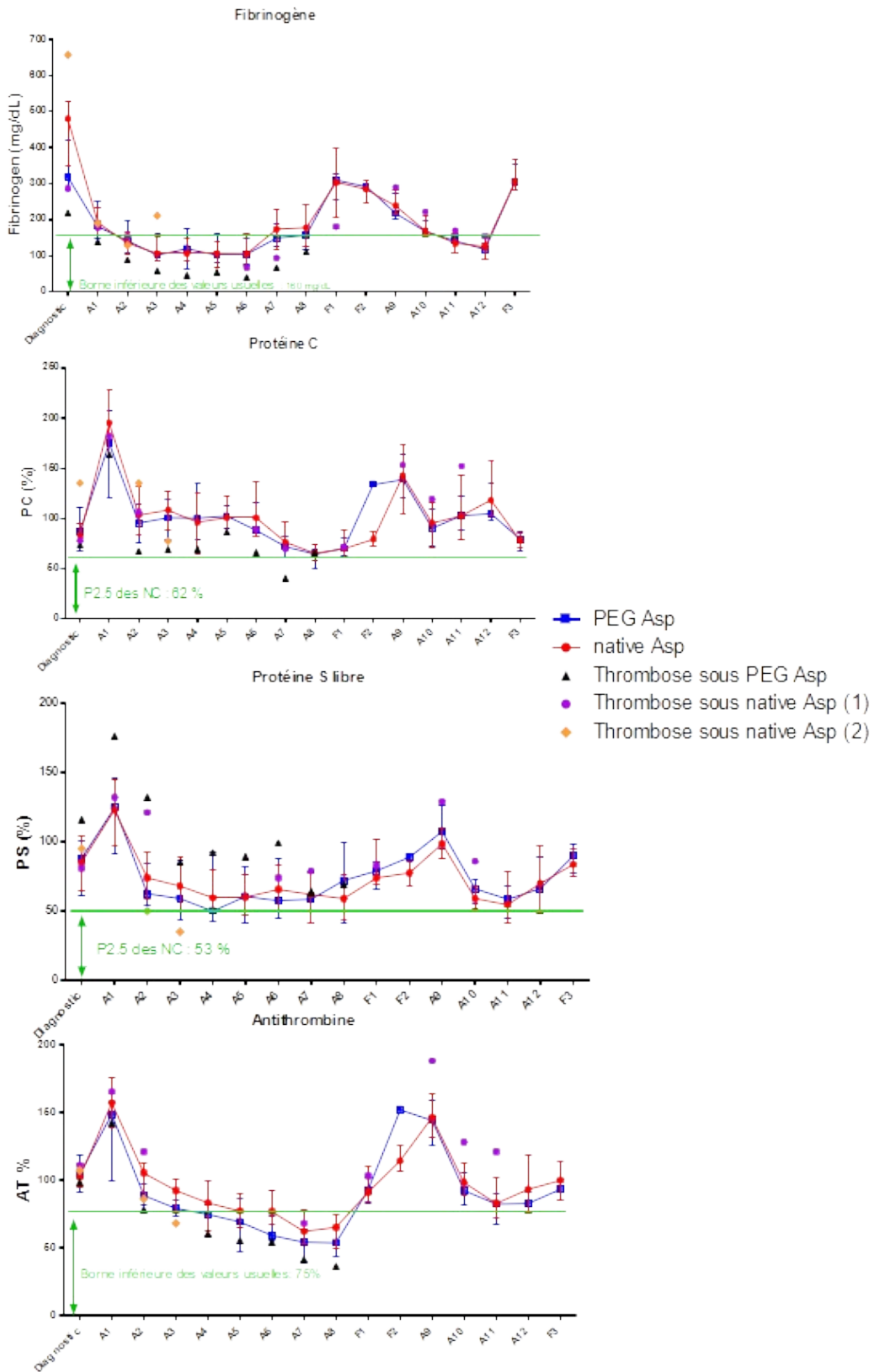


Figure 23 : Comparaison des paramètres individuels d'hémostase entre les cohortes sous native et Peg Asp

Taux d'antithrombine, de protéine C, de protéine S et fibrinogène aux différents temps pour la cohorte sous Asp native (rouge) et PEG Asp (bleu).

Les barres d'erreur représentent la médiane et l'étendue des mesures des patients.

Losanges oranges : valeurs d'un patient avec thrombose sous-clavière au jour 22 de l'induction d'Asp native.

Losanges mauves : valeurs d'un patient ayant développé une thrombose de la veine jugulaire au jour 50 lors de l'induction et une thrombose cérébrale lors de l'intensification tardive d'Asp native.

Triangles noirs : valeurs d'un patient ayant développé une thrombose du sinus longitudinal supérieur de PEG Asp.

4.1.4 Discussion

Le taux de thrombose symptomatique (5%) observée dans cette étude est similaire à celle retrouvée dans la littérature^{107,110,159}. Cependant des taux plus élevés sont observés dans certaines séries, selon le critère diagnostique utilisé (ex. symptomatique versus asymptomatique) ou les méthodes radiologiques utilisées¹⁶⁰. Les événements thrombotiques (ET) rencontrés ici étaient localisés soit dans le système veineux supérieur, concomitamment à une infection de voie centrale, soit dans le système nerveux cérébral. Ces localisations sont aussi fréquemment rapportées dans la littérature¹⁰⁷. L'association entre thrombose veineuse supérieure et présence d'une voie centrale est aussi fréquente¹⁰⁹. Les adolescents avec LAL, par rapport aux enfants plus jeunes, sont considérés comme à haut risque d'événement thrombo-embolique^{107,161,162,163}. Cependant dans la cohorte étudiée, aucune thrombose n'a été observée chez les trois patients âgés de plus de 10 ans. Les adolescents étaient peu représentés ici et aucune conclusion ne peut donc être déduite sur l'incidence de thrombose et l'âge. Zwicker et al. ont émis récemment des recommandations sur la prévention et la prise en charge des ET sous asparaginase chez l'adulte¹⁶⁴. Celles-ci sont plus interventionnelles que chez l'enfant suite au taux plus élevé de thrombose rapporté chez l'adulte (infusion d'antithrombine et thromboprophylaxie par héparine de bas poids moléculaire).

Toujours en concordance avec la littérature, les événements thrombotiques rencontrés sont apparus principalement pendant l'induction¹⁰⁷, indiquant l'influence de la maladie et de la chimiothérapie sur l'apparition de thrombose^{165,166}. La durée d'administration des CS et d'ASP est plus longue durant l'induction que durant

l'intensification tardive. Ces deux molécules modulent la coagulation et augmentent le risque thrombotique, principalement en diminuant les anticoagulants physiologiques (protéine S, protéine C et antithrombine)^{167,168}. Néanmoins l'interaction entre Asp et CS sur la balance hémostatique dépend du programme spécifique d'administration¹⁶⁹, et diffère entre les différents protocoles thérapeutiques de LAL utilisés. Les CS augmentent le FVII, le FVIII, et le FXI chez les sujets sains¹⁷⁰, alors que durant l'inflammation le fibrinogène, PAI-1 et FvW sont augmentés. Cette modification du FvW et du PAI-1 entraîne une activation de la coagulation et une inhibition de la fibrinolyse^{171,172,173}.

Des résultats discordants concernant l'influence de l'antithrombine, la protéine S et la protéine C sur le profil prothrombotique de patients en induction de LAL sont rapportés.

Une étude portant sur 23 enfants montre un profil de TGT plus élevé mais sans différence significative pour l'ETP et le pic avec le groupe contrôle¹⁶⁶. Ce profil prothrombotique n'était pas affecté par l'hypofibrinogénémie et/ou par la déficience en antithrombine.

Yamashita et al. ont montré qu'avec l'addition de 5 pM de facteur tissulaire, l'ETP était significativement augmenté après traitement par Asp, en comparaison avec la situation avant traitement ; cette augmentation d'ETP était corrélée avec la diminution de l'antithrombine et la protéine C^{174,175}. Le profil prothrombotique était diminué après supplémentation d'antithrombine, cependant certains patients avec hypofibrinogénémie concomitante ont développé une tendance hémorragique après supplémentation en antithrombine.

De plus, la CRP est corrélée avec l'ETP, suggérant une contribution de l'infection au profil prothrombotique ce qui est en accord avec le risque d'ET augmenté en induction et consolidation en présence d'infection.

Un autre facteur impliqué dans le profil prothrombotique est la perturbation de la voie de la protéine C et protéine S comme démontrée par la sensibilité réduite à la TM (RETP diminuée), confirmant les données de Staddon et al. dans une cohorte de 12 patients sous PEG Asp¹⁷⁶. Un mécanisme évoqué à ce RETP abaissé et à la résistance à la protéine C serait la présence de taux élevés de FVIII durant

l'induction¹⁷⁷. Au diagnostic, les D-dimères, le FVIII, le FvW, la protéine C, l'antithrombine, et le TAFI sont élevés. Pendant l'induction, le fibrinogène, les inhibiteurs et le plasminogène diminuent mais les FVIII, D-dimères et TAFI restent élevés. Ces taux élevés de FVIII contribuent à l'état hypercoagulable¹⁷⁸ et entraînent une résistance acquise à la protéine C, compatible avec le RETP bas observé.

De plus, la fibrinolyse étant altérée (TAFI augmenté) et les D-dimères élevés pendant l'induction, cela contribue aussi au profil prothrombotique¹⁷⁷.

De manière étonnante, nous avons mis en évidence un profil de TGT plus bas sous PEG Asp que sous Asp native. Cette différence n'a pu être expliquée par une différence significative d'âge, de sexe ou de CS entre les deux cohortes. La cohorte PEG contenait une proportion plus élevée (mais non significative) de patients traités dans le bras AR2B et donc recevant de la DXM à la place de PDN en induction. Les patients sous DXM en induction ont un profil moins prothrombotique, avec moins d'ET^{179,180}. Les glucocorticoïdes agissent sur l'intégrité des membranes cellulaires ; ils inhibent la libération de l'acide arachidonique des phospholipides et diminuent ainsi la production de prostaglandines et de thromboxane. Néanmoins une large méta-analyse n'a pas mis en évidence de différence entre la PDN et la DXM dans l'incidence d'ET pendant l'induction¹⁰⁷ ; le profil prothrombotique plus bas ne peut être expliqué par une proportion plus élevée de patients recevant la DXM. De plus, en intensification tardive, tous les patients reçoivent de la DXM et la cohorte PEG montre toujours un profil prothrombotique moins marqué.

Le calendrier d'administration de l'Asp et des CS influence la coagulation de manière contrastée. L'Asp native a un temps de demi-vie court et est administrée à doses plus élevées et plus fréquentes et pour une période plus longue en combinaison avec la DXM ; cela entraîne un effet cumulatif avec une correction plus lente des protéines abaissées¹⁶⁹. Cela ne peut expliquer le profil prothrombotique plus faible sous PEG. La formulation PEG Asp a été développée pour réduire le risque d'allergie et d'inactivation silencieuse, elle permet d'obtenir une activité asparaginase et une déplétion en asparagine prolongée et prévisible¹⁸¹. En comparaison à la forme native, une dose unique permet d'obtenir une activité thérapeutique de l'enzyme pendant 2 semaines¹⁸². Cette optimisation de l'activité asparaginase avec la forme pégylée ne peut expliquer le profil prothrombotique moins marqué car l'antithrombine sous PEG

est significativement plus basse. Une explication avancée serait un meilleur effet anti-leucémique sous PEG, avec une diminution plus rapide des blastes et des microparticules libérés pendant l'induction, l'état procoagulant au diagnostic pouvant être expliqué par une exposition aux phosphatidylsérines¹⁸³. Dong et al. ont mis en évidence que la chimiothérapie induisait un état procoagulant suite à l'exposition de phosphatidylsérine sur les lymphoblastes au diagnostic et qui augmentait après traitement par Daunorubicine ou Asp¹⁸⁴. Fait intéressant, au diagnostic, nous avons observé une augmentation du fibrinogène, de l'ETP TM+, du pic TM- et du pic TM+ dans le groupe Asp native. Même s'ils ne sont pas statistiquement différents, 2 patients VHR appartenaient à la cohorte native et aucun à la cohorte PEG. Ces patients avaient une réponse médiocre à la PDN. Le profil TGT plus élevé dans le groupe natif au temps A1 correspondant à l'échantillon prélevé juste avant la première administration d'Asp pourrait refléter une activité plus élevée de la maladie comme suggéré par un taux de leucocytes plus élevé. Néanmoins, celui-ci n'était pas significativement différent entre les deux cohortes, au diagnostic et à des moments ultérieurs, et il ne peut expliquer le profil du TGT différent observé pendant l'induction et en réinduction avec des ETP TM+ et pic TM- significativement plus élevés (cf. temps A11 et A12).

Bien que le pourcentage de patients avec une maladie résiduelle supérieure à 10^{-3} à la fin de l'induction soit plus faible dans la cohorte PEG (0% contre 14%), il n'était pas statistiquement différent par rapport à la cohorte native. L'hypothèse d'un lien entre une meilleure clairance des blastes et un profil prothrombotique moins prononcé sous PEG reste à étudier.

L'exploration du profil de coagulation, par un test global, des enfants LAL sous PEG et native Asp est peu rapportée. Les études publiées comparent l'Asp native avec l'Erwiniase mais en explorant seulement des paramètres de coagulation individuels. Ils ont montré un risque plus élevé d'ET avec l'Asp native avec des marqueurs de coagulation individuels accrus et une diminution du plasminogène et de l' α 2-antiplasmine¹⁸⁵.

Notre étude a fourni des données sur trois questions importantes qui n'avaient pas été abordées chez les patients LAL. Tout d'abord, elle a montré la différence entre l'Asp native et sa forme pégylée sur le profil prothrombotique. Elle a permis de

caractériser la TGT pendant une période libre de tout Asp ou de tout stéroïdes. Enfin, suite à l'ajout de TM, le TGT a été sensibilisé à la voie de la protéine C et de la protéine S et a permis de montrer sa défaillance.

Le TGT est donc un outil prometteur pour l'évaluation de l'état hypercoagulable chez les enfants atteints de LAL traités par Asp en combinaison avec les CS. Elle met en évidence un potentiel accru de génération de thrombine sous Asp (native et PEG), déjà tôt au diagnostic, persistant pendant l'induction et réapparaissant pendant l'intensification tardive. Cette observation est cohérente avec la forte incidence d'événements thrombotiques précédemment décrite pendant l'induction et jusqu'à 14 jours après la dernière perfusion d'Asp.

Les CS et l'ASP, et plus globalement la polychimiothérapie administrée dans les traitements de LAL, a aussi un impact sur l'intégrité de l'endothélium et sur la fonction plaquettaire. Giordano et al. ont bien mis en évidence une dysfonction endothéliale avec augmentation du PAI-1, de la P-sélectine soluble ainsi qu'une potentielle augmentation de l'activité plaquettaire suite à, l'augmentation de la libération de FVW de haut poids moléculaire¹¹⁴. Ces deux versants n'ont pas pu être explorés dans notre étude. Les profils de TGT prothrombotiques observés chez les patients sous Asp native qui ont connu des événements thrombotiques suggèrent que ce test pourrait être utile pour identifier les patients présentant un risque thrombotique accru. Le profil prothrombotique plus bas observé sous PEG Asp pendant l'induction, est peut-être la conséquence de l'optimisation de l'activité Asp conduisant à une meilleure activité anti-leucémique, et reste à élucider. Dans l'étude de phase 3 de l'Asp pégylée et la comparant à l'Asp native, aucune différence significative n'avait été mise en évidence en termes d'événement thrombotique ou hémorragique¹⁸⁶. Cependant, et ce malgré les controverses de ces derniers mois sur l'impact de la pégylation sur le risque thrombotique, une étude récente portant sur la notification en termes de pharmacovigilance de six médicaments dont l'Asp, entre leur forme classique et pégylée, a même montré une atténuation des notifications pour événements thrombotiques avec les formes pégylées¹⁸⁷.

4.1.5 Conclusion intermédiaire

Ce premier travail a permis d'illustrer l'utilité d'un test global en coagulation pour caractériser l'hémostase d'une population de patients en traitement pour leucémie aiguë lymphoblastique et soumis à de nombreuses modifications des différentes protéines de la coagulation. Le profil hémostatique mis en évidence correspond bien au profil clinique prothrombotique retrouvé chez ces patients.

4.2 Exploration de la balance hémostatique grâce au TGT suite à la greffe de moelle chez les patients drépanocytaires

4.2.1 Données démographiques

17 enfants (5 filles et 12 garçons) ont été enrôlés dans cette étude, 16 étaient homozygotes HbSS et un était hétérozygote composé HbSB+. Tous les patients étaient sous hydroxyurée. Trois patients étaient en programme de transfusion chronique avant HSCT, soit pour maladie cérébro-vasculaire soit pour syndrome thoracique aigu récurrent malgré traitement à l'hydroxyurée. L'âge médian au moment de la greffe était de 9,6 ans (range 3,6 – 16,5 ans). Le donneur était un frère ou une sœur (11 étaient porteurs de l'hémoglobine S HbAS, 5 homozygotes normaux AA et 1 porteur hétérozygote de l'hémoglobine C HbAC). La source de cellules souches étaient le sang de cordon (n = 1), de la moelle (n = 11) ou la combinaison moelle et sang de cordon (n = 5). Le Tableau 5 reprend les données démographiques.

Tous les patients ont reçu un conditionnement myélo-ablatif. La maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) a été prévenue par de la cyclosporine et du méthotrexate ou de la cyclosporine et du mycophénolate dans le cas de greffe par sang de cordon.

4.2.2 Données cliniques

Tous les patients ont été greffés avec succès. Aucune GVHD aiguë n'a été déplorée. Un patient a développé une GVHD chronique extensive qui a été bien contrôlée après traitement par CS et photophérèse extracorporelle. Après un suivi médian de 3 ans, tous les patients étaient en vie avec un chimérisme complet du donneur.

Le Tableau 5 reprend les données cliniques.

Tableau 5 : Données démographiques, cliniques et biologiques des 17 patients

Génotype patient		11 HbSS, 1 HbSB+					
Sexe		5 filles, 12 garçons					
Age au moment de la greffe (années)		9,6 (3,6-16,5)					
Génotype du donneur		11 HbAS, 5 HbAA, 1 HbAC					
Sexe du donneur		7 filles, 10 garçons					
Complications lors de la greffe	Insuffisance rénale aiguë	1, résolue 3 mois après la greffe (suite à des toxicités médicamenteuses)					
	Cystite hémorragique	1, avec cystite hémorragique modérée résolue moins d'1 mois après la greffe					
	Maladie veino-occlusive	0					
	GVHD aiguë	0					
	GVHD chronique	1, patient pour lequel il n'y avait plus de traitement immuno-suppresseur 12 mois après la greffe					
		Post-test de Dunn					
	Avant greffe	6 mois après greffe	15 mois après greffe	Test de Friedmann	Avant versus 6 mois après greffe	Avant versus 15 mois après greffe	6 mois versus 15 mois après greffe
Hb (g/dL)	8,3 (7,2-11,4)	11,7 (10,5-14,5)	12,4 (10,9-13,5)	p < 0,0001	**	***	NS
HbS (%)	70 (26-88)	32 (0-40)	34 (0-42)	p = 0,0001	***	*	NS
LDH	466 (256-823)	243 (185-488)	235 (177-317)	p < 0,0001	**	***	NS

Les données sont exprimées en médiane et range. GVHD : maladie du greffon contre l'hôte.

Hb : hémoglobine, HbS : hémoglobine S, LDH : lactate déshydrogénase.

NS : non significatif ($p > 0,05$), * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$.

4.2.3 Paramètres de TGT

En présence ou absence de TM, l'ETP, le pic et la vélocité étaient significativement plus élevés ; le temps de latence et time-to-pic étaient plus courts tandis que le RETP était diminué chez les enfants SCD avant HSCT par rapport aux NC.

La situation en présence de TM est illustrée à la Figure 24.

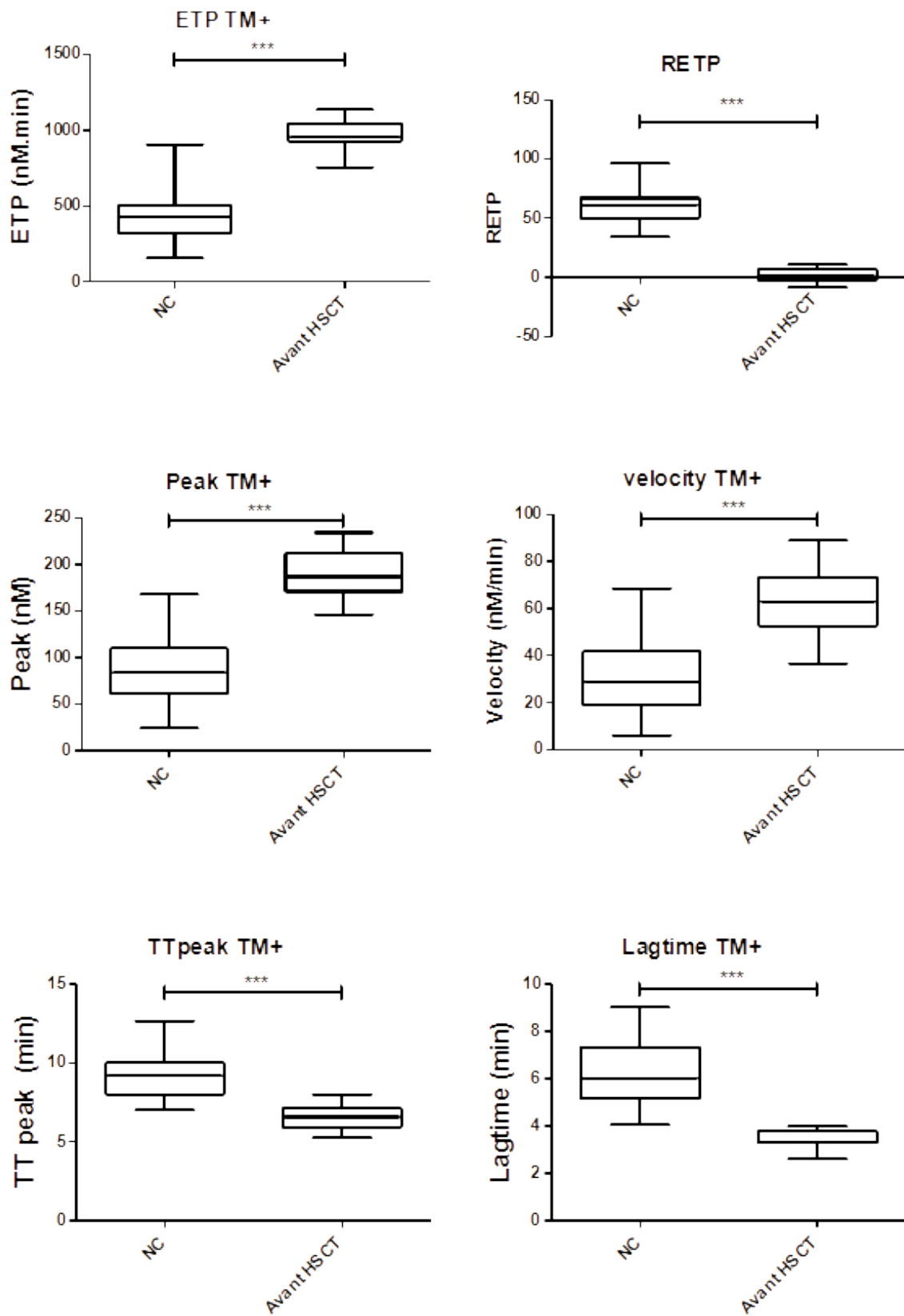


Figure 24 : Comparaison des paramètres de TGT en présence de TM.

Médiane et étendue des mesures entre les NC et les patients SCD avant greffe.
 ETP TM+ : potentiel de thrombine endogène suite à l'ajout de thrombomoduline.
 RETP : réduction de l'ETP avec l'ajout de thrombomoduline.
 GCSH : greffe de cellules souches hématopoïétiques.
 TM+ : avec ajout de thrombomoduline.
 TT : temps jusqu'au pic.
 NC : contrôle normal.
 *** p < 0,001 par rapport aux témoins utilisant le test de Mann-Whitney.

Toutes les valeurs pour le TGT sont résumées au Tableau 6.

Tableau 6 : Paramètres de TGT pour les NC et les patients avant et après greffe

Paramètres	NC	Avant HSCT	3 mois après HSCT	6 mois après HSCT	9 mois après HSCT	12 mois après HSCT	15 mois après HSCT	Comparaison NC versus avant HSCT	Comparaison avant versus 3 mois après HSCT
ETP sans TM (nM.min)	681,5 (313 – 1355)	1010 (806,6 – 1117)	938,2 (795,3 – 1318)	1021 (803,3 – 1329)	1050 (878,3 – 1261)	925,7 (743,9 – 1298)	992,0 (844,8 – 1263)	p < 0,0001	NS
ETP avec TM (nM.min)	426 (157 – 905)	956,1 (753 – 1139)	780,0 (564,7 – 1268)	899,5 (616,4 – 1224)	888,0 (520 – 1103)	768,9 (388,5 – 1189)	870,8 (493 – 1239)	p < 0,0001	NS
Réduction de l'ETP (%)	61 (34 – 96)	1,4 (-8,4 – 11,2)	12,5 (2,2 – 35,1)	16,2 (3 – 23,3)	21,8 (-1,1 – 40,8)	15,4 (-1,8 – 47,8)	18,3 (1,8 – 41,6)	p < 0,0001	p = 0,0195
Pic sans TM (nM)	81,5 (23-173,2)	183,1 (134,7 – 219,3)	136,1 (78,1 – 215,4)	134,9 (64,6 – 208,8)	142,1 (91,2 – 190,1)	129,9 (53,2 – 236,2)	132,9 (106,2 – 192,2)	p < 0,0001	p = 0,0371
Pic avec TM (nM)	84 (24,7 – 168)	187,0 (145,9 – 234)	139,6 (78,5 – 225,6)	142,5 (75,3 – 201,9)	151,2 (73,5 – 200,8)	130,0 (47,8 – 243,4)	149,3 (76 – 211,7)	p < 0,0001	p = 0,0371
Vélocité sans TM	21 (3,8 – 42,7)	62,5 (29 – 78)	31,5 (12 – 52,7)	29 (7,9 – 56,9)	29,8 (18,3 – 67,1)	26,2 (7 – 74,8)	29,8 (20,5 – 66,2)	p < 0,0001	p = 0,0098
Vélocité avec TM	28,9 (6,2 –	62,9 (36,5	34,4 (15,9	35 (12,2	37,8 (17 –	30,8 (9,6 –	35,6 (18,9	p < 0,0001	p = 0,0195

	68,7)	- 89)	- 64,9)	- 58,8)	75,1)	86,4)	- 63,5)		
Time to peak sans TM	9,8 (7,6 – 13)	6,7 (5 – 8,3)	8,1 (6,7 – 11,5)	8,5 (6,4 – 12,3)	8,4 (5,4 – 9,7)	8,7 (7,5 – 11,7)	8,3 (6,4 – 11)	p < 0,0001	p = 0,0137
Time to peak avec TM	9,2 (7 – 12,7)	6,6 (5,3 – 8)	7,7 (6,3 – 9,5)	8,2 (6,3 – 10,3)	7,6 (5,3 – 9,5)	7,7 (7 – 10,4)	7,5 (6,3 – 9,7)	p < 0,0001	p= 0,0093
Temps de latence sans TM (min)	5,3 (3,9 – 8,3)	3,5 (2,6 – 4,0)	3,6 (3,1 – 4,8)	4,0 (3,1 – 4,7)	3,5 (2,6 – 4,5)	4,0 (3,3 – 6,0)	3,7 (2,9 – 6,2)	p < 0,0001	p = 0,0578
Temps de latence avec TM (min)	6 (4,1 – 9)	3,3 (2,6 – 4,0)	3,7 (3,3 – 4,7)	4,0 (3,1 – 4,5)	3,5 (2,6 – 5)	3,9 (3 – 6)	3,7 (2,9 – 5,8)	p < 0,0001	p = 0,0195

Les données sont exprimées en médiane et étendue de mesure. ETP : potentiel endogène de thrombine, TM : thrombomoduline, HSCT : greffe de cellules souches hématopoïétique.

À 3 mois après greffe, le pic et la vélocité diminuent significativement tandis que le temps de latence et le temps d'arrivée au pic augmentent significativement par rapport à la situation pré-greffe, indépendamment de la présence ou de l'absence de TM. Le pic médian, la vélocité et le temps d'arrivée au pic sont retournés à des valeurs du range normal (voir la Figure 25 pour les résultats avec TM). Le temps de latence et le RETP ont augmenté de manière significative à 3 mois post-HSCT par rapport à la situation pré-HSCT. Cependant, leurs valeurs médianes ne sont pas revenues dans les intervalles allant du percentile 2,5 au percentile 97,5 des NC, ce qui indique une récupération partielle (Tableau 6).

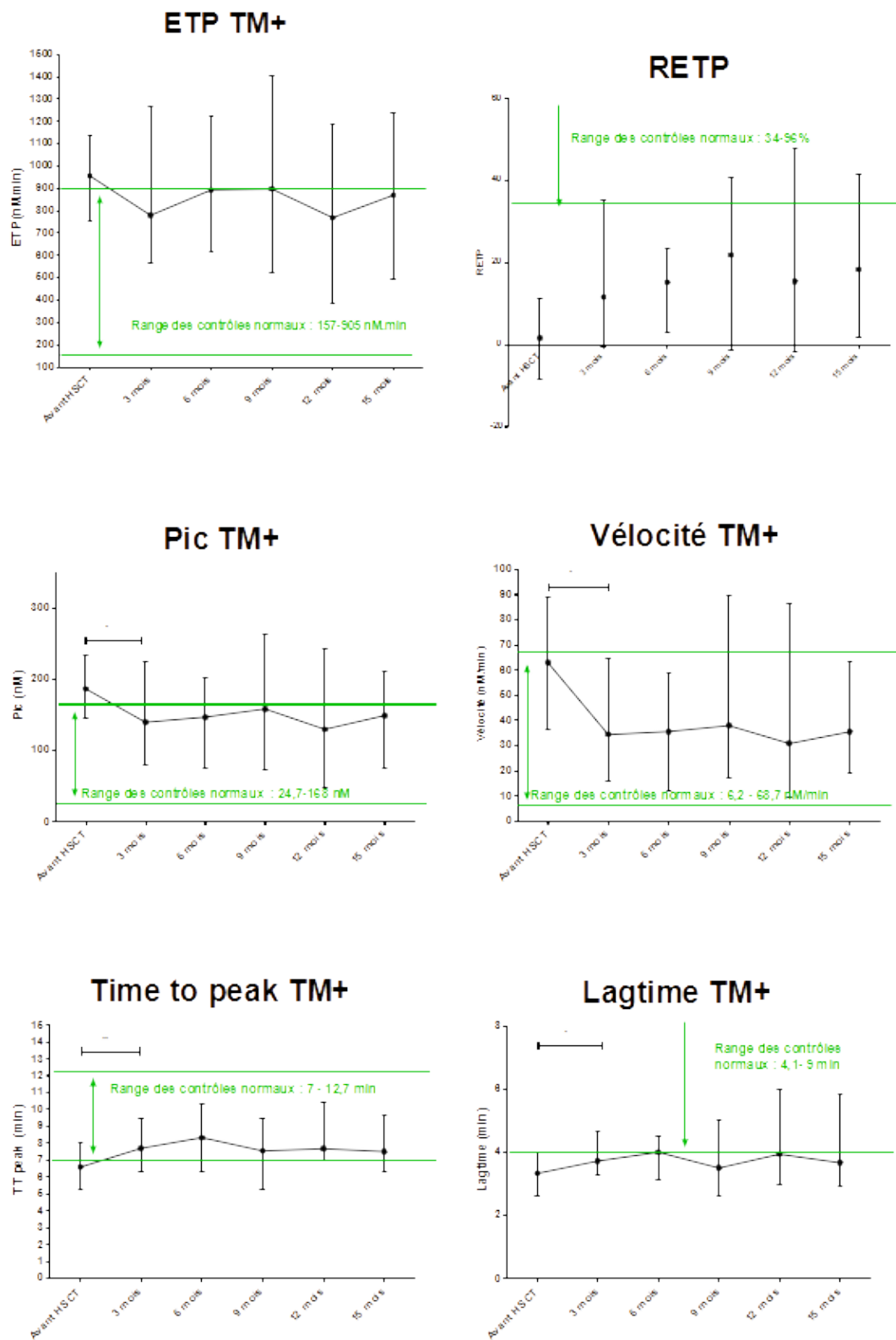


Figure 25 : Modification des paramètres de TGT (médiane et intervalle) avant et après HSCT, en présence de TM

L'intervalle p2,5 – p97,5 des NC est colorée en vert. ETP TM+ : potentiel de thrombine endogène suite à l'ajout de thrombomoduline ; RETP : réduction de l'ETP avec ajout de thrombomoduline ; GCSH : greffe de cellules souches hématopoïétiques ; TM+ : avec ajout de thrombomoduline ; NC : contrôle normal ; * : $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

De trois mois à 15 mois après HSCT, aucun autre changement n'a été observé dans tous les paramètres TGT. La valeur médiane de l'ETP est restée plus élevée que les NC tandis que les valeurs médianes avaient tendance à diminuer. La valeur médiane du RETP, effondrée en situation pré-greffe, est remontée dans les valeurs des NC en situation post-greffe. Les valeurs médianes du temps de latence médian sont restées inférieures à l'intervalle allant du percentile 2,5 au percentile P97,5 des NC. En revanche, les valeurs médianes du pic, du temps d'arrivée au pic et de la vélocité en présence de TM se sont stabilisées dans l'intervalle allant du percentile 2,5 au percentile 97,5 des NC, suggérant une récupération (Tableau 6 et Figure 25, pour les résultats avec TM).

