



HAL
open science

Le dosage des monomères de fibrine : étude in vitro, et intérêt en traumatologie

Laurent Weinmann

► **To cite this version:**

Laurent Weinmann. Le dosage des monomères de fibrine : étude in vitro, et intérêt en traumatologie. Sciences pharmaceutiques. 2016. dumas-01388030

HAL Id: dumas-01388030

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01388030>

Submitted on 26 Oct 2016

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

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

UNIVERSITE DE BORDEAUX

FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 2016

THESE N°122

LE DOSAGE DES MONOMERES DE FIBRINE

Etude *in vitro*, et intérêt en traumatologie

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE
MEDICALE TENANT LIEU DE THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE
DOCTEUR EN PHARMACIE

Présenté et soutenu publiquement

Le 19 octobre 2016

Par

Laurent WEINMANN

Né le 24 novembre 1988, à Vannes

EXAMINATEURS DE LA THESE

Mme le Pr Marie-Claude SAUX, PU-PH.Président,
Mr le Pr Yves PEREL, PU-PHMembre,
Mme le Dr Stéphanie ROULLET, PHMembre,
Mme le Dr Michèle GOURSOLLE, PHMembre,
Mme le Dr Geneviève FREYBURGER, PH, HDRDirecteur.

REMERCIEMENTS

A Mme le Professeur SAUX, Professeur des Universités à l'Université de Bordeaux, et Praticien Hospitalier au CHU de Bordeaux, d'avoir immédiatement accepté de présider ce jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de tout mon respect.

A M. le Professeur Perel, Professeur des Universités à l'Université de Bordeaux, et Praticien Hospitalier au CHU de Bordeaux, de me faire l'honneur de juger ce travail. Veuillez trouver ici toute ma considération et mon respect.

A Mme le Docteur Stéphanie Rouillet, Praticien Hospitalier au CHU de Bordeaux, de me faire l'honneur de siéger à ce jury. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

A Mme le Docteur Michèle GOURSOLLE, Praticien Hospitalier au CH d'Arcachon, d'avoir immédiatement accepté de participer à ce jury. Je vous remercie pour votre accueil chaleureux au sein de votre laboratoire lors de ce dernier stage d'internat. Merci pour toutes les connaissances que vous m'avez transmises, avec bonne humeur, et dynamisme.

A Mme le Docteur Geneviève FREYBURGER, Praticien Hospitalier au CHU de Bordeaux, pour m'avoir encadré tout au long de ce travail. Les 2 stages passés au sein du laboratoire d'hématologie furent très enrichissants grâce à vous. Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée, pour votre disponibilité, votre gentillesse, et votre pertinence à toute épreuve.

Je tiens à remercier toutes les personnes m'ayant aidé à la réalisation de ce projet :

Les externes, qui ont soigneusement collecté tous les échantillons et organisé les données biologiques des patients (Lea Bientz, Jessica Cros, Emilie Battery et Marielle Bajal).

Le laboratoire Stago® pour sa participation matérielle.

Tous les techniciens du laboratoire d'hématologie de Pellegrin, qui ont participé à la réalisation des analyses biologiques.

Les équipes soignantes qui ont participé à l'étude EXATEM et en particulier Chloé Gisbert-Mora et Fanny Lacaze.

Un grand merci à toutes les équipes des laboratoires de bactériologie, d'hématologie, de parasitologie, de biochimie et de pharmacologie de Pellegrin. Mention spéciale à l'équipe du laboratoire du CH d'Arcachon, qui m'a laissé beaucoup de temps pour travailler sur ce projet. Je garde un très bon souvenir de tous ces stages, durant lesquels j'ai pu rencontrer des équipes sympathiques, toujours motivées pour transmettre leurs connaissances.

Je tiens à remercier mes cointernes, sans qui ces années n'auraient pas été les mêmes :

A Edona, Chloé, Catherine, Pierre, Raoul, Aurélia et Mariana. Quel premier stage d'internat !!!! Les premiers pas au laboratoire ont été plus que savoureux à vos côtés ; à Chloé pour toutes tes photos de chats et tes supers dessins ; à David, pour ta fougue dans le travail, pour tes envolées pas très lyriques au milieu du plateau, et bien évidemment pour Kim Kardashian ; à Cécile, pour ta bonne humeur constante, et pour les allongés, DEFINITIVEMENT ! A Anne, je ne suis pas sûr que des internes ont eu un jour un ratio transat'/labo aussi important que le nôtre ; à Chloé, Muriel, Aurélia, Nitesh et Vincent pour nos mustos festifs ; à Benoit, pour ta participation

active dans la transmission des potins du plateau, à Julian pour m'avoir fait accepté le poste de référent ; et à tous ceux que je n'ai pas cités : Marion, Olivier, Xavier, Cécile L, Alexis, Nicolas, Julien E, Laure, Célia, Marion, Sarah, Morgane D, Florian, Joaquim et Ismaël.

Bien sûr, merci à toutes les autres personnes qui ont fait de cet internat des années mémorables :

A Samy, Marine J, Florence, les pharmaciens rennais qui ont également envahis Bordeaux ; à Charlotte pour les Experts Bordeaux ; à Julie, France et Chloé, pour les serpentins de Majorque ; et un grand merci à toutes les personnes rencontrées sur Bordeaux, pour les cocktails - terrasse, apéros et restos faits ensemble : Clémence, Marine L, Céline G, Carole, Sylvain, Hugo, Barnabé, Alexandre, Jean-Benoit, Thibaut, Nichef, Julien G, Julien G, Mickaël, Loïc, Jérémy, Marie C, Constance, Candice, Agathe, Sarita, Anne-Laure, Erwann, Sébastien F, Anthony J, Ghislain, Cécile B, Pierre C, Eleonore.

A mes amis de longue date, Justine, Typhaine, Anthony, Bastien, Aurore, Sébastien C, Maxime, Bruno, Anthony MM, Marie, Quentin, Camille.

A Morgane, alias Cougui, pour toutes ces années de fêtes, de week-ends partout en France, de travail pour ce maudit concours, et évidemment pour ces 4 années de colocation. Miss Noix de coco et Miss Pamplemousse s'en souviendront pour longtemps !!!!!!!

A Vincent, pour avoir supporté mes humeurs parfois difficiles ces derniers mois. Merci pour ton soutien, ton réconfort, et ton affection.

A ma famille adorée.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	2
SOMMAIRE	5
ABREVIATIONS	7
LISTE DES FIGURES	8
LISTE DES TABLEAUX	10
INTRODUCTION	11
PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	13
1. Généralités	14
2. Du fibrinogène à la fibrinolyse :	15
2.1. Le fibrinogène	15
2.2. Fibrinoformation	21
2.3. Fibrinolyse :	25
3. Les marqueurs de fibrine et de fibrinolyse.....	31
3.1. Les monomères de fibrine et les complexes solubles	31
3.2. Les D-dimères	46
3.3. Les Produits de dégradation de la fibrine et du fibrinogène (PDF).	48
3.4. Données sur la cinétique d'apparition et la clairance des marqueurs de fibrine 50	
4. La coagulopathie associée au traumatisme	52
4.1. Généralités	52
4.2. Physiopathologie	53
4.3. Diagnostic de la coagulopathie associée au traumatisme	57
4.4. Prise en charge de la coagulopathie liée au traumatisme.....	61
5. Objectif de l'étude	65
DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES.....	66
1. Etude portant sur les patients traumatisés	67