Sinon, aucune différence statistique n'a été observée pour l'âge du patient ou le statut d'hémoglobinopathie du donneur (données non présentées mais toutes les valeurs de p étaient supérieures à 0,05).

4.2.4 Évolution de l'hémoglobine, de l'HbS et des LDH

Les valeurs médianes d'Hb, HbS et LDH sont résumées dans le Tableau 5 et dans la Figure 26. Elles se modifient significativement après greffe. Comparée aux valeurs antérieures à la greffe, à 6 mois, l'Hb passe de 8,3 g/dL (étendue de mesure de 7,2 à 11,4) à 11,7 g/dL (étendue de mesure de 10,5 à 14,5) ($p < 0,01$). L'HbS et les LDH ont diminué de 70% (étendue de mesure de 26 à 88) à 32% (étendue de mesure de 0 à 40) ($p < 0,001$) et de 466 UI/L (étendue de mesure de 256 à 823) à 243 UI/L (étendue de mesure de 185 à 488) ($p < 0,01$), respectivement. À 15 mois après HSCT, les résultats sont similaires à ceux après 6 mois. Les taux d'Hb et de LDH se sont pratiquement normalisés.

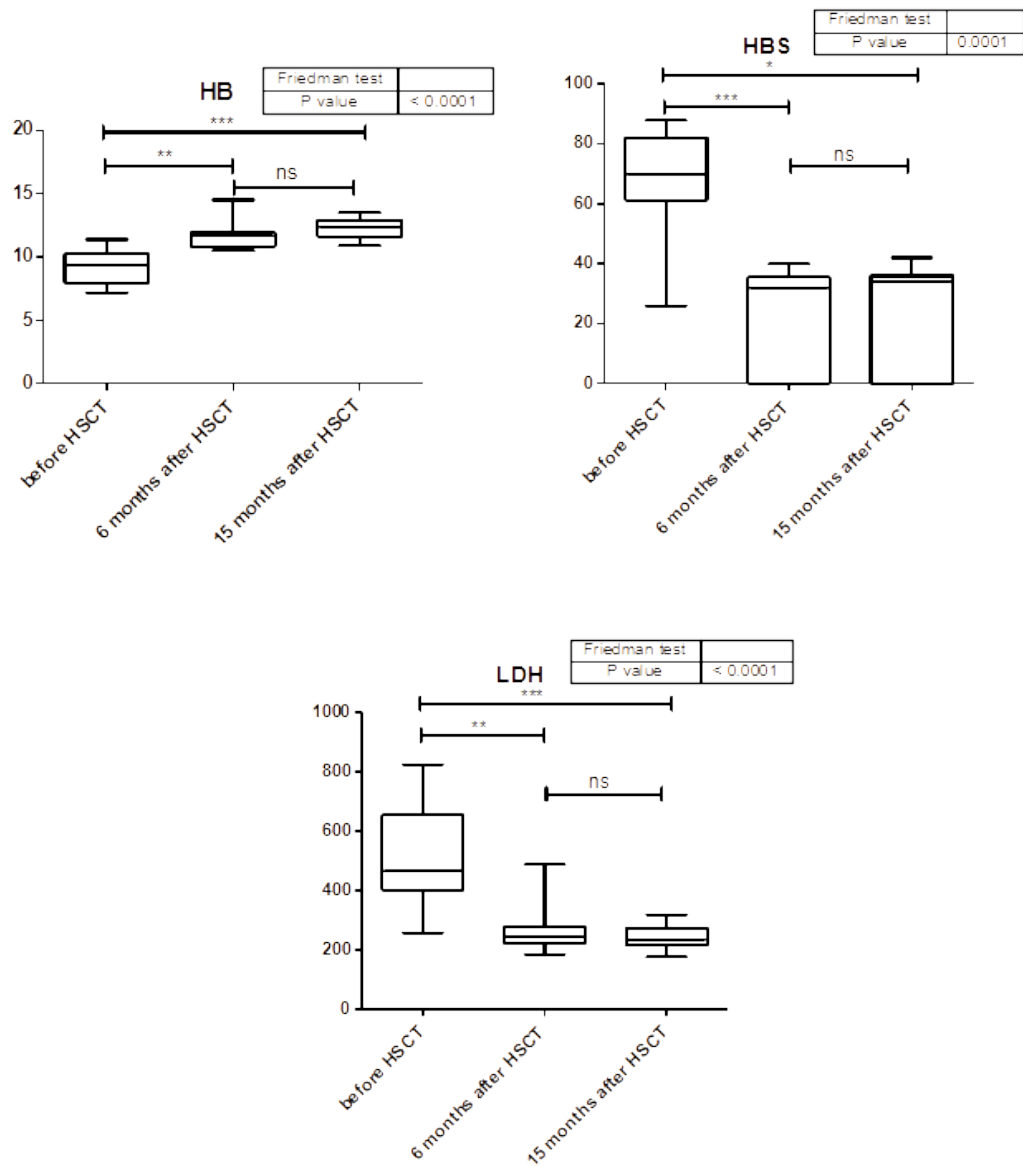


Figure 26 : Évolution de l'hémoglobine, de l'hémoglobine S et des LDH

L'hémoglobine augmente après la greffe (à gauche). L'hémoglobine S et les LDH diminuent après la greffe (milieu et droite). Ces modifications sont déjà observées à 6 mois après la greffe et se maintiennent après 15 mois.

La cohorte de patients comprend 3 patients en programme d'échange transfusionnel. Les résultats d'Hb, HbS et LDH restent identiques si on retire de l'analyse ces trois patients.

4.2.5 Discussion

Il s'agit d'une première étude portant sur les modifications de la coagulation suite à la HSCT. Comme attendu, les patients SCD dans cette étude présentaient un état hypercoagulable par rapport aux NC avant HSCT. Cet état hypercoagulable est caractérisé par un temps plus rapide pour générer de la thrombine (le temps de latence et le temps pour atteindre le pic sont plus courts chez les SCD que les NC), un taux de production de thrombine plus rapide (la vélocité est plus élevée chez les SCD que les NC), une concentration et une capacité à générer de la thrombine plus élevées (le pic et l'ETP sont plus élevés chez les SCD que les NC). La coagulation globale altérée chez les patients atteints de SCD avant HSCT avait été précédemment mise en évidence par notre équipe dans une cohorte limitée¹⁸⁸ et par Gerotziakas et al.¹²¹. Plusieurs facteurs synergiques ont été suggérés pour expliquer l'augmentation du potentiel hémostatique chez les patients atteints de drépanocytose. La diminution des niveaux de protéine C et de protéine S a été rapportée chez ces patients^{188,189,190,191,192,193}. La protéine C et la protéine S sont des déterminants connus du TGT¹⁹⁴ et une diminution des niveaux de ces protéines induit une résistance à la thrombomoduline¹⁹⁵. De plus, des taux élevés de FVIII chez ces patients sont inversement corrélés avec le RETP et peuvent contribuer à une certaine résistance à la protéine C activée¹⁷⁸.

Des taux circulants de microvésicules procoagulantes dérivées des cellules sanguines et endothéliales ont également été signalés chez des patients atteints de drépanocytose^{196,197,198,199}. Certaines de ces microvésicules, en particulier celles libérées par les monocytes activés ou les cellules endothéliales, expriment le facteur tissulaire, ce qui peut contribuer à raccourcir le temps de latence et le temps d'arrivée au pic chez ces patients¹⁹⁷. Les microvésicules procoagulantes exposent également la phosphatidylsérine, un phospholipide procoagulant qui fournit la surface pour l'assemblage des complexes de coagulation. Nous avons précédemment montré que l'augmentation de l'activité procoagulante des microvésicules portant des phospholipides, dans le plasma des patients atteints de SCD, contribue à l'accélération de la vitesse et à un pic élevé de TGT²⁰⁰.

Ces résultats ont été observés en présence et en l'absence de TM. Comme déjà rapporté plus haut, cette protéine endothéliale sensibilise le TGT au système

anticoagulant protéine C/protéine S et permet donc d'explorer plus globalement la balance hémostatique. Nous avons observé un RETP très bas avant la greffe, compatible avec le profil prothrombotique et résultant d'un défaut du système protéine C/protéine S.

De plus, l'altération observée avant HSCT semble être liée à un phénotype hémolytique : une corrélation a été rapportée précédemment entre les marqueurs d'hémolyse et les paramètres de TGT chez les enfants drépanocytaires²⁰⁰.

Les résultats montrent une tendance nette à la résolution de l'état hypercoagulable chez les patients SCD greffés avec succès et cela dès 3 mois après la greffe et de manière soutenue jusqu'au suivi réalisé à 15 mois post-greffe. Le remplacement des drépanocytes par des GR normaux diminue les microvésicules circulantes responsables de la phase de propagation du TGT chez les patients SCD²⁰⁰. La correction de l'anémie et la diminution de l'HbS et des LDH témoignent de la guérison clinique des patients.

Certains paramètres (le temps de latence, l'ETP et le RETP) s'améliorent mais ne retournent pas dans les intervalles normaux. L'amélioration du RETP est compatible avec une récupération partielle du système anticoagulant protéine C/protéine S²⁰¹.

Cette correction partielle n'est pas totalement élucidée. L'étude a porté sur une population pédiatrique et nous n'avons pas eu assez de volume d'échantillons pour explorer plus en détails d'autres paramètres. Néanmoins l'état inflammatoire des patients décrit dans les premières semaines après une HSCT peut mener à une élévation du FVIII et de FT circulant, acteurs contribuant à un temps de latence court, un ETP élevé et un RETP diminué.

Quelques limitations dans cette étude sont à mentionner. Tout d'abord, elle n'a concerné que des enfants, la greffe dans ce cadre étant plus rarement réalisée chez les patients adultes. L'impact de la transplantation sur le système hémostatique des adultes SCD pourrait être différent. La deuxième limitation est la sélection de la population de NC qui n'était pas ethniquement identique car elle incluait essentiellement des enfants d'origine caucasienne. Or les Africains sub-sahariens souffrent d'une incidence d'ET plus élevée^{202,203}. Roberts et al. rapportent chez les adultes Africains un profil TGT plus élevé que chez les Caucasiens, avec un pic,

l'ETP et une vitesse plus élevées²⁰⁴. Enfin, cette étude est monocentrique et ne concerne qu'une petite cohorte de patients ayant bénéficié d'une HSCT appariée avec conditionnement myélo-ablatif et chimérisme complet. Ces résultats ne peuvent être extrapolés aux patients avec chimérisme incomplet ou aux greffes haploidentiques.

Pour résumer, une HSCT réussie inverse les réactions de coagulation accélérées chez les enfants atteints de SCD. Aucun ET n'a été enregistré chez les patients étudiés.

4.2.6 Conclusion intermédiaire

Cette deuxième étude a permis de confirmer que le test de génération de thrombine permet de caractériser le statut hémostatique de patients drépanocytaires sévères soumis à une greffe de cellules souches hématopoïétiques en mettant en évidence une amélioration de leur balance hémostatique suite à ce traitement curatif dont ils ont pu bénéficier. Une évaluation des patients après un recul de quelques années, à distance de la toxicité du conditionnement et des traitements immunosuppresseurs, permettrait de vérifier si une amélioration plus complète de la balance hémostatique est mise en évidence.

4.3 Utilisation d'un test de viscoélasticité (ROTEM) en chirurgie cardiaque et plus précisément pédiatrique pour déterminer la dose minimale d'acide tranexamique nécessaire pour inhiber la fibrinolyse

4.3.1 Données démographiques

Les données démographiques sont reprises dans le Tableau 7.

Des taux de plaquettes plus élevés sont observés chez les enfants par rapport aux adultes sains et aucune différence statistiquement significative n'a été rapportée pour l'Hb, l'hématocrite, le PT, l'aPTT et le fibrinogène.

Aucune différence statistiquement significative n'a été rapportée pour l'âge entre les enfants avec pathologie cardiaque cyanogène ou non-cyanogène. Comme attendu, les patients avec pathologie cyanogène ont un taux plus élevé d'Hb et d'hématocrite.

Tableau 7 : Données cliniques et démographiques des adultes et enfants

Variables	Adultes (n = 10)	Enfants (n = 20)	p-value
Poids (kg)	Non mesuré	15 (11 – 19)	
Taille (m)	Non mesurée	0,965 (0,69 – 1,15)	
Homme – femme	5-5	11 – 9	
ASA 2 (%)	NA	10 (50%)	
ASA 3 (%)	NA	10 (50%)	
Communication interauriculaire	NA	4 (20%)	
Connexion cavo-pulmonaire bidirectionnelle	NA	4 (20%)	
Dilatation d'une sténose pulmonaire	NA	2 (10%)	
Sténose aortique	NA	2 (10%)	
Persistance du canal artériel	NA	2 (10%)	

Autre pathologie cardiaque	NA	4 (20%)	
Hémoglobine (g/dL)		13,2 (12,8 – 14,6)	0,9797
	Cyanogène	15,2 (14,1 – 18,3)	0,0013 **
	Non cyanogène	12,4 (11,6 – 13,1)	
Taux de plaquettes (x 10 ⁹ /L)	236 (188 – 261)	337 (318 – 425)	0,0002 ***
Fibrinogène (g/L)	3,11 (2,79 – 3,64)	3,31 (2,77 – 3,52)	1
PT (%)	85 (80,8 – 93)	95 (85-100)	0,0578
PT (INR)	1,09 (1,03 – 1,12)	1,03 (1 – 1,1)	0,1278
aPTT (s)	31,8 (30,5 – 33,7)	31,1 (29,9 – 32,7)	0,5525

aPTT, temps de prothrombine partiel activé ; ASA, Société américaine d'anesthésiologie ; NA, sans objet ; PDA, persistance du canal artériel ; PT, temps de prothrombine ; ** : valeur de p 0,001 à 0,01 ; *** : valeur p < 0,001.

4.3.2 Profil des courbes du ROTEM à différentes concentrations de TXA

À l'état de base, avant addition de t-PA et de TXA, les paramètres du ROTEM et la courbe sont normaux (Figure 27 a). L'addition de 1535 U t-PA/mL est associée à une hyperfibrinolyse massive, caractérisée par l'absence de formation de caillot (Figure 27 b). Après addition de concentrations croissantes de TXA, les paramètres du ROTEM et les courbes retournent aux valeurs de base (Figure 27 c à l).

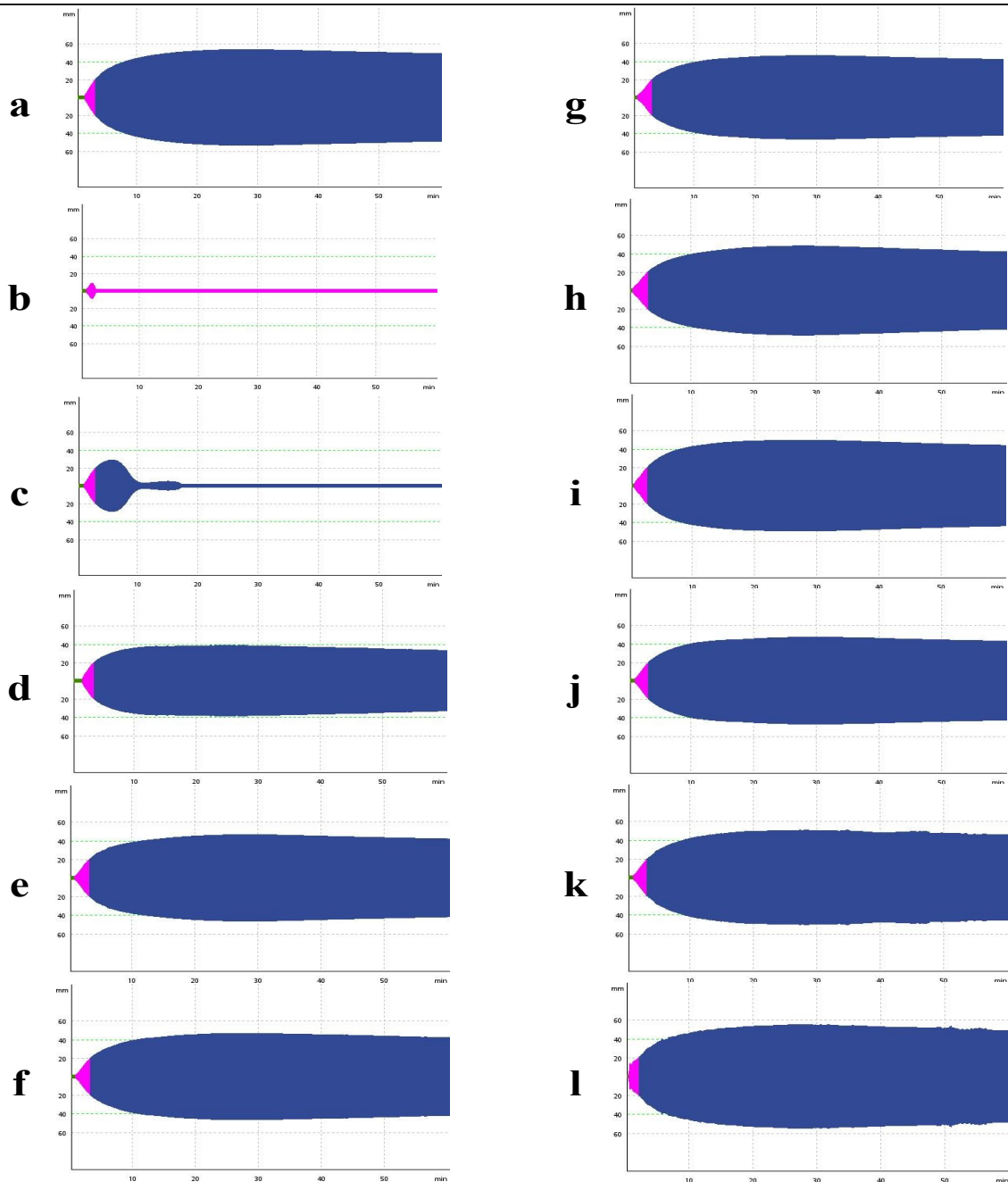


Figure 27 : Courbes obtenues avec le réactif EXTEM et l'ajout de t-PA et de TXA

En l'absence de t-PA et de TXA (a), on observe une courbe classique de test viscoélastique. Après ajout uniquement de t-PA (b), on observe une absence de caillot formé suite à une hyperfibrinolyse. Après ajout de t-PA et de concentrations croissantes de TXA 2,5 (c), 5 (d), 7,5 (e), 10 (f), 12,5 (g), 15 (h), 17,5 (i), 20 (j), 50 (k) et 100 $\mu\text{g/mL}$ (l), on observe que la courbe se normalise, le TXA limitant les effets de la fibrinolyse induite par l'ajout de t-PA.

4.3.3 Concentration effective en TXA inhibant une fibrinolyse maximale

La Figure 28 et le Tableau 8 illustrent la relation entre l'amplitude du caillot formé et la lyse du caillot après 30 minutes (A30 et LI30), exprimée comme un pourcentage par rapport à la situation basale, et les concentrations croissantes de TXA.

L'addition de TXA renverse la situation de fibrinolyse induite par le t-PA chez les adultes et les enfants.

Tableau 8 : Lyse et amplitude après 30 minutes (Médiane et range)

TXA (µg/mL)	LI30 adultes	LI30 cyanogènes	LI30 non cyanogènes	A30 adultes	A30 cyanogènes	A30 non cyanogènes
0	2 (0-28)	1,5 (0-23)	1,5 (0-14)	0 (0-5)	0 (0-5)	0 (0-5)
2,5	1,5 (0-5)	90 (1-100)	42,5 (0-100)	0,5 (0-2)	55,5 (0-99)	29 (0-96)
5	9,5 (0-48)	99 (91-100)	99,5 (81-103)	6 (0-34)	90 (72-97)	84 (56-97)
7,5	80,5 (2-93)	100 (98-100)	100 (94-101)	58 (0-78)	92 (87-100)	89,5 (77-94)
10	95 (43-101)	100 (100-100)	99 (86-101)	77,5 (25-91)	91 (82-100)	88 (73-94)
12,5	100 (100-100)	100n(99-100)	99 (90-101)	85 (85-85)	93 (87-98)	89 (79-94)
15	99,5 (81-101)	100 (99-100)	99 (87-103)	84,5 (52-92)	91 (88-97)	90 (75-98)
17,5	100 (98-101)	100 98-100)	99 (90-101)	85,5 (73-94)	93 (86-97)	91,5 (84-97)
20	100 (99-100)	100 (99-100)	99 (91-100)	90 (80-92)	92,5 (89-95)	89,5 (77-97)
50	100 (98-100)	100 (99-100)	99,5 (79-101)	91,5 (87-97)	94,5 (94-97)	95 (70-102)
100	100 (98-101)	100 (100-101)	100 (97-101)	93 (84-97)	99,5 (84-105)	95 (91-105)

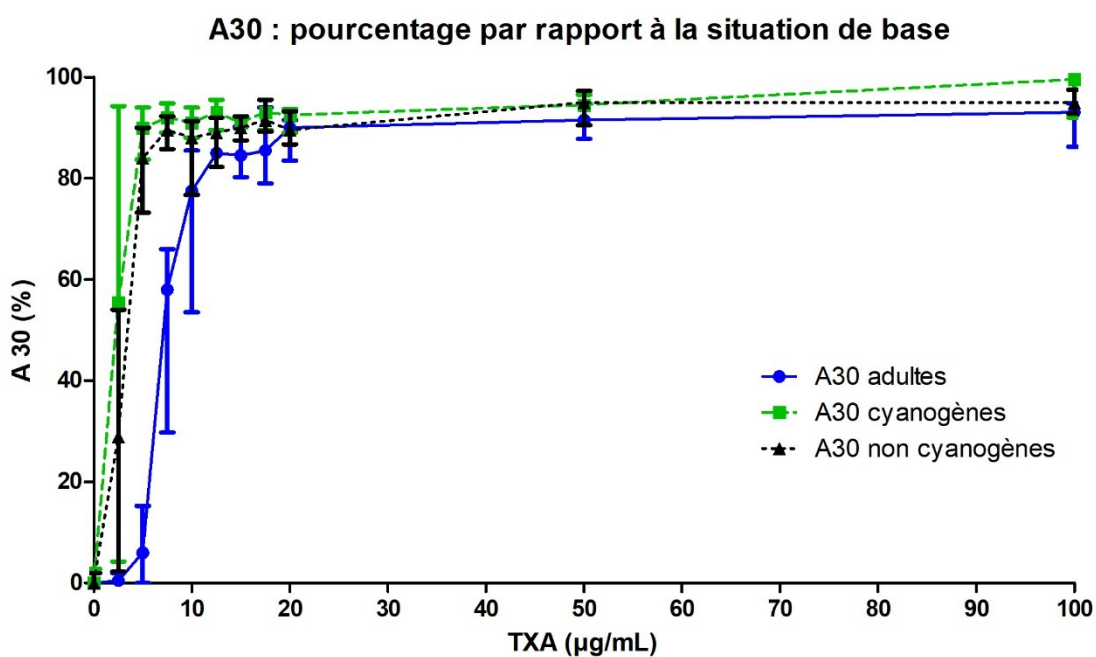
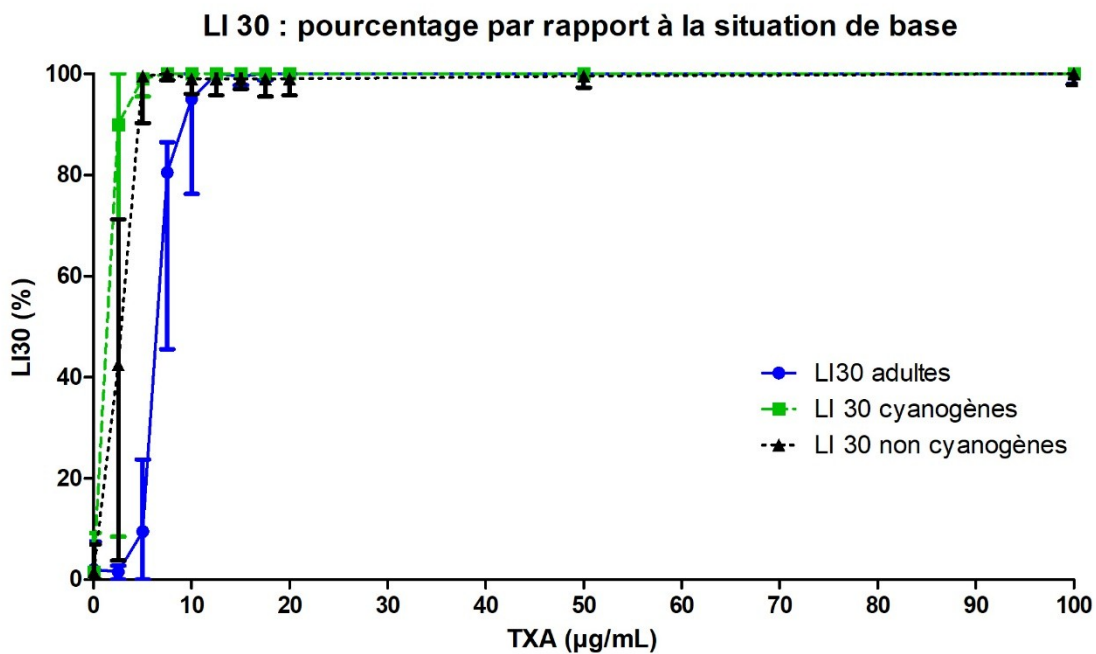


Figure 28 : Index de lyse et amplitude en fonction des doses d'acide tranexamique

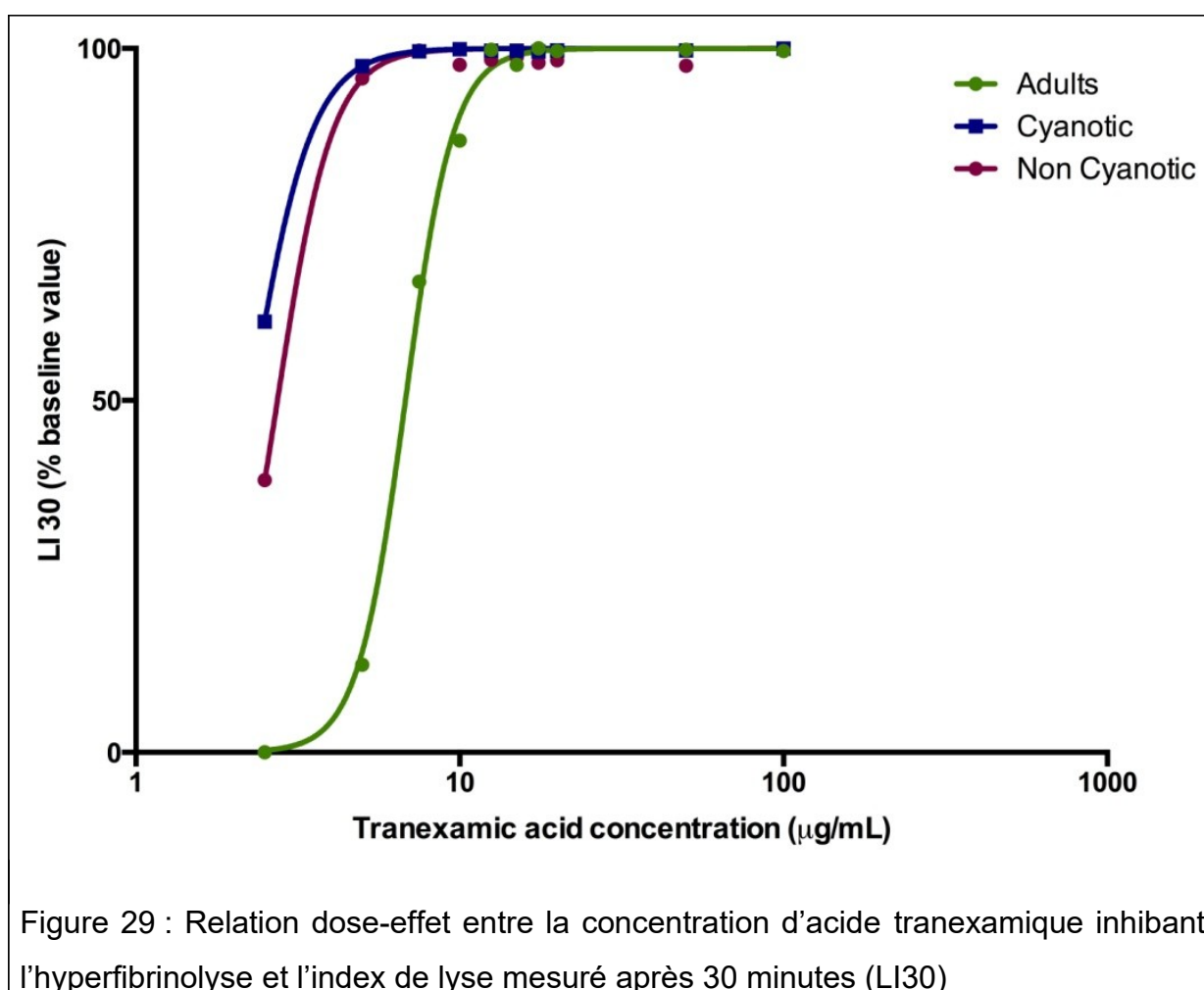
Les courbes reprennent l'index de lyse après 30 minutes (LI30) et l'amplitude après 30 minutes (A30) observés chez les adultes sains et les enfants avec pathologies cardiaques cyanogènes et non cyanogènes en fonction des doses de TXA. On observe que les courbes chez les enfants sont superposables, par contre la courbe chez les adultes est décalée vers la droite, indiquant une concentration de TXA plus importante nécessaire pour inhiber l'état d'hyperfibrinolyse.

Les barres d'erreur représentent la médiane et l'étendue des mesures des patients.

Les valeurs sont exprimées en pourcentage par rapport à la situation de base, sans ajout ni de t-PA ni de TXA.

4.3.4 L'effet de l'acide tranexamique sur la lyse du caillot

Suite à la mise à l'échelle logarithmique de la concentration en acide tranexamique, l'effet sur la lyse du caillot après 30 minutes est reprise à la Figure 29.



L'effet des concentrations de TXA a permis la détermination de l'ED50 et le calcul de l'ED95 pour le paramètre LI30. Pour les adultes, la ED50 était de 6,8 µg/mL (IC à 95% : 6,4 – 7,2 µg/mL) et la ED95 était de 11,3 µg/mL (IC à 95% : 10,6 – 12,9 µg/mL). Pour les enfants atteints de cardiopathie congénitale, la ED50 était de 2,8 µg/mL (IC à 95% : 2,6 – 3 µg/mL) et la ED95 : 8,6 µg/mL (IC à 95% : 6,9 – 14,9 µg/mL). Les valeurs de ED95 chez les enfants et les adultes étaient significativement différentes ($p < 0,001$) : une concentration de TXA de 31% plus élevée était nécessaire pour inhiber la fibrinolyse induite par le t-PA chez les adultes, par rapport aux enfants atteints de cardiopathie congénitale. Aucune différence statistique n'a été observée entre les enfants atteints d'une maladie cyanogène ou non cyanogène ($p = 0,179$).

4.3.5 Discussion

Dans cette étude *in vitro*, nous avons observé que la concentration minimale de TXA qui inhibait 95% de l'hyperfibrinolyse induite par le t-PA chez les enfants atteints d'une maladie cardiaque congénitale était de 8,6 µg/mL, ce qui était significativement inférieur à la concentration requise chez des volontaires adultes en bonne santé.

Les agents antifibrinolytiques sont utilisés depuis longtemps chez les adultes et les enfants subissant une chirurgie cardiaque. L'administration prophylactique de TXA réduit considérablement les saignements peropératoires et le recours aux transfusions de produits sanguins. Une énorme variabilité entre les doses utilisées dans différentes études a été rapportée : avec des doses de charge et/ou des bolus répétés allant de 10 à 100 mg/kg, suivis ou non de différents débits de perfusion continue²⁰⁵.

Cette énorme différence pourrait être facilement expliquée par le fait que, jusqu'à récemment, les caractéristiques pharmacocinétiques du TXA n'étaient pas bien connues chez les enfants. Jusque-là, le schéma de dose de TXA a été arbitrairement extrapolé de la littérature adulte. Des études ayant signalé une incidence accrue et dose-dépendante de crises épileptiques chez les adultes^{206,149} et les enfants²⁰⁷ subissant des chirurgies à cœur ouvert, il est nécessaire de poursuivre les études pour déterminer la dose de TXA « optimale » offrant le meilleur rapport

bénéfice/risque entre la réduction des saignements et l'incidence des effets secondaires.

Bien que les propriétés pharmacocinétiques du TXA aient été précisées chez des enfants subissant une chirurgie cardiaque^{150,151} la concentration plasmatique « optimale » qui devrait être ciblée pour inhiber au maximum la fibrinolyse n'est pas connue. D'après les premières études publiées par Anderson et al. à la fin des années 1970²⁰⁸, une concentration de TXA de 100 µg/mL est nécessaire pour atteindre 100% d'inhibition de l'activité fibrinolytique, tandis qu'une concentration de TXA de 10-20 µg/mL est nécessaire pour atteindre 80% d'inhibition du t-PA. Dans une autre étude, Dowd¹⁴⁷ a suggéré qu'une concentration plasmatique de TXA supérieure à 50 µg/mL soit maintenue pour les adultes subissant une chirurgie cardiaque. Cependant, aucune de ces études n'a évalué la concentration plasmatique nécessaire pour inhiber complètement la fibrinolyse chez les enfants subissant une chirurgie cardiaque.

Récemment, ces concentrations minimales de TXA nécessaires pour inhiber la fibrinolyse activée par le t-PA ont été déterminées sur des plasmas « poolés » de nouveau-nés et d'adultes par thromboélastographie²⁰⁹. Dans cette étude, Yee et al. ont observé qu'une concentration plus élevée de TXA était nécessaire pour prévenir la fibrinolyse dans le plasma adulte (17,5 µg/mL) par rapport au sang de cordon néonatal (6,54 µg/mL). Bien que nous ayons observé la même différence entre les adultes et les enfants, nos résultats ne peuvent être comparés à ces résultats car notre modèle *in vitro* a été réalisé sur du sang total, incluant ainsi les composants cellulaires (plaquettes, globules rouges), et s'est concentré sur des échantillons individuels obtenus d'enfants atteints de cardiopathie congénitale ou d'adultes volontaires en bonne santé et non sur des plasmas regroupés provenant du sang de cordon de nouveau-nés en bonne santé. Il convient de noter que l'utilisation de plasma mis en commun a exclu l'influence des composants cellulaires du sang total, en particulier les globules rouges et les plaquettes.

Cette étude présente certaines limitations. Premièrement, la concentration optimale de TXA obtenue dans notre modèle *in vitro* doit être interprétée avec prudence, et son efficacité pour inhiber l'activation de la fibrinolyse *in vivo* doit être validée chez une plus grande cohorte d'enfants subissant une chirurgie cardiaque. De plus,

comme les tests viscoélastiques sont peu sensibles à la fibrinolyse²¹⁰, nous utilisons un modèle *in vitro* d'hyperfibrinolyse en ajoutant un taux élevé de t-PA pour sensibiliser le ROTEM à la neutralisation par du TXA. Deuxièmement, ce modèle *in vitro* ne prend pas en compte la phase vasculaire et les modifications physiologiques spécifiques dues aux traumatismes chirurgicaux, à l'hypothermie et au contact entre le sang et la surface non-endothéliale qui pourraient tous conduire à l'activation de la fibrinolyse. Les différences que nous avons constatées entre adultes et enfants peuvent également s'expliquer par l'augmentation du potentiel hémostatique survenant avec l'âge²¹¹. Bien que la numération plaquettaire, l'hémoglobine, le fibrinogène, le PT et l'aPTT étaient normaux avant la chirurgie, la numération plaquettaire était significativement plus élevée dans la cohorte d'enfants. Cette différence a déjà été observée²¹². Cependant ce taux plus élevé de plaquettes ne contribue pas à un profil ROTEM plus élevé en situation de base car aucune différence significative n'a été trouvée concernant les paramètres de lyse et de fermeté du caillot. De plus, la génération de plasmine et l'activité fibrinolytique sont diminuées pendant l'enfance par rapport aux adultes, en situation normale, en raison d'un taux plus faible de t-PA et de plasminogène et d'un taux plus élevé de PAI-1^{213,214}. Par conséquent, la dose plus élevée de TXA nécessaire chez l'adulte pour neutraliser la fibrinolyse du t-PA peut refléter un niveau de fibrinolyse basale plus élevé. Néanmoins, le fait que nous ayons utilisé une dose très élevée de t-PA pour induire la fibrinolyse a pu minimiser la différence entre les enfants et les adultes. Cependant lors de la chirurgie cardiaque, et notamment lors du pontage cardio-pulmonaire (PCP), la situation est différente : l'endothélium est lésé avec un contact prolongé avec la surface artificielle ; les patients sont sous héparine continue et en hypothermie. La fibrinolyse est alors activée suite à la libération de t-PA des parois vasculaires. La comparaison entre les adultes et les enfants est plus difficile car aucune étude ne compare les adultes et les enfants subissant un PCP. Chez l'adulte, le t-PA, les D-dimères, le complexe t-PA-PAI-1 augmentent et le PAI-1 diminue^{215,216,217}. Chez l'enfant, Eisses et al. ont montré de la génération de thrombine et de la dégradation de la fibrine pendant la PCP²¹⁸. Le t-PA augmentait pendant le PCP mais à un moindre degré chez les nourrissons. Chez les enfants de moins de 6 ans, Ignjatovic et al. n'ont observé aucun changement dans la génération de plasmine, même si le plasminogène, le PAI-1 et le fibrinogène ont diminué²¹⁹. De

plus, le profil hémostatique chez les nouveau-nés est plus prothrombotique que chez les enfants plus âgés²²⁰, et l'augmentation du t-PA est plus faible²¹⁸.

En conclusion, cette étude *in vitro* a confirmé que notre modèle expérimental de fibrinolyse induite par le t-PA pouvait être utilisé pour déterminer la concentration « optimale » de TXA nécessaire pour inhiber la fibrinolyse chez les enfants subissant une chirurgie cardiaque. La concentration minimale de TXA qui inhibait complètement l'hyperfibrinolyse induite par le t-PA était significativement plus faible chez les enfants atteints de cardiopathie congénitale que chez les adultes volontaires sains. La concentration minimale efficace de TXA mise en évidence était plus basse que les valeurs des cibles identifiées dans les rares études de pharmacocinétiques, qui sont supérieures à 20 µg/mL^{150,151}.

Comme les tests de laboratoire évaluant la fibrinolyse restent longs et mal standardisés, ce modèle *in vitro* pourrait être un outil prometteur pour analyser et surveiller les patients recevant du TXA. D'autres études sont nécessaires pour confirmer que cette concentration cible inhibe efficacement la fibrinolyse chez les enfants subissant une chirurgie cardiaque avec bypass cardio-pulmonaire, en accordant une attention particulière aux nouveau-nés.

4.3.6 Conclusion intermédiaire

Cette troisième partie illustre l'utilité d'un test viscoélastique modifié pour l'exploration de la fibrinolyse et l'amélioration possible, grâce à ce test, de la prise en charge avec de l'acide tranexamique de patients subissant une chirurgie cardiaque et donc un gros challenge chirurgical.

5 Conclusion et perspectives

Grâce aux tests globaux de génération de thrombine et de viscoélasticité, nos travaux ont permis d'investiguer de manière approfondie le profil hémostatique de trois populations de patients présentant des pathologies différentes. En effet, comme décrit amplement précédemment, la technique de génération de thrombine nous a permis de démontrer l'interaction complexe entre les corticostéroïdes et l'asparaginase sur l'entièreté du processus hémostatique chez les enfants en traitement d'induction de leucémie aiguë lymphoblastique. Appliquée à l'étude de l'hypercoagulabilité aux patients drépanocytaires, nous avons pu démontrer un retour vers la normalité après greffe de moelle osseuse. Enfin, l'emploi d'un test de viscoélasticité, nous a permis de déterminer la dose efficace d'acide tranexamique chez des enfants devant subir une chirurgie cardiaque. Ces mêmes explorations réalisées à l'aide des tests diagnostiques de laboratoire courants ne nous auraient pas permis de définir ou de prédire le risque individuel de thrombose ou de saignement des patients recrutés dans les différentes études ni d'explorer l'impact des mécanismes sous-jacents. Les limites des tests diagnostiques actuellement disponibles pour appréhender la complexité des situations cliniques et prendre les décisions cliniques adéquates sont par ailleurs décrites dans chaque étude. Brièvement, ces tests traditionnels (PT, aPTT), toujours d'application dans les laboratoires, sont bien adaptés au suivi des traitements anticoagulants anti-vitamine K et héparine classique. Ils permettent la mise en évidence et le suivi des déficiences en facteurs procoagulants et pourtant dans les pathologies hémorragiques, ils sont également imparfaits, car ils ne reflètent pas la complexité de la situation clinique. Ainsi, ils ne sont pas prédictifs du risque hémorragique (déficience en FXI par exemple), de même qu'ils ne constituent pas un bon outil dans le suivi du traitement de l'hémorragie^{221,222}. Comme évoqué à plusieurs reprises, ils ne sont pas adaptés pour le suivi des déficits en anticoagulants physiologiques, pour la détection d'état hypercoagulable, et de ce fait, ne permettent pas une évaluation globale de la coagulation⁸⁴. Ils sont déclenchés *in vitro* suite à l'ajout au plasma de taux élevés, par ailleurs non physiologiques, d'activateurs de la coagulation. Ils ne témoignent que de la phase d'initiation de la formation de thrombine, sans investiguer les phases consécutives d'amplification et de neutralisation de celle-ci, contrairement aux tests globaux. Ces tests cliniques basés sur la formation de caillots sont conçus pour être

rapides et détecter certains déficits protéiques dans les voies d'activation de la coagulation. L'impact de légères variations dans la concentration de facteurs de coagulation procoagulants ou anticoagulants peut être étudié par des tests globaux permettant d'inférer l'état hémostatique d'un individu.

Parmi ces tests, le TGT est un test intrinsèquement flexible dans sa conception, ce qui est à la fois une limite et une force de cet essai. Sa faiblesse est son manque de standardisation ce qui limite son utilisation en routine. Ce manque de standardisation porte à la fois sur les différentes approches préanalytiques, sur la variété et les concentrations des réactifs employés suite à la large gamme des protocoles décrits, tant dans leur conception que dans l'interprétation des résultats obtenus. Les progrès principaux réalisés jusqu'à présent porte notamment sur l'automatisation et vers plus de standardisation, si on se réfère à la méthode initiale décrite par Hemker. Les tests automatisés ou semi-automatisés actuellement disponibles sur le marché sont le Technothrombin TGA kit de Technoclone et la méthode Calibrated Automated Thrombogram (CAT-méthode semi-automatisée) et STGenesia de Stago Diagnostica (méthode entièrement automatisée)^{223,224}.

La technique séduit, et afin de progresser vers plus de standardisation, la société internationale de thrombose et d'hémostase (ISTH) a réalisé une enquête actuellement publiée sur les différents protocoles de TGT utilisés à de nos jours dans les laboratoires²²⁵. La méthode la plus utilisée dans les différents laboratoires ayant répondu au questionnaire d'enquête est la méthode utilisée dans ce travail (CAT). Cependant des différences importantes sont mises en évidence sur les aspects pratiques entre laboratoires telles que le type d'aiguille de prélèvement, le type de tube de prélèvement, le protocole de centrifugation, la conservation des échantillons, leur décongélation, les réactifs utilisés, les dilutions d'échantillons, la calibration, les ranges de référence utilisés, la normalisation des résultats. L'enquête révèle que la cause majeure de variabilité porte sur la phase préanalytique²²⁶. Cette étude, comme d'autres auparavant^{227,228,229,226}, souligne aussi le réel besoin de standardisation dans le rendu des résultats sous forme normalisée afin d'obtenir des résultats comparables entre laboratoires. Le but final étant d'intégrer ce test en clinique⁸⁵. Le choix d'un plasma de référence servant à la normalisation des résultats permet de réduire la variabilité inter-laboratoire²²⁶. Ceci a déjà été démontré, par exemple, pour

l'expression de l'aPTT sous forme de ratio. Cependant les plasmas de référence commerciaux doivent être choisis avec soin et la variabilité inter-lot doit être prise en compte²³⁰. De plus, ils peuvent présenter une nature hypercoagulable inhérente à leur préparation. Afin de minimiser cet impact, un facteur de correction peut être calculé lors de chaque changement de lot et appliqué aux résultats.

Les conséquences du manque actuel de standardisation impliquent l'établissement de normes dans chaque centre, en fonction du protocole préanalytique et analytique utilisé, avec une attention particulière pour la population pédiatrique, qui comporte des aspects bien particuliers. En effet, le système hémostatique évolue progressivement de la vie fœtale jusqu'à l'âge adulte. La modification des paramètres hémostatiques se manifeste au cours des premières années de vie, son étude est décrite sous le nom de « hémostase développementale »^{231,211}. Ainsi, les facteurs procoagulants (sauf fibrinogène, FV et FVIII) mais aussi anticoagulants sont plus bas chez les nouveau-nés et les jeunes enfants^{232,233}. L'antithrombine est diminuée de moitié à la naissance et n'atteint des taux « adultes » que vers 3-6 mois. La protéine C est de 30-40% et se normalise vers l'âge de 1 an. La protéine S atteint des taux adultes entre 6 mois et 1 an. L'a2M constitue le principal anticoagulant physiologique chez l'enfant, avec des taux bien supérieurs par rapport à l'adulte²³⁴. Le taux bas de ces facteurs pro- et anticoagulants s'explique par une immaturité hépatique, par le faible passage trans-placentaire de la vitamine K, par l'absence de flore intestinale endogène à la naissance et par la faible teneur en vitamine K dans le lait maternel^{235,236}. Le TGT chez les enfants, sans TM, montre un ETP diminué par rapport aux adultes, probablement suite à une réduction de la conversion de la prothrombine²³⁷ : des taux plus faibles de prothrombine, de FX, FVII diminuent l'activité du complexe prothrombinase. Il est intéressant que la différence observée du TGT entre population pédiatrique et adulte s'estompe en présence de TM, indiquant un équilibre global maintenu suite à la diminution proportionnée entre facteurs procoagulants et anticoagulants²³⁸. Cette observation de balance hémostatique maintenue est aussi observée chez les patients cirrhotiques²³⁹. De ce fait, un risque accru d'événement thrombotique ou hémorragique n'est pas observé chez les enfants entre 1 et 15 ans. À noter que le risque thrombotique est plus élevé en dessous d'un an et au-dessus de 15 ans²⁴⁰, suggérant une fragilité plus élevée de l'équilibre hémostatique suite à des facteurs extérieurs favorisant.

Les désavantages du TGT précédemment décrits sont liés à la grande flexibilité de la technique, mais cette flexibilité comporte aussi des avantages. En effet, elle permet d'adapter la composition des réactifs déclenchants à la situation clinique que l'on veut explorer, ce qui n'est pas possible avec les tests courants. Ainsi, la concentration en facteur tissulaire à employer sera conditionnée par le problème clinique soulevé. Avec un taux très élevé de facteur tissulaire, supérieur à 10 pM, le TGT ne prendra pas en compte les variations des taux de FVIII, FIX et FXI ; entre 2 et 5 pM de facteur tissulaire, il y sera sensible. Ainsi, à taux faible de facteur tissulaire, la sensibilité au FXI est plus importante²⁴¹. La concentration de facteur tissulaire choisie permet donc de sensibiliser le test à l'exploration de différents facteurs et dépendra donc de la situation clinique à explorer. Des taux faibles (1 pM) de facteur tissulaire permettront l'exploration de troubles hémorragiques comme l'hémophilie²⁴², les déficits en FXI²⁴³. Des taux intermédiaires (5 pM) seront utilisés dans les pathologies thrombotiques²⁴⁴, des taux très élevés (20 pM) permettent le suivi des anticoagulants. Dans notre travail d'exploration des thromboses sous asparaginase ou du potentiel hémostatique chez les patients drépanocytaires greffés, le TGT en PPP est déclenché par ajout de 4 µM de phospholipides²⁴⁵ et de 1 pM de facteur tissulaire. Cette concentration a été choisie dans le but de mettre en évidence une tendance prothrombotique dans un contexte possible de tendance hémorragique suite aux effets des traitements reçus par les patients (chimiothérapie-greffe). De la même manière, le TGT en présence et en l'absence de TM explore des facettes différentes : en l'absence de TM, la génération de thrombine est inhibée par l'intervention de l'antithrombine (et a2M) tandis qu'en présence de TM, le TGT est en plus sensibilisé à la voie inhibitrice de la protéine C Protéine S et est donc d'une grande utilité dans l'évaluation d'une pathologie prothrombotique²⁴⁴. Le TGT peut aussi être sensibilisé à l'effet de la protéine S par ajout dans le réactif de la protéine C activée.

L'autre test global utilisé dans ce travail, le ROTEM, est basé sur l'exploration des propriétés viscoélastiques du caillot. Par opposition au TGT qui a été réalisé sur plasma, le ROTEM implique tous les composants sanguins puisqu'il est réalisé sur sang total. Outre leur utilisation en situations hémorragiques graves pour l'épargne des produits sanguins, les tests viscoélastiques peuvent détecter des états hypercoagulables²⁴⁶. Cependant les études réalisées jusqu'à présent n'ont pas pu

démontrer leur utilité dans la prédiction des thromboses ou l'ajustement des traitements anticoagulants. En effet, ils sont peu sensibles aux traitements par anticoagulants oraux directs ou héparine de bas poids moléculaire²⁴⁷. Comme exposé précédemment, cette technique nous a permis d'établir un modèle d'hyperfibrinolyse aboutissant à l'établissement des concentrations optimales d'acide tranexamique à utiliser lors de la chirurgie cardiaque de l'enfant. Un tel modèle d'hyperfibrinolyse n'aurait pas pu être réalisé par le TGT seul, non adapté à l'exploration de la fibrinolyse.

De manière générale, l'exploration de la fibrinolyse aussi est trop peu exploitée en général dans les laboratoires du fait de contraintes importantes sur le plan préanalytique et analytique, son exploration est peu aisée⁷¹. Notre modèle d'hyperfibrinolyse sur le ROTEM avec apport de t-PA est un modèle original et une alternative permettant d'étudier l'action d'agents hypofibrinolytiques.

Des tests mesurant simultanément la génération de plasmine et de thrombine par ajout de FT, de calcium, de phospholipides et de t-PA sont cependant décrits, mais ils sont très expérimentaux. Ils permettent d'étudier la fibrinolyse en parallèle avec la génération de thrombine^{102,103,248}. Une étude récente a exploré le déséquilibre de la coagulation et de la fibrinolyse chez les patients sous Asp native par un test mesurant de manière simultanée la génération de thrombine et de plasmine²⁴⁹. Elle a permis de mettre en évidence une hypercoagulabilité suite à une hypofibrinolyse sous Asp, particulièrement chez les enfants de plus de 10 ans.

Citons encore pour être complet un test explorant globalement la fibrinolyse, le « Plasma clot lysis assay ». Il s'agit d'un test dynamique mesurant la formation de fibrine et la fibrinolyse en fonction du temps²⁵⁰. Du plasma citraté pauvre en plaquettes est mis en contact avec un activateur (du facteur tissulaire ou de la thrombine), des phospholipides et du calcium pour induire la formation de fibrine. En même temps, un activateur de la fibrinolyse (t-PA) est ajouté pour induire la lyse du caillot. La mesure de la turbidité est réalisée, celle-ci augmentant avec la formation du caillot et diminuant lors de sa lyse. Ce test requiert une expertise technique mais aussi biologique pour la validation des résultats. Malgré une variabilité intra-laboratoire acceptable (< 10%), la variabilité inter-laboratoire est importante suite à une absence de standardisation de méthodologie.

Chaque test global présente des avantages et des inconvénients⁸². Ainsi les tests viscoélastiques permettent une analyse au lit du malade et permettent de détecter une fibrinolyse importante ; ils sont, par contre, peu standardisés et ne permettent pas la détection des pathologies plaquettaires. Le TGT permet la mise en évidence d'état hypo ou prothrombotique, avec un outil automatisé et comparativement bien standardisé.

Les deux tests globaux utilisés dans ce travail présentent néanmoins quelques limitations.

Le TGT présente quelques limitations quant à son utilisation en routine et à la conception du test en soi. Par exemple, cette technique ne permet pas l'exploration fonctionnelle du fibrinogène. En outre, pour une exploration plus approfondie de la balance hémostatique, l'exploration du TGT sur plasma riche en plaquettes (PRP) ou sur sang total, prenant en compte les plaquettes et les globules rouges, apporte une information plus complète et plus proche de la situation *in vivo* que celle réalisée dans ce travail sur PPP²⁵¹. Cependant les conditions préanalytiques dans ces deux conditions sont encore plus strictes que le TGT sur PPP car elles nécessitent entre autres de travailler à frais, sans possibilité de réunir des batch d'analyses. Le TGT sur sang total nécessite un protocole analytique adapté, et ne permet pas encore de travailler avec un substrat fluorescent²⁴⁴. Dans notre travail, cela aurait nécessité de travailler à frais et donc dans des délais courts après prélèvements ce qui s'avérait difficilement envisageable dans la gestion des prélèvements pour un travail de recherche avec inclusion prospective des patients. De plus, la préparation du PPP ou PRP est chronophage, ce qui a limité son utilisation comme test rapide et adapté à l'urgence.

Une autre limitation concernant les TGT réalisés dans ce travail est l'absence d'utilisation d'un d'inhibiteur de phase contact, comme le corn trypsin inhibitor (CTI), indiqué dans des conditions analytiques avec du FT en très faible concentration, inférieur à 1 pM²⁵². Le CTI est ainsi indispensable lors de la réalisation du TGT en PRP. Nos études, réalisées sur PPP, ont été menées dans des conditions avec des taux supérieurs à 1 pM de FT ce qui permettait de pouvoir l'éviter et de faciliter la phase préanalytique et de limiter les coûts.

De plus, le délai pour l'obtention des résultats de TGT est limité par le temps requis pour la préparation des tests (entre 1 et 2 heures) suivi de celui pour la génération de thrombine (1 heure) ; cela mobilise donc pendant environ 3 heures un technologue au poste de travail.

Les tests viscoélastiques, quant à eux, sont limités par leur insensibilité aux dysfonctions plaquettaires, à la maladie de von Willebrand et aux déficits en FXIII²⁵³. De plus, la variabilité est importante^{254,255}. Le contrôle de qualité externe utilisé au laboratoire rapporte un CV supérieur à 10% pour le paramètre CT et inférieur à 10% pour le paramètre MCF, exploité dans ce travail, selon le dernier rapport de qualité ECAT²⁵⁶. Cette variabilité peut s'expliquer par l'absence de protocole standardisé pour ces tests viscoélastiques.

Les tests globaux étudiés dans leur ensemble sont des modèles *in vitro* tentant de se rapprocher le plus possible des situations physiologiques. Cependant tant pour le TGT que pour les tests viscoélastiques utilisés dans ce travail, ni les vaisseaux (et donc l'endothélium) ni le flux ni le pH ni la température ne sont pris en compte. Aucun test global actuellement disponible ne couvre l'ensemble des acteurs de l'hémostase, dont l'endothélium est pourtant un composant très important. L'endothélium est un fin régulateur de la fonction hémostatique et sa moindre altération peut engendrer un risque de saignement ou de thrombose qui ne sera pas reflété par ces techniques. Ceci a bien été décrit récemment dans la coagulopathie associée au COVID²⁵⁷. Seul l'ajout aux tests de facteurs sécrétés par l'endothélium permet de mimer imparfaitement l'intervention de celui-ci dans le processus hémostatique. Ainsi dans notre travail, nous avons ajouté de la thrombomoduline pour démontrer l'action du système PC/PS dans diverses situations cliniques.

Dans les évaluations de saignement, l'exploration de la fibrinolyse est souvent omise. Il existe peu de tests globaux explorant la fibrinolyse. Pour l'exploration de l'hypofibrinolyse dans des conditions thrombotiques ou l'exploration d'effet de médicaments antifibrinolytiques, l'utilisation d'un test avec apport de t-PA comme exploré dans la troisième étude de ce travail est une bonne alternative.

D'autres tests globaux existent. Citons brièvement l'analyse de la courbe de formation du caillot ou CWA (clot waveform analysis) exploitée à partir des mesures

optiques des automates de coagulation et modélisant par une courbe les changements d'absorbance survenant au cours de la formation du caillot en présence des réactifs d'aPTT ou de PT²⁵⁸. Le CWA permet de détecter et de suivre les coagulopathies intravasculaires disséminées²⁵⁹, au cours du sepsis²⁶⁰. Une modification de ce test appelée FibWave permet d'analyser la formation de fibrine en présence de concentration plus faible de FT que les réactifs d'aPTT ou de PT²⁶¹. Il s'agit d'un test rapide, moins couteux que le TGT et aisément disponible sur les automates de coagulation de routine. Il pourrait être intéressant d'utiliser ce test pour analyser nos patients drépanocytaires greffés et de comparer les résultats du test FibWave, en présence de protéine C activée avec ceux du TGT. Ceci constituerait une perspective concrète à ce travail, comprenant aussi l'exploration à plus long terme des patients drépanocytaires greffés.

Le Thrombodynamics permet l'évaluation spatiale de la formation de fibrine par vidéo-microscopie après initiation de la coagulation par du FT immobilisé, le caillot se formant depuis cet activateur et s'étendant au plasma, comme dans une situation *in vivo*²⁶².

Plusieurs perspectives dans l'utilisation du TGT pourraient enrichir prochainement les possibilités de diagnostiquer plus finement et de prendre en charge de manière plus appropriée diverses situations cliniques.

Nous espérons que l'introduction dans notre laboratoire d'un test standardisé, tel que celui proposé sur les automates St-Genesia va nous permettre d'apporter au patient une plus-value dans l'exploration plus globale d'un déséquilibre de la balance de coagulation présent dans de nombreuses situations cliniques, dont quelques exemples sont repris ci-dessous. Cet automate permet de réaliser les analyses de manière automatisée, standardisée et en rendant les résultats de manière normalisée. Moyennant quelques améliorations techniques, notamment en termes de praticabilité et vitesse d'exécution, il permettrait d'implémenter le TGT dans les laboratoires de biologie clinique avec un résultat quasiment en temps réel. Bien sûr une standardisation des conditions préanalytiques est également indispensable, comme précédemment évoqué. Cet automate a fait actuellement l'objet d'une évaluation au sein de notre laboratoire avec établissement de valeurs usuelles chez l'enfant et l'adulte. Des résultats préliminaires ont été présentés au congrès de la

société belge de thrombose et d'hémostase en 2019²⁶³. Les résultats étant prometteurs, l'automate est en cours d'évaluation dans diverses situations cliniques rencontrées. Ainsi son intérêt, par rapport à un questionnaire de diathèse hémorragique standardisé, dans le dépistage préopératoire du risque hémorragique de l'adulte subissant une intervention à haut risque de saignement, est en cours d'évaluation. Une étude est aussi en cours afin de comparer les performances du ST-Genesis avec la méthode classique CAT, utilisée jusqu'à présent dans la cohorte d'hémophiles suivie à l'HUDERF. Enfin l'étude du profil prothrombotique de patients COVID-19, lors de leur passage par le service des urgences et ce en dehors de toute thérapie anticoagulante, fait l'objet d'un mémoire de fin d'étude.

Parmi les situations cliniques à explorer, un domaine qui évolue énormément à l'heure actuelle est celui du traitement de l'hémophilie. En effet, à l'heure actuelle, il ne s'agit plus d'administrer la même dose standard de produit à tous les patients, mais chacun d'entre eux doit recevoir la dose qui lui convient en fonction de son profil propre de saignement et notamment, de son activité physique. On parle de traitement personnalisé. À l'avenir, nous espérons utiliser le TGT comme outil d'adaptation du traitement personnalisé de l'hémophile. En effet, le seul taux de FVIII ne reflète pas de manière fidèle le phénotype clinique de ces patients alors que le TGT le prédit de manière plus fidèle. En effet, à taux égal en FVIII, des patients vont plus saigner que d'autres²⁶⁴. Dans une étude pilote réalisée chez des hémophiles sévères, nous avons montré une corrélation entre le phénotype clinique et le TGT et nous avons pu déterminer un seuil en-dessous duquel une adaptation thérapeutique était nécessaire pour diminuer les saignements^{265,266}. Une étude prospective est en cours dans notre centre de suivi des hémophiles (HEMOWAB) afin d'inclure une plus large cohorte de patients. Des résultats préliminaires ont déjà pu être exposés²⁶⁷.

Une autre application possible dans ce domaine est de déterminer la dose d'agents « bypassants » (FEIBA ou Novoseven), permettant de traiter l'hémophile qui s'est immunisé contre son traitement. Ces agents « bypassants » contiennent des facteurs de coagulation activés et permettent de rétablir une génération de thrombine satisfaisante en contournant l'administration de facteurs substitutifs contre lequel l'hémophile s'est immunisé et qui sont par conséquent devenus inefficaces²⁶⁸.

Une autre perspective intéressante est l'exploration de la maladie thromboembolique veineuse. La maladie thromboembolique veineuse est une affection très fréquente avec une incidence dans la population adulte d'environ 1/1000. Elle augmente avec l'âge pour atteindre 3/1000 après 70 ans. Cette maladie constitue un véritable problème de santé publique, si on considère le vieillissement de la population, la fréquence des récives (5 à 7% par an) et les séquelles de cette maladie qui sont graves dans 5 à 10% des cas²⁶⁹. Les possibilités de diagnostic biologique de la thrombophilie sont limitées, les tests de coagulation de routine (aPTT, PT) ne sont pas sensibles aux états prothrombotiques, les tests existants sont axés sur le dosage individuels de facteurs sans vision globale du processus hémostatique dans son ensemble. Il s'agit des anticoagulants physiologiques protéine C, protéine S, antithrombine, de la mise en évidence d'un excès de facteurs procoagulants comme le FVIII, de la mise en évidence des anticorps antiphospholipides, de la résistance à la protéine C activée et du dépistage des mutations génétiques courantes (recherche de FV Leiden, de mutation de la prothrombine). De plus, ils n'identifient un facteur de risque que pour 50% seulement des patients avec événements thromboemboliques²⁷⁰. La mise en évidence d'un phénotype prothrombotique global, grâce au test de génération de thrombine, reflétant la balance réelle entre procoagulants et anticoagulants chez un même individu serait d'une grande utilité clinique dans le cas où les bilans classiques ne sont pas informatifs sur une prédisposition ou en cas de récive de ET. Nous espérons développer cet aspect dans une perspective future.

En rapport avec la pandémie récente, nous souhaitons explorer l'hypercoagulabilité associée au SARS-COV-2. Ce sujet a déjà été traité par d'autres équipes. Ainsi une équipe a comparé en TGT des patients sévères COVID-19 en soins intensifs et ceux moins sévères en unité classique. L'étude ne met pas en évidence de différence significative entre ces deux cohortes en termes d'ETP, pic et vélocité, et ce même en présence de TM²⁷¹. Deux autres études ont montré une génération de thrombine, non abaissée chez des patients en soins intensifs ou en salle de médecine interne, malgré l'instauration d'une thromboprophylaxie^{272,273} à l'héparine, ce qui pourrait expliquer la survenue des thromboses chez ce type de patients, même anticoagulés. Le manque de standardisation précédemment décrit rend la comparaison des résultats malaisée. Ainsi, l'une des équipes (celle de Dargaud²⁷³) a utilisé un réactif

hautement dosé en FT (20 pM), réactif plutôt adapté au suivi des traitements anticoagulants qu'à la mise en évidence d'état prothrombotique. L'équipe de Lisman a quant à elle utilisé un réactif avec 5 pM de FT. Ces deux équipes ont aussi étudié la coagulation par viscoélastométrie de ces patients²⁷². Dargaud montre qu'en présence de t-PA les patients ont un profil d'hypofibrinolyse, ce qui correspond aux données actuelles sur la coagulopathie associée au COVID, pour laquelle une inhibition de la fibrinolyse a été décrite²⁷³. L'exploration de cette pathologie par une technique plus standardisée, par exemple, à l'aide de l'automate Genesis, pourrait peut-être réconcilier les deux points de vue.

La caractérisation des états prothrombotiques des cancers est aussi un domaine intéressant qui pourrait faire l'objet d'étude au sein de notre laboratoire. En effet, le cancer prédispose à la thrombose et le développement de la tumeur est facilité par un état hypercoagulable qu'il induit. L'hypercoagulabilité dans le cancer est un processus multifactoriel qui implique des mécanismes procoagulants à la fois physiques et biochimiques. La compression des vaisseaux par la tumeur induit une stase sanguine. Les parois des vaisseaux sont endommagées par l'invasion tumorale, la chimiothérapie, la chirurgie et la mise en place de cathéters. Les cellules tumorales peuvent exprimer des protéines hémostatiques, des cytokines inflammatoires et des récepteurs d'adhésion. Ils interagissent avec les cellules hôtes, comme les cellules endothéliales, les leucocytes, les plaquettes et conduisent à leur activation ce qui déséquilibre la coagulation vers un état hypercoagulable^{274,275}.

Le suivi thérapeutique des anticoagulants directs est en général non indiqué mais peut s'avérer utile dans des situations particulières (poids extrêmes, polymédication, saignements, événements thrombotiques sous anticoagulation, etc.)²⁷⁶. Les xabans peuvent être suivis par mesure de l'activité anti-Xa moyennant une calibration adaptée selon le médicament. Cependant le résultat fourni, malgré une aide à la prise en charge, ne reflète pas l'effet anticoagulant. Le TGT permettrait de mieux appréhender cet effet mais aussi celui des antidotes à administrer en cas de saignement²⁷⁷.

La coagulopathie dans la cirrhose entraîne un risque thrombotique plutôt qu'un risque hémorragique. Ce phénotype a été caractérisé grâce à l'utilisation du TGT en présence de TM mettant en évidence un effet réduit de la TM et un phénotype

hypercoagulable²⁷⁸. Ce profil s'explique probablement par une déficience acquise en antithrombine et protéine C et des taux élevés de FVIII. Cependant en cas de cirrhose décompensée, le profil clinique évolue vers une tendance hémorragique. Le TGT permettrait un suivi personnalisé des patients cirrhotiques et de détecter cette évolution clinique.

L'influence de facteurs individuels sur le potentiel hémostatique du patient est aussi un large champ possible d'investigation. Pour ne citer que lui, des études ont montré que le microbiote intestinal a une influence sur l'hémostase et plus particulièrement sur les thromboses artérielles²⁷⁹. L'influence sur la thrombose veineuse a été peu étudiée. Mohammed et al. a montré qu'après une transplantation de microbiote fécal chez des patients avec syndrome métabolique le temps de latence du TGT se prolongeait²⁸⁰.

Toutes ces applications sont des champs d'exploration bien réels, puisque ceux-ci sont incomplètement compris. Mais la question finale reste posée : à quoi devrait répondre les tests du futur ? Les tests de coagulation idéaux devraient combiner à la fois les avantages des tests classiques en termes de rapidité, de standardisation, d'automatisation et de praticabilité dans un laboratoire de routine et ceux des tests globaux par leur approche plus exhaustive du processus hémostatique à l'échelon individuel. Si le test est intégré dans le laboratoire de biologie clinique, il devra être approuvé par les autorités régulatrices et obtenir un remboursement de l'assurance des soins de santé. Les coûts de ces tests globaux restent élevés (plus de 15 euros par condition analytique) par rapport aux tests classiques, leur usage devra être réservé à des situations cliniques bien ciblées. Le test global CWA, et son adaptation FibWave, peu coûteuse, pourrait être prometteur dans le contexte de la rationalisation des coûts.