1.1. Population étudiée.....	67
1.2. Echantillons biologiques.....	68
2. Analyse <i>in vitro</i> des taux de marqueurs de fibrine au cours de la formation d'un caillot.....	73
2.1. Echantillon biologique utilisé.....	73
2.2. Formation du caillot de fibrine.....	74
2.3. Dosage des marqueurs de fibrine.....	75
TROISIEME PARTIE : RESULTATS.....	76
1. Analyse des données cliniques.....	77
2. Analyse des paramètres biologiques.....	77
2.1. Données biologiques générales.....	79
2.2. Analyse des taux de FM.....	81
2.3. Scores ISTH et CIVD.....	90
2.4. Marqueurs de fibrine et mortalité.....	92
2.5. Corrélation entre marqueurs de fibrine et scores cliniques.....	93
QUATRIEME PARTIE : DISCUSSION.....	96
1. Qualités analytiques du kit STA® Liatest® FM.....	97
2. Analyse des concentrations en marqueurs de fibrine.....	98
3. Monomères de fibrine et applications cliniques.....	99
CONCLUSION.....	101
ANNEXES.....	102
BIBLIOGRAPHIE.....	104
SERMENT DE GALIEN.....	113

ABREVIATIONS

ASA : American society of anesthesiologists
CIVD : Coagulation intravasculaire disséminée
ELFA : Enzyme linked fluorescent assay
EP : Embolie pulmonaire
FM : Monomères de fibrine
FpA : Fibrinopeptide A
FpB : Fibrinopeptide B
FT : Facteur tissulaire
INR : International normalized ratio
ISTH : International society on thrombosis and haemostasis
NETs : Neutrophil extracellular traps
PAI-1 : Inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 1
PARs : Protease-activated receptors
PDF : Produits de dégradation de la fibrine
PDFg : Produits de dégradation du fibrinogène
PFC : Plasma frais congelé
ROTEM® : Rotational thromboelastometry
TAFI : Thrombin activated fibrinolysis inhibitor
TCA : Temps de céphaline activé
TEG® : Thromboelastographie
TFPI : Tissue Factor Pathway Inhibitor
TIC : Trauma induced coagulopathy ou coagulopathie liée au traumatisme
TLR : Toll like receptor
TP : Taux de prothrombine
t-PA : Activateur tissulaire du plasminogène
TVP : Thrombose veineuse profonde
TXA : Acide tranexamique
u-PA : Urokinase
vWF : Facteur von Willebrand

LISTE DES FIGURES

- 1 – Structure du fibrinogène
- 2 – Schéma de la coagulation
- 3 – Oligomère de fibrine composé de 3 monomères de fibrine
- 4 – Représentation des différentes étapes de la polymérisation de la fibrine
- 5 – Action de la plasmine sur la fibrine et le fibrinogène
- 6 – Lyse séquentielle du caillot de fibrine en microscopie confocale
- 7 – Anatomie du monomère de fibrine
- 8 – Réaction enzymatique du dosage quantitatif des monomères de fibrine par la méthode COA-SET FM de Kabi Vitrum Diagnostica®
- 9 – Spécificité de l'anticorps monoclonal F405
- 10 – Interactions entre inflammation et coagulation lors de la CIVD
- 11 – Score ISTH pour le diagnostic de CIVD décompensée
- 12 – Score ISTH pour le diagnostic de CIVD compensée
- 13 – Elévation des marqueurs liés à la fibrine après apparition d'un événement thrombotique
- 14 – Tracé de thromboélastométrie sur sang total, avec les dénominations des principaux paramètres rendus par le ROTEM®, et le TEG®.
- 15 – Tracés thromboélastométriques obtenus pour les patients du protocole EXATEM
- 16 – Analyse en composantes principales des principaux paramètres biologiques dosés chez les patients du protocole EXATEM
- 17 – Essai de linéarité à partir d'un échantillon contenant une concentration théorique en FM évaluée à 310 µg/mL
- 18 – Evolution des taux de marqueurs de fibrine au cours de la formation d'un caillot *in vitro*
- 19 – Répartition des valeurs de D-dimères et de FM dans une population de 49 patients témoins normaux
- 20 - Répartition de la concentration en FM dans la population témoin, et comparaison avec la répartition de la concentration en FM et PDF chez les patients EXATEM
- 21 – Evolution du taux de FM par patient au cours du temps
- 22 – Evolution du taux de PDF par patient au cours du temps

- 23 – Evolution du taux de D-dimères par patient au cours du temps
- 24 – Représentation graphique des coefficients de corrélation entre les différents marqueurs de fibrine
- 25 – Calcul du score ISTH en fonction du marqueur de fibrine pris en compte
- 26 – Corrélation entre les taux de marqueurs de fibrine et les scores cliniques de Glasgow et ASA

LISTE DES TABLEAUX

- 1 – Situations pathologiques susceptibles d'entraîner une CIVD
- 2 – Situations physiologiques et pathologiques associées à une élévation des D-dimères
- 3 – Incidence d'hyperfibrinolyse et mortalité associée chez des patients polytraumatisés selon 3 études
- 4 – Liste et comparaison des principales variables des courbes ROTEM® et TEG®
- 5 – Comparaison des médianes et écarts interquartiles des paramètres biologiques entre le premier prélèvement post-traumatisme et les prélèvements suivants
- 6 – Variabilité des résultats de différents dosages de FM d'un même échantillon
- 7 – Cut-off des marqueurs de fibrine pour l'attribution du nombre de points dans le score de CIVD de l'ISTH
- 8 – Comparaison des taux de marqueurs de fibrine entre les patients décédés dans les suites de la prise en charge initiale, et les autres
- 9 – Comparaison du TP, du fibrinogène, du facteur V et des plaquettes, entre les patients décédés dans les suites de la prise en charge initiale, et les autres
- 10 – Comparaison des taux de marqueurs de fibrine à l'admission entre les patients présentant un score de Glasgow ≤ 10 et ceux présentant un score de Glasgow > 10
- 11 – Comparaison des taux de marqueurs de fibrine à l'admission entre les patients présentant un score ASA > 3 et ceux présentant un score ASA ≤ 3

INTRODUCTION

Le caillot de fibrine est principalement constitué d'un maillage de molécules liées entre elles, appelées monomères de fibrine (FM). Ils sont le produit de l'action de la thrombine sur le fibrinogène, et l'élévation de la concentration en FM traduit l'activation de la coagulation. Ce paramètre biologique fait partie des marqueurs de fibrine, aux côtés des D-dimères et des produits de dégradation de la fibrine (PDF).

Le dosage des marqueurs de fibrine est actuellement recommandé dans de nombreuses situations pathologiques, et notamment pour le diagnostic et le suivi de la coagulation intravasculaire disséminée (CIVD). Les FM, dans ce contexte sont très spécifiques puisqu'ils traduisent un processus de coagulation active.

Les FM sont élevés dans de nombreuses autres situations pathologiques, et présentent l'avantage selon certains auteurs, d'apparaître plus précocement que les autres marqueurs de fibrine. Ces hypothèses restent purement théoriques, et sont basées sur des données physiologiques d'hémostase et non sur des données expérimentales.

A notre connaissance, peu de données existent sur l'analyse comparative des taux des différents marqueurs de fibrine *ex vivo*. Nous souhaitons donc évaluer la réactivité des FM par rapport à celle des D-dimères et des PDF. Notre étude s'est portée sur une population de patients polytraumatisés prélevés très précocement sur le théâtre de l'accident, susceptibles de présenter de forts taux de FM, en réponse à l'activation de la coagulation chez ces patients.

Les dosages de FM ont été réalisés grâce au kit STA® Liatest® FM de Stago®. Cette méthode n'est pas utilisée en routine au CHU de Bordeaux, mais a fait l'objet d'un contrat d'étude permettant de bénéficier des réactifs à cout nul. L'étude des concentrations en marqueurs de fibrine chez les patients polytraumatisés, et également au sein d'une population saine ne présentant pas de troubles de la coagulation, nous a permis tout d'abord d'étudier les performances du kit STA®

Liatest® FM, puis d'analyser la réactivité des FM par rapport aux autres marqueurs de fibrine.