L'approche de la génération de thrombine en sang total intégrant tous les composants sanguins, est déjà en développement. Les tests parfaits devraient prendre en compte les conditions de flux sanguin, les interactions endothéliales, la phase plaquettaire, la température, le pH du sang des patients : une utopie ?

6 Bibliographie

7 Annexes

7.1 Évaluation du potentiel hémostatique chez les enfants atteints de leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) pendant le traitement par Asparaginase

Received: 18 April 2016 | Accepted: 2 August 2016

DOI: 10.1002/pbc.26228

RESEARCH ARTICLE

WILEY Pediatric Blood & Cancer 

Different profile of thrombin generation in children with acute lymphoblastic leukaemia treated with native or pegylated asparaginase: A cohort study

Laurence Rozen¹ | Denis Noubouossie¹ | Laurence Dedeken² | Sophie Huybrechts² | Phu Quoc Lê² | Alina Ferster² | Anne Demulder¹

¹Laboratory of hematology, CHU Brugmann, LHUB-ULB, ULB Université libre de Bruxelles, Brussels, Belgium

²Hematology-Oncology Unit, Hôpital Universitaire des Enfants Reine Fabiola, ULB Université libre de Bruxelles, Brussels, Belgium

Correspondence

Laurence Rozen, Laboratory of Hematology and Haemostasis, CHU Brugmann, 4 Place Arthur Van Gehuchten, Postal Code 1020, Brussels, Belgium.

Email: laurence.rozen@chu-brugmann.be

Preliminary results of this study were presented as a poster at the annual meeting of the American Society of Hematology, December 2013, New Orleans, USA.

Abstract

Background: Asparaginase (Asp) and corticosteroid (CS) treatment in patients with acute lymphoblastic leukaemia (ALL) is associated with an increased risk of thrombotic events.

Objective: Characterization of global haemostatic phenotypes of patients with ALL during Asp therapy.

Procedure: Thrombin generation (TG) was monitored in platelet-poor plasma of 56 children treated for a B lineage ALL (36 with native, 20 with PEG Asp) using 1 pM tissue factor and 4 μM phospholipids, with and without thrombomodulin. Protein C activity (PC), free protein S (PS), antithrombin (AT) and fibrinogen levels were also measured.

Results: Elevated endogenous thrombin potential (ETP) and peak of TG were noted at diagnosis, throughout the Induction phase and Late Intensification but was significantly less for PEG than for native Asp ($P < 0.001$), while age, sex, type of corticosteroid during Induction and molecular response had no significant effect. The reduction of ETP after addition of thrombomodulin was significantly lower in ALL children compared with that in controls, suggesting impairment in PS/PC pathway. Three patients experienced thrombosis: two treated with native and one with PEG Asp. The two patients with native Asp had, at the time of thrombosis, a prothrombotic profile.

Conclusions: Treatment with Asp, in combination with CS, enhances TG in children with ALL, more significantly with native than PEG Asp, which is present early at diagnosis, persists during Induction and reappears during Late Intensification. This is consistent with the high incidence of thrombotic events described during these phases of therapy. The less pronounced effect of PEG Asp remains to be elucidated.

KEYWORDS

acute lymphoblastic leukaemia, asparaginase, coagulation, haemostatic potential, thrombin generation

Abbreviations: Asp, asparaginase; ALL, acute lymphoblastic leukaemia; AR1, average risk 1; AR2B, average risk 2 B; AT, antithrombin; CAT, calibrated automated thrombogram®; CS, corticosteroids; CVC, central vein catheter; DXM, dexamethasone; ETP, endogenous thrombin potential; FVIII, factor VIII; MRD, minimal residual disease; NC, normal controls; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; PC, protein C activity; PDN, prednisolone; PEG, pegylated; PPP, platelet-poor plasma; PS, free protein S; TAFI, thrombin activatable fibrinolysis inhibitor; TE, thrombotic event; TG, thrombin generation; TM, thrombomodulin; VLR, very low risk; VHR, very high risk; VTE, venous thromboembolism; vWF, von Willebrand factor; WBC, white blood cells

1 | INTRODUCTION

Incidence of thrombosis during treatment in children with acute lymphoblastic leukaemia (ALL) is about 5%.¹ Aetiology is multifactorial including disease burden, coagulation defects induced by the treatment (mainly due to corticosteroids [CS] and asparaginase [Asp]), presence of a central vein catheter (CVC), infection and genetic predisposition.²⁻⁵ Asp is a major drug in the treatment of ALL, but it also causes adverse effects on healthy cells with a decrease of proteins like coagulation factors, procoagulant factors such as FV, FVIII

and fibrinogen, natural anticoagulant antithrombin (AT), protein C (PC) and free protein S (PS).⁶ Moreover, CS, also used in the ALL treatment, induces a prothrombotic state² by increasing procoagulant factors (such as FVIII-von Willebrand factor [vWF], FXI, FV, FII) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1). Treatment of ALL includes the combination of Asp and CS, with a cumulative effect on haemostatic alterations leading to a hypercoagulable state.

Till now, most studies have evaluated individual parameters of the coagulation system to infer the prothrombotic profile.^{7–9} Global haemostatic potential of children with ALL and its changes during treatment have rarely been investigated.

In this study, we aimed to characterize the global haemostatic phenotype of patients with ALL during native or pegylated (PEG) Asp therapy, using a global haemostatic assay, the Calibrated Automated Thrombogram[®] (CAT) method of TG.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Patients and controls

The study was approved by the local Ethics Committee and informed consent was obtained from parents before enrolment. Samples were collected from children with B lineage ALL diagnosed from December 2009 to September 2013. Patients with thrombophilia (including PS, PC, antithrombin deficiencies or lupus anticoagulant, resistance to activated protein C, prothrombin G20210A mutation or factor V Leiden mutation) at diagnosis were excluded, they received prophylaxis with low-molecular weight heparin. Children, aged between 1 and 18 years, were treated according to the CLG-EORTC first-line recommendations (BFM-derived protocol based on EORTC Trial 58951^{10,11}). Patients were classified into four treatment groups: VLR, AR1, AR2B or very high risk (VHR) according to the relapse risk assessed by white blood cell count (WBC) at diagnosis, number of circulating blasts 8 days after the start of CS, ploidy, karyotype, molecular biology of the leukemic cells, testicular or central nervous involvement and minimal residual disease (MRD) at the end of Induction and Consolidation.

All patients received prednisolone (PDN) 60 mg/m² from day 1 to 7. CS was given during Induction: PDN 60 mg/m² or dexamethasone (DXM) 6 mg/m² for AR2B patients from day 8 to 28 according to the therapeutic group. During Late Intensification, all patients received DXM (6 mg/m²) from day 1 to 21.

From December 2009 to December 2012, patients received eight intravenous infusions of native *Escherichia coli* Asp (10,000 U/m²) twice a week from day 12 to 35 of induction and four intravenous infusions twice a week from day 8 to 18 during Late Intensification.

Since January 2013, when PEG Asp became available in Belgium for first-line treatment in children, patients received PEG Asp instead of native Asp following a schedule that aimed to obtain the same duration of asparaginase depletion. Two PEG Asp (2,500 U/m² intravenous) at day 12 and 26 were given in Induction and one at day 8 during Late Intensification.

In case of allergy to native or PEG Asp, it was substituted by Erwinia Asp (20,000 U/m²) given three times a week.

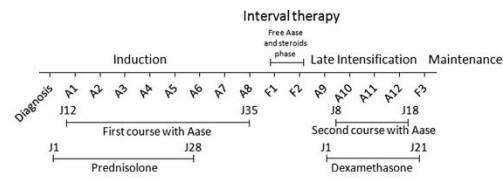


FIGURE 1 Schematic overview of CS and Asp during Induction and Maintenance. A and F represent the time points of sampling. Aase, asparaginase.

Samples tested were drawn at several points of interest during treatment (see Fig. 1): at diagnosis (day 1), before each native *E. coli* Asp infusion (A1 to A8 in Induction and A9 to A12 in Late Intensification), at distance of Asp infusion (F1 and F2 between Induction and Late Intensification and F3 2–3 months after last Asp infusion). Patients treated with PEG or Erwinia Asp for allergy were collected at the same points as native cohort, even if they received PEG only on A1, A5 and A9.

Twenty-three children, aged from 2 to 14 years who had to undergo minor elective surgery, were considered as normal controls (NC) if their complete blood counts, routine coagulation tests, liver and kidney function tests, C-reactive protein (CRP) and plasma lactate dehydrogenase (LDH) levels were normal. These controls did not present with any haemostatic, thrombotic or other haemoglobin affections. The remaining citrated plasma after completion of routine haemostatic tests before a minor elective surgery for these controls were frozen within the 2 hr after blood collection.

2.2 | Sample collection and handling

Peripheral venous blood of patients and NC was collected into Vacutainer[®] tubes (BD) containing buffered sodium citrate (0.109M). Platelet-poor plasma (PPP) was prepared within the hour after blood collection by a first centrifugation at 2,500g for 15 min followed by a second centrifugation at 16,000g for 2 min. Samples were stored at -80°C with an average freezing time between 6 and 12 months. They were tested by batch after a rapidly thawing at 37°C.

2.3 | Thrombin generation assay

TG was performed using CAT[®] method as described by Hemker et al.¹² TG was triggered by addition of 1 pM tissue factor and 4 μM phospholipids with and without addition of thrombomodulin (PPP low +/- TM, Synapse BV). The detailed protocol was already described by Noubouossie et al.^{13,14}

Two TG parameters were analysed: peak height (Peak) and endogenous thrombin potential (ETP). The reduction of ETP (RETP) in the presence of TM was calculated for each sample and expressed in percentage. Internal quality control was ensured by performing reference plasma (Poolnorm[®], Diagnostica Stago) on each TG plate.

2.4 | Other coagulation tests

Clotting fibrinogen was measured (STA-Fibrinogen[®], Diagnostica Stago). Protein C activity was measured using a chromogenic assay (Coamatic[®] Protein C, Chromogenix, Milan, Italy). PS antigen and

D-dimers levels were measured using immunoturbidimetric assays (STA-Liatest[®] Free Protein S and STA-Liatest[®] D-DI, Diagnostica Stago). These assays were performed on STA-R[®] automate (Diagnostica Stago).

2.5 | Statistical analyses

Patient results were expressed as median with interquartile range (IQR) at each time point. For the demographic data, comparisons for age and sex between NC and patients treated with native and PEG Asp were performed using an ANOVA test and a chi-square test, respectively. For the comparisons between the two cohorts of patients (native and PEG Asp), Mann-Whitney test for continuous variables and Fisher exact test for discrete variables were performed. The results of TG parameters were compared with the range (percentile 2.5–97.5) of normal controls. PS and PC values were compared to the cut-off value established as the percentile 2.5 of normal controls (57 and 65%, respectively). For AT and fibrinogen, the cut-off values were identical to the reference range used in our laboratory (AT >75%, fibrinogen 160–400 mg/dl). For TG results, comparisons between patients treated with native and PEG Asp at different time points were achieved using a two-way ANOVA test, the Bonferroni post-test. Statistical calculations were realized using the software GraphPad Prism[®] version 5 (GraphPad Software Inc.). A *P* value less than 0.05 was considered significant.

3 | RESULTS

After exclusion of three patients with thrombophilia at diagnosis, 56 children with B lineage ALL aged from 1 to 14 years were enrolled in this study. Among them, 36 were treated with native Asp and 20 with PEG Asp. The demographic data of the patients are summarized in Table 1. No statistical difference was observed for age distribution and for sex between normal controls and the two cohorts of patients. Initial leukocyte count, proven infection at start of Induction, incidence of thrombosis and ALL classification subtype were similar between patients receiving native or PEG Asp. The cohort receiving PEG Asp contained more patients treated with DXM in Induction (AR2B) than the native cohort (20 vs. 8.3%), but statistically no difference was found between the two groups. The cohort receiving native Asp contained more patients treated in the VHR group than the PEG cohort (5.6 vs. 0%), but statistically no difference was found between the two groups. WBC at time point A1 was significantly higher in the native Asp group compared with the PEG Asp group (1.9 [0.6–4.3] vs. 1.8 [0.4–3.0] × 10³ μl; *P* = 0.045), while no difference could be found at any other time points.

All patients achieved cytological remission after the Induction course. MRD was less than 10⁻³ in 31/36 patients (86%) in the native Asp group and 20/20 (100%) in the PEG Asp group (*P* = 0.1438).

Four patients developed allergic reaction with native or with PEG Asp (three and one, respectively) and were switched to Erwinia Asp.

With native and PEG Asp, two and one patient, respectively, suffered from symptomatic thrombosis, leading to thrombosis rates of 5.6 and 5.0%. Two patients (2 and 3 years old), treated in the VLR and AR1

group, developed a subclavian vein thrombosis concurrent with a central venous catheter infection, respectively, on day 22 of Induction and after completion of Induction (13 days after the eighth Asp infusion). One of those two also developed a longitudinal sinus thrombosis during Late Intensification. A third patient (10 years old), treated in the AR1 group, also developed longitudinal sinus thrombosis on PEG Asp.

3.1 | TG profile during Asp treatment

Figure 2 shows the comparison of TG profile with native and PEG Asp at each time points studied.

For the cohort receiving native Asp, significantly elevated ETP and Peak of TG as compared with NC were noted at diagnosis and persisted during the whole Induction phase. During Interval Therapy and later at the start of Maintenance (period free of any CS or Asp), ETP and Peak returned to levels comparable to NC. During Late Intensification, ETP and Peak levels increased significantly again. At every time point studied, ETP and Peak levels showed similar patterns when TG was performed with or without TM. Patients treated with PEG Asp showed a similar TG pattern as patients with native Asp. However, with or without TM, ETP and Peak were significantly lower (*P* < 0.001) in patients treated with PEG than those treated with native Asp. Bonferroni post tests revealed significant difference (*P* < 0.01) for ETP with TM at two time points, A1 and A11; for Peak without TM at two time points, A1 and A12; and for Peak with TM at four time points (A1, A9, A11 and A12). As age, CS type, and sex could affect the haemostatic profile, further analyses were done. ETP was not significantly different in patients older than 5 years compared with younger ones (*P* = 0.8550), in those receiving DXM in Induction compared with those receiving PDN in Induction (0.8023), and in females compared with males (*P* = 0.0577).

RETP was significantly lower in patients with ALL compared with controls (*P* < 0.001) (median value 39, 15, and 21% for NC, native and PEG cohorts respectively).

Patients with thrombotic events occurring during the course of native Asp treatment had higher ETP and Peak values when compared to the entire cohort of children with ALL sampled at the same time points. Their ETP and Peak values with and without TM were above the median values of all other patients at several time points during Induction and Late Intensification (A1, A3, A7, A9 and A10). However, for the patient treated with PEG who experienced a thrombosis in the longitudinal sinus, the ETP and Peak values were not enhanced as compared with both PEG-treated cohort and NC. The Peak value with TM remained in the P2.5–97.5 range of NC.

3.2 | Individual haemostatic parameters

As shown in Figure 3, the patterns of evolution of plasma levels of AT, PS, PC and fibrinogen were similar in patients treated with native or PEG Asp. PC, PS, AT, and fibrinogen levels all decreased during the Induction phase. Nearly all median PS and PC levels of patients remained above the cut-off value, whereas median AT levels decreased below the cut-off value, with the lowest values obtained at the end of Induction (at time of the seventh and eighth Asp infusion, respectively [A7 = day 32 and A8 = day 35]). At diagnosis, fibrinogen was

TABLE 1 Demographic data comparing normal controls, patients treated with native and patients treated with PEG asparaginase

	Normal controls	Native asparaginase	PEG asparaginase	
Number of children	23	36	20	-
Median age, years (range)	5 (2-14)	3.7 (1-14)	3 (1.5-13)	<i>P</i> = 0.0704 [#]
Sex (male/female)	11/12	20/16	14/6	<i>P</i> = 0.3331 ^{##}
Risk treatment groups		VLR: 2 AR1: 29 AR2B: 3 VHR: 2	VLR: 2 AR1: 14 AR2B: 4 VHR: 0	
Patients with thrombosis		2 (5.6%) VLR: 1 and AR1: 1	1 (5%) AR1: 1	<i>P</i> = 1 NS ^{**}
Patients with documented infection at diagnosis		4	1	<i>P</i> = 0.6449 ^{**}
Switch to Erwinase		3	1	<i>P</i> = 1 NS ^{**}
Switch during Induction		2	0	<i>P</i> = 0.5325, NS ^{**}
AR2B (%) with DXM during Induction		3 (8.3%)	4 (20%)	<i>P</i> = 0.2336 ^{**}
Leukocytosis at diagnosis (x10 ⁹ cells/l, range)		11.60 (0.86-89.31)	12.20 (0.94-92.36)	<i>P</i> = 0.8877 [*]
Minimal residual disease at the end of induction > 10 ⁻³		5	0	<i>P</i> = 0.1438 ^{**}

[#]ANOVA: for comparison between normal controls and the two cohorts of patients.

^{##}Chi-square: for comparison between normal controls and the two cohorts of patients.

^{*}Mann-Whitney test: for comparison between the two cohorts of patients.

^{**}Fischer exact test.

significantly higher in the native group. Median fibrinogen levels of patients were below the cut-off value during Induction from day 15 to 29.

For AT, results were lower with PEG than with native Asp, with significant difference between the two cohorts (*P* < 0.001, but Bonferroni posttests revealed no significant difference at each time point). PS, PC, and fibrinogen did not show any significant difference between the two cohorts.

4 | DISCUSSION

The rate of symptomatic thrombosis (5%) we observed with PEG or with native Asp was mostly similar to those reported in literature.^{1,4,15} However, higher rates of thrombosis were observed in some series, owing to either different diagnostic criteria used (e.g. symptomatic TE vs. asymptomatic) or methods for radiological or clinical TE detection.¹⁶ Our reported events were localized either in the upper venous system concomitant with CVC infection or in the central venous system. In the literature, thrombosis in these locations were also the most frequently reported¹ and episodes occurring in the upper venous system were also often associated with the presence of CVC.³ Although adolescents with ALL are generally considered at higher risk for venous thromboembolism (VTE) than younger children,^{1,17,18} in our cohort, no thrombosis occurred among the three patients older than 10 years. Teenagers were poorly represented here; therefore, no conclusion can be deduced on thrombosis incidence related to age.

In accordance with published data, our VTE cases occurred mainly during Induction,¹ indicating the enhanced influence of disease burden and chemotherapy on thrombosis^{19,20} as the duration of CS

administration and Asp exposure is longer during Induction than during Late Intensification. Both CS and Asp, used during the Induction phase, modulate coagulation and increase the thrombotic risk, mainly by decreasing physiological anticoagulants PS, PC and AT and thus impairing the anticoagulant pathway during treatment with these drugs.^{21,22} Nevertheless, the interaction between Asp and CS influencing haemostatic balance depends on the specific schedules of administration of these drugs,²³ and these differ among the different protocols used worldwide. Differences in the type and dose of CS in the different ALL protocols must be taken into account, as CS modify the coagulation process. CS increase FVII, FVIII and XI in healthy subjects,²⁴ while PAI-1 and VW are increased and fibrinogen decreased during inflammation. It has been shown that these modifications in levels of VW and PAI-1 lead to coagulation activation and inhibition of fibrinolysis.²⁵⁻²⁷

Discrepant results on the role of AT, PS, and PC levels on the prothrombotic profile of children with ALL during the Induction phase have been reported in the literature. In a cohort of 23 children with ALL treated with a similar treatment protocol, a significantly higher TG profile during Induction than during re-Induction was found, but ETP and Peak were not significantly different than the values observed in a control group.²⁰ This higher prothrombotic profile during Induction was not affected by hypofibrinogenemia and/or by AT deficiency. Yamashita et al.,^{28,29} who also studied TG in a small cohort of children with ALL, showed that with addition of 5 pM TF, ETP was significantly increased after Asp treatment as compared to before treatment and this increased ETP correlated with decreased AT and PC. The prothrombotic profile was reduced by AT supplementation; however, some patients with concurrent severe hypofibrinogenemia developed a hemorrhagic tendency when supplemented with AT. In addition, CRP positively correlated with ETP, suggesting the contribution of

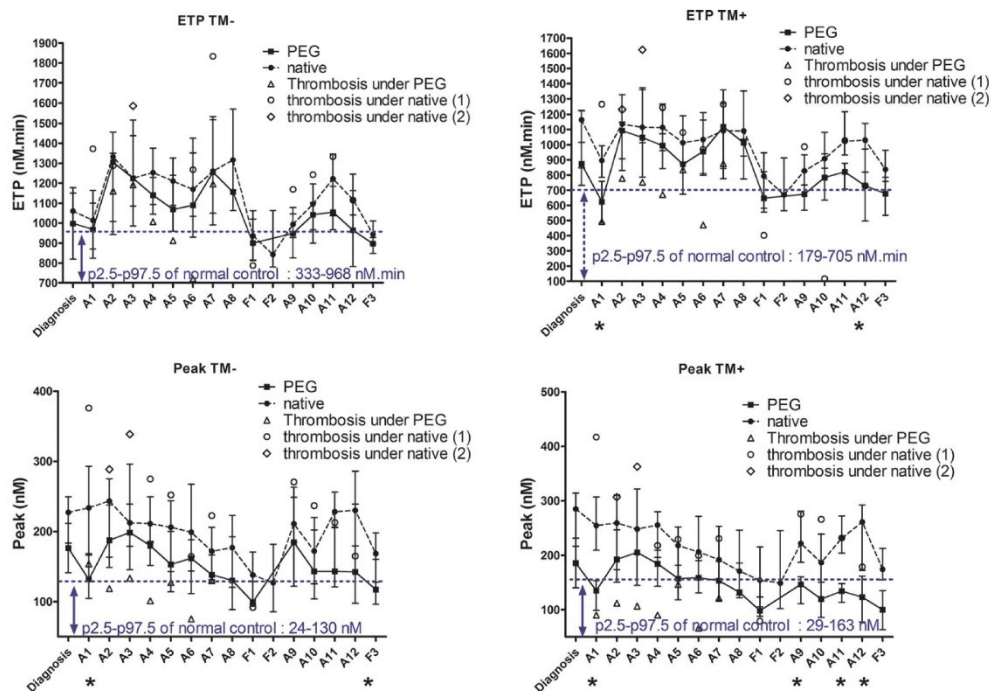


FIGURE 2 Comparison of TG profile with native or PEG Asp. ETP and Peak, without (TM-) and with (TM+) addition of thrombomodulin at different time points (error bars represent median and range) for the cohort treated with native (filled circle with dotted line) and PEG Asp (filled squares with continue line). Diamond: values of a patient with sub-clavian thrombosis on day 22 of Induction with native Asp. Circles: values of a patient who developed a jugular vein thrombosis on day 50 during Induction and a cerebral thrombosis during Late Intensification with native Asp. Triangles: values of a patient who developed an upper longitudinal sinus thrombosis with PEG Asp. Asterisk represents time points when Bonferroni posttests revealed significant difference ($P < 0.01$) between native and PEG cohort

infection to the prothrombotic profile, which is in accordance with the enhanced risk of VTE during the Induction and Consolidation phases when infection is present. Another factor implicated in the prothrombotic profile is the impairment of PC and PS pathways, as demonstrated by the reduced sensitivity to TM expressed as RETP, confirming the data of Staddon et al.³⁰ in a cohort of 12 patients treated with PEG Asp. The mechanism leading to a lower RETP and to the increased resistance to activated PC after addition of TM may reflect the persisting high FVIII level observed during ALL induction chemotherapy as described by Albayrak et al.³¹ Indeed, at ALL diagnosis, D-dimers, FVIII, vWF, PC, AT and thrombin-activated fibrinolysis inhibitor (TAFI) are elevated. During induction, fibrinogen, coagulation inhibitors and plasminogen decrease, but FVIII, D-dimer and TAFI remain elevated. Increased FVIII may contribute to the hypercoagulability status³² and induce an acquired resistance to activated PC, which can explain the lower RETP observed. In addition, impaired fibrinolysis (elevated TAFI) and persistent high D-dimer during ALL induction treatment may further contribute to the higher prothrombotic profile.³¹

Surprisingly, we found a lower TG profile with PEG Asp than with native Asp, while age, sex, or type of CS during Induction had no

impact. The cohort with PEG Asp contained a higher proportion of patients (although not significant) following AR2B and thus received DXM instead of PDN during Induction. It has been shown that patients treated with DXM during Induction have a higher thrombosis-free survival than those treated with PDN,³³ and DXM is considered to have a higher "protective role" on the development of VTE.³⁴ Glucocorticoids act on the integrity of cell membranes; they inhibit arachidonic acid release from phospholipids and thus reduce prostaglandins and thromboxane production. Nevertheless, a large meta-analysis did not show any difference in thrombotic event incidence between PDN and DXM during Induction;¹ therefore, the lower prothrombotic profile observed with PEG Asp cannot be explained by a significantly higher proportion of patients receiving DXM in Induction. Moreover, during Late Intensification, when all patients receive DXM, patients treated with PEG Asp still exhibit a less pronounced prothrombotic profile.

The schedule of administration of Asp and CS also influences the coagulation system in contrasting ways. Native Asp, having a short half-life and given in lower doses but more frequently and for a longer period of time in combination with DXM, provides a cumulative effect with a slower recovery of decreased proteins.²³ This

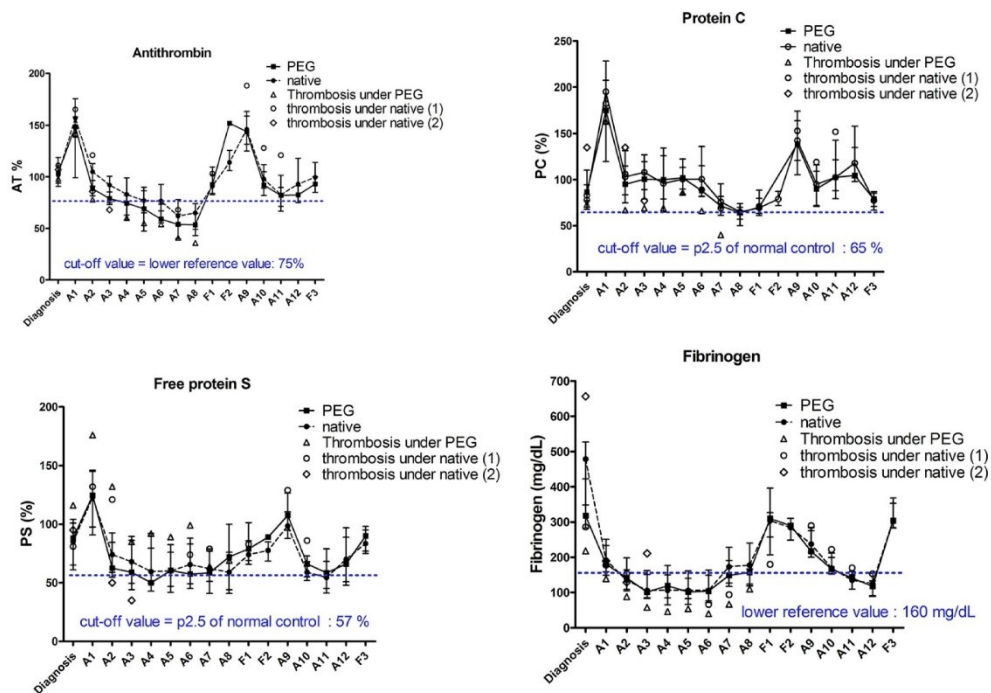


FIGURE 3 Comparison of individual haemostatic parameters with native and PEG Asp. AT, PC, PS and fibrinogen levels with native and PEG Asp therapy, given in Induction and Maintenance with native (filled circle with dotted line) and with PEG (filled squares with continue line) Asp. Error bars represent median and range. Diamond: values of a patient with sub-clavian thrombosis on day 22 of Induction with native Asp. Circles: values of a patient who developed a jugular vein thrombosis on day 50 during Induction and a cerebral thrombosis during Late Intensification with native Asp. Triangles: values of a patient who developed an upper longitudinal sinus thrombosis with PEG Asp

cannot explain why a lower prothrombotic profile was found with PEG Asp. This formulation was developed with the objective of reducing the risk of allergy and silent inactivation as it provides prolonged and more predictable Asp activity and asparagine depletion.³⁵ Compared with native Asp, it allows therapeutic enzyme activity for 2 weeks with only a single dose.³⁶ The optimization of Asp activity with PEG Asp does not explain the lower prothrombotic profile we found, as AT with PEG Asp was significantly lower than that with native Asp. This previous observation could possibly be related to a better anti-leukemic effect, with a more rapid decrease of both blast numbers and microparticles released during Induction, as the high procoagulant state at diagnosis and during treatment could also be due to the exposure to phosphatidylserine.³⁷ Dong et al.³⁸ showed that chemotherapy induced a procoagulant state due to phosphatidylserine exposure on ALL cells at diagnosis that increased after treatment with daunorubicin or Asp. Interestingly, at diagnosis, we observed increased fibrinogen, ETP TM+, Peak TM- and Peak TM+ in the native Asp group. Even though not statistically different, the two VHR patients belonged to the native Asp cohort and none to the PEG Asp cohort. These patients had poor prednisolone responses. The higher TG profile in the native Asp group at time point A1 corresponding to the sample taken just

before the first Asp administration might reflect the higher disease burden as suggested by higher WBC. Nevertheless, similar WBC in the native cohort compared with the PEG one at diagnosis and later time points could not explain the different TG profile observed during Induction and especially during Late Intensification, as the differences in TG were also noted during re-Induction with significantly higher ETP TM+ and Peak TM- (cf. A11 and A12 time points).

Although the percentage of patients with a MRD higher than 10^{-3} at end of Induction was lower in the PEG cohort (0 vs. 14%), it was not statistically different when compared with the native cohort. The hypothesis of a link between better blast clearance and less pronounced prothrombotic profile with PEG Asp remains to be further investigated. To our knowledge, the investigation of the global coagulation profile of children with ALL on PEG and native Asp treatment has not been reported in the literature. Previous studies compared native *E. coli* Asp versus Erwinase using individual coagulation parameters. They showed a higher risk of VTE with *E. coli* Asp with increased individual coagulation markers and decreased plasminogen and alpha2-antiplasmin.³⁹

Our study provides data on three important issues that have not been addressed until now, namely the difference between native and

PEG Asp on the prothrombotic profile, the influence of the addition of TM to sensitize TG to the PC/PS pathway, and TG during a period free of any Asp or steroids.

We think that TG is a promising global assay to evaluate the hypercoagulable state in children with ALL treated with Asp in combination with CS. Our TG data revealed increased thrombin potential with both native and PEG Asp, already present early at diagnosis, persisting during Induction and reappearing during Late Intensification. This observation is consistent with the high incidence of thrombotic events previously described during Induction and within 14 days after the last Asp infusion. The prothrombotic TG profiles observed in patients treated with native Asp who experienced thrombotic events suggest that this assay could be useful to identify patients with an increased thrombotic risk. The lower prothrombotic profile with PEG Asp during Induction, possibly due to the optimization of Asp activity leading potentially to a better anti-leukemic activity, needs further investigation.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by a grant from Baxter. The authors would like to thank all the patients and their parents, nurses and physicians of the hemato-oncology unit at HUDERF for their contribution to sample collection, technicians of our laboratory for their contribution to samples handling and Bhavna Mahadeb for the time she spent on re-reading.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

- Caruso V, Iacoviello L, Di Castelnuovo A, et al. Thrombotic complications in childhood acute lymphoblastic leukemia: A meta-analysis of 17 prospective studies comprising 1752 pediatric patients. *Blood*. 2006;108:2216–2222.
- Athale UH, Chan AK. Thrombosis in children with acute lymphoblastic leukemia. Part II. Pathogenesis of thrombosis in children with acute lymphoblastic leukemia: Effects of the disease and therapy. *Thromb Res*. 2003;111:199–212.
- Payne JH, Vora AJ. Thrombosis and acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2007;138:430–445.
- Nowak-Göttl U, Kenet G, Mitchell LG. Thrombosis in childhood acute lymphoblastic leukaemia: Epidemiology, aetiology, diagnosis, prevention and treatment. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2009;22:103–114.
- Athale UH, Chan AK. Thromboembolic complications in pediatric hematologic malignancies. *Semin Thromb Hemost*. 2007;33:416–426.
- Mitchell LG, Halton JM, Vegh PA, et al. Effect of disease and chemotherapy on hemostasis in children with acute lymphoid leukemia. *Am J Pediatr Hematol Oncol*. 1994;16:120–126.
- Mitchell L, Hoogendoorn H, Giles AR, Vegh P, Andrew M. Increased endogenous thrombin generation in children with acute lymphoblastic leukemia: Risk of thrombotic complications in L-Asparaginase-induced antithrombin III deficiency. *Blood*. 1994;83:386–391.
- Appel IM, Hop WC, van Kessel-Bakvis C, Stigter R, Pieters R. L-Asparaginase and the effect of age on coagulation and fibrinolysis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Thromb Haemost*. 2008;100:330–337.
- Giordano P, Molinari AC, Del Vecchio GC, et al. Prospective study of hemostatic alterations in children with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Hematol*. 2010;85:325–330.
- Duval M, Suciu S, Ferster A, et al. Comparison of Escherichia coli-asparaginase with Erwinia-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: Results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Children's Leukemia Group phase 3 trial. *Blood*. 2002;99:2734–2739.
- Domenech C, Suciu S, De Moerloose B, et al. Dexamethasone (6 mg/m²/day) and prednisolone (60 mg/m²/day) were equally effective as induction therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia in the EORTC CLG 58951 randomized trial. *Haematologica*. 2014;99:1220–1227.
- Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, et al. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2003;33:4–15.
- Noubouossie DC, Lê PQ, Rozen L, et al. Thrombin generation in children with sickle cell disease: Relationship with age, hemolysis, transcranial Doppler velocity, and hydroxyurea treatment. *Eur J Haematol*. 2013;91:46–54.
- Noubouossie DF, Lê PC, Corazza F, et al. Thrombin generation reveals high procoagulant potential in the plasma of sickle cell disease children. *Am J Hematol*. 2012;87:145–149.
- Grace RF, Dahlberg SE, Neuberg D, et al. The frequency and management of asparaginase-related thrombosis in paediatric and adult patients with acute lymphoblastic leukaemia treated on Dana-Farber Cancer Institute consortium protocols. *Br J Haematol*. 2011;152:452–459.
- Athale UH, Chan AK. Thrombosis in children with acute lymphoblastic leukemia. Part I. Epidemiology of thrombosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Thromb Res*. 2003;111:125–131.
- Barry E, DeAngelo DJ, Neuberg D, et al. Favorable outcome for adolescents with acute lymphoblastic leukemia treated on Dana-Farber Cancer Institute Acute Lymphoblastic Leukemia Consortium Protocols. *J Clin Oncol*. 2007;25:813–819.
- Tuckuviene R, Ranta S, Albersten BK, et al. Prospective study of thromboembolism in 1038 children with acute lymphoblastic leukemia: A Nordic Society Pediatric Hematology and Oncology (NOPHO) study. *J Thromb Haemost*. 2016;14:485–494.
- Astwood E, Vora A. Personal practice: How we manage the risk of bleeding and thrombosis in children and young adults with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2011;152:505–511.
- Lejhancova-Tousovska K, Zapletal O, Vytiskova S, Strbackova P, Sterba J. Profile of thrombin generation in children with acute lymphoblastic leukemia treated by Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) protocols. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2012;23:144–154.
- Hunault-Berger M, Chevallier P, Delain M, et al. GOELAMS (Groupe Ouest-Est des Leucémies Aiguës et Maladies du Sang). Changes in antithrombin and fibrinogen levels during induction chemotherapy with L-asparaginase in adult patients with acute lymphoblastic leukemia or lymphoblastic lymphoma. Use of supportive coagulation therapy and clinical outcome: The CAPELAL study. *Haematologica*. 2008;93:1488–1494.
- Merlen C, Bonnefoy A, Wagner E, et al. L-Asparaginase lowers plasma antithrombin and mannan-binding-lectin levels: Impact on thrombotic and infectious events in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2015;62:1381–1387.
- Appel IM, van Kessel-Bakvis C, Stigter R, Pieters R. Influence of two different regimens of concomitant treatment with asparaginase and dexamethasone on hemostasis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2007;21:2377–2380.

24. van Zaane B, Nur E, Squizzato A, et al. Systematic review on the effect of glucocorticoid use on procoagulant, anti-coagulant and fibrinolytic factors. *J Thromb Haemost.* 2010;8:2483–2493.
25. Heaton JH, Nebes VL, O'Dell LG, Morris SM Jr, Gelehrter TD. Glucocorticoid and cyclic nucleotide regulation of plasminogen activator and plasminogen activator-inhibitor gene expression in primary cultures of rat hepatocytes. *Mol Endocrinol.* 1989;3:185–192.
26. Huang LQ, Whitworth JA, Chesterman CN. Effects of cyclosporin A and dexamethasone on haemostatic and vasoactive functions of vascular endothelial cells. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1995; 6: 438–445.
27. Morange PE, Aubert J, Peiretti F, et al. Glucocorticoids and insulin promote plasminogen activator inhibitor 1 production by human adipose tissue. *Diabetes.* 1999;48:890–895.
28. Yamashita A, Nagae C, Ashikaga T, et al. Pathogenesis of hemostatic abnormalities due to L-asparaginase in children with acute leukemia. *J Thromb Haemost.* 2013;11(Suppl 2):1–1322.
29. Yamashita A, Nagae C, Shoji T, et al. Effects of L-asparaginase therapy on thrombin generation in children with acute leukemia. *J Thromb Haemost.* 2009;7(Suppl 2):1–1204.
30. Staddon J, Smock K, Schiffman J, et al. Pegasparginase treatment alters thrombin generation by modulating the protein C and protein S system in acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2015;26:840–843.
31. Albayrak M, Gürsel T, Kaya Z, Koçak U. Alterations in procoagulant, anticoagulant, and fibrinolytic systems before and after start of induction chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2013;19:644–651.
32. Noubououssie D, Le PQ, Rozen L, et al. FVIII level correlates with hemolysis and may contribute to the hypercoagulability of children with sickle cell disease. *JTH.* 2013;11(Suppl 2):290–1019.
33. Nowak-Göttl U, Ahlke E, Fleischhack G, et al. Thromboembolic events in children with acute lymphoblastic leukemia (BFM protocols): Prednisone versus dexamethasone administration. *Blood.* 2003;101:2529–2533.
34. Brunton L, Chabner B, Knollman B. *The Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics.* 12th ed. 2011, McGraw-Hill Medical, Columbus, USA.
35. Avramis VI, Sencer S, Periclou AP, et al. A randomized comparison of native *Escherichia coli* asparaginase and polyethylene glycol conjugated asparaginase for treatment of children with newly diagnosed standard-risk acute lymphoblastic leukemia: A Children's Cancer Group study. *Blood.* 2002;99:1986–1994.
36. Silverman LB, Supko JG, Stevenson KE, et al. Intravenous PEG-asparaginase during remission induction in children and adolescents with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2010;115:1351–1353.
37. Schneider P, Van Dreden P, Rousseau A, et al. Increased levels of tissue factor activity and procoagulant phospholipids during treatment of children with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* 2010;148:582–592.
38. Dong X, Shi J, Zhou J, et al. Chemotherapy induces enhanced procoagulant activity through phosphatidylserine exposure in acute lymphoblastic leukemia. *Thromb Res.* 2013;132:614–620.
39. Appel IM, Hop WC, Pieters R. Changes in hypercoagulability by asparaginase: A randomized study between two asparaginases. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2006;17:139–146.

7.2 Exploration de la balance hémostatique grâce au TGT suite à la greffe de moelle chez les patients drépanocytaires

Article

Is There Any Improvement of the Coagulation Imbalance in Sickle Cell Disease after Hematopoietic Stem Cell Transplantation?

Laurence Rozen ^{1,*}, Denis F. Noubouossie ¹, Laurence Dedeken ², Phu Quoc Lê ², Alina Ferster ² and Anne Demulder ¹

¹ Laboratory of Hematology LHUB-ULB ULB Université Libre de Bruxelles, 1020 Brussels, Belgium; noubouossie75@yahoo.fr (D.F.N.); Anne.DEMULDER@LHUB-ULB.BE (A.D.)

² Hematology Oncology Unit, Hôpital and universitaire des Enfants Reine Fabiola, ULB Université Libre de Bruxelles, 1020 Brussels, Belgium; laurence.dedeken@huderf.be (L.D.); phuquoc.le@huderf.be (P.Q.L.); alina.ferster@huderf.be (A.F.)

* Correspondence: laurence.rozen@lhub-ulb.be; Tel.: +32-2477-2921

Received: 23 August 2019; Accepted: 23 October 2019; Published: 26 October 2019



Abstract: Several components of the clotting system are modified towards hypercoagulability in sickle cell disease (SCD). To date, hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is the only validated curative treatment of SCD. Here, we investigated the changes in the hemostatic potential of SCD children who've received a successful HSCT. Seventeen children with severe SCD were enrolled in the study. Thrombin generation (TG) was performed on citrated platelet-poor plasma, obtained before and 3, 6, 9, 12 and 15 months after HSCT. TG was triggered using 1 pM tissue factor and 4 μM phospholipids with or without thrombomodulin (TM). Before the HSCT, SCD children showed a higher endogenous thrombin potential (ETP), higher peak, higher velocity and shorter time-to-peak of TG than the normal controls (NC). ETP did not significantly change following the HSCT. However, the peak, velocity and time-to-peak of TG reversed to normal ranges from 3 months post-HSCT and remained so up to 15 months post-HSCT. The reduction of ETP after the addition of thrombomodulin (RETP) was dramatically reduced in SCD children before HSCT as compared with the NC. A partial reversal of RETP was observed from 3 months through 15 months post-HSCT. No statistical difference was observed for patient age or donor hemoglobinopathy status. In summary, successful HSCT improves the kinetics of TG but not the total thrombin capacity in SCD children.

Keywords: sickle cell disease; hematopoietic stem cell transplantation; thrombin generation test; coagulation; hemostatic potential

1. Introduction

Sickle cell disease (SCD) is considered as a hypercoagulable state. Clinical manifestations include venous thromboembolism and stroke in a subset of patients [1,2]. The activation of coagulation is often present, with consumptive coagulopathy as well as increased levels of in vivo markers of thrombin and fibrin generation [3,4].

Several components of the clotting system are modified towards hypercoagulability in SCD. Previous studies have reported that patients with SCD present with alterations of several of the individual procoagulant and anticoagulant factors involved in the coagulation system (may it be pro or anticoagulants: elevated FVIII levels, decreased protein C, and protein S), but also an increase in the hemostatic potential using global tests of coagulation. Global tests reflect a better hemostatic balance than the usual test performed in a routine laboratory; they are the final result of the interaction between pro- or anti-coagulant factors. As thrombin is a central factor of the coagulation cascade, the evaluation

of the thrombin generation (TG) is a key element in the evaluation of coagulation disorders and easy to measure thanks to the Calibrated Automated Method (CAT[®]), developed by Hemker [5]. This method provides a curve characterized by an initiation phase (lag-time, corresponding to the clotting time of the routine tests) followed by an amplification phase reaching a peak of maximal thrombin formation. This phase is followed by a decay phase, corresponding to the intervention of anticoagulant factors. ETP (the area under the curve), represents the total amount of thrombin formed as a result of pro- and anticoagulant factors. Velocity represents the rate of thrombin formation, and time-to-peak the time to reach the peak of thrombin formation. Hypercoagulable states, as is the case in SCD, show a reduced lag-time, and increased ETP and peak [6]. Therefore, observations with global tests have demonstrated in children with SCD that, even at a steady state, hypercoagulability is present [7,8]. Elevated thrombin generation (TG) in SCD children has been described as being related to younger age as well as to the intensity of hemolysis and a link between TG and cerebral vasculopathy in these patients has been mentioned [9].

The treatment of SCD patients has been considerably improved with the introduction of hydroxyurea (HU) and with much better global medical management, at least in developed countries [10,11]. However, SCD remains associated with severe morbidity and decreased survival (organ failure, chronic damage). To date, matched sibling donor (MSD) hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is the only validated curative treatment of SCD [12].

HSCT is mainly considered for children with severe clinical disease characterized by a history of stroke, repeated vaso-occlusive crises (VOC), multiple acute chest syndrome (ACS), and multiple osteonecrosis or allo-immunization that hampers the appropriate management of acute or chronic complications [13]. Patients with deteriorating lung or kidney disease also benefit from transplantation [14] as well as children at risk of stroke [15].

The overall survival (OS) and event-free survival (EFS) after MSD-HSCT ranges from 93% to 97% and from 82% to 86% [16–20]. Despite these impressive clinical results, the evolution of the hemostatic balance following HSCT is still unknown.

According to a recent study [21], HSCT affects the coagulation system mainly in the first few weeks after transplantation. This study reports a clear shift towards a procoagulant state with an increase of the coagulation activation markers (Von Willebrand factor, pro-thrombin fragments 1 + 2), fibrin turnover (D-dimers), and ETP. These early coagulation abnormalities can lead to an increased morbi-mortality rate [22], with transplant-associated thrombotic microangiopathy (TA-TMA) as a major side effect, mainly due to endothelial damage [23,24].

As SCD and HSCT confers a prothrombotic profile to patients, the aim of our study was to investigate whether the hemostatic imbalance in SCD children could improve following HSCT. We used the Calibrated Automated Thrombogram[®] to compare the hemostatic potential of SCD children before and after HSCT.

2. Materials and Methods

2.1. Patients

From November 2014 to March 2018, children with severe SCD undergoing MSD-HSCT were enrolled in the study. Before HSCT, all patients were suffering from severe clinical diseases, including cerebrovascular disease, recurrent ACS or frequent VOC (≥ 2 /year).

2.2. Controls

The population of normal controls (NC) has already been described in a previous publication [25] and consisted of 23 children aged from 2 to 14 years who had a blood coagulation test before a minor elective surgery. The remaining plasmas of those samples were used as controls for the present study.

3. Results

3.1. Demographic Data

Seventeen children (five females, 12 males) were consecutively enrolled. Sixteen patients were homozygote HbSS and one was compound heterozygote HbSB+. Three patients were on a chronic exchange transfusion program before HSCT, either for cerebro-vascular disease ($N = 1$) or recurrent ACS despite treatment with HU ($N = 2$). All the patients were treated with HU. The median age at transplantation was 9.6 years (range: 3.6–16.5 years). The stem cell donor was a matched sibling in all cases (11 were heterozygous AS, five were AA and one was heterozygous AC). The source of the stem cell was cord blood in one patient, bone marrow in 11 patients and bone marrow plus cord blood in five patients. Table 1 summarizes the demographic data.

All the patients received myeloablative conditioning regimen (Busulfan, Cyclophosphamide and Anti-thymocytes Globulins). The graft-versus-host disease (GVHD) prophylaxis included cyclosporine and methotrexate or cyclosporine and mycophenolate in the case of cord blood.

3.2. Clinical Data

All patients engrafted successfully. No acute GVHD occurred. One patient developed chronic extensive GVHD which was well controlled after steroids and extracorporeal photopheresis and could be stopped after five months. After a median follow-up of three years, all patients were alive with a full donor chimerism. Table 1 summarizes the clinical data.

3.3. Thrombin Generation Parameters

In the presence or absence of thrombomodulin, the ETP, peak and velocity of TG were significantly higher; lag time and time-to-peak were shorter, whereas the RETP was decreased in children with SCD before HSCT as compared with NC. As it represented a more complete situation, results with TM are illustrated in Figure 1. All values for the TG parameters are summarized in Table S1, in the Supplementary Materials.

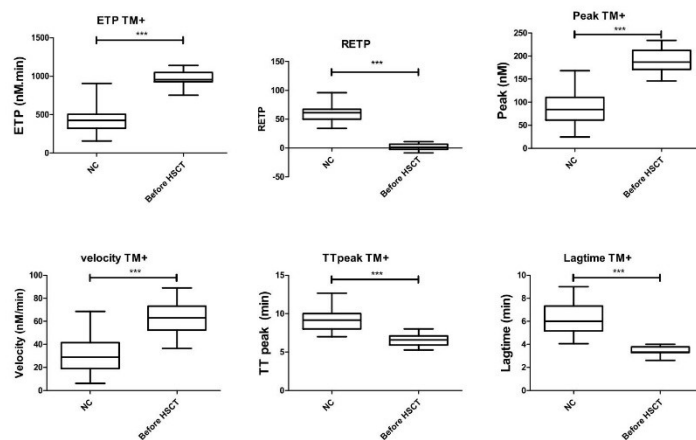


Figure 1. Comparison of the TG parameters with TM (median and range) between normal controls (NC) and sickle cell disease (SCD) patients before HSCT. ETP TM+: endogenous thrombin potential following addition of thrombomodulin, RETP: reduction of ETP with the addition of thrombomodulin, HSCT: hematopoietic stem cell transplantation, TM+: with addition of thrombomodulin, TT: time to peak, NC: normal control, *** $p < 0.001$ as compared to the controls using the Mann–Whitney test.

Table 1. Demographic data of the 17 patients, their donors, and clinical and biological data following hematopoietic stem cell transplantation (HSCT).

		Genotype patient			16 HbSS, 1 HbSB+		
		Sex			5 females, 12 males		
		Age at transplant (years)			9.6 (3.6–16.5)		
		Donor Genotype			11 HbAS, 5 HbAA, 1 HbAC		
		Donor sex			7 females, 10 males		
HSCT complications	Acute renal insufficiency		1, resolved 3 months after transplant, due to drug toxicities)				
	Hemorrhagic cystitis		1, with mild hemorrhagic cystitis resolved less than 1 month after transplant				
	VOD		0				
	Acute GVHD		0				
		Chronic GVHD		1, with no more immuno-suppressive treatment 12 months after transplant			
		Dunn's post-test					
	Before HSCT	6 months after HSCT	15 months after HSCT	Friedmann test	Before versus 6 months after HSCT	Before versus 15 months after HSCT	6 months versus 15 months after HSCT
Hb (g/dL)	8.3 (7.2–11.4)	11.7 (10.5–14.5)	12.4 (10.9–13.5)	$p < 0.0001$	**	***	NS
HbS (%)	70 (26–88)	32 (0–40)	34 (0–42)	$p = 0.0001$	***	*	NS
LDH	466 (256–823)	243 (185–488)	235 (177–317)	$p < 0.0001$	**	***	NS

Data are expressed as median and range. VOD: vaso-occlusive disease, GVHD: graft-versus-host disease, Hb: hemoglobin, HbS: sickle hemoglobin, LDH: lactate dehydrogenase, HbSS: patient with sickle cell disease that are homozygote for HbS, HbSB+: patient with sickle cell disease that are compound heterozygote for HbS and B+ thalassaemia, HbAS: sickle cell trait for HbS, HbAC: sickle cell trait for HbC, HSCT: hematopoietic stem cell transplantation, NS: not significant ($p > 0.05$), *: $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

At 3 months post-HSCT, peak and velocity significantly decreased while lag time and time-to-peak significantly increased as compared with pre-HSCT values, regardless of the presence or absence of TM. The median peak, velocity and time-to-peak returned to values within the normal range, set as (P2.5–P97.5) of the NC (see Figure 2 for results with TM). The lag time and RETP significantly increased at 3 months post-HSCT as compared with pre-HSCT. However, their median values did not return within the normal range, indicating a partial recovery (Table S1).

From three months through 15 months after HSCT, no further changes were observed in all TG parameters. Median ETP value remained higher while median RETP and median lag time values remained lower than P2.5–P97.5 of NC. In contrast, median values of the peak, time-to-peak and velocity of TG performed in the presence of TM stabilized within the P2.5–P97.5 of NC, suggesting a full recovery (Table 1 and Figure 2, for results with TM).

Otherwise, no statistical difference was observed for patient age or donor hemoglobinopathy status (data not shown but all *p*-value were >0.05).

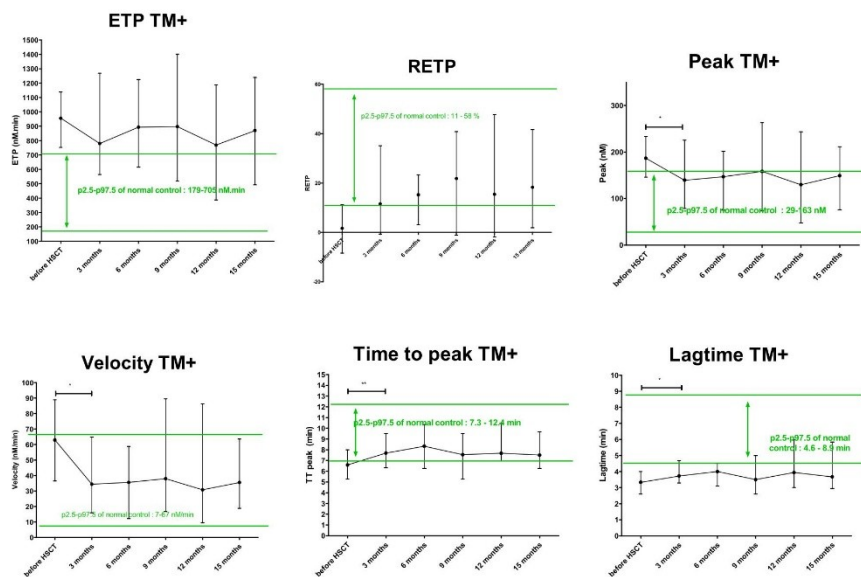


Figure 2. Modification of TG parameters (median and range) before and after successful HSCT, with (TM+) the addition of thrombomodulin. The range p2.5–p97.5 of NC is colored in green. ETP TM+: endogenous thrombin potential following addition of thrombomodulin, RETP: reduction of ETP with the addition of thrombomodulin, HSCT: hematopoietic stem cell transplantation, TM+: with addition of thrombomodulin, NC: normal control, *, *p* < 0.05, ** *p* < 0.01.

3.4. Evolution Of hemoglobin, HbS and LDH

Median hemoglobin, HbS and LDH are summarized in Table 1. They change significantly after HSCT. When compared to pre HSCT values, at 6 months, total hemoglobin increased from 8.3 g/dL (range: 7.2–11.4) to 11.7 g/dL (range: 10.5–14.5) (*p* < 0.01). HbS and LDH decreased from 70% (range: 26–88) to 32% (range: 0–40) (*p* < 0.001) and from 466 UI/L (range: 256–823) to 243 UI/L (range: 185–488) (*p* < 0.01), respectively. The comparison of 15 months before and after HSCT showed similar results while the comparison between 6 and 15 months after HSCT did not show any significant changes.

These observations were similar even when not taking into account the three patients under exchange transfusion before HSCT.

4. Discussion

To our knowledge, this is the first study addressing the changes in the clotting system following HSCT. As expected, SCD patients in this study presented a hypercoagulable state as compared to the NC before HSCT. This hypercoagulable state included a faster time to generate thrombin (lag time and time-to-peak are shorter in SCD than in NC), a faster rate of thrombin production (velocity is higher in SCD than in NC), a higher concentration and total capacity to generate thrombin (peak and ETP are higher in SCD than in NC). The altered global coagulation in patients with SCD before HSCT was previously highlighted by our team in a limited cohort [26] and by Gerotziafas et al. [8]. Several synergistic factors have been suggested to explain the increased hemostatic potential in patients with SCD. Indeed, we and others have previously reported the decreased levels of protein C and protein S in these patients [26–31]. Protein C and protein S are known determinants of TG [32] and decreased levels of these proteins induce a resistance to thrombomodulin [33]. In addition, elevated FVIII levels in these patients inversely correlate with RETP and may contribute to some resistance to activated protein C [34].

Circulating levels of pro-coagulant microvesicles deriving from blood and endothelial cells have also been reported in patients with SCD [35–38]. Some of these microvesicles, especially those released by activated monocytes or endothelial cells, expose functional tissue factor that may contribute to shortening the lag time and the time-to-peak of TG in these patients [36]. Procoagulant microvesicles also expose phosphatidylserine, a procoagulant phospholipid that provides the surface for the assembly of coagulation complexes. We have previously shown that increased microvesicle-bearing phospholipid procoagulant activity in the plasma of patients with SCD contributes to accelerated velocity and an elevated peak of TG [39].

These results were observed both with and without thrombomodulin. This protein sensitizes TG to the protein C/protein S anticoagulant pathway and allows a more global exploration of the coagulation balance. Therefore, we observed an extremely low RETP before HSCT which emphasizes the prothrombotic profile resulting from the impairment of the protein C and protein S anticoagulant pathway.

Furthermore, the altered hemostatic balance before HSCT seems to be linked to a hemolysis-endothelial dysfunction phenotype, as suggested by the significant correlations previously reported between markers of hemolysis and parameters of TG in children with SCD [39]. This can be supported by the low Hb and the high LDH level before HSCT.

Our results indicate a clear trend toward the resolution of the hypercoagulable state in SCD as soon as 3 months following successful allogeneic HSCT, as evidenced by the reversal of the kinetic parameters of TG to normal values. This is likely the result of the replacement of sickle red cells by engrafted non-sickle erythrocytes, leading to a decreased level of circulating erythrocyte-derived phosphatidylserine-positive microvesicles. As stated earlier, the level of these microvesicles have been shown to be a critical determinant of the propagation phase of TG in patients with SCD [39]. Interestingly, the improvement of the kinetics of TG persisted over time and was sustainable up to 15 months after engraftment. In parallel, Hb increased, while HbS and LDH level decreased after HSCT and tended towards normal values.

Some TG parameters—lag time, ETP and RETP for instance—did not return to normal values. RETP improved after HSCT suggesting a partial recovery of the impaired protein C/protein S anticoagulant pathway [40]. The reasons for these findings are unclear. Since the study was performed in a pediatric population, we could not get enough sample volume to measure other coagulation parameters, including individual coagulation factors, physiologic anticoagulants, D-dimers and microvesicles. These will be addressed in further studies with the aim to better understand the underlying mechanisms of our observations. Nonetheless, a persistent inflammatory state following HSCT may lead to circulating tissue factor and an elevated level of FVIII, which are potential factors that can contribute to the maintenance of a short lag time, high ETP and reduced RETP in these patients.

Our study has some other limitations. The first one is that it was only centered on SCD children. Indeed, HSCT in SCD is mainly performed during childhood. Our observations might be extendable

to SCD adults as they have a similar procoagulant profile. However, the impact of HSCT on the hemostatic system of adults could be different. The second limitation is that the population of the NC was not entirely race matched as it also included Caucasian children. It is well recognized that African people have a higher incidence of thromboembolism as compared to “white” people [41,42]. Roberts et al. reported that African-Caribbean adults have a higher TG profile than Caucasians, with higher peak, ETP and velocity [43]. Despite the fact that lag time, time-to-peak and ETP reduction were not significantly different in Roberts’s study, this highlights the fact that TG studies are influenced by ethnicity. In further studies, we intend to use sibling donors as potential controls. Nevertheless, it is a significant challenge to get samples from normal controls in children for coagulation studies.

Finally, our study is monocentric and concerns a small cohort of patients who all had a successful MSD-HSCT after myeloablative conditioning with full donor chimerism. Our results may not be extrapolated to patients who develop mixed chimerism after transplantation.

5. Conclusions

To summarize, a successful HSCT reverses accelerated coagulation reactions in children with SCD. No thromboembolic events were recorded in the patients studied. However, further properly designed studies are essential to evaluate the clinical impact and the underlying mechanisms of the changes induced by HSCT on coagulation in SCD.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2077-0383/8/11/1796/s1>, Table S1: Thrombin generation parameters for NC and for SCD children before and after successful allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.

Author Contributions: D.F.N., A.F. and A.D. designed the study; L.R. performed the experiments, L.D., P.Q.L. and A.F. enrolled the patients, L.R. and L.D. performed the statistical analyses, L.R. wrote the manuscript, D.F.N., L.D., A.D., A.F., P.Q.L. reviewed and edited the manuscript.

Funding: No funding was received for this study.

Acknowledgments: This work was partially supported by grants from Shire, Bayer and CSL Behring. The authors would like to thank all the patients and their parents, nurses and physicians of the hemato-oncology unit at HUDERF for their contribution to sample collection, technicians of our laboratory for their contribution to samples handling.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- De Franceschi, L.; Cappellini, M.D.; Olivieri, O. Thrombosis and sickle cell disease. *Semin. Thromb. Hemost.* **2011**, *37*, 226–236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Austin, H.; Key, N.S.; Benson, J.M.; Lally, C.; Dowling, N.F.; Whitsett, C.; Hooper, W.C. Sickle cell trait and the risk of venous thromboembolism among blacks. *Blood* **2007**, *1*, 908–912. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ataga, K.I.; Key, N.S. Hypercoagulability in sickle cell disease: New approaches to an old problem. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* **2007**, 91–96. [[CrossRef](#)]
- Noubouossie, D.; Key, N.S.; Ataga, K.I. Coagulation abnormalities of sickle cell disease: Relationship with clinical outcomes and the effect of disease modifying therapies. *Blood Rev.* **2016**, *30*, 245–256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hemker, H.C.; Giesen, P.; Al Dieri, R.; Regnault, V.; de Smedt, E.; Wagenvoerd, R.; Lecompte, T.; Béguin, S. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* **2003**, *33*, 4–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Duarte, R.C.F.; Ferreira, C.N.; Rios, D.R.A.; Reis, H.J.D.; Carvalho, M.D.G. Thrombin generation assays for global evaluation of the hemostatic system: Perspectives and limitations. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* **2017**, *39*, 259–265. [[CrossRef](#)]
- Noubouossie, D.F.; Lê, P.Q.; Corazza, F.; Debaugnies, F.; Rozen, L.; Ferster, A.; Demulder, A. Thrombin generation reveals high procoagulant potential in the plasma of sickle cell disease children. *Am. J. Hematol.* **2012**, *87*, 145–149. [[CrossRef](#)]

8. Gerotziakas, G.T.; Van Dreden, P.; Chaari, M.; Galea, V.; Khaterchi, A.; Lionnet, F.; Stankovic-Stojanovic, K.; Blanc-Brude, O.; Woodhams, B.; Maier-Redelsperger, M.; et al. The acceleration of the propagation phase of thrombin generation in patients with steady-state sickle cell disease is associated with circulating erythrocyte-derived microparticles. *Thromb. Haemost.* **2012**, *107*, 1044–1052. [[CrossRef](#)]
9. Noubouossie, D.C.; Lê, P.Q.; Rozen, L.; Ziereisen, F.; Willems, D.; Demulder, A.; Ferster, A. Thrombin generation in children with sickle cell disease: Relationship with age, hemolysis, transcranial Doppler velocity, and hydroxyurea treatment. *Eur. J. Haematol.* **2013**, *91*, 46–54. [[CrossRef](#)]
10. Quinn, C.T.; Rogers, Z.R.; McCavit, T.L.; Buchanan, G.R. Improved Survival of Children and Adolescents with Sickle Cell Disease. *Blood* **2010**, *115*, 3447–3452. [[CrossRef](#)]
11. Hamideh, D.; Alvarez, O. Sickle Cell Disease Related Mortality in the United States (1999–2009). *Pediatric Blood Cancer* **2013**, *60*, 1482–1486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Talano, J.A.; Cairo, M.S. Hematopoietic stem cell transplantation for sickle cell disease: State of the science. *Eur. J. Haematol.* **2015**, *94*, 391–399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Locatelli, F.; Pagliara, D. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children with sickle cell disease. *Pediatric Blood Cancer* **2012**, *59*, 372–376. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Powars, D.; Weidman, J.A.; Odom-Maryon, T.; Niland, J.C.; Johnson, C. Sickle cell chronic lung disease: Prior morbidity and the risk of pulmonary failure. *Medicine* **1988**, *67*, 66–76. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Bernaudin, F.; Verlhac, S.; Peffault de Latour, R.; Dalle, J.H.; Brousse, V.; Petras, E.; Thuret, I.; Paillard, C.; Neven, B.; Galambrun, C.; et al. Association of Matched Sibling Donor Hematopoietic Stem Cell Transplantation with Transcranial Doppler Velocities in Children with Sickle Cell Anemia. *JAMA* **2019**, *321*, 266–276. [[CrossRef](#)]
16. Bhatia, M.; Walters, M.C. Hematopoietic Cell Transplantation for Thalassemia and Sickle Cell Disease: Past, Present and Future. *Bone Marrow Transpl.* **2008**, *41*, 109–117. [[CrossRef](#)]
17. Bernaudin, F.; Socie, G.; Kuentz, M.; Chevret, S.; Duval, M.; Bertrand, Y.; Vannier, J.P.; Yakouben, K.; Thuret, I.; Bordigoni, P.; et al. Long-term Results of Related Myeloablative Stem-cell Transplantation to Cure Sickle Cell Disease. *Blood* **2007**, *110*, 2749–2756. [[CrossRef](#)]
18. Dedeken, L.; Lê, P.Q.; Azzi, N.; Brachet, C.; Heijmans, C.; Huybrechts, S.; Devalck, C.; Rozen, L.; Ngalula, M.; Ferster, A. Haematopoietic stem cell transplantation for severe sickle cell disease in childhood: A single centre experience of 50 patients. *Br. J. Haematol.* **2014**, *165*, 402–408. [[CrossRef](#)]
19. Gluckman, E.; Cappelli, B.; Bernaudins, F.; Labopins, M.; Volts, F.; Carreras, J.; Pinto Simões, B.; Ferster, A.; Dupont, S.; de la Fuente, J.; et al. Eurocord, the Pediatric Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation, and the Center for International Blood and Marrow Transplant Research. Sickle cell disease: An international survey of results of HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* **2017**, *129*, 1548–1556. [[CrossRef](#)]
20. Cappelli, B.; Volt, F.; Tozatto-Maio, K.; Scigliuolo, G.M.; Ferster, A.; Dupont, S.; Pinto Simões, B.; Al-Seraihy, A.; Aljurf, M.D.; Almohareb, F.; et al. Risk factors and outcomes according to age at transplantation with an HLA-identical sibling for sickle cell disease. *Haematologica* **2019**, *104*. [[CrossRef](#)]
21. Långström, S.; Koskenvuo, M.; Huttunen, P.; Lassila, R.; Taskinen, M.; Ranta, S.; Heikinheimo, M.; Mäkipernaa, A. Haematopoietic Stem Cell Transplantation in Children Shifts the Coagulation System towards a Pro-Coagulant State. *Thromb. Haemost.* **2018**, *118*, 1390–1396. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Nagasawa, M.; Ohkawa, T.; Endo, A.; Mitsui, N.; Ono, T.; Aoki, Y.; Isoda, T.; Tomizawa, D.; Takagi, M.; Kajiwara, M.; et al. Early coagulation disorder after allogeneic stem cell transplantation is a strong prognostic factor for transplantation-related mortality, and intervention with recombinant human thrombomodulin improves the outcome: A single-center experience. *Int. J. Hematol.* **2013**, *98*, 533–542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Dvorak, C.C.; Higham, C.; Shimano, K.A. Transplant-Associated Thrombotic Microangiopathy in Pediatric Hematopoietic Cell Transplant Recipients: A Practical Approach to Diagnosis and Management. *Front. Pediatric* **2019**, *7*, 133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Rosenthal, J. Hematopoietic cell transplantation-associated thrombotic microangiopathy: A review of pathophysiology, diagnosis, and treatment. *J. Blood Med.* **2016**, *7*, 181–186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Rozen, L.; Noubouossie, D.; Dedeken, L.; Huybrechts, S.; Le, P.Q.; Ferster, A.; Demulder, A. Different profile of thrombin generation in children with acute lymphoblastic leukaemia treated with native or pegylated asparaginase—A cohort study. *Pediatric Blood Cancer* **2017**, *64*, 294–301. [[CrossRef](#)]