Dans un premier temps, nous ferons quelques rappels physiologiques d'hémostase en se concentrant sur le fibrinogène et le caillot de fibrine. L'étude bibliographique permettra également de faire un état des lieux des connaissances concernant la fibrinoformation, la cinétique d'apparition et de clairance des marqueurs de fibrine, ainsi que de la physiopathologie de la CIVD, et de la coagulopathie du traumatisme. Dans un second temps, nous présenterons et discuterons des résultats du dosage de ces marqueurs en traumatologie lourde.

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralités

L'hémostase est un ensemble de mécanismes physiologiques permettant la prévention et l'arrêt des saignements. Elle participe au phénomène de cicatrisation lors d'une brèche vasculaire, et contribue ainsi au maintien de l'intégrité de la circulation sanguine et des vaisseaux sanguins.

On distingue classiquement 3 étapes essentielles :

- L'hémostase primaire, correspondant à l'adhésion, l'activation et l'agrégation plaquettaire, conduisant à la formation d'un clou plaquettaire, ou thrombus blanc.
- La coagulation, correspondant à une cascade de réaction enzymatique conduisant à la formation d'un caillot de fibrine insoluble qui consolide le thrombus blanc.
- La fibrinolyse, permettant de détruire le caillot fibrino-plaquettaire, ou d'en limiter l'extension.

Ces 3 étapes ne sont pas séquentielles, mais simultanées, dès l'initiation du processus d'hémostase. Chaque étape est complexe, et fait intervenir un grand nombre d'acteurs et de régulateurs, afin de garantir que ce phénomène reste rapide, localisé, et équilibré entre processus coagulant, et fibrinolyse.

Pour bien définir les différentes espèces mises en jeu, nous détaillerons la structure et les rôles du fibrinogène, ainsi que le processus de fibrinof ormation et de fibrinolyse.

2. Du fibrinogène à la fibrinolyse :

2.1. Le fibrinogène

2.1.1. Généralités :

Le fibrinogène, également appelé facteur I de la coagulation, est une protéine synthétisée et sécrétée par les cellules du parenchyme hépatique, qui possède un rôle majeur dans le processus d'hémostase. La demi-vie plasmatique de cette protéine est de 4 à 6 jours, avec un taux physiologique compris entre 2 et 5 g/L de sang. La concentration minimale indispensable pour pouvoir assurer l'hémostase est de 0,5 g/L [1], mais certaines circonstances cliniques requièrent des concentrations supérieures.

2.1.2. Variations physiologiques et pathologiques du taux de fibrinogène :

Le taux de fibrinogène augmente physiologiquement au cours de la grossesse [1] et avec l'âge [2]. Ce sont les principales situations physiologiques au cours desquelles on observe une modification la concentration en fibrinogène.

Plusieurs situations pathologiques vont conduire à une hyperfibrinogénémie telles que les cancers, les syndromes inflammatoires, le syndrome néphrotique, l'utilisation de traitements antirétroviraux. La consommation de tabac entraîne également une élévation du taux de fibrinogène dans le sang.

L'hypofibrinogénémie peut être retrouvée dans diverses situations, acquises ou constitutionnelles.

Les déficits acquis sont dus à l'insuffisance hépatocellulaire, à la coagulation intravasculaire disséminée ou la fibrinolyse primitive. De rares cas de

dysfibrinogénémies acquises ont été décrites (cancers primitifs du foie, hépatomes, cirrhoses...).

Les déficits constitutionnels sont de 2 types :

- Les déficits quantitatifs : afibrinogénémie (absence de fibrinogène) ou hypofibrinogénémie constitutionnelles. La mesure de l'activité et le dosage pondéral du fibrinogène sont diminués en proportion égale.
- Les déficits qualitatifs : dysfibrinogénémies constitutionnelles, au cours desquelles le dosage pondéral du fibrinogène est normal, mais la mesure de son activité est diminuée.

2.1.3. Structure :

Le fibrinogène est une molécule de 340 kD mesurant environ 45 nm de long. La molécule est constituée de 3 paires de chaînes polypeptidiques $A\alpha$, $B\beta$ et γ enroulées de façon hélicoïdale. Ces 6 chaînes sont reliées entre elles par 29 ponts disulfures et forment ainsi une protéine symétrique comportant 3 domaines : 2 domaines D distaux et un domaine E central [3].

Les extrémités NH₂-terminales des 6 chaînes polypeptidiques forment le domaine E et les extrémités COOH-terminales forment les deux domaines D de part et d'autre du domaine E, ainsi que deux domaines αC (correspondant à l'extrémité COOH-terminale de la chaîne $A\alpha$) (figure 1).

L'extrémité NH₂-terminale des chaînes $A\alpha$ et $B\beta$ correspond respectivement au fibrinopeptide A (FpA, 16 acides aminés) et au fibrinopeptide B (FpB, 14 acides aminés). Ces fibrinopeptides sont clivés par la thrombine, ce qui représente la première étape de la transformation du fibrinogène en fibrine [4].

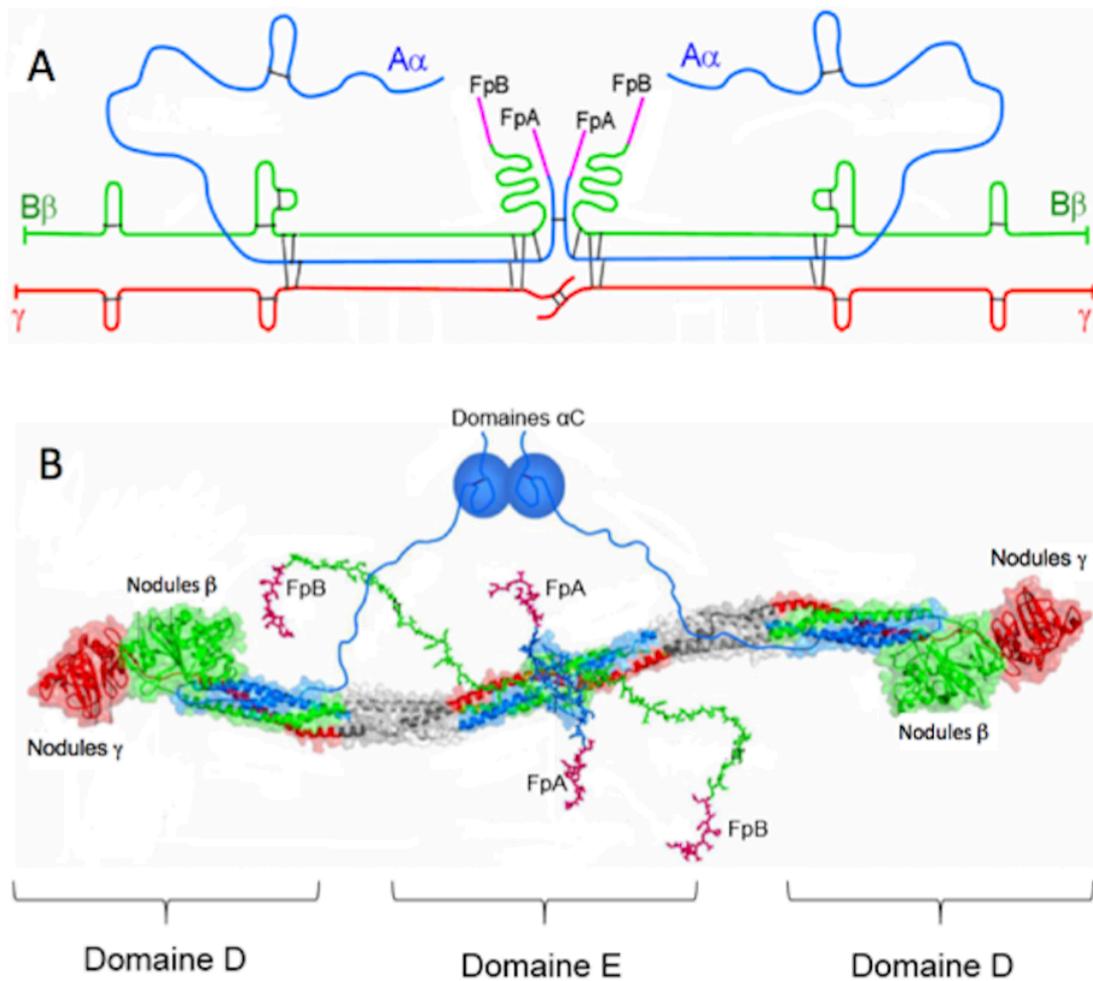


Figure 1 : *structure du fibrinogène d'après [5]*. (A) : les chaînes polypeptidiques $A\alpha$, $B\beta$, et γ sont représentées respectivement en bleu, vert, et rouge. Les fibrinopeptides A et B sont représentés en rose. (B) : structure tridimensionnelle du fibrinogène. Les chaînes sont enroulées de façon hélicoïdale. Les domaines D sont composés des extrémités COOH-terminale des chaînes $B\beta$ et γ , formant respectivement les nodules β et les nodules γ . L'extrémité COOH-terminale des chaînes $A\alpha$ ne sont pas incluses dans le domaine D, mais forment les domaines αC représentés par les 2 cercles bleus.