26. Noubououssie, D.F.; Emmerechts, J.; Debaugnies, F.; Le, P.Q.; Rozen, L.; Hoylaerts, M.F.; Demulder, A.; Ferster, A. Towards an Improvement of the Coagulation Imbalance in Sickle Cell Disease After Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Preliminary Study. *Blood* **2011**, *118*, 4840. [[CrossRef](#)]
27. Yee, D.L.; Edwards, R.M.; Mueller, B.U.; Teruya, J. Thromboelastographic and hemostatic characteristics in pediatric patients with sickle cell disease. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2005**, *129*, 760–765. [[CrossRef](#)]
28. Bezeaud, A.; Venisse, L.; Helley, D.; Trichet, C.; Giro, R.; Guillin, M.-C. Red blood cells from patients with homozygous sickle cell disease provide a catalytic surface for factor Va inactivation by activated protein C. *Br. J. Haematol.* **2002**, *117*, 409–413. [[CrossRef](#)]
29. Bayazit, A.K.; Kilinç, Y. Natural coagulation inhibitors (protein C, protein S, antithrombin) in patients with sickle cell anemia in a steady state. *Pediatric Int.* **2001**, *43*, 592–596. [[CrossRef](#)]
30. Wright, J.G.; Malia, R.; Cooper, P.; Thomas, P.; Preston, F.E.; Serjeant, G.R. Protein C and protein S in homozygous sickle cell disease: Does hepatic dysfunction contribute to low levels? *Br. J. Haematol.* **1997**, *98*, 627–631. [[CrossRef](#)]
31. Westerman, M.P.; Green, D.; Gilman-Sachs, A.; Beaman, K.; Freels, S.; Boggio, L.; Allen, S.; Zuckerman, L.; Schlegel, R.; Williamson, P. Antiphospholipid antibodies, proteins C and S, and coagulation changes in sickle cell disease. *J. Lab. Clin. Med.* **1999**, *134*, 352–362. [[CrossRef](#)]
32. Dielis, A.W.J.H.; Castoldi, E.; Spronk, H.M.H.; van Oerle, R.; Hamulyák, K.; Ten Cate, H.; Rosing, J. Coagulation factors and the protein C system as determinants of thrombin generation in a normal population. *J. Thromb. Haemost.* **2008**, *6*, 125–131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Whelihan, M.F.; Lim, M.Y.; Mooberry, M.J.; Piegore, M.G.; Ilich, A.; Wogu, A.; Cai, J.; Monroe, D.M.; Ataga, K.I.; Mann, K.G.; et al. Thrombin generation and cell-dependent hypercoagulability in sickle cell disease. *J. Thromb. Haemost.* **2016**, *14*, 1941–1952. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Noubououssie, D.; Lê, P.Q.; Rozen, L.; Willems, D.; Mujinga, N.M.; Ferster, A.; Demulder, A. Factor VIII level correlates with hemolysis and may contribute to the hypercoagulability of children with sickle cell disease. *Br. J. Haematol.* **2013**, *111*, 710–711. [[CrossRef](#)]
35. Van Beers, E.J.; Schaap, M.C.L.; Berckmans, R.J.; Nieuwland, R.; Sturk, A.; van Doormaal, F.F.; Meijers, J.C.; Biemond, B.J.; CURAMA study group. Circulating erythrocyte-derived microparticles are associated with coagulation activation in sickle cell disease. *Haematologica* **2009**, *94*, 1513–1519. [[CrossRef](#)]
36. Van Tits, L.J.; van Heerde, W.L.; Landburg, P.P.; Boderie, M.J.; Muskiet, F.A.J.; Jacobs, N.; Duits, A.J.; Schnog, J.B. Plasma annexin A5 and microparticle phosphatidylserine levels are elevated in sickle cell disease and increase further during painful crisis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *390*, 161–164. [[CrossRef](#)]
37. Shet, A.S.; Aras, O.; Gupta, K.; Hass, M.J.; Rausch, D.J.; Saba, N.; Koopmeiners, L.; Key, N.S.; Heibel, R.P. Sickle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood* **2003**, *102*, 2678–2683. [[CrossRef](#)]
38. Westerman, M.; Pizzey, A.; Hirschman, J.; Cerino, M.; Weil-Weiner, Y.; Ramotar, P.; Eze, A.; Lawrie, A.; Purdy, G.; Mackie, I.; et al. Microvesicles in haemoglobinopathies offer insights into mechanisms of hypercoagulability, haemolysis and the effects of therapy. *Br. J. Haematol.* **2008**, *142*, 126–135. [[CrossRef](#)]
39. Noubououssie, D.C.; Lê, P.Q.; Rozen, L.; Debaugnies, F.; Ferster, A.; Demulder, A. Evaluation of the procoagulant activity of endogenous phospholipids in the platelet-free plasma of children with sickle cell disease using functional assays. *Thromb. Res.* **2012**, *130*, 259–264. [[CrossRef](#)]
40. Tripodi, A. Modified endogenous thrombin potential with results expressed as ratio of values with-to-without thrombomodulin. *Thromb. Haemost.* **2017**, *117*, 830–836. [[CrossRef](#)]
41. White, R.H.; Zhou, H.; Gage, B.F. Effect of age on the incidence of venous thromboembolism following major surgery. *J. Thromb. Haemost.* **2004**, *2*, 1327–1333. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. White, R.H.; Zhou, H.; Murin, S.; Harvey, D. Effect of ethnicity and gender on the incidence of venous thromboembolism in a diverse population in California. *Thromb. Haemost.* **2005**, *93*, 298–305. [[PubMed](#)]
43. Roberts, L.N.; Patel, R.K.; Chitongo, P.; Bonner, L.; Arya, R. African-Caribbean ethnicity is associated with a hypercoagulable state as measured by thrombin generation. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **2013**, *24*, 40–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



7.3 Utilisation d'un test de viscoélasticité (ROTEM) en chirurgie cardiaque et plus précisément pédiatrique pour déterminer la dose minimale d'acide tranexamique nécessaire pour inhiber la fibrinolyse

CE: Swati; EJA-D-15-00217; Total nos of Pages: 7;

EJA-D-15-00217

EJA

Eur J Anaesthesiol 2015; **32**:1–7

ORIGINAL ARTICLE

Effective tranexamic acid concentration for 95% inhibition of tissue-type plasminogen activator induced hyperfibrinolysis in children with congenital heart disease

A prospective, controlled, in-vitro study

Laurence Rozen, David Faraoni, Cristel Sanchez Torres, Ariane Willems, Denis C.F. Noubouossie, Dragos Barglazan, Philippe Van der Linden and Anne Demulder

BACKGROUND Although recent studies have assessed tranexamic acid (TXA) pharmacokinetics in different subgroups, the effective concentration of TXA required to completely inhibit fibrinolysis remains to be determined.

OBJECTIVE An in-vitro determination of the effective TXA concentration needed for 95% inhibition (EC95) of tissue-type plasminogen activator (t-PA) activated fibrinolysis, using an experimental model designed for thromboelastometry (ROTEM).

DESIGN A prospective interventional study.

SETTING Department of Anaesthesiology, Queen Fabiola Children's University Hospital and Laboratory of Haematology and Haemostasis, Brugmann University Hospital. Patients were enrolled between June 2013 and October 2014.

PATIENTS AND VOLUNTEERS Twenty children, aged between 1 and 10 years, undergoing elective cardiac catheterisation were included (10 with cyanotic and 10 with noncyanotic diseases). Exclusion criteria were child requiring a procedure in a moribund state. Ten adult volunteers were also included as controls.

INTERVENTION Citrated whole blood samples were obtained from children and volunteers.

MAIN OUTCOMES MEASURES The extrinsic coagulation pathway was activated by tissue factor using the EXTEM test on ROTEM. The degree of lysis measured 30 min (LI30) after the clotting time (CT), and clot amplitudes measured at different times were recorded at baseline, after addition of 1535 units t-PA ml⁻¹, and following the addition of increasing TXA concentrations in t-PA activated samples.

RESULTS The concentration-effect analysis performed with lysis index after 30 min (LI30) allowed the determination of TXA efficacy concentration 50% (EC50), and calculation of the EC95, which was significantly lower in cardiac surgery children than in adults [8.6 µg ml⁻¹; 95% confidence interval (95% CI) 6.9 to 14.9 versus 11.3 µg ml⁻¹; 95% CI 10.6 to 12.9, $P < 0.001$].

CONCLUSION In this in-vitro study, we observed that the EC95 TXA concentration that completely inhibited t-PA induced hyperfibrinolysis in children with congenital heart was significantly lower than the concentration required in healthy adult volunteers. Further studies are needed to confirm that this plasma concentration can effectively inhibit fibrinolysis activation in children undergoing cardiac surgery.

Published online xx month 2015

Introduction

The lysine analogue tranexamic acid (TXA) is a synthetic amino acid that inhibits activation of plasminogen to plasmin through reversible blocking of the plasminogen

lysine binding site and the heavy chain of plasmin, leading to an inhibition of plasminogen-induced fibrin degradation.¹ This antifibrinolytic agent is routinely

From the Laboratory of Haemostasis, Brugmann University Hospital, Université libre de Bruxelles ULB, Brussels, Belgium (LR, DCFN, AD), Department of Anaesthesiology, Peri-operative and Pain Medicine, Boston Children's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA (DF), Department of Anaesthesiology, Queen Fabiola Children's University Hospital (CST, PVDL), Paediatric Intensive Care Unit, Queen Fabiola Children's Hospital (AW), and Chemistry Laboratory, Brugmann University Hospital, Université libre de Bruxelles ULB, Brussels, Belgium (DB)

Correspondence to Laurence Rozen, Laboratory of Haematology and Haemostasis, CHU Brugmann, 4 Place Arthur Van Gehuchten, 1020 Brussels, Belgium
Tel: +32 24772921; fax: +32 24772166; e-mail: laurence.rozen@chu-brugmann.be

0265-0215 Copyright © 2015 European Society of Anaesthesiology. All rights reserved.

DOI:10.1097/EJA.0000000000000316

administered as a prophylactic or as first-line therapy in different bleeding contexts such as trauma, cardiac surgery and postpartum haemorrhage, to inhibit fibrinolysis activation, limiting blood loss and transfusion of blood products.²⁻⁴

Coagulopathy induced during cardiopulmonary bypass (CPB) is complex and multifactorial. Those factors recognised to have a role include heparin administration, both protamine under and over-dosage, haemodilution, consumption of clotting factors, platelet dysfunction and increased fibrinolytic activity.^{5,6} Although the pharmacokinetic properties of TXA have been recently studied in children undergoing cardiac surgery,^{7,8} the ideal TXA concentration required to completely inhibit fibrinolysis remains to be determined.⁹

In a recent study, we described an in-vitro model of tissue-type plasminogen activator (t-PA) induced hyperfibrinolysis designed for thromboelastometry (ROTEM® delta; Tem-International, Munich, Germany).¹⁰ The addition of increasing t-PA concentration was associated with a gradual increase in hyperfibrinolysis, characterised by a reduction of clot firmness and premature breakdown of the clot. The application of this model after CPB during TXA infusion confirmed that TXA completely abolished the fibrinolysis response to t-PA.

The aim of this in-vitro study was to investigate the EC95 TXA concentration needed to inhibit t-PA induced hyperfibrinolysis, using our experimental model of hyperfibrinolysis¹⁰ in children with congenital heart disease and in healthy adult volunteers.

Materials and methods

This study was approved by the local Ethics Committee of Queen Fabiola Children's University Hospital, QFCUH, 15 Avenue J J Crocq, 1020 Brussels, Belgium (CEH no. 09/13, accepted on 28 May 2013).

We obtained written informed consent from all adults and all parents of children included in this study.

Healthy adult volunteers

Five female and five male healthy adult volunteers, free of any history of coagulation disorder and also drugs that might interfere with platelet function and coagulation, were recruited.

Children with congenital heart disease

Twenty children, aged between 1 and 10 years, undergoing elective cardiac catheterisation as part of the diagnosis and treatment of their congenital heart disease were included (10 cyanotic and 10 noncyanotic disease). Exclusion criteria were a moribund state [American Society of Anesthesiology (ASA) 5], Jehovah's witness faith and presence of coagulopathy defined as platelet count less than $150 \times 10^9 l^{-1}$, prothrombin time (PT) less than 70% [or international normalised ratio (INR) >1.31],

activated partial thromboplastin time (aPTT) more than 33 s and fibrinogen level less than $1.50 g l^{-1}$. General anaesthesia was standardised during the study period and followed departmental protocols.

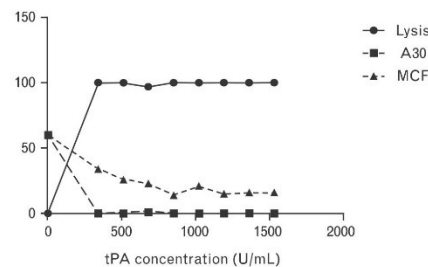
Sample collection and handling

Venipuncture in adults was performed using a butterfly 21-gauge needle. In children, blood samples were drawn from an indwelling arterial catheter inserted by the cardiologist after appropriate rejection of the dead space. Blood was collected into citrated tubes (BD Vacutainer® Plus plastic citrated tube; BD, Plymouth, UK) and samples were kept at room temperature and analysed soon after collection.

Rotational thromboelastometry

Blood samples were analysed under the following conditions: native whole blood (baseline), after addition of $1535 U ml^{-1}$ t-PA (Alteplase, Actilyse, Boehringer Ingelheim Internation GmbH, Ingelheim am Rhein, Germany) and increasing TXA concentrations (0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 50, $100 \mu g ml^{-1}$) (Exacyl, Sanofi Aventis, France). Different TXA concentrations were used, allowing the addition of a minimal TXA volume (1.7 to $13.6 \mu l$) to t-PA (0 or $9 \mu l$) and to whole blood sample (284.2 to $300 \mu l$), limiting the haemodilution effect of whole blood to 5% in the constant volume. The high t-PA concentration was used to induce maximal fibrinolysis, mimicking a catastrophic situation, based on the model validated on blood samples of children undergoing cardiac surgery and of healthy adult volunteers (Fig. 1). t-PA was diluted in normal saline (0.9% sodium

Fig. 1



Determination of tissue-type plasminogen activator concentration inducing maximal fibrinolysis in adults: after adding increasing concentrations of t-PA, we observed a decreased amplitude of MCF and an increase of the lysis. We observed a maximal lysis at $1000 U t-PA ml^{-1}$, mimicking catastrophic lysis. We choose a t-PA concentration of $1535 U t-PA ml^{-1}$ because we observed variability between adults: some samples needing a higher t-PA concentration than others. This concentration was also validated for children in a previous study.¹⁰ The following experiments were done with this concentration of $1535 U t-PA ml^{-1}$. A30, clot amplitude at 30 min; MCF, maximum clot firmness.

Table 1 Personal and clinical characteristics of adults and children

Variables	Adults (n = 10)	Children (n = 20)	P
Weight (kg)	Not measured	15 (11 to 19)	
Height (m)	Not measured	0.965 (0.69 to 1.15)	
Male:female	5:5	11:9	
ASA 2 (%)	NA	10 (50%)	
ASA 3 (%)	NA	10 (50%)	
ASD	NA	4 (20%)	
GLENN	NA	4 (20%)	
Pulmonary stenosis dilatation	NA	2 (10%)	
Aortic stenosis	NA	2 (10%)	
PDA	NA	2 (10%)	
Other	NA	4 (20%)	
Hb (g dl ⁻¹)	13.2 (12.8 to 14.6)	13.2 (12.3 to 15.4)	0.9797
	Cyanotic; noncyanotic	15.2 (14.1 to 18.3); 12.4 (11.6 to 13.1)	0.0013**
PLT count (x10 ⁹ l ⁻¹)	236 (188 to 261)	337 (318 to 425)	0.0002***
Fibrinogen (g l ⁻¹)	3.11 (2.79 to 3.64)	3.31 (2.77 to 3.52)	1
PT (%)	85 (80.8 to 93)	95 (85 to 100)	0.0578
PT (INR)	1.09 (1.03 to 1.12)	1.03 (1 to 1.1)	0.1278
aPTT (s)	31.8 (30.5 to 33.7)	31.1 (29.9 to 32.7)	0.5525

aPTT, activated partial thrombin time; ASA, American Society of Anesthesiology; ASD, atrial septal defect; GLENN, bidirectional cavo-pulmonary connection; Hb, haemoglobin; NA, not applicable; PDA, patent ductus arteriosus; PLT, platelet; PT, prothrombin time; ** : p value 0.001 to 0.01 ; *** : p value < 0.001.

chloride) to obtain a final concentration of 1535 U ml⁻¹ t-PA. Due to variability observed between adults, we choose this high t-PA concentration to ensure maximal fibrinolysis in all adults. This concentration had also been validated for children in a previous study.¹⁰ The extrinsic pathway of coagulation was activated by tissue factor using ex-tem reagent on the ROTEM thromboelastometer (Tem Innovations GmBH, Munich, Germany). The following variables were recorded: the clot amplitude measured after 30 min (A30) and the lysis index 30 (LI30) corresponding to the percentage of remaining clot stability in relation to the maximum clot firmness (MCF) value at 30 min after clotting time (CT) is detected.

Statistical analyses

Continuous personal data are reported as median and interquartile range (IQR). Nonparametric tests were used due to the small data sets. Mann–Whitney *U* test was used to compare children and adult variables. Discrete variables are presented as number and percentage.

A two-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures was used to compare the different experimental conditions and the difference between adults, children with cyanotic and noncyanotic heart diseases.

Concentration–effect sequences were used to determine TXA concentration leading to the inhibition of t-PA induced hyperfibrinolysis. After logarithmic transformation and normalisation, LI30 was modelled as a function of TXA concentration using nonlinear regression. The probability of 50% (EC50) efficacy and the 95% confidence intervals (95% CIs) were obtained, while the EC95 and its 95% CI were calculated from the EC50. These values were used to calculate the TXA concentration required to achieve the return of ROTEM variables to baseline in 50 and 95%, respectively, of the studied population. Statistical analyses were performed with

Graph Pad Prism version 5 for XP and Graph Pad Prism version 6 for Mac OS (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA). A *P* value less than 0.05 was considered statistically significant for all comparisons.

Results

Personal data are summarised in Table 1. Higher platelet counts were observed in children compared with healthy adult volunteers (*P* < 0.001), although no statistical difference was reported for haemoglobin levels, haematocrit, PT, aPTT and fibrinogen concentration. No statistical difference was reported for age distribution between children with cyanotic and noncyanotic diseases. As expected, those with cyanotic disease had a statistically higher haemoglobin level and haematocrit.

ROTEM profile curve at different tranexamic acid concentrations

At baseline, before addition of t-PA and TXA, ROTEM variables and curve were normal (Fig. 2a). The addition of 1535 U ml⁻¹ t-PA was associated with massive hyperfibrinolysis, characterised by the absence of any clot formation (Fig. 2b). After addition of increasing TXA concentrations, ROTEM variables and curves gradually returned to baseline (Fig. 2c to 2l).

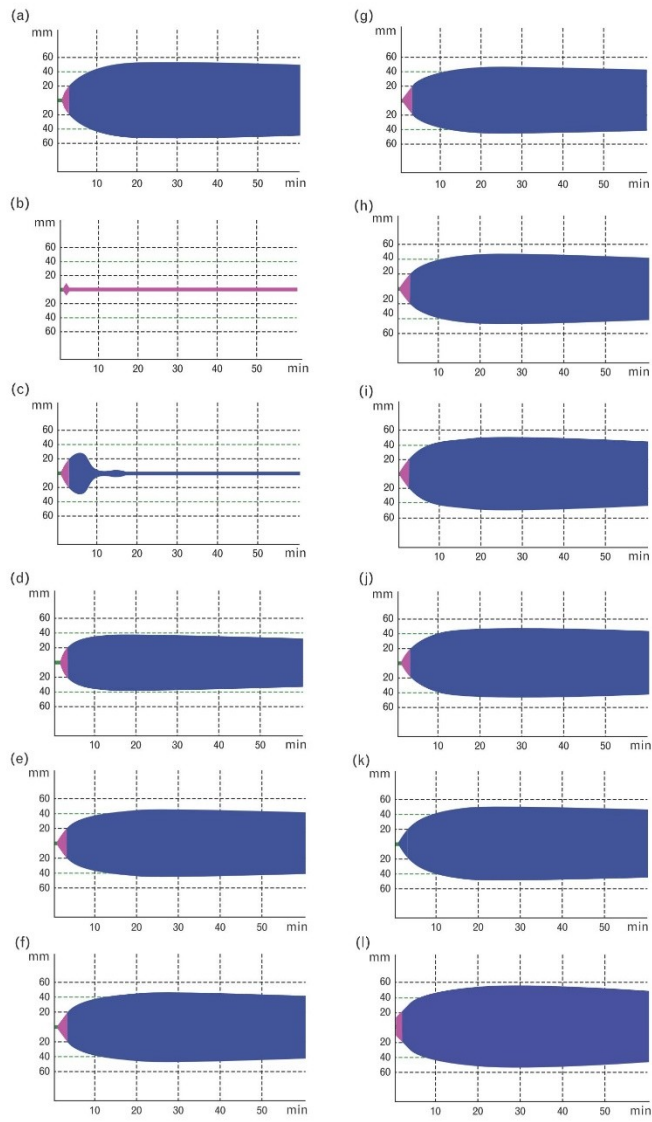
Determination of effective tranexamic acid concentrations inhibiting maximal fibrinolysis

Figure 3 represents the relationship between A30 (Fig. 3a) or LI30 (Fig. 3b) values, expressed as a percentage of baseline, and the increasing TXA concentrations. The addition of TXA reversed t-PA induced fibrinolysis.

Tranexamic acid concentration effect on clot lysis at 30 min

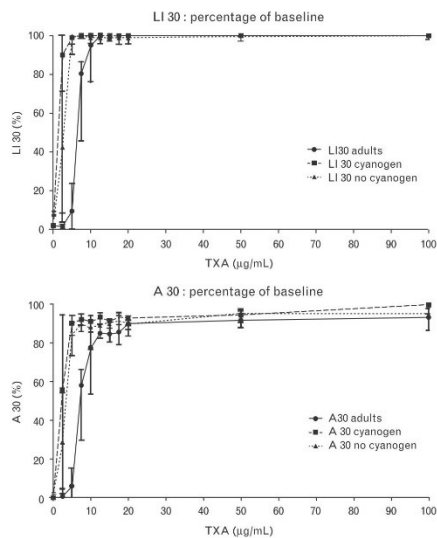
The TXA concentration–effect allowed the determination of the EC50 and the calculation of the EC95

Fig. 2



EXTEM tests in absence of any t-PA and TXA (a), with only t-PA (b), with t-PA along with TXA (2.5 to 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) (c to l).

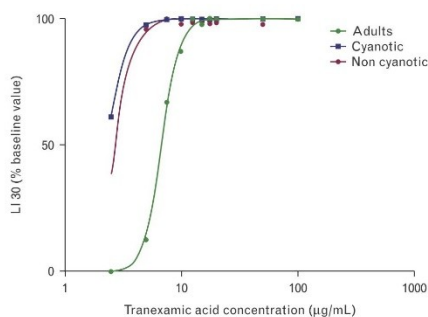
Fig. 3



Lysis index (LI30) and amplitude (A30) after 30 min. Values expressed as percentage of baseline, at different TXA concentrations, for adults and children.

for the LI30 (Fig. 4). For adults, EC50 was $6.8 \mu\text{g ml}^{-1}$ (95% CI 6.4 to 7.2) and EC95 was $11.3 \mu\text{g ml}^{-1}$ (95% CI 10.6 to 12.9). For children with congenital heart disease, EC50 was $2.8 \mu\text{g ml}^{-1}$ (95% CI 2.6 to 3) and EC95

Fig. 4



Concentration-effect relationship for tranexamic acid inhibiting hyperfibrinolysis on lysis index measured after 30 min (LI30).

$8.6 \mu\text{g ml}^{-1}$ (95% CI 6.9 to 14.9). The values for EC95 in children and adults were significantly different ($P < 0.001$); a 31% higher TXA concentration was needed to inhibit t-PA induced fibrinolysis in adults than children with congenital heart disease. No statistical difference between children with a cyanotic and noncyanotic disease was observed ($P = 0.179$).

Discussion

In this in-vitro study, we observed that the TXA concentration required to inhibit 95% of t-PA induced hyperfibrinolysis in children with a congenital heart disease was $8.6 \mu\text{g ml}^{-1}$, which was significantly lower than the concentration required in healthy adult volunteers.

Antifibrinolytic agents have been used for a long time in adults and children undergoing cardiac surgery. Prophylactic TXA administration has been shown to significantly decrease perioperative bleeding and the requirement for blood product transfusion. In a recent systematic review, a huge variability between the doses used in different studies was reported, with loading doses and repeated boluses ranging from 10 to 100 mg kg^{-1} , followed or not by different rates of continuous infusion.¹¹ This huge difference could be easily explained by the fact that, until recently, the pharmacokinetic characteristics of TXA were unknown in children. As a consequence, TXA dose schemes were arbitrarily extrapolated from the adult reports. Because recent studies have reported an increased, and dose-dependent incidence of clinical seizures in adults^{12,13} and children¹⁴ undergoing open-heart procedures, there is a need for further studies to determine the TXA dose that offers the best benefit-to-risk balance between bleeding reduction and incidence of side effects.

Although the pharmacokinetic properties of TXA have been recently reported in children undergoing cardiac surgery,^{7,8} the ideal plasma concentration that would maximally inhibit fibrinolysis has not been identified. On the basis of the initial investigations of Andersonn *et al.*¹⁵ at the end of the 1970s, a TXA concentration of $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ would be required to achieve 100% inhibition of fibrinolytic activity, although a TXA concentration of 10 to $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ would be needed to achieve 80% inhibition of tissue plasminogen activator. In another study, Dowd *et al.*¹⁶ suggested that a TXA plasma concentration greater than $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ should be maintained for adults undergoing cardiac surgery. However, none of these studies assessed the plasma concentration needed to completely inhibit fibrinolysis in children undergoing cardiac surgery.

Recently, the TXA concentration needed to inhibit t-PA activated fibrinolysis was determined on pooled neonatal and adult plasma using thromboelastography.¹⁷ In this study, Yee *et al.*¹⁷ observed that a higher TXA concentration was required to prevent fibrinolysis in adult plasma ($17.5 \mu\text{g ml}^{-1}$) than neonatal cord blood ($6.54 \mu\text{g ml}^{-1}$). Although we observed the same difference between adults

and children, our results are not comparable because our in-vitro model was performed on whole blood, including the cellular components, with individual samples obtained from children with congenital heart disease and healthy volunteers and not on pooled plasma from cord blood of healthy neonates. Of note, the use of pooled plasma excluded the influence of the cellular components of whole blood, especially red blood cells and platelets.

This study presents some limitations. First, the ideal TXA concentration obtained in our in-vitro model should be interpreted with caution, and its effectiveness to inhibit in-vivo fibrinolysis activation requires validation in a larger cohort of children undergoing cardiac surgery. Because thromboelastometry and thromboelastography are not sensitive to fibrinolysis,¹⁸ we used an in-vitro model of hyperfibrinolysis by adding a high level of t-PA to sensitise the ROTEM to the neutralisation of TXA. Second, this in-vitro model does not take into account the vascular phase and the specific physiologic modifications resulting from surgical trauma, hypothermia and contact between blood and nonendothelial surface that all could lead to fibrinolysis activation. The differences we found between adults and children could also be explained by increased haemostatic tendencies associated with age.¹⁹ Although platelet counts, haemoglobin, fibrinogen, PT and aPTT were normal before surgery, platelets counts were significantly higher in the children's cohort.²⁰ However, this higher platelet count did not confer a higher ROTEM profile at baseline, as no significant difference was found regarding lysis and clot firmness values. Furthermore, plasmin generation and fibrinolytic activity are decreased during childhood compared with adults in healthy situations, due to a lower level of t-PA and plasminogen and a higher level of plasminogen activator inhibitor-1.^{21,22} As a consequence, the higher dose of TXA needed to neutralise t-PA fibrinolysis in adults may reflect a higher basal fibrinolysis level. Nevertheless, the fact that we used a very high dose of t-PA to induce fibrinolysis may have reduced the difference between children and adults. During cardiac surgery, and especially during CPB, the situation is different: endothelium will be injured through prolonged contact with an artificial surface. In addition, patients are heparinised and hypothermic. Fibrinolysis is activated due to t-PA release from vascular walls. The comparison between adults and children is more difficult, as there have been no comparisons during CPB. In adults, t-PA, D-dimer, t-PA-PAI-1 complex increase, and PAI-1 decreases.^{23–25} In children, Eisses and Chandler²⁶ showed thrombin generation and fibrin degradation during CPB. t-PA increased during CPB but to a lower extent in infants. In children under 6 years of age, Ignjatovic *et al.*²⁷ failed to observe any change in plasmin generation, even if plasminogen, PAI-1 and fibrinogen decreased. Furthermore the haemostatic profile in neonates is more prothrombotic than in older children,²⁸ and the increase of t-PA lower.²⁶

Eur J Anaesthesiol 2015; **32**:1–7

In conclusion, this in-vitro study confirmed that our experimental model of t-PA induced fibrinolysis could be used to determine the ideal TXA concentration needed to inhibit fibrinolysis in children undergoing cardiac surgery. The TXA concentration that completely inhibited t-PA induced hyperfibrinolysis was significantly lower in children with congenital heart disease than healthy adult volunteers. As laboratory tests evaluating fibrinolysis remain time-consuming and poorly standardised, this in-vitro model could be a promising tool with which to analyse and monitor patients receiving TXA. Further studies are needed to confirm that this target concentration effectively inhibits fibrinolysis in children undergoing cardiac surgery with CPB.

Acknowledgements relating to this article

Assistance with the article: the authors thank Myriam Faklan and Progene Zillimwabagabo for their technical help.

Financial support and sponsorship: this work was attributed to and solely supported by the Department of Anaesthesiology, Queen Fabiola Children's University Hospital (QFCUH), Brussels, Belgium.

Conflicts of interest: none.

Presentation: preliminary results of this study were presented as an oral communication at the British Society of Haemostasis and Thrombosis/Belgian Society of Thrombosis and Haemostasis BSHT/BSTH Joint Meeting, Nottingham, 10 to 11 October 2013. The final results were presented during the 2015 Euroanaesthesia (ESA) meeting in Berlin.

References

- Dunn CJ, Goa KL. Tranexamic acid: a review of its use in surgery and other indications. *Drugs* 1999; **57**:1005–1032.
- Faraoni D, Carlier C, Samama CM, *et al.* Efficacy and safety of tranexamic acid administration for the prevention and/or the treatment of postpartum haemorrhage: a systematic review with meta-analysis. *Ann Fr Anesth Reanim* 2014; **33**:563–571.
- Eaton MP. Antifibrinolytic therapy in surgery for congenital heart disease. *Anesth Analg* 2008; **106**:1087–1100.
- Faraoni D, Willems A, Melot C, *et al.* Efficacy of tranexamic acid in paediatric cardiac surgery: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cardiothorac Surg* 2012; **42**:781–786.
- Arnold P. Treatment and monitoring of coagulation abnormalities in children undergoing heart surgery. *Paediatr Anaesth* 2011; **21**:494–503.
- Woodman RC, Harker LA. Bleeding complications associated with cardiopulmonary bypass. *Blood* 1990; **76**:1680–1697.
- Grassin-Delyle S, Couturier R, Abe E, *et al.* A practical tranexamic acid dosing scheme based on population pharmacokinetics in children undergoing cardiac surgery. *Anesthesiology* 2013; **118**:853–862.
- Wesley M, Pereira L, Scharp L, *et al.* Pharmacokinetics of tranexamic acid in neonates, infants, and children undergoing cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology* 2015; **122**:746–758.
- Faraoni D, Goobie SM. New insights about the use of tranexamic acid in children undergoing cardiac surgery: from pharmacokinetics to pharmacodynamics. *Anesth Analg* 2013; **117**:760–762.
- Faraoni D, Rozen L, Willems A, *et al.* Experimental model of hyperfibrinolysis designed for rotational thromboelastometry in children with congenital heart disease. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2015; **26**:290–297.
- Faraoni D, Goobie SM. The efficacy of antifibrinolytic drugs in children undergoing noncardiac surgery: a systematic review of the literature. *Anesth Analg* 2014; **118**:628–636.
- Koster A, Bürgermann J, Zittermann A, *et al.* Moderate dosage of tranexamic acid during cardiac surgery with cardiopulmonary bypass and convulsive seizures: incidence and clinical outcome. *Br J Anaesth* 2013; **110**:34–40.

- 13 Sharma V, Fan J, Jerath A, *et al*. Pharmacokinetics of tranexamic acid in patients undergoing cardiac surgery with use of cardiopulmonary bypass. *Anaesthesia* 2012; **67**:1242–1250.
- 14 Martin K, Breuer T, Gertler R, *et al*. Tranexamic acid versus ϵ -aminocaproic acid: efficacy and safety in paediatric cardiac surgery. *Eur J Cardiothorac Surg* 2011; **39**:892–897.
- 15 Andersson I, Eriksson O, Hedlund PO, *et al*. Special considerations with regard to the dosage of tranexamic acid in patients with chronic renal diseases. *Urol Res* 1978; **6**:83–88.
- 16 Dowd NP, Karski JM, Cheng DC, *et al*. Pharmacokinetics of tranexamic acid during cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology* 2002; **97**:390–399.
- 17 Yee BE, Wissler RN, Zanghi CN, *et al*. The effective concentration of tranexamic acid for inhibition of fibrinolysis in neonatal plasma in vitro. *Anesth Analg* 2013; **117**:767–772.
- 18 Raza I, Davenport R, Rourke C, *et al*. The incidence and magnitude of fibrinolytic activation in trauma patients. *J Thromb Haemost* 2013; **11**:307–314.
- 19 Monagle P, Barnes C, Ignjatovic V, *et al*. Developmental haemostasis. Impact for clinical haemostasis laboratories. *Thromb Haemost* 2006; **95**:362–372.
- 20 Giacomini A, Legovini P, Gessoni G, *et al*. Platelet count and parameters determined by the Bayer ADVIA 120 in reference subjects and patients. *Clin Lab Haematol* 2001; **23**:181–186.
- 21 Parmar N, Albisetti M, Berry LR, *et al*. The fibrinolytic system in newborns and children. *Clin Lab* 2006; **52**:115–124.
- 22 Albisetti M. The fibrinolytic system in children. *Semin Thromb Hemost* 2003; **29**:339–348.
- 23 Paparella D, Brister SJ, Buchanan MR. Coagulation disorders of cardiopulmonary bypass: a review. *Intensive Care Med* 2004; **30**:1873–1881.
- 24 Hartmann M, Sucker C, Boehm O. Effects of cardiac surgery on hemostasis. *Transfus Med Rev* 2006; **20**:230–241.
- 25 Valen G, Eriksson E, Risberg B, Vaage J. Fibrinolysis during cardiac surgery. Release of tissue plasminogen activator in arterial and coronary sinus blood. *Eur J Cardiothorac Surg* 1994; **8**:324–330.
- 26 Eisses MJ, Chandler WL. Cardiopulmonary bypass parameters and hemostatic response to cardiopulmonary bypass in infants versus children. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2008; **22**:53–59.
- 27 Ignjatovic V, Chandramouli A, Than J, *et al*. Plasmin generation and fibrinolysis in pediatric patients undergoing cardiopulmonary bypass surgery. *Pediatr Cardiol* 2012; **33**:280–285.
- 28 Edwards RM, Naik-Mathuria BJ, Gay AN, *et al*. Parameters of thromboelastography in healthy newborns. *Am J Clin Pathol* 2008; **130**:99–102.

- 1 Cito S, Mazzeo MD, Badimonc L. A review of macroscopic thrombus modeling methods. *Thrombosis Research*. 2013;131:116–124.
- 2 Butenas S, Mann KG. Blood coagulation. *Biochemistry*. 2002;67:3-12.
- 3 Tomaiuolo M, Brass LF, Stalker TJ. Regulation of Platelet Activation and Coagulation and its role in Vascular Injury and Arterial Thrombosis. *Interv Cardiol Clin*. 2017;6:1-12.
- 4 Winter W, Flax S, Harris N. Coagulation testing in the Core Laboratory. *Lab Medicine*. 2017;48:295-313.
- 5 Bruce Furie, Barbara C. Furie. Mechanisms of Thrombus Formation. *N Engl J Med*. 2008;359:938-949.
- 6 Newman PJ, Newman DK. Platelets and the vessel wall. In: Orkin SH, Nathan DG, Ginsburg D, Look AT, Fisher DE, Lux SE, eds. *Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood*. 7th ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier;2009:1379-1398.
- 7 Eble JA, Niland S. The extracellular matrix of blood vessels. *Curr Pharm Des*.2009;15:1385-400.
- 8 Harrison P. Chapter 5 in *Practical hemostasis and thrombosis*. N. Key, M.Makris, D. O'Shaughnessy, D. Lillicrap, – 2nd ed. 2009 – Blackwell Publishing Ltd.
- 9 Wachowicz B, Morel A, Miller E, Saluk J. The physiology of blood platelets and changes of their biological activities in multiple sclerosis. *Acta Neurobiol Exp (Warsz)*.2016;76:269-81.
- 10 Watson S, Harrison P. The vasculature function of platelets in Hoffbrand V, Tuddenham E, Catovsky D, eds *Postgraduate Haematology (5th Edition)*, Oxford Blackwell, 2005:813.
- 11 Ghoshal K, Bhattacharyya M. Overview of platelet physiology: its hemostatic and non hemostatic role in disease pathogenesis. *Scientific World Journal*. 2014:781857.
- 12 Walford G, Loscalzo J. Nitric oxide in vascular biology. *J Thromb Haemost JTH*. 2003;1:2112-8.
- 13 Fox JE, Reynolds CC, Morrow JS, Phillips DR. Spectrin is associated with membrane-bound actin filaments in platelets and is hydrolyzed by the Ca²⁺-dependent protease during platelet activation. *Blood*. 1987;69:537-45.
- 14 Gremmel T, Frelinger AL, Michelson AD. Platelet Physiology. *Semin Thromb Hemost*. 2016;42:191-204.
- 15 Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:5193-7.
- 16 Kobayashi T, Ushikubi F, Narumiya S. Amino acid residues conferring ligand binding properties of prostaglandin I and prostaglandin D receptors. Identification by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*. 2000;275(32):24294-303.
- 17 Hartwig JH, Barkalow K, Azim A, Italiano J. The elegant platelet: signals controlling actin assembly. *Thromb. Haemost*.1999;82392-398.
- 18 Crespín M, Vidal C, Picard F, Lacombe C, Fontenay M. Activation of PAK1/2 during the shedding of platelet microvesicles. *Blood Coagul. Fibrinolysis*.2009;20:63-70.

- 19 Sadoul K. New explanations for old observations: marginal band coiling during platelet activation. *J Thromb Haemost.* 2015;13:333-46.
- 20 Lhermusier T, Chap H, Payrastre B. Platelet membrane phospholipid asymmetry: from the characterization of a scramblase activity to the identification of an essential protein mutated in Scott syndrome. *J Thromb Haemost JTH.* 2011;9:1883-91.
- 21 Flaumenhaft R. Platelet secretion. In: Michelson AD ed. *Platelets*, 3rd ed. San Diego: Elsevier/Academic Press;2013:343–366.
- 22 Youssefian T, Cramer EM. Megakaryocyte dense granule components are sorted in multivesicular bodies. *Blood.* 2000;95:4004–4007.
- 23 Dean GE, Fishkes H, Nelson PJ, Rudnick G. The hydrogen ionpumping adenosine triphosphatase of platelet dense granule membrane. Differences from F1F0- and phosphoenzyme-type ATPases. *J Biol Chem.* 1984;259:9569–9574.
- 24 Youssefian T, Massé JM, Rendu F, Guichard J, Cramer EM. Platelet and megakaryocyte dense granules contain glycoproteins Ib and IIb-IIIa. *Blood* 1997;89(11):4047–4057.
- 25 South K, Freitas MO, Lane DA. A Model for the Conformational Activation of the Structurally Quiescent Metalloprotease ADAMTS13 by Von Willebrand Factor. *J Biol Chem.* 2017.
- 26 Löf A, Müller JP, Brehm MA. A Biophysical View on von Willebrand Factor Activation. *J Cell Physiol.* 2017.
- 27 Thon JN, Italiano JE. Platelets: production, morphology and ultrastructure. *Handb Exp Pharmacol.* 2012;210:3-22.
- 28 Bearer EL, Prakash JM, Li ZInt. Actin dynamics in platelets. *Rev Cytol.* 2002;217:137-82.
- 29 Siedlecki CA, Lestini BJ, Kottke-Marchant KK, Eppel SJ, Wilson DL, Marchant RE. Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. *Blood* 1996;88:2939-50.
- 30 Schneider SW, Nuschele S, Wixforth A, Gorzelanny C, Alexander-Katz A, Netz RR, Schneider MF. Shear-induced unfolding triggers adhesion of von Willebrand factor fibers. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104:7899-903.
- 31 Bergmeier W, Stefanini L. Novel molecules in calcium signaling in platelets. *J Thromb Haemost.* 2009;7(suppl1):187-90.
- 32 Varga-Szabo D, Braun A, Nieswandt B. STIM and Orai in platelet function. *Cell Calcium.* 2011;50:270-8.
- 33 Vu TK, Wheaton VI, Hung DT, Charo I, Coughlin SR. Domains specifying thrombin-receptor interaction. *Nature.* 1991;353:674-7.
- 34 Suzuki J, Umeda M, Sims PJ, Nagata S. Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature* 2010;468:834-8.
- 35 Castoldi E, Collins PW, Williamson PL, Bevers EM. Compound heterozygosity for 2 novel TMEM16F mutations in a patient with Scott syndrome. *Blood.* 2011;117:4399-400.

- 36 Nieswandt B, Varga-Szabo D, Elvers M. Integrins in platelet activation. *J Thromb Haemost.* 2009;Suppl1:206-9.
- 37 Kasirer-Friede A, Kang J, Kahner B, Ye F, Ginsberg MH, Shattil SJ. ADAP interactions with talin and kindlin promote platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ activation and stable fibrinogen binding. *Blood.* 2014;123:3156-65.
- 38 Stalker TJ, Welsh SD, Brass LF. Shaping the platelet response to vascular injury. *Curr Opin Hematol.* 2014;21:410-7.
- 39 Jin RC, Voetsch B, Loscalzo J. Endogenous mechanisms of inhibition of platelet function. *Microcirculation* 2005;12:247–58.
- 40 Fristma MG, Fristma GA. Normal hemostasis and coagulation. In: EM Keohnae, LJ Smith, JM Walenga. *Rodak's Hematology.* St. Louis, MI:Elsevier;2016:642-666.
- 41 Spadarella G, Di Minno A, Milan G, Franco N, Polimeno M, Castaldo F, Di Minno G. Paradigm shift for the treatment of hereditary haemophilia: Towards precision medicine *Blood Reviews.* Volume 39, 100618.
- 42 Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin polymerization and functions. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1999, 10 Suppl 1, S45-8.
- 43 Medved L, Weisel JW, Fibrinogen and Factor XIII Subcommittee of Scientific Standardization Committee of International Society on Thrombosis and Haemostasis. Recommendations for nomenclature on fibrinogen and fibrin. *J Thromb Haemost.* 2009;7:355–9.
- 44 Greenberg CS, Birckbichler PJ, Rice RH. Transglutaminases: multifunctional crosslinking enzymes that stabilize tissues. *FASEB J*, 1991,5, 3071-7.
- 45 Chapin JC, Hajjar KA. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Rev.* 2015;29:17-24.
- 46 Francis CW, Markhamr E, Marder VJ. Demonstration of in situ fibrin degradation in pathologic thrombi. *Blood.* 1984;63,5:1216-1224.
- 47 Bachmann F. "Fibrinolysis" dans "Thrombosis and Haemostasis", Verstraete M, Vermylen J, Lijnen H.R, Arnout J, Louvain: International Society on Thrombosis and Haemostasis and Leuven University Press, 227-265, 1987.
- 48 Collen D, Lijnen HR. Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood.* 1991;78:3114-3124.
- 49 Faure. Fibrinolytiques. *Actualités Pharmaceutiques* 2014;53:53-56.
- 50 Bagot CN, Arya R. Virchow and his triad: a question of attribution. *Br J Haematol.* 2008;143:180-90.
- 51 Kushner A, West WP, Pillarisetty LS. Virchow Triad. *Book StatPearls.* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing;2020-. Last update 2019 Mar 27.
- 52 Salles II, Feys HB, Iserbyt BF, De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H. Inherited traits affecting platelet function. *Blood Rev.* 2008;22:155-72
- 53 Lippi G, Pasalic L, Favaloro EJ. Detection of mild inherited disorders of blood coagulation: current options and personal recommendations. *Expert Rev Hematol.*

2015;8:527-542.

54 Longo D. Von Willebrand's Disease. *N Engl J Med* 2016;375:2067-80.

55 Leebeek F, Eikenboom J. Von Willebrand's Disease. *N Engl J Med* 2016;375:2067-80.

56 Iorio A, Stonebraker JS, Chambost H, Makris M, Coffin D, Herr C, Germini F; Data and Demographics Committee of the World Federation of Hemophilia. Establishing the Prevalence and Prevalence at Birth of Hemophilia in Males: A Meta-analytic Approach Using National Registries. *Ann Intern Med.* 2019;171:540-546.

57 Srivastava A, Brewer AK, Mauser-Bunschoten EP, Key NS, Kitchen S, Llinas A, Ludlam CA, Mahlangu JN, Mulder K, Poon MC, Street A. Guidelines for the management of hemophilia. *Haemophilia* 2013;19:e1-47.

58 Palla R, Peyvandi F, Shapiro AD. Rare bleeding disorders: diagnosis and treatment. *Blood.* 2015;125:2052-61.

59 Peyvandi F, Palla R, Menegatti M, Siboni SM, Halimeh S, Faeser B, Pergantou H, Platokouki H, Giangrande P, Peerlinck K, Celkan T, Ozdemir N, Bidlingmaier C, Ingerslev J, Giansily-Blaizot M, Schved JF, Gilmore R, Gadisseur A, Benedik-Dolničar M, Kitanovski L, Mikovic D, Musallam KM, Rosendaal FR; European Network of Rare Bleeding Disorders Group. Coagulation factor activity and clinical bleeding severity in rare bleeding disorders: results from the European Network of Rare Bleeding Disorders. *J Thromb Haemost.* 2012;10:615-621.

60 de Moerloose P, Casini A, Neerman-Arbez M. Congenital fibrinogen disorders: an update. *SeminThromb Hemost.* 2013;39(6):585-595.

61 Lak M, Keihani M, Elahi F, Peyvandi F, Mannucci PM. Bleeding and thrombosis in 55 patients with inherited afibrinogenaemia. *Br J Haematol.* 1999;107:204-206.

62 Franchini M. The utility of thrombophilia testing. *Clin Chem Lab Med.* 2014;52:495-7.

63 Ghosh SK, Bandyopadhyay D, Dutta A. Purpura fulminans: a cutaneous marker of disseminated intravascular coagulation. *West J Emerg Med.* 2009;10:41.

64 Heylen E, Van Goethem S, Willemse J, Olsson T, Augustyns K, Hendriks D. Development of a sensitive and selective assay for the determination of procarboxypeptidase U (thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor) in plasma. *Anal Biochem.* 2010;396:152-4.

65 De bruijne E, Gils A, Guimarães A, Dippel D, Deckers JW, Van den meiracker AH, Poldermans D, Rijken DC, Declerck PJ, de Maat MPM, Leebeek FWG. The role of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor in arterial thrombosis at a young age: the ATTAC study. *J Thromb Haemost.* 2009;7:919-27.

66 Mertens JC, Claesen K, Leenaerts D, Sim Y, Lambeir AM, Hendriks D. Inhibition of the procarboxypeptidase U (proCPU, TAFI, proCPB2) system due to hemolysis. *J Thromb Haemost.* 2019;17:878-84.

67 Amiral J, Seghatchian J. The contact system at the crossroads of various key pathophysiological functions: update on present understanding, laboratory exploration and future perspectives. *Transfus Apher Sci.* 2019;58:216-22.

- 68 Budkowska M, Lebiecka A, Marcinowska Z, Wozniak J, Jastrzebska M, Dolegowska B. The circadian rhythm of selected parameters of the hemostasis system in healthy people. *Thromb Res.* 2019;182:79–88.
- 69 Eriksson E, Tengborn L, Risberg B. The effect of various anticoagulant/antiplatelet mixtures on determination of plasminogen activator inhibitor, platelet proteins and hemostasis parameters. *Thromb Haemost.* 1989;61:511–6.
- 70 Soria C, Soria J, Mirshahi, Lu H, Faivre R, Neuhart E, Boucheix C. La mesure des D-dimères et son intérêt. *Sang Thromb. Vaiss*, 5, 1, 305-310, 1989.
- 71 Ilich A, Bokarev I, Key NS. Global assays of fibrinolysis. *Int J Lab Hematol.* 2017;39:441–7.
- 72 Chakrabarti R, Bielawiec M, Evans JF, Fearnley GR. Methodological study and a recommended technique for determining the euglobulin lysis time. *J Clin Pathol.* 1968;21:698–701.
- 73 Cash JD, Leask E. Automatic determination of euglobulin lysis time. *J Clin Pathol.* 1965;18:821–3.
- 74 Ilich A, Noubouossie DF, Henderson M, Ellsworth P, Betbadal KF, Campello E, Meeks S, Dunn, Park MS, Pawlinski R, Simioni P, Shapiro A, Key NS. Development and application of global assays of hyper- and hypofibrinolysis. *Res Pract Thromb Haemost.* 2020;4:46–53.
- 75 The Thrombogram Guide 2005 (Thrombinoscope B.V.).
- 76 Hemker HC, Wielders S, Kessels H, Béguin S. Continuous registration of thrombin generation in plasma, its use for the determination of the thrombin potential. *Thromb. Haemost.* 1993;70:617-624.
- 77 Hemker HC, Giesen PL, Ramjee M, Wagenvoord R, Béguin S. The thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma. *Thromb. Haemost.* 2000;83:589-591.
- 78 Hemker HC, Al Dieri R, Béguin S. *Current Opinion in Hematology* 11(2004) 170-175.
- 79 Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoord R, Lecompte T, Béguin S. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 2003;33:4–15.
- 80 De Smedt E, Al Dieri R, Spronk HMH, Hamulyak K, ten Cate H, Hemker HC. The technique of measuring thrombin generation with fluorogenic substrates: 1. Necessity of adequate calibration. *Thromb. Haemost.* 2008;100:343-349.
- 81 Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoord R, Lecompte T, Béguin. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 2002;32:249-253.
- 82 Duarte RCF, Ferreira CN, Rios DRA, Reis HJD, Carvalho MDG. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2017;39:259-265.
- 83 Pike GN, Cumming AM, Hay CRM, Bolton-Maggs PH, Burthem J. Sample conditions determine the ability of thrombin generation parameters to identify bleeding phenotype in FXI deficiency. *Blood.* 2015;126:397-405.

- 84 Berntorp E, Salvagno GL. Standardization and clinical utility of thrombin-generation assays. *Seminars in thrombosis and hemostasis*.2008;34:670-682.
- 85 Baglin T. The measurement and application of thrombin generation. *Brit J Haematol* 2005;130:653-61.
- 86 Al Dieri R, de Laat B, Hemker HC: Thrombin generation: what have we learned? *Blood Rev* 2012;26:197–203.
- 87 Hemker HC. Thrombin generation: biochemical possibilities and clinical reality. *Blood*. 2015;126:288-289.
- 88 Lecompte T, Wahl D, Régnault V. Thrombinographie. *Hématologie* 2006 ;12 :115–27.
- 89 Fischer AM, Tapon-Breaudière J, Bros A, Josso F. *Thrombosis and Haemostasis* 45 (1981) 51-54.
- 90 Hemker HC, Willems GM, Beguin S. *Thrombosis and Haemostasis* 33 (2003) 4-15.
- 91 Lipets En, Ataulakhanov FI. Global assays of hemostasis in the diagnostics of hypercoagulation and evaluation of thrombotic risk. *Thromb J*. 2015;13:4.
- 92 Wikkelsø A, Wetterslev J, Møller AM, Afshari A. Thromboelastography (TEG) or thromboelastometry (ROTEM) to monitor haemostatic treatment versus usual care in adults or children with bleeding. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016;22:CD007871.
- 93 Johansson PI, Stensballe J, Ostrowski SR. Current management of massive hemorrhage in trauma. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*. 2012;20:47.
- 94 Karlsson O, Jeppsson A, Hellgren M. Major obstetric haemorrhage: monitoring with thromboelastography, laboratory analyses or both? *Int J Obstet Anesth*. 2014;23:10–7.
- 95 Bolliger D, Tanaka KA. Roles of thrombelastography and thromboelastometry for patient blood management in cardiac surgery. *Transfus Med Rev*. 2013;27:213–20.
- 96 Nicola S. Curry et al. The use of viscoelastic haemostatic assays in the management of major bleeding A British Society for Haematology Guideline *Br J Haematol*. 2018 Sep;182:789-806.
- 97 Curry NS, Davenport R. Transfusion strategies for major haemorrhage in trauma. *Br J Haematol*. 2019 Feb;184:508-523
- 98 Aleshnick M, Orfeo T, Brummel-Ziedins K, Gissel M, Mann K. Interchangeability of rotational elastographic instruments and reagents. *J Trauma Acute Care Surg*. 2014; 76:107–13.
- 99 Manuel d'utilisation du ROTEM® delta version 1.6.0.02.FR 2012 (© Tem Innovations GmbH).
- 100 van Geffen M, Loof A, Lap P, Boezeman J, Laros-van Gorkom BAP, Brons P, et al. A novel hemostasis assay for the simultaneous measurement of coagulation and fibrinolysis. *Hematol Amst Neth*. 2011;16:327–36.
- 101 Antovic A. The overall hemostasis potential: a laboratory tool for the investigation of global hemostasis. *Semin Thromb Hemost* 2010;36:772–779.

- 102 Simpson ML, Goldenberg NA, Jacobson LJ, Bombardier CG, Hathaway WE, Manco-Johnson MJ. Simultaneous thrombin and plasmin generation capacities in normal and abnormal states of coagulation and fibrinolysis in children and adults. *Thromb Res.* 2011;127:317–23.
- 103 Matsumoto T, Nogami K, Shima M. Simultaneous measurement of thrombin and plasmin generation to assess the interplay between coagulation and fibrinolysis. *Thromb Haemost.* 2013;110:761–8.
- 104 Soshitova NP, Karamzin SS, Balandina AN, et al. Predicting prothrombotic tendencies in sepsis using spatial clot growth dynamics. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2012;23:498–507.
- 105 Rouillet S, Labrousche S, Freyburger G. Fibrinolysis during liver transplantation: analysis by the Thrombodynamics method. *J Clin Pathol.* 2019;72:636-638.
- 106 Flament G, Rozen L, Dardabi S, Demulder A. Influence of various concentrations of anticoagulants on the thrombodynamics assay: an in vitro study. *JTH* 2015 13:PO081.
- 107 Caruso V, Iacoviello L, Di Castelnuovo A, Storti S, Mariani G, de Gaetano G, Donati MB. Thrombotic complications in childhood acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis of 17 prospective studies comprising 1752 pediatric patients. *Blood* 2006;108:2216-2222.
- 108 Athale UH, Chan AK. Thrombosis in children with acute lymphoblastic leukemia. Part II. Pathogenesis of thrombosis in children with acute lymphoblastic leukemia: effects of the disease and therapy. *2003 Thromb Res* 2003;111:199-212.
- 109 Payne JH, Vora AJ. Thrombosis and acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* 2007;138:430-445.
- 110 Nowak-Göttl U, Kenet G, Mitchell LG. Thrombosis in childhood acute lymphoblastic leukaemia: epidemiology, aetiology, diagnosis, prevention and treatment. *Best Pract Res Clin Haematol* 2009;22:103-114.
- 111 Athale UH, Chan AK. Thromboembolic complications in pediatric hematologic malignancies. *Semin Thromb Hemost* 2007;33:416-426.
- 112 Mitchell LG, Halton JM, Vegh PA, Barr RD, Venneri T, Pai KM, Andrew ME. Effect of disease and chemotherapy on hemostasis in children with acute lymphoid leukemia. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1994;16:120-126.
- 113 Appel IM, Hop WC, van Kessel-Bakvis C, Stigter R, Pieters R. L-Asparaginase and the effect of age on coagulation and fibrinolysis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Thromb Haemost.* 2008;100:330-7.
- 114 Giordano P, Molinari AC, Del Vecchio GC, Saracco P, Russo G, Altomare M, Perutelli P, Crescenzo N, Santoro N, Marchetti M, De Mattia D, Falanga A. Prospective study of hemostatic alterations in children with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Hematol.* 2010;85:325-30.
- 115 Rozen L, Noubouossie D, Dedeken Laurence, Huybrechts Sophie, Le Phu-Quoc, Ferster Alina, Demulder Anne. Different profile of thrombin generation in children with acute lymphoblastic leukaemia treated with native or pegylated asparaginase: A cohort study. *Pediatr Blood Cancer.* 2017;64(2):294-301.
- 116 De Franceschi L, Cappellini MD, Olivieri O. Thrombosis and sickle cell disease. *Semin. Thromb. Hemost.* 2011, 37, 226–236.

- 117 Austin H, Key NS, Benson JM, Lally C, Dowling NF, Whitsett C, Hooper WC. Sick cell trait and the risk of venous thromboembolism among blacks. *Blood* 2007;1:908–912.
- 118 Ataga KI, Key NS. Hypercoagulability in sickle cell disease: New approaches to an old problem. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* 2007, 91–96.
- 119 Noubouossie D, Key NS, Ataga KI. Coagulation abnormalities of sickle cell disease: Relationship with clinical outcomes and the effect of disease modifying therapies. *Blood Rev.* 2016;30:245–256.
- 120 Noubouossie DF, Lê PQ, Corazza F, Debaugnies F, Rozen L, Ferster A, Demulder A. Thrombin generation reveals high procoagulant potential in the plasma of sickle cell disease children. *Am. J. Hematol.* 2012;87:145–149.
- 121 Gerotziapas GT, Van Dreden P, Chaari M, Galea V, Khaterchi A, Lionnet F, Stankovic-Stojanovic K, Blanc-Brude O, Woodhams B, Maier-Redelsperger M, Girot R, Hatmi M, Elalamy I. The acceleration of the propagation phase of thrombin generation in patients with steady-state sickle cell disease is associated with circulating erythrocyte-derived microparticles. *Thromb. Haemost.* 2012;107:1044–1052.
- 122 Noubouossie DC, Lê PQ, Rozen L, Ziereisen F, Willems D, Demulder A, Ferster A. Thrombin generation in children with sickle cell disease: Relationship with age, hemolysis, transcranial Doppler velocity, and hydroxyurea treatment. *Eur. J. Haematol.* 2013;91:46–54.
- 123 Quinn CT, Rogers ZR, McCavit TL, Buchanan GR. Improved Survival of Children and Adolescents with Sickle Cell Disease. *Blood* 2010;115:3447–3452.
- 124 Hamideh D, Alvarez O. Sickle Cell Disease Related Mortality in the United States (1999-2009). *Pediatric Blood Cancer* 2013;60:1482–1486.
- 125 Talano JA, Cairo MS. Hematopoietic stem cell transplantation for sickle cell disease: State of the science. *Eur. J. Haematol.* 2015;94:391–399.
- 126 Locatelli F, Pagliara D. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children with sickle cell disease. *Pediatric Blood Cancer* 2012;59:372–376.
- 127 Powars D, Weidman JA, Odom-Maryon T, Niland JC, Johnson C. Sickle cell chronic lung disease: Prior morbidity and the risk of pulmonary failure. *Medicine* 1988;67:66–76.
- 128 Bernaudin F, Verlhac S, Peffault de Latour R, Dalle JH, Brousse V, Petras E, Thuret I, Paillard C, Neven B, Galambrun C, Divialle-Doumdo L, Pondarré C, Guitton C, Missud F, Runel C, Jubert C, Elana G, Ducros-Miralles E, Drain E, Taïeb O, Arnaud C, Kamdem A, Malric A, Elmaleh-Bergès M, Vasile M, Leveillé E, Socié G, Chevret S. Association of Matched Sibling Donor Hematopoietic Stem Cell Transplantation with Transcranial Doppler Velocities in Children with Sickle Cell Anemia. *JAMA* 2019;321:266–276.
- 129 Bhatia M, Walters MC. Hematopoietic Cell Transplantation for Thalassemia and Sickle Cell Disease: Past, Present and Future. *Bone Marrow Transpl.* 2008;41:109–117.
- 130 Bernaudin F, Socié G, Kuentz M, Chevret S, Duval M, Bertrand Y, Vannier JP, Yakouben K, Thuret I, Bordigoni P, Fischer A, Lutz P, Stephan JL, Dhedin N, Plouvier E, Margueritte G, Bories D, Verlhac S, Esperou H, Coic L, Vernant JP, Gluckman E, SFGM-TC. Long-term Results of Related Myeloablative Stem-cell Transplantation to Cure Sickle Cell Disease. *Blood* 2007;110:2749–2756.

- 131 Dedeken L, Lê PQ, Azzi N, Brachet C, Heijmans C, Huybrechts S, Devalck C, Rozen L, Ngulula M, Ferster A. Haematopoietic stem cell transplantation for severe sickle cell disease in childhood: A single centre experience of 50 patients. *Br. J. Haematol.* 2014;165:402–408.
- 132 Gluckman E, Cappelli B, Bernaudin F, Labopins M, Volts F, Carreras J, Pinto Simões B, Ferster A, Dupont S, de la Fuente J, Dalle JH, Zecca M, Walters MC, Krishnamurti L, Bhatia M, Leung K, Yanik G, Kurtzberg J, Dhedin N, Kuentz M, Michel G, Apperley J, Lutz P, Neven B, Bertrand Y, Vannier JP, Ayas M, Cavazzana M, Matthes-Martin S, Rocha V, Elayoubi H, Kenzey C, Bader P, Locatelli F, Ruggeri A, Eapen M. Eurocord, the Pediatric Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation, and the Center for International Blood and Marrow Transplant Research. Sickle cell disease: An international survey of results of HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2017;129:1548–1556.
- 133 Cappelli B, Volt F, Tozatto-Maio K, Scigliuolo GM, Ferster A, Dupont S, Pinto Simões B, Al-Seraihy A, Aljurf MD, Almohareb F, Belendez C, Matthes S, Dhedin N, Pondarre C, Dalle JH, Bertrand Y, Vannier JP, Kuentz M, Lutz P, Michel G, Ralfi H, Neven B, Zecca M, Bader P, Cavazzana M, Labopin M, Locatelli F, Magnani A, Ruggeri A, Rocha V, Bernaudin F, de La Fuente J, Corbacioglu S, Gluckman E, Eurocord, the Cellular Therapy and Immunobiology Working Party (CTIWP) and the Paediatric Diseases Working Party (PDWP) of the EBMT. Risk factors and outcomes according to age at transplantation with an HLA-identical sibling for sickle cell disease. *Haematologica* 2019, 104.
- 134 Långström S, Koskenvuo M, Huttunen P, Lassila R, Taskinen M, Ranta S, Heikinheimo M, Mäkipernaa A. Haematopoietic Stem Cell Transplantation in Children Shifts the Coagulation System towards a Pro-Coagulant State. *Thromb. Haemost.* 2018;118:1390–1396.
- 135 Nagasawa M, Ohkawa T, Endo A, Mitsuiki N, Ono T, Aoki Y, Isoda T, Tomizawa D, Takagi M, Kajiwara M, Morio T, Mizutani S. Early coagulation disorder after allogeneic stem cell transplantation is a strong prognostic factor for transplantation-related mortality, and intervention with recombinant human thrombomodulin improves the outcome: A single-center experience. *Int. J. Hematol.* 2013;98:533–542.
- 136 Dvorak CC, Higham C, Shimano KA. Transplant-Associated Thrombotic Microangiopathy in Pediatric Hematopoietic Cell Transplant Recipients: A Practical Approach to Diagnosis and Management. *Front. Pediatric* 2019;7:133.
- 137 Rosenthal, J. Hematopoietic cell transplantation-associated thrombotic microangiopathy: A review of pathophysiology, diagnosis, and treatment. *J. Blood Med.* 2016, 7, 181–186.
- 138 Rozen L, Noubouossie DF, Dedeken L, Lê PQ, Ferster A, Demulder A. Is There Any Improvement of the Coagulation Imbalance in Sickle Cell Disease after Hematopoietic Stem Cell Transplantation? *J Clin Med.* 2019;8:1796.
- 139 Arnold P. Treatment and monitoring of coagulation abnormalities in children undergoing heart surgery. *Paediatr Anaesth* 2011;21:494-503.
- 140 Woodman RC, Harker LA. Bleeding complications associated with cardiopulmonary bypass. *Blood.* 1990;76:1680-97.
- 141 Ngaage DL, Bland JM. Lessons from aprotinin: is the routine use and inconsistent dosing of tranexamic acid prudent? Meta-analysis of randomised and large matched

observational studies. *Eur J Cardiothorac Surg* 2010;37:1375-83.

142 Fergusson DA, Hebert PC, Mazer CD, Fremes S, MacAdams C, Murkin JM, Teoh K, Duke PC, Arellano R, Blajchman MA, Bussieres JS, Cote D, Karski J, Martineau R, Robblee JA, Rodger M, Wells G, Clinch J, Pretorius R. A comparison of aprotinin and lysine analogues in high-risk cardiac surgery. *N Engl J Med* 2008;358:2319-31.

143 Faraoni D, Willems A, Melot C, De Hert S, Van der Linden P. Efficacy of tranexamic acid in paediatric cardiac surgery: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cardiothorac Surg* 2012;42:781-6.

144 Dunn CJ, Goa KL. Tranexamic acid: a review of its use in surgery and other indications. *Drugs* 1999;57:1005-32.

145 Faraoni D, Carlier C, Samama CM, Levy JH, Ducloy-Bouthors AS. Efficacy and safety of tranexamic acid administration for the prevention and/or the treatment of post-partum haemorrhage: A systematic review with meta-analysis. *Ann Fr Anesth Reanim.* 2014;33:563-71.

146 Eaton MP. Antifibrinolytic therapy in surgery for congenital heart disease. *AnesthAnalg* 2008;106:1087-100.

147 Dowd NP, Karski JM, Cheng DC, Carroll JA, Lin Y, James RL, Butterworth J. Pharmacokinetics of tranexamic acid during cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology* 2002;97:390–399.

148 Fiechtner B. Plasma Tranexamic Acid Concentrations During Cardiopulmonary Bypass. *Anesthesia Analgesia* 2001;92:1131-6.

149 Sharma V, Fan J, Jerath A, Pang KS, Bojko B, Pawliszyn J, Karski JM, Yau T, McCluskey S, Wasowicz M. Pharmacokinetics of tranexamic acid in patients undergoing cardiac surgery with use of cardiopulmonary bypass. *Anaesthesia* 2012;67:1242–1250.

150 Grassin-Delyle S, Couturier R, Abe E, Alvarez JC, Devillier P, Urien S. A practical tranexamic acid dosing scheme based on population pharmacokinetics in children undergoing cardiac surgery. *Anesthesiology* 2013;118:853-862.