2.1.4. Rôles :

Le fibrinogène possède de multiples fonctions dans l'organisme, c'est une protéine majeure de l'inflammation, de la cicatrisation, et la fibrine et ses produits de

dégradation ont également un rôle dans la formation de la plaque d'athérome en favorisant la migration des monocytes dans la plaque et en s'y liant au LDL-cholestérol oxydé [6].

Mais la principale fonction du fibrinogène dans l'organisme est son rôle dans le processus d'hémostase. Il participe au phénomène d'agrégation plaquettaire lors de l'hémostase primaire, et représente également la protéine de la phase finale de la coagulation, en permettant la formation du caillot de fibrine.

2.1.4.1. Fibrinogène et hémostase primaire

Lors d'une brèche vasculaire, les plaquettes adhèrent au sous-endothélium mis à nu, notamment grâce à l'interaction entre le facteur von Willebrand (vWF) et le récepteur GP Ib/IX des plaquettes. Il s'en suit une activation plaquettaire, qui conduit au changement de conformation du complexe GP IIb/IIIa plaquettaire qui acquiert une forte affinité pour le fibrinogène. Le fibrinogène (et le vWF) en se liant au récepteur GP IIb/IIIa forme alors des ponts inter-plaquettaires permettant l'agrégation plaquettaire [7].

2.1.4.2. Fibrinogène et coagulation :

La coagulation est une série de réaction enzymatique ayant pour but de former un caillot de fibrine insoluble. L'enzyme qui permet la transformation du fibrinogène en fibrine est la thrombine, qui elle-même est générée grâce à une cascade enzymatique complexe représentée en figure 2.

La cascade de coagulation est activée quand un saignement se produit suite à une blessure au niveau d'un vaisseau sanguin. Le facteur tissulaire (FT) dans le sous-endothélium rentre en contact avec le facteur VII, ce qui provoque l'activation du facteur VII en facteur VIIa. Le complexe FT-VIIa active alors le facteur X en facteur Xa qui forme un complexe avec le facteur Va, qui transforme la prothrombine, en thrombine. Cette première étape constitue la phase d'initiation de la coagulation.

Ensuite, les premières traces de thrombine générées, activent les facteurs V, VIII, et XI, permettant ainsi de considérablement augmenter la production de facteur X activé, et de thrombine. Ces boucles d'activation provoquent une explosion de la production de thrombine, et correspondent à la phase d'amplification de la coagulation. La thrombine permet de convertir efficacement le fibrinogène en fibrine, qui forme alors un maillage permettant de stabiliser les lésions tissulaires.

Les différentes réactions enzymatiques de la coagulation nécessitent un support membranaire, qu'il soit apporté par l'endothélium, les plaquettes, les leucocytes ou des microvésicules d'origine cellulaire. Ces surfaces sont fondamentales. Elles expriment le facteur tissulaire lors de l'initiation de la coagulation, elles servent de support catalytique aux réactions de coagulation, et permettent ainsi de maintenir la génération de thrombine localisée et contrôlée [8].

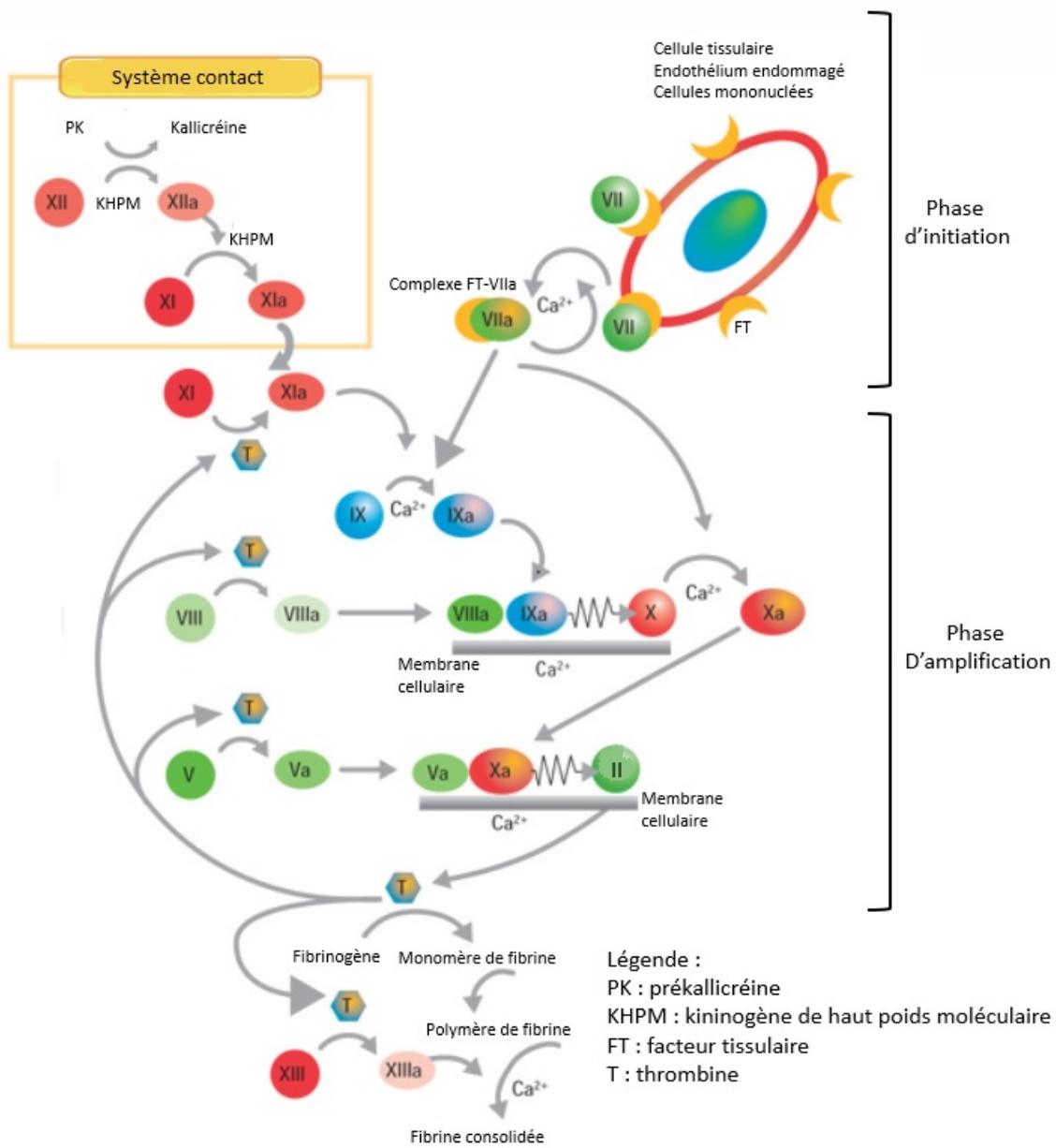


Figure 2 : Schéma de la coagulation [9]. L'encadré jaune correspond au système contact d'activation de la coagulation, dont les anomalies perturbent les tests de coagulation *in vitro*, mais sont asymptomatiques (sauf pour le facteur XI).

2.2. Fibrinoformation

La fibrinoformation est un processus ordonné et complexe, comprenant plusieurs étapes :

- Relargage des fibrinopeptides A et B du fibrinogène conduisant à la formation de monomères de fibrine.
- Formation d'oligomères de fibrine puis de protofibrilles, structures composées de plusieurs monomères de fibrine liés entre eux de façon longitudinale.
- Agrégation latérale des protofibrilles conduisant à la formation de fibres de fibrine.
- Consolidation de la structure par le FXIIIa.

2.2.1. Relargage des fibrinopeptides

La polymérisation de la fibrine est initiée par le clivage par la thrombine des extrémités NH₂-terminales des chaînes peptidiques A α et B β du fibrinogène entraînant le relargage des fibrinopeptides A et B. Cette modification catalytique donne naissance à un monomère de fibrine.

Le relargage du fibrinopeptide A a pour conséquence l'exposition d'une séquence d'acides aminés de la chaîne A α (« knob » 'A'), qui est complémentaire d'une partie de la chaîne γ des autres monomères de fibrine appelée « hole » 'a'.

Le relargage du fibrinopeptide B, a pour conséquence l'exposition d'une séquence d'acides aminés de la chaîne B β (« knob » 'B'), qui est complémentaire d'une partie de la chaîne β des autres monomères de fibrine appelée « hole » 'b'.

L'action de la thrombine sur le fibrinogène est séquentielle. Il est démontré que le clivage du FpB est secondaire au clivage du FpA lors de la fibrinoformation [10], et le délai entre le clivage du fibrinopeptide A et B est essentielle à l'obtention d'un réseau organisé de fibrine [11].

2.2.2. Formation d'oligomères de fibrine et de protofibrilles.

Dans un premier temps, les monomères de fibrine s'agrègent de façon longitudinale. La première étape correspond à la liaison entre le knob 'A' d'un monomère de fibrine et le hole 'a' de la chaîne γ d'un autre monomère de fibrine. C'est une liaison hydrogène appelée interaction « knob-to-hole ». L'agrégation de plusieurs monomères de fibrine entre eux conduit à la formation d'oligomères de fibrine (figure 3). Cette étape ne nécessite que le clivage du FpA, ainsi, les monomères de fibrine qui constituent les oligomères de fibrine possèdent encore le FpB.

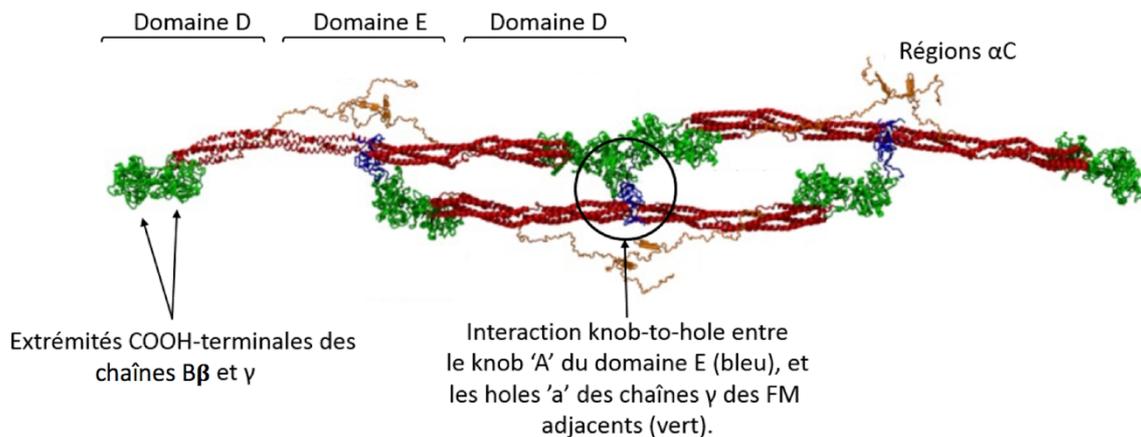


Figure 3 : *oligomère de fibrine composé de 3 monomères de fibrine adapté de [3].* En rouge sont représentées les 3 paires de chaîne A α , B β , et γ . En vert sont représentées les extrémités COOH-terminales des chaînes B β et γ (domaine D). En bleu sont représentés les domaines centraux E. Dans le cercle noir figure l'interaction knob-to-hole entre le knob 'A' d'un FM situé dans le domaine E, et les holes 'a' situés dans le domaine D de deux FM adjacents.

L'addition de nouveaux monomères de fibrine provoque l'élongation de la structure, qu'on appelle alors protofibrille : structure longitudinale constituée de 2 « brins » de monomères de fibrine positionnés en quinconce [5] (figure 4).

2.2.3. Agrégation latérale des protofibrilles

Dans un second temps, les protofibrilles s'agrègent latéralement pour former une fibre de fibrine. L'agrégation latérale est toujours secondaire à l'agrégation longitudinale des monomères de fibrine et semble n'intervenir que lorsque les protofibrilles ont atteint une longueur suffisante [12]. Les mécanismes à l'origine de l'agrégation latérale, et la nature des liaisons entre protofibrilles demeurent encore largement méconnus.

L'hypothèse fréquemment rencontrée dans littérature reste que l'agrégation latérale entre protofibrilles repose sur l'interaction knob-to-hole entre le knob 'B' (exposé après clivage du FpB) d'un FM, et le hole 'b' d'un FM adjacent [13]. Cette hypothèse vient surtout du fait qu'il existe un parallèle entre le relargage secondaire du FpB par rapport au FpA, et l'agrégation latérale secondaire à l'agrégation longitudinale des monomères de fibrine.

Le clivage secondaire du FpB est dû au fait que le FpB n'est clivé qu'au sein d'oligomères de fibrine, ou de protofibrilles [14]. Pechik et al. expliquent ce phénomène par le fait que lors de la formation d'un oligomère de fibrine, le rapprochement de deux domaines D autour d'un domaine E possédant encore le FpB, entraîne l'exposition accrue du FpB, et son clivage par la thrombine est ainsi facilité [4]. Dans cette même étude, ils montrent qu'une fois le FpB clivé, l'agrégation latérale entre protofibrilles s'accélère.

Cependant, cette hypothèse est largement remise en question. Hantgan et al. ont montré que le clivage du FpB n'est pas nécessaire à l'obtention d'un réseau de fibrine normal [14]. En remplaçant la thrombine comme enzyme clivant les fibrinopeptides, par la reptilase, qui est incapable de cliver le FpB, Hantgan et al. ont pu constater une polymérisation normale de la fibrine. Le clivage secondaire du FpB n'est donc pas uniquement responsable de l'agrégation latérale entre protofibrilles.

Yang et al. eux, proposent que l'agrégation latérale entre protofibrilles repose en partie sur l'interaction entre deux nodules β de deux protofibrilles adjacentes [15].

Plus récemment, Tsurupa et al. ont montré que les domaines α C (correspondants aux extrémités COOH-terminales des chaînes $A\alpha$) ont un rôle dans l'agrégation

latérale des protofibrilles [16]. En effet, lors de la polymérisation de la fibrine, ces domaines interagissent entre eux, et avec le domaine E de protofibrilles adjacentes ce qui permet le rapprochement des protofibrilles entre elles [17].

Parallèlement à l'élongation et l'épaississement des fibres de fibrine, un phénomène de branchement entre protofibrilles s'opère, afin de permettre la structure tridimensionnelle et la réticulation du réseau de fibrine (figure 4).