151 Wesley M, Pereira L, Scharp L, Emani SM, McGowan FX, DiNardo JA. Pharmacokinetics of Tranexamic Acid in Neonates, Infants, and Children Undergoing Cardiac Surgery with Cardiopulmonary Bypass. *Anesthesiology.* 2015;122:746-58.

152 Rozen L, Faraoni D, Torres CS, Willems A, Noubouossie DC, Barglazan D, Van der Linden P, Demulder A. Effective tranexamic acid concentration for 95% inhibition of tissue-type plasminogen activator induced hyperfibrinolysis in children with congenital heart disease: A prospective, controlled, in-vitro study. *Eur J Anaesthesiol.* 2015;32:844-850.

153 Mackie I.J, Kitchen S, Machin S.J, Lowe G.D.O. Guidelines on fibrinogen assays. *Br. J. Haematology.* 2003;121:396-404.

154 Duval M, Suciú S, Ferster A, Riolland X, Nelken B, Lutz P, Benoit Y, Robert A, Manel AM, Vilmer E, Otten J, Philippe N. Comparison of *Escherichia coli*-asparaginase with *Erwinia*-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: Results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Children's Leukemia Group phase 3 trial. *Blood.* 2002;99:2734–2739.

155 Domenech C, Suciú S, De Moerloose B, Mazingue F, Plat G, Ferster A, Uyttebroeck A, Sirvent N, Lutz P, Yakouben K, Munzer M, Röhrlich P, Plantaz D, Millot F, Philippet P, Dastugue N, Girard S, Cavé H, Benoit Y, Bertrand Y for Children's Leukemia Group (CLG) of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Dexamethasone (6mg/m²/day) and prednisolone (60 mg/m²/day) were equally effective as induction therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia in the EORTC CLG 58951 randomized trial. *Haematologica*. 2014;99:1220–1227.

156 Angiolillo AL, Schore RJ, Devidas M, Borowitz MJ, Carroll AJ, Gastier-Foster JM, Heerema NA, Keilani T, Lane AR, Loh ML, Reaman GH, Adamson PC, Wood B, Wood C, Zheng HW, Raetz EA, Winick NJ, Carroll WL, Hunger SP. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of calaspargase pegol *Escherichia coli* L-asparaginase in the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia: results from Children's Oncology Group Study AALL07P4. *J Clin Oncol*. 2014;32:3874–82.

157 Faraoni D, Rozen L, Willems A, Sanchez Torres C, Pereira LM, Demulder A, Van der Linden P. Experimental model of hyperfibrinolysis designed for rotational thromboelastometry in children with congenital heart disease. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2015;26:290–297.

158 Mayhew D, Mendonca V, Murthy BVS. A review of ASA physical status – historical perspectives and modern developments. *Anaesthesia* 2019;74:373-9.

159 Grace RF, Dahlberg SE, Neuberg D, Sallan SE, Connors JM, Neufeld EJ, Deangelo DJ, Silverman LB. The frequency and management of asparaginase-related thrombosis in paediatric and adult patients with acute lymphoblastic leukaemia treated on Dana-Farber Cancer Institute consortium protocols. *Br J Haematol* 2011;152:452-459.

160 Athale UH, Chan AK. Thrombosis in children with acute lymphoblastic leukemia. Part I. Epidemiology of thrombosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Thromb Res* 2003;111:125-131.

161 Barry E, DeAngelo DJ, Neuberg D, Stevenson K, Loh ML, Asselin BL, Barr RD, Clavell LA, Hurwitz CA, Moghrabi A, Samson Y, Schorin M, Cohen HJ, Sallan SE, Silverman LB. Favorable outcome for adolescents with acute lymphoblastic leukemia treated on Dana-Farber Cancer Institute Acute Lymphoblastic Leukemia Consortium Protocols. *J Clin Oncol* 2007;25:813-819.

162 Tuckuviene R, Ranta S, Albersten BK, Andersson NG, Bendtsen MD, Frisk T, Gunnes MW, Helgestad J, Heyman MM, Jonsson OG, Mäkipernaa A, Pruunsild K, Tedgård U, Trakymiene SS, Ruud E. Prospective study of thromboembolism in 1038 children with acute lymphoblastic leukemia: a Nordic Society Pediatric Hematology and Oncology (NOPHO) study. *J Thromb Haemost* 2016;14:485-494.

163 Stock W, Luger SM, Advani AS. A pediatric regimen for older adolescents and young adults with acute lymphoblastic leukemia: results of CALGB 10403. *Blood*. 2019;133:1548–1559.

164 Zwicker J, Wang T, DeAngelo D, Lauw M, Connors J, Falanga A, McMasters M, Carrier M. The prevention and management of asparaginase-related venous thromboembolism in adults: Guidance from the SSC on Hemostasis and Malignancy of the ISTH. *J Thromb Haemost*. 2020;18:278-284.

165 Astwood E, Vora A. Personal practice: how we manage the risk of bleeding and thrombosis in children and young adults with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J*

Haematol 2011;152:505-511.

166 Lejhancova-Tousovska K, Zapletal O, Vytiskova S, Strbackova P, Sterba J. Profile of thrombin generation in children with acute lymphoblastic leukemia treated by Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) protocols. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2012;23:144-154.

167 Hunault-Berger M, Chevallier P, Delain M, Bulabois CE, Bologna S, Bernard M, Lafon I, Cornillon J, Maakaroun A, Tizon A, Padrazzi B, Ifrah N, Gruel Y. GOELAMS (Groupe Ouest-Est des Leucémies Aiguës et Maladies du Sang). Changes in antithrombin and fibrinogen levels during induction chemotherapy with L-asparaginase in adult patients with acute lymphoblastic leukemia or lymphoblastic lymphoma. Use of supportive coagulation therapy and clinical outcome: the CAPELAL study. *Haematologica* 2008;93:1488-1494.

168 Merlen C, Bonnefoy A, Wagner E, Dedeken L, Leclerc JM, Laverdière C, Rivard GE. L-Asparaginase lowers plasma antithrombin and mannan-binding-lectin levels: Impact on thrombotic and infectious events in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2015;62:1381-1387.

169 Appel IM, van Kessel-Bakvis C, Stigter R, Pieters R. Influence of two different regimens of concomitant treatment with asparaginase and dexamethasone on hemostasis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2007;21:2377-2380.

170 van Zaane B, Nur E, Squizzato A, Gerdes VEA, Büller HR, Dekkers OM, Brandjes DPM. Systematic review on the effect of glucocorticoid use on procoagulant, anticoagulant and fibrinolytic factors. *J Thromb Haemost* 2010;8:2483-2493.

171 Heaton JH, Nebes VL, O_Dell LG, Morris SM Jr, Gelehrter TD. Glucocorticoid and cyclic nucleotide regulation of plasminogen activator and plasminogen activator-inhibitor gene expression in primary cultures of rat hepatocytes. *Mol Endocrinol* 1989;3:185-192.

172 Huang LQ, Whitworth JA, Chesterman CN. Effects of cyclosporin A and dexamethasone on haemostatic and vasoactive functions of vascular endothelial cells. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1995;6:438-445.

173 Morange PE, Aubert J, Peiretti F, Lijnen HR, Vague P, Verdier M, Nègre R, Juhan-Vague I, Alessi MC. Glucocorticoids and insulin promote plasminogen activator inhibitor 1 production by human adipose tissue. *Diabetes* 1999;48:890-895.

174 Yamashita A, Nagae C, Ashikaga T, Muto S, Akita M, Yamazaki S, Takayama S, Tatsunami S, Taki M. Pathogenesis of hemostatic abnormalities due to L-asparaginase in children with acute leukemia: PB 1.61-1. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2013 Jul;11.

175 Yamashita A, Nagae C, Shoji T, Muto S, Asahara M, Morimoto M, Kondo K, Kinoshita A, Yamazaki S, Takayama S, Taki M. Effects of L-asparaginase therapy on thrombin generation in children with acute leukemia: PP-MO-439. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2009 Jul;7:466-7.

176 Staddon J, Smock K, Schiffman J, Fluchel MN, Engel ME, Weyrich AS, Campbell RA. Pegasparaginase treatment alters thrombin generation by modulating the protein C and protein S system in acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2015;26:840-843.

177 Albayrak M, Gürsel T, Kaya Z, Koçak U. Alterations in procoagulant, anticoagulant, and fibrinolytic systems before and after start of induction chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Clin Appl Thromb Hemost* 2013;19:644-651.

- 178 Noubouossie D, Le PQ, Rozen L Willems, D, Mujinga, N.M, Ferster, A, Demulder. A. FVIII level correlates with hemolysis and may contribute to the hypercoagulability of children with sickle cell disease. *J Thromb Haemost.* 2013;11, 710–711.
- 179 Nowak-Göttl U, Ahlke E, Fleischhack G, Schwabe D, Schobess R, Schumann C, Junker R. Thromboembolic events in children with acute lymphoblastic leukemia (BFM protocols): prednisone versus dexamethasone administration. *Blood* 2003;101:2529-2533.
- 180 Brunton L, Chabner B, Knollman B. *The Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics Twelfth Edition* 2011.
- 181 Avramis VI, Sencer S, Periclou AP, Sathe H, Bostrom BC, Cohen LJ, Ettinger AG, Ettinger LJ, Franklin J, Gaynon PS, Hilde JM, Lange B, Majlessipour F, Mathew P, Needle M, Neglia J, Reaman G, Holcenberg JS, Stork L. A randomized comparison of native *Escherichia coli* asparaginase and polyethylene glycol conjugated asparaginase for treatment of children with newly diagnosed standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study. *Blood* 2002;99:1986-94.
- 182 Silverman LB, Supko JG, Stevenson KE, Woodward C, Vrooman LM, DS, Asselin BL, Athale UH, Clavell L, Cole PD, Kelly KM, Laverdière C, Michon B, Schorin M, Schwartz CL, O'Brien JE, Cohen HJ, Sallan SE. Intravenous PEG-asparaginase during remission induction in children and adolescents with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2010;115:1351-1353.
- 183 Schneider P, Van Dreden P, Rousseau A, Kassim Y, Legrand E, Vannier JP, Vasse M. Increased levels of tissue factor activity and procoagulant phospholipids during treatment of children with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2010;148:582-592.
- 184 Dong X, Shi J, Zhou J, Chen X, Jin Y, Zhang X, Li X, Dai H, Wang J. Chemotherapy induces enhanced procoagulant activity through phosphatidylserine exposure in acute lymphoblastic leukemia. *Thrombosis Research.* 2013;132:614-620.
- 185 Appel IM, Hop WC, Pieters R. Changes in hypercoagulability by asparaginase: a randomized study between two asparaginases. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2006;17:139-146.
- 186 Place AE, Stevenson KE, Vrooman LM, Harris MH, Hunt SK, O'Brien JE, Supko JG, Asselin BL, Athale UH, Clavell LA, Cole PD, Kelly KM, Laverdiere C, Leclerc JM, Michon B, Schorin MA, Welch JJ, Lipshultz SE, Kutok JL, Blonquist TM, Neuberg DS, Sallan SE, Silverman LB. Intravenous pegylated asparaginase versus intramuscular native *Escherichia coli* L-asparaginase in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukaemia (DFCI 05-001): a randomised, open-label phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2015;16:1677-90.
- 187 Zhu Z, Gao P, Hu Y, Wang J, Wang H, Yang J, Huang L, Ji C, Ni Y, Fang L. PEGylated versus non-PEGylated drugs: A cross-sectional analysis of adverse events in the FDA Adverse Event Reporting System (FAERS) Database. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2020; 58: 332-342.
- 188 Noubouossie DF, Emmerechts J, Debaugnies F, Le PQ, Rozen L, Hoylaerts MF, Demulder A, Ferster A. Towards an Improvement of the Coagulation Imbalance in Sickle Cell Disease After Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Preliminary Study. *Blood* 2011;118:4840.

- 189 Yee DL, Edwards RM, Mueller BU, Teruya J. Thromboelastographic and hemostatic characteristics in pediatric patients with sickle cell disease. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2005;129:760–765.
- 190 Bezeaud A, Venisse L, Helley D, Trichet C, Girot R, Guillin M-C. Red blood cells from patients with homozygous sickle cell disease provide a catalytic surface for factor Va inactivation by activated protein C. *Br. J. Haematol.* 2002;117:409–413.
- 191 Bayazit AK, Kiliç Y. Natural coagulation inhibitors (protein C, protein S, antithrombin) in patients with sickle cell anemia in a steady state. *Pediatric Int.* 2001; 43:592–596.
- 192 Wright JG, Malia R, Cooper P, Thomas P, Preston FE, Serjeant GR. Protein C and protein S in homozygous sickle cell disease: Does hepatic dysfunction contribute to low levels? *Br. J. Haematol.* 1997;98:627–631.
- 193 Westerman MP, Green D, Gilman-Sachs A, Beaman K, Freels S, Boggio L, Allen S, Zuckerman L, Schlegel R, Williamson P. Antiphospholipid antibodies, proteins C and S, and coagulation changes in sickle cell disease. *J. Lab. Clin. Med.* 1999;134: 352–362.
- 194 Dielis AWJH, Castoldi E, Spronk HMH, van Oerle R, Hamulyák K, Ten Cate H, Rosing J. Coagulation factors and the protein C system as determinants of thrombin generation in a normal population. *J. Thromb. Haemost.* 2008;6:125–131.
- 195 Whelihan MF, Lim MY, Mooberry MJ, Piegore MG, Ilich A, Wogu A, Cai J, Monroe DM, Ataga KI, Mann KG, Key NS. Thrombin generation and cell-dependent hypercoagulability in sickle cell disease. *J. Thromb. Haemost.* 2016;14:1941–1952.
- 196 Van Beers EJ, Schaap MCL, Berckmans RJ, Nieuwland R, Sturk A, van Doormaal FF, Meijers JC, Biemond BJ, CURAMA study group. Circulating erythrocyte-derived microparticles are associated with coagulation activation in sickle cell disease. *Haematologica* 2009;94:1513–1519.
- 197 Van Tits LJ, van Heerde WL, Landburg PP, Boderie MJ, Muskiet FAJ, Jacobs N, Duits A, Schnog JB. Plasma annexin A5 and microparticle phosphatidylserine levels are elevated in sickle cell disease and increase further during painful crisis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009;390:161–164.
- 198 Shet AS, Aras O, Gupta K, Hass MJ, Rausch DJ, Saba N, Koopmeiners L, Key NS, Heibel RP. Sickle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood* 2003;102:2678–2683.
- 199 Westerman M, Pizzey A, Hirschman J, Cerino M, Weil-Weiner Y, Ramotar P, Eze A, Lawrie A, Purdy G, Mackie I, Porter J. Microvesicles in haemoglobinopathies offer insights into mechanisms of hypercoagulability, haemolysis and the effects of therapy. *Br. J. Haematol.* 2008;142:126–135.
- 200 Noubouossie DC, Lê PQ, Rozen L, Debaugnies F, Ferster A, Demulder A. Evaluation of the procoagulant activity of endogenous phospholipids in the platelet-free plasma of children with sickle cell disease using functional assays. *Thromb. Res.* 2012;130:259–264.
- 201 Tripodi A. Modified endogenous thrombin potential with results expressed as ratio of values with-to-without thrombomodulin. *Thromb. Haemost.* 2017, 117, 830–836.
- 202 White R.H, Zhou H, Gage B.F. Effect of age on the incidence of venous thromboembolism following major surgery. *J. Thromb. Haemost.* 2004, 2, 1327–1333.

- 203 White R.H, Zhou H, Murin S, Harvey D. Effect of ethnicity and gender on the incidence of venous thromboembolism in a diverse population in California. *Thromb. Haemost.* 2005, 93, 298–305.
- 204 Roberts L.N, Patel R.K, Chitongo P, Bonner L, Arya R. African-Caribbean ethnicity is associated with a hypercoagulable state as measured by thrombin generation. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 2013, 24, 40–49.
- 205 Faraoni D, Goobie SM. The efficacy of antifibrinolytic drugs in children undergoing noncardiac surgery: a systematic review of the literature. *Anesth Analg* 2014;118:628–636.
- 206 Koster A, Boörgermann J, Zittermann A, Lueth JU, Gillis-Januszewski T, Schirmer U. Moderate dosage of tranexamic acid during cardiac surgery with cardiopulmonary bypass and convulsive seizures: incidence and clinical outcome. *Br J Anaesth* 2013;110:34–40.
- 207 Martin K, Breuer T, Gertler R, Hapfelmeier A, Schreiber C, Lange R, Hess J, Wiesner G. Tranexamic acid versus e-aminocaproic acid: efficacy and safety in paediatric cardiac surgery. *Eur J Cardiothorac Surg* 2011;39:892–897.
- 208 Anderson I, Eriksson O, Hedlund PO, Kjellman H, Lindqvist B. Special considerations with regard to the dosage of tranexamic acid in patients with chronic renal diseases. *Urol Res* 1978;6:83–88.
- 209 Yee BE, Wissler RN, Zanghi CN, Feng C, Eaton MP. The effective concentration of tranexamic acid for inhibition of fibrinolysis in neonatal plasma in vitro. *Anesth Analg* 2013;117:767–772.
- 210 Raza I, Davenport R, Rourke C, Platton S, Manson J, Spoor C, Khan S, De'Ath HD, Allard S, Hart DP, Pasi KJ, Hunt BJ, Stanworth S, MacCallum PK, Brohi K. The incidence and magnitude of fibrinolytic activation in trauma patients. *J Thromb Haemost* 2013;11:307–314.
- 211 Monagle P, Barnes C, Ignjatovic V, Furmedge J, Newall F, Chan A, De Rosa L, Hamilton S, Ragg P, Robinson S, Auld A, Crock C, Roy N, Rowlands S. Developmental haemostasis. Impact for clinical haemostasis laboratories. *Thromb Haemost* 2006;95:362–372.
- 212 Giacomini A, Legovini P, Gessoni G, Antico F, Valverde S, Salvadeo MM, Manoni F. Platelet count and parameters determined by the Bayer ADVIA 120 in reference subjects and patients. *Clin Lab Haematol* 2001;23:181–186.
- 213 Parmar N, Albisetti M, Berry LR, Chan AKC. The fibrinolytic system in newborns and children. *Clin Lab* 2006;52:115–124.
- 214 Albisetti M. The fibrinolytic system in children. *Semin Thromb Hemost* 2003;29:339–348.
- 215 Paparella D, Brister SJ, Buchanan MR. Coagulation disorders of cardiopulmonary bypass: a review. *Intensive Care Med* 2004;30:1873–1881.
- 216 Hartmann M, Sucker C, Boehm O. Effects of cardiac surgery on hemostasis. *Transfus Med Rev* 2006;20:230–241.
- 217 Valen G, Eriksson E, Risberg B, Vaage J. Fibrinolysis during cardiac surgery. Release of tissue plasminogen activator in arterial and coronary sinus blood. *Eur J Cardiothorac Surg* 1994;8:324–330.

- 218 Eisses MJ, Chandler WL. Cardiopulmonary bypass parameters and hemostatic response to cardiopulmonary bypass in infants versus children. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2008;22:53–59.
- 219 Ignjatovic V, Chandramouli A, Than J, Summerhayes R, Newall F, Horton S, Cochrane A, Monagle P. Plasmin generation and fibrinolysis in pediatric patients undergoing cardiopulmonary bypass surgery. *Pediatr Cardiol* 2012;33:280–285.
- 220 Edwards RM, Naik-Mathuria BJ, Gay AN, Olutoye OO, Teruya J. Parameters of thromboelastography in healthy newborns. *Am J Clin Pathol* 2008;130:99–102.
- 221 Kitchens CS: To bleed or not to bleed? Is that the question for the PTT? *J Thromb Haemost* 2005, 3:2607–2611.
- 222 Segal JB, Dzik WH: Paucity of studies to support that abnormal coagulation test results predict bleeding in the setting of invasive procedures: an evidence-based review. *Transfusion* 2005, 45:1413–1425.
- 223 Kintigh J, Monagle P, Ignjatovic V. A review of commercially available thrombin generation assays. *Res Pract Thromb Haemost*. 2018;2:42-48.
- 224 Castoldi E, Rosing J. Thrombin generation tests. *Thromb Res*. 2011;127(Suppl 3):S21-S25.
- 225 de Laat-Kremers RMW, Ninivaggi M, Devreese KMJ, de Laat B. Towards standardization of thrombin generation assays: Inventory of thrombin generation methods based on results of an International Society of Thrombosis and Haemostasis Scientific Standardization Committee survey. *J Thromb Haemost*. 2020;00:1–7.
- 226 Loeffen R, Kleinegris MC, Loubele ST, Pluijmen PHM, Fens D, van Oerle R, ten Cate H, Spronk HMH. Preanalytic variables of thrombin generation: towards a standard procedure and validation of the method. *J Thromb Haemost*. 2012;10:2544-2554.
- 227 Dargaud Y, Luddington R, Gray E, Lecompte T, Siegemund T, Baglin T, Hogwood J, Regnault V, Siegemund A, Negrier C. Standardisation of thrombin generation test-which reference plasma for TGT? An international multicentre study. *Thromb Res*. 2010;125:353-356.
- 228 Dargaud Y, Luddington R, Gray E, Negrier C, Lecompte T, Petros S, Hogwood J, Bordet JC, Regnault V, Siegemund A, Baglin T. Effect of standardization and normalization on imprecision of calibrated automated thrombography: an international multicenter study. *Br J Haematol*. 2007;139:303-309.
- 229 Duarte RCF, Rios DRA, Rezende SM, Jardim LL, Ferreira CN, Carvalho MDG. Standardization and evaluation of the performance of the thrombin generation test under hypo- ad hypercoagulability conditions. *Hematol Transfus Cell Ther*. 2019;41:244-252.
- 230 Dargaud Y, Wolberg AS, Luddington R, Regnault V, Spronk H, Baglin T, Lecompte T, Ten Cate H, Negrier C. Evaluation of a standardized protocol for thrombin generation measurement using the calibrated automated thrombogram: an international multicentre study. *Thromb Res*. 2012 ;130:929-34.
- 231 Monagle P, Massicotte P. Developmental haemostasis: Secondary haemostasis. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* 2011; 16:294-300.

- 232 Attard C, Straaten T, Karlaftis V, Monagle P, Ignjatovic V. Developmental hemostasis: age-specific differences in the levels of hemostatic proteins. *J Thromb Haemost* 2013;11:1850-4.
- 233 Toulon P. Developmental hemostasis: laboratory and clinical implications. *Int J Lab Hem* 2016;38:66-77.
- 234 Kremers R, Bloemen S, Al Dieri R, Hemker CH, Karlaftis V, Attard C. Alpha-2-Macroglobulin is a major determinant of a lower thrombin generation in infants and children compared to adults. *Blood* 2013;122:2344.
- 235 Beath SV. Hepatic function and physiology in the newborn. *Semin Neonatal* 2003;8:337-46.
- 236 Ardell S, Offringa M, Ovelman C, Soll R. Prophylactic vitamin K for the prevention of vitamin K deficiency bleeding in preterm neonates. *Cochrane Database Syst Rev* 2018;2:CD008342.
- 237 Kremers R, Wagenwood R, de Laat H, Monagle P, Kemker H, Ignjatovic V. Low paediatric thrombin generation is caused by an attenuation of prothrombin conversion. *Thromb Haemost* 2016;115:1090-100.
- 238 Talon L, Sapin AF, Fourneyron V, Senectaire S, Tardieu M, Tillier M, Trapani A, Trayaud A, Vaissade A, Lebreton A, Sinégre T. Study of thrombin generation in healthy children. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2020 Dec 1.
- 239 Tripodi A, Raffaelli G, Scalabrino E, Padovan L, Clerici M, Chantarangkul V, Cavallaro G, Peyvandi F, Mosca F, Ghirardello S. Procoagulant imbalance in preterm neonates detected by thrombin generation procedures. *Thromb Res* 2020;185:96-101.
- 240 Ignjatovic V, Mertyn E, Monagle P. The coagulation System in Children: Developmental and Pathophysiological Considerations. *Semin Thromb Hemost* 2011;37:723-9.
- 241 Keularts IM, Zivelin A, Seligsohn U, Hemker HC, Beguin S: The role of factor XI in thrombin generation induced by low concentrations of tissue factor. *Thromb Haemost* 2001, 85:1060–1065.
- 242 Dargaud Y, Béguin S, Lienhart A, Al Dieri R, Trzeciak C, Bordet J, Hemker HC, Negrier C. Evaluation of thrombin generating capacity in plasma from patients with haemophilia A and B. *Thromb Haemost* 2005;93:475-80.
- 243 Rugeri L, Quélin F, Chatard B, De Mazancourt P, Negrier C, Dargaud Y. Thrombin generation in patients with factor XI deficiency and clinical bleeding risk. *Haemophilia* 2010;16:771-7.
- 244 Dargaud Y, Trzeciak MC, Bordet JC, Ninet J, Negrier C. Use of calibrated automated thrombinography +/- thrombomodulin to recognize the prothrombotic phenotype. *Thromb Haemost* 2006;96:562-7.
- 245 Dachary-Prigent J, Toti F, Satta N, Pasquet JM, Uzan A, Freyssinet JM. Physiopathological significance of catalytic phospholipids in the generation of thrombin. *Semin Thromb Hemost* 1996, 22:157–164.
- 246 Kashuk JL, Moore EE, Sabel A, Barnett C, Haenel J, Le T, Pezold M, Lawrence J, Biffl WL, Cothren CC, Johnson JL. Rapid thrombelastography (r-TEG) identifies

- hypercoagulability and predicts thromboembolic events in surgical patients. *Surgery*. 2009;146(4):764–72.55.
- 247 Lancé MD. A general review of major global coagulation assays: thrombelastography, thrombin generation test and clot waveform analysis. *Thromb J*. 2015;13:1.
- 248 Greene LA, Goldenberg NA, Simpson ML, Villalobos-Menuy E, Bombardier C, Acharya SS, Santiago-Borrero PJ, Cambara A, DiMichele DM. Use of global assays to understand clinical phenotype in congenital factor VII deficiency. *Haemophilia*. 2013; 19:765–72.
- 249 Ishihara T, Nogami K, Ochi S, Ishida T, Kosaka Y, Sawada A, Inoue, Shinya Osone M, Imamura T, Hosoi H, Shima M. Disordered hemostasis associated with severely depressed fibrinolysis demonstrated using a simultaneous thrombin and plasmin generation assay during L-asparaginase induction therapy in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2020;67:e28016.
- 250 Neergaard-Petersen S, Mogensen V.B, Veirup M.S., Grove, E.L, Kristensen S.D, Hvas A.M. Fibrin clot lysis assay: Establishment of a reference interval. *Thromb. Res*. 2018;167:9–11.
- 251 Ninivaggi M, Apitz-Castro R, Dargaud Y, de Laat B, Hemker HC, Lindhout T. Whole-blood thrombin generation monitored with a calibrated automated thrombogram-based assay. *Clin Chem*.2012;58:1252-1259.
- 252 Spronk HMH, Dielis A, Panova-Noeva M, van Oerle R, Govers-Riemslog JWP, Hamulyak K, Falanga A, Ten Cate H. Monitoring thrombin generation: is addition of corn trypsin inhibitor needed? *Thromb Haemost* 2009;101:1156-62.
- 253 Lang T, von Depka M. Possibilities and limitations of thrombelastometry/-graphy. *Hamostaseologie* 2006, 26:S20–S29.
- 254 Kitchen DP, Kitchen S, Jennings I, Woods T, Walker I. Quality assurance and quality control of thrombelastography and rotational Thromboelastometry: the UK NEQAS for blood coagulation experience. *Semin Thromb Hemost* 2010, 36:757–763.
- 255 Chitlur M, Sorensen B, Rivard GE, Young G, Ingerslev J, Othman M, Nugent D, Kenet G, Escobar M, Lusher J. Standardization of thromboelastography: a report from the TEG-ROTEM working group. *Haemophilia* 2011;17:532–537.
- 256 External quality Control for Assays and Tests SURVEY 2020-T2 ROTEM / TEG Survey 2020-2 – Rapport du 30-7-2020.
- 257 Iba T, Levy JH, Levi M, Connors JM, Thachil J. Coagulopathy of Coronavirus Disease 2019. *Crit Care Med*. 2020;48:1358-1364.
- 258 Braun PJ, Givens TB, Stead AG, Beck LR, Gooch SA, Swan RJ, Fischer TJ. Properties of optical data from activated partial thromboplastin time and prothrombin time assays. *Thromb Haemost* 1997;78::1079–1087.
- 259 Levi M, Toh CH, Thachil J, Watson HG; British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for the diagnosis and management of disseminated intravascular coagulation. *Br J Haematol* 2009;145:24–33.
- 260 Dempfle CE, Lorenz S, Smolinski M, Wurst M, West S, Houdijk W, Quintel, Martin Borggreffe M. Utility of activated partial thromboplastin time waveformanalysis for

- identification of sepsis and overt disseminated intravascular coagulation in patients admitted to a surgical intensive care unit. *Crit Care Med* 2004;32:520–524.
- 261 Evrard J, Morimont L, Benyahia Z, Laloy J, Siriez R, Dogné JM, Douxfils J. Evaluation of the analytical performances of FibWave, a new sensitive tool assessing the fibrin clot formation, to measure the effects of anticoagulants. *Thromb Res.* 2020;191:78-81.
- 262 Ovanesov MV, Ananyeva NM, Panteleev MA, Ataullakhanov FI, Saenko EL. Initiation and propagation of coagulation from tissue factor-bearing cell monolayers to plasma: initiator cells do not regulate spatial growth rate. *J Thromb Haemost* 2005;3:321–331.
- 263 Rozen L, Noel C, Faklan M, El Ouailiti M, Cantinieaux B, Demulder A. Evaluation of the automated standardized ST-Genesia in order to measure thrombin generation in the clinical lab. Poster presented at the 27th annual meeting of the Belgian Society on Thrombosis and Haemostasis. 2019. P14.
- 264 Van den berg HM, De Groot PH, Fischer K. Heterogeneity in severe haemophilia. *J Thromb Haemost*, 2007;5 (suppl 1):151-156.
- 265 La C, Lê PQ, Rozen L, Ferster A, Reygaerts T, Leenders B and Demulder A. Is endogenous thrombin potential a useful tool to adapt the prophylactic treatment scheme in pediatric hemophilic patients? *JTH* 2011; 9(S2):947.
- 266 Lê PQ, Rozen L, Ferster A, Demulder A. Endogenous thrombin generation potential: An added value parameter to individualize prophylaxis treatment in pediatric hemophilic patients? *Haemophilia* 2016; 22(S4):61.
- 267 Rozen L, Moszynski N, Lê PQ, Peters P, Demulder A. Establishment of a thrombin generation threshold in severe haemophilic patients under prophylaxis to further determine an added value of this test in the personalized treatment: a pilot study. Poster présenté à l'ECTH 2018 (abstract 223).
- 268 Ay Y, Balkan C, Karapinar DY, Akin M, Bilenoglu B, Kavakli K. Feasibility of using thrombin generation assay (TGA) for monitoring bypassing agent therapy in patients with hemophilia having inhibitors. *Clin Appl Thromb Hemost* 2013;19:389–394.
- 269 Emmerich J. « Fréquence et facteurs de risque de la maladie veineuse thromboembolique ». *La revue de praticien*, 2003, 53, p. 14.
- 270 Cohen AT, Agnelli G, Anderson FA, Arcelus JI, Bergqvist D, Brecht JG, Greer IA, Heit JA, Hutchinson JL, Kakkar AK, Mottier D, Oger E, Samama MM, Spannagl M; VTE Impact Assessment Group in Europe (VITAE). Venous thromboembolism (VTE) in Europe. The number of VTE events and associated morbidity and mortality. *Thromb Haemost.* 2007;98:756-764.
- 271 White D, MacDonald S, Edwards T, Bridgeman C, Hayman M, Sharp M, Cox-Morton S, Duff E, Mahajan S, Moore C, Kirk M, Williams R, Besser M, Thomas W. Evaluation of COVID-19 coagulopathy; laboratory characterization using thrombin generation and nonconventional haemostasis assays. *Int J Lab Hematol.* 2020 Sep 5.
- 272 Lisman T, Thachil J. Differentiating biochemical from clinical heparin resistance in COVID-19. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 10.1007/s11239-020-02259-5, (2020).
- 273 Nougier C, Benoit R, Simon M, Desmurs-Clavel H, Marcotte G, Argaud L, David JS, Bonnet A, Negrier C, Dargaud Y. J Hypofibrinolytic state and high thrombin generation may

play a major role in SARS-COV2 associated thrombosis. *Thromb Haemost.* 2020 Jul 15;10.1111/jth.15016.

274 Falanga A, Panova-Noeva M, Russo L. Procoagulant mechanisms in tumour cells.

Best Pract Res Clin Haematol 2009;22:49–60.

275 Prandoni P, Falanga A, Piccioli A. Cancer and venous thromboembolism. *Lancet Oncol* 2005;6:401–10.

276 Douxfils J, Ageno W, Samama CM, Lessire S, Ten Cate H, Verhamme P, Dogné J-M, Mullier F. Laboratory testing in patients treated with direct oral anticoagulants: a practical guide for clinicians. *J Thromb Haemost* 2018;16:209–219.

277 Rigano J, Ng C, Nandurkar H, Ho P. Thrombin generation estimates the anticoagulation effect of direct oral anticoagulants with significant interindividual variability observed. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2018;29:148–154.

278 Lebreton A, Sinégre T, Lecompte T, Talon L, Abergel A, Lisman T. Thrombin Generation and Cirrhosis: State of the Art and Perspectives. *Semin Thromb Hemost.* 2020;46:693-703.

279 Jonsson AL, Bäckhed F. Role of gut microbiota in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol.* 2017;14(2):79-87.

280 Mohammed Y, Kootte RS, Kopatz WF, Borchers CH, Büller HR, Versteeg HH, Nieuwdorp M, van Mens TE. The intestinal microbiome potentially affects thrombin generation in human subjects. *J Thromb Haemost.* 2020;18(3):642-650.