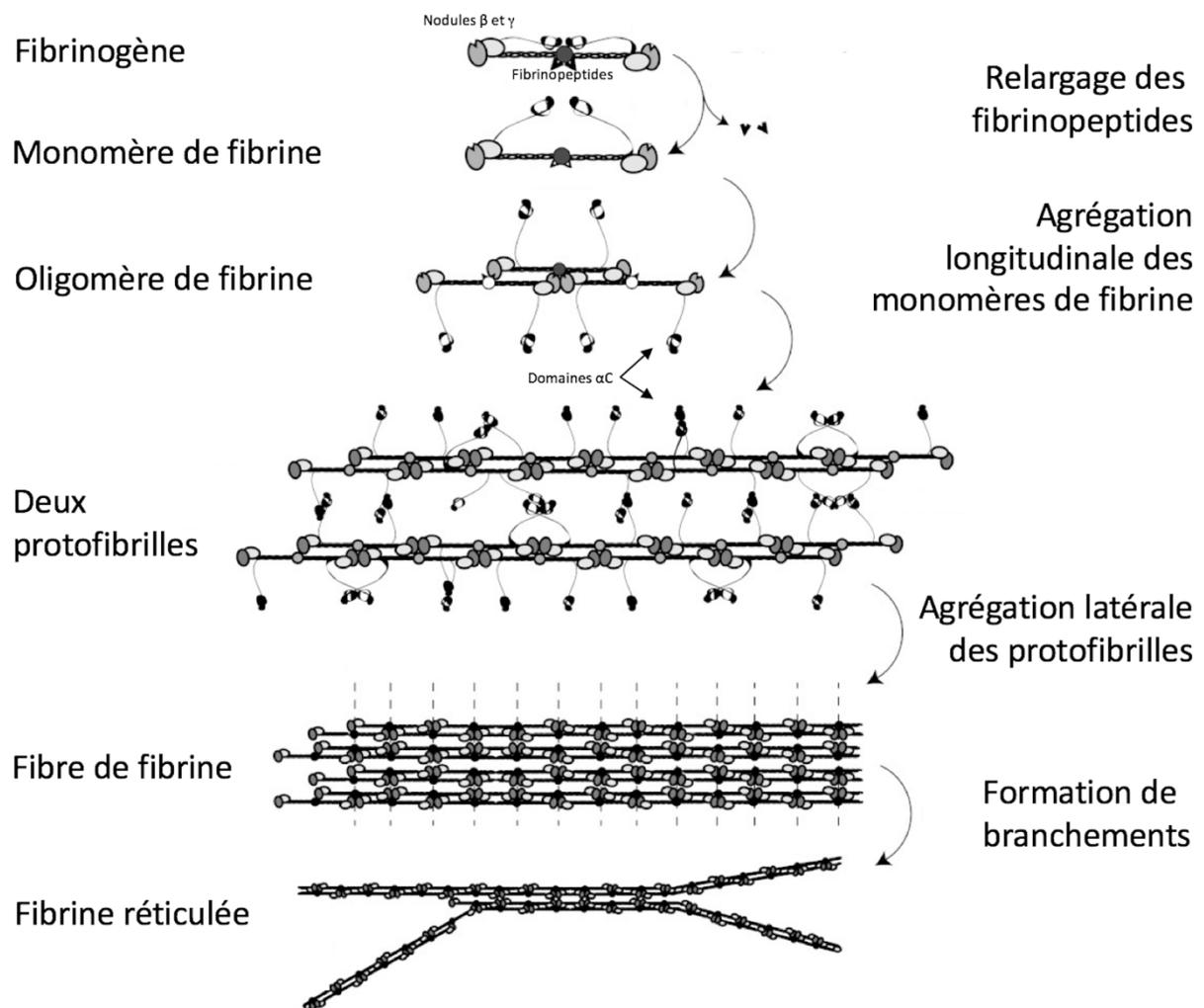


Figure 4 : Représentation schématique des différentes étapes de la polymérisation de la fibrine, d'après [3]. Le schéma montre le relargage enzymatique des fibrinopeptides, permettant l'agrégation des premiers monomères de fibrine entre eux, formant un oligomère de fibrine, puis une protofibrille. L'agrégation latérale entre protofibrilles conduit à l'apparition d'une fibre de fibrine qui, grâce à la formation de branchements, prend sa conformation tridimensionnelle.

2.2.4. Action du Facteur XIII sur les polymères de fibrine.

La fibrinof ormation se termine par l'action du FXIII activé sur les polymères de fibrine. Le FXIII est une transglutaminase qui nécessite une activation calcium-dépendante par la thrombine. Le facteur activé permet de former des liaisons covalentes entre les monomères de fibrine. La liaison covalente créée correspond à un pont γ -glutamyl- ϵ -lysyl entre deux domaines γ de monomères de fibrine adjacents. Ce phénomène est appelé le « cross-linking » de la fibrine, et permet de consolider le réseau de fibrine.

2.3. Fibrinolyse :

La fibrinolyse est l'étape finale du processus d'hémostase. Elle débute dès l'initiation du processus d'hémostase, et a pour objectif de limiter l'extension du caillot de fibrine, et de le résorber, une fois la cicatrisation du vaisseau terminée.

2.3.1. Acteurs de la fibrinolyse :

La plasmine est une sérine protéase, enzyme clé de la fibrinolyse. Elle est capable de dégrader la fibrine, le fibrinogène, mais aussi d'autres facteurs de la coagulation. La plasmine est formée à partir du plasminogène, protéine synthétisée par le foie, qui circule dans le plasma sous forme inactive. Le clivage de la liaison peptidique entre l'arginine 561 et la valine 562 du plasminogène provoque la transformation du plasminogène en plasmine. On distingue 2 types d'activateurs :

- L'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) est synthétisé par les cellules endothéliales sur le site du caillot. Le t-PA possède très peu d'activité sur le plasminogène non lié à la fibrine. En présence de fibrine, le t-PA et le plasminogène, se lient sur les résidus lysine de la fibrine. La formation de ce complexe fibrine-t-PA-Plasminogène permet l'activation du plasminogène en plasmine.

- L'urokinase (u-PA), activateur ne se liant pas spécifiquement à la fibrine.

Les systèmes inhibiteurs de la fibrinolyse sont de plusieurs types :

- L' α 2-antiplasmine est une glycoprotéine sécrétée par le foie inhibant la plasmine. Le mécanisme d'inhibition consiste en une liaison covalente forte, spécifique et rapide avec la plasmine. L' α 2-antiplasmine inhibe également la fibrinolyse en bloquant la liaison du plasminogène aux résidus lysine de la fibrine de façon compétitive.
- Les inhibiteurs de l'activateur du plasminogène : 2 types d'inhibiteurs de l'activateur du plasminogène ont été identifiés. Le principal étant le PAI-1, synthétisé par l'endothélium et stocké majoritairement dans les granules α des plaquettes. L'inhibition de l'activateur du plasminogène consiste en la formation d'un complexe serpine protéase entre les 2 molécules par liaison covalente entre le PAI-1 et le site actif de l'activateur du plasminogène [18]. Le PAI-2 lui, a un rôle moindre, il est surtout retrouvé en quantité importante lors de la grossesse [19].
- Le thrombin activated fibrinolysis inhibitor (TAFI), est une protéine synthétisée par le foie, activée par la thrombine mais aussi par la plasmine. Le TAFI est capable de cliver les résidus lysine de la surface de la fibrine, empêchant la liaison du plasminogène et du t-PA à la fibrine, et diminuant ainsi l'activation du plasminogène [20].

2.3.2. Déroulement de la fibrinolyse :

En l'absence de caillot de fibrine, le t-PA ne possède qu'une activité très faible. Il est synthétisé sous forme active dans la circulation, mais se retrouve complexé par son inhibiteur principal, le PAI-1, très rapidement. En effet, la demi-vie d'inactivation du t-PA dans la circulation est estimée à 2 minutes [21].

Lors de la polymérisation de la fibrine, les monomères de fibrine subissent des changements de conformation, entraînant l'apparition des sites de fixation pour le t-PA et le plasminogène. Yakovlev et al. ont montré que la liaison entre le domaine E d'un monomère de fibrine, et les domaines D de monomères adjacents (interaction « knob-to-hole » entre le nœud 'A' et le hole 'a') est à l'origine des changements de conformation observés. Les sites de fixation pour le t-PA et le plasminogène correspondent à des résidus lysine, et sont situés sur le domaine D des monomères de fibrine. Ce phénomène est réversible, puisqu'un domaine D seul, ou une molécule de D-dimère est incapable de fixer le plasminogène et le t-PA [22].

Ce n'est que lorsque ces 2 molécules sont adsorbées sur la fibrine, que le t-PA peut activer le plasminogène en plasmine. Le clivage de la liaison peptidique par le t-PA entre l'arginine 561 et la valine 562 provoque la formation de plasmine qui est constituée de 2 chaînes polypeptidiques reliées par un pont disulfure. Le site actif de la plasmine est situé sur la chaîne légère. La plasmine formée reste fixée à la fibrine et commence la digestion protéolytique de la fibrine.

La digestion protéolytique par la plasmine s'effectue sur de nombreux sites de la fibrine. Les sites préférentiels de protéolyse semblent être situés au niveau de résidus lysine et arginine de la chaîne $A\alpha$ et $B\beta$ [21], situés entre les domaines D et le domaine E. L'initiation de la dégradation de la fibrine par la plasmine entraîne l'exposition de nouveaux sites de liaison pour le t-PA et le plasminogène, accentuant ainsi le phénomène [23].

L'action de la plasmine sur la fibrine entraîne l'apparition de produits de dégradation de la fibrine (PDF), ensemble hétérogène de molécules, possédant une taille et une structure très variable. Plusieurs phénomènes sont à l'origine de cette hétérogénéité. Tout d'abord, la multitude de sites de protéolyse, et l'action aléatoire de la plasmine sur la fibrine entraînent la production de produits de dégradation de taille variable, pouvant même correspondre à de véritables protofibrilles [21]. Ensuite, la structure de la fibrine elle-même et son niveau de réticulation impactent la structure des molécules de dégradation.

Les produits de dégradation de la fibrine sont également différents, selon que la plasmine exerce son action protéolytique sur de la fibrine ayant subi le « cross-linking » par le facteur XIII ou non. En effet, la plasmine ne détruit pas les liaisons covalentes entre les 2 domaines D de monomères de fibrine adjacents. L'action de la plasmine sur de la fibrine ayant subi le « cross-linking » par le facteur XIII produit donc des fragments contenant le motif D-D appelés D-dimères [24].

De plus, il est important de noter que la plasmine est capable de dégrader le fibrinogène, et ainsi entraîner la formation de produits de dégradation du fibrinogène (PDFg), proches des produits de dégradation de la fibrine, mais contenant les fibrinopeptides A et B.

Les principaux fragments résultant de l'action de la plasmine sur la fibrine et le fibrinogène sont désignés par une lettre ou un ensemble de lettres. Ils sont représentés sur la figure 5.

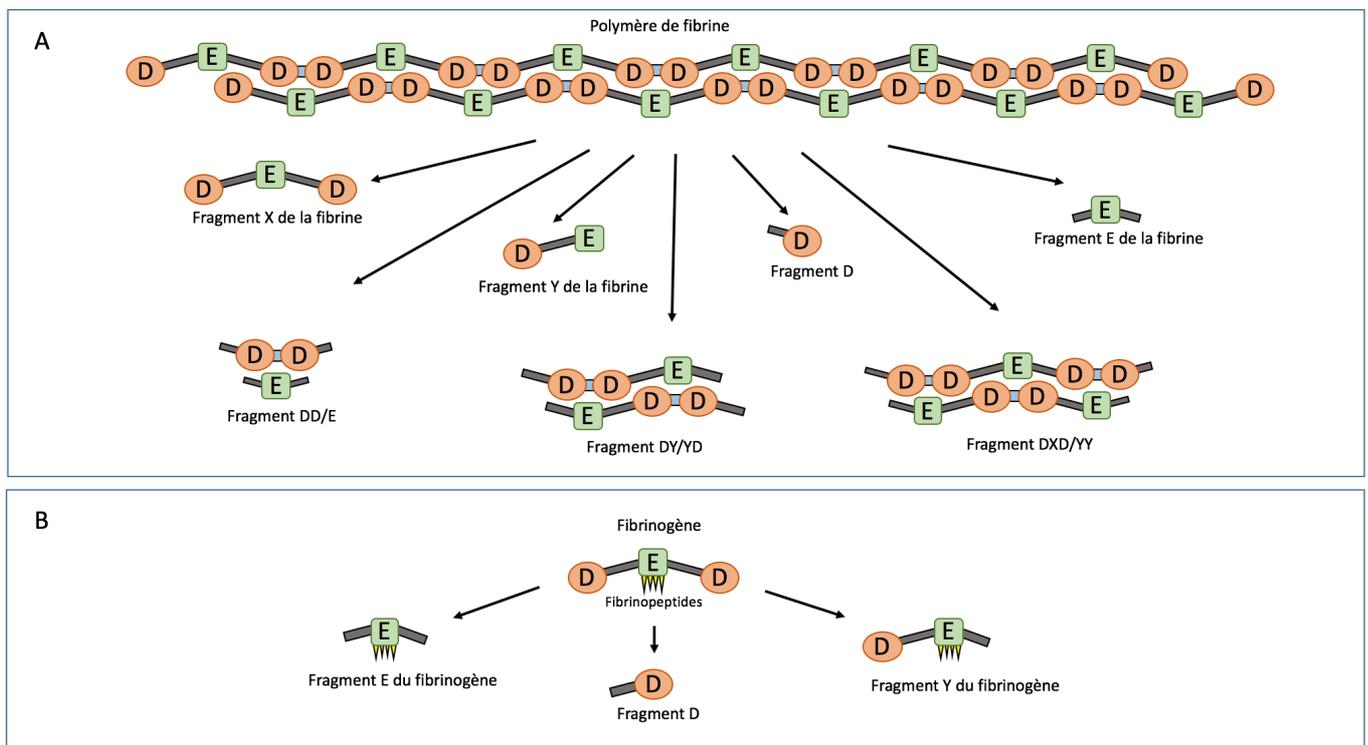


Figure 5 : Action de la plasmine sur la fibrine et le fibrinogène d'après [25]. Les produits de dégradation de la fibrine et du fibrinogène sont de structure et de taille variable, dépendantes des sites de protéolyse par la plasmine.

La fibrinolyse est un processus dynamique organisé, qui permet de résorber le caillot de fibrine efficacement, de la surface du caillot vers l'intérieur. Sakharov et al. en utilisant du plasminogène et du t-PA marqués à la fluorescéine, ont pu montrer que ces molécules s'accumulent de façon importante dans la couche superficielle du caillot et dans les fragments de fibrine qui s'en détachent. Ainsi la concentration en plasminogène dans la couche superficielle du caillot peut atteindre jusqu'à 30 fois celle retrouvée dans le plasma [26].

L'utilisation de molécules marquées (plasminogène, t-PA et fibrinogène), a permis de visualiser les fibres de fibrine, et de localiser l'endroit du caillot qui subit d'importantes modifications lors de la lyse. Ils ont pu conclure que la fibrinolyse active ne se produit que dans la couche superficielle du caillot (n'excédant pas 5 à 8 μm), et que le processus de fibrinolyse s'effectue progressivement, couche par couche, vers le centre du caillot (figure 6).

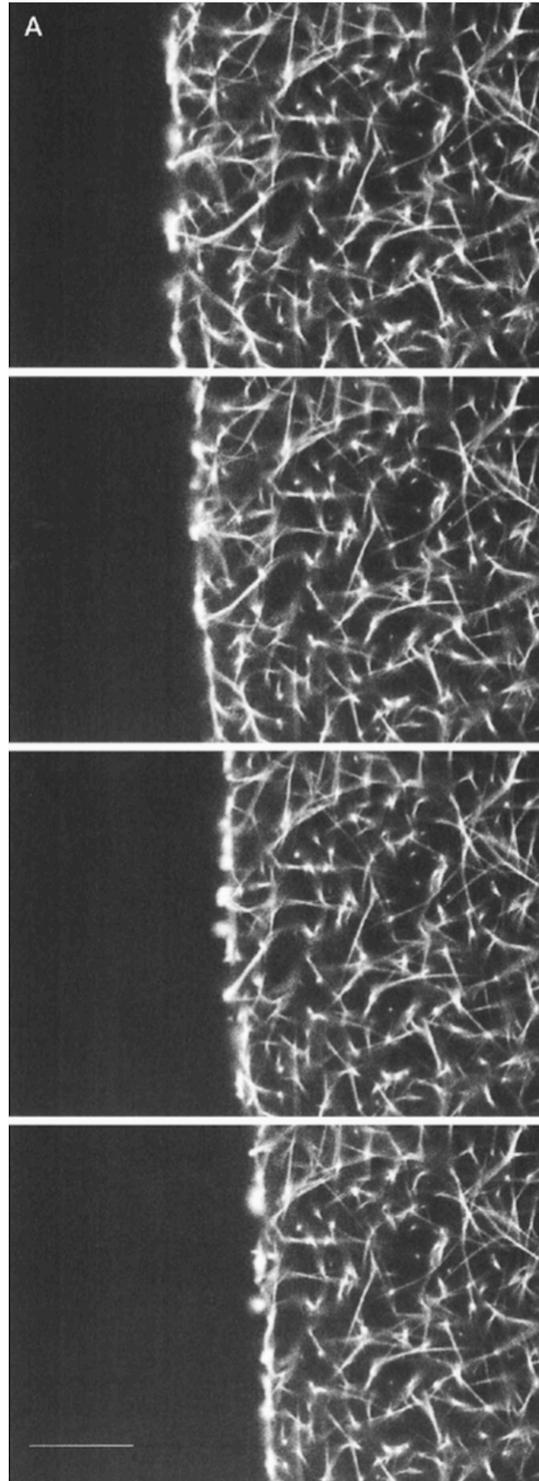


Figure 6 : Lyse séquentielle du caillot de fibrine en microscopie confocale (intervalles de 30 secondes entre les 4 images). Les fibres sont visualisables grâce à l'utilisation de fibrinogène marqué. On peut constater que les fibres situées en profondeur du caillot ne subissent pas de réarrangements aux premières étapes de la lyse, et que la lyse du caillot commence par la couche superficielle, et progresse vers le centre du caillot.

3. Les marqueurs de fibrine et de fibrinolyse

3.1. Les monomères de fibrine et les complexes solubles

3.1.1. Définition

Le terme « monomère de fibrine » au sens strict se réfère à la molécule qui ne diffère du fibrinogène que par le clivage des fibrinopeptides A et B (figure 7). La molécule contient les 3 paires de chaînes polypeptidiques $A\alpha$, $B\beta$ et γ organisées en 2 domaines D et un domaine E.

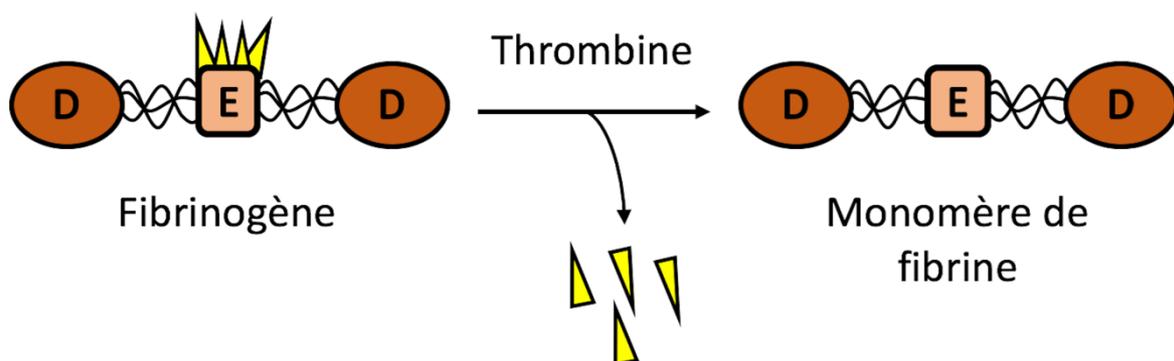


Figure 7 : Anatomie du monomère de fibrine.

Les monomères de fibrine formés après l'action de la thrombine sur le fibrinogène sont normalement destinés à se polymériser en fibrine. Ils ont aussi la propriété de se lier soit avec le fibrinogène, soit avec des produits de dégradation de la fibrine ou du fibrinogène, sous forme de complexes solubles [27].

La définition précise de ces complexes solubles, et la structure des espèces moléculaires qui sont associées à ce terme sont confuses dans la littérature. Les complexes solubles se réfèrent à un ensemble de molécules de taille et de structure variables, comportant au moins un monomère de fibrine, relié à une molécule de fibrinogène ou de PDF.

Parallèlement, la description des espèces moléculaires reconnues par les méthodes de dosage des monomères de fibrine et des complexes solubles n'est pas explicite dans les documents fournis par les industriels. Pour la méthode STA® Liatest® FM, l'anticorps monoclonal utilisé reconnaît les monomères de fibrine seuls, et ceux associés au fibrinogène et/ou aux PDF sous forme de complexe solubles [28][29]. Ainsi, dans cet exposé, lorsque l'on parle d'une concentration en FM ou du dosage des FM, cela correspond à la fois aux monomères de fibrine qui circulent seuls, et aux monomères qui circulent sous forme de complexes solubles.

On peut établir un parallèle avec les D-dimères. En effet, le terme « D-dimères » au sens strict désigne un motif constitué de 2 domaines D reliés entre eux par liaison covalente. Mais le dosage des D-dimères englobe tous les produits de dégradation de la fibrine comportant ce motif, la réactivité des anticorps utilisés par les différents fournisseurs pouvant montrer des différences importantes entre les espèces moléculaires ciblées (produits de dégradation de taille différente).

3.1.2. Dosage des monomères de fibrine et des complexes solubles

3.1.2.1. Historique des méthodes de dosage

Le dosage des monomères de fibrine et des complexes solubles, existe depuis plusieurs décennies. Cependant, la réelle reconnaissance de son utilité diagnostique est récente puisque ce paramètre a été ajouté aux critères diagnostique de CIVD décompensée de l'International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) en 2013. La difficulté d'obtention d'un dosage quantitatif précis des monomères de fibrine réside dans la grande variabilité de taille et de structure de ces derniers, due à des modulations de l'activité de la thrombine, de la plasmine, et du facteur XIII, et également à la concentration variable du substrat, le fibrinogène, et des autres espèces de dégradation déjà formées.

La plus ancienne méthode de détection des complexes solubles date des années 1960. Il s'agit du test à l'éthanol. Ce test repose sur la capacité de l'éthanol, *in vitro*, à gélifier un plasma citraté en présence de monomères de fibrine [30]. Le froid (+4°C) et l'éthanol libèrent les monomères de fibrine des complexes dans lesquels ils sont engagés et on observe une coagulation du plasma par polymérisation des monomères de fibrine libérés. Une autre méthode, utilisant le sulfate de protamine, est comparable au test à l'éthanol. Ce sont des méthodes semi quantitatives, opérateur dépendantes, et peu sensibles, qui sont majoritairement abandonnées de nos jours [31].

Par la suite, les monomères de fibrine ont pu être dosés par une méthode d'hémagglutination. Cette méthode utilise des globules rouges recouverts de monomères de fibrine fixés de façon covalente et irréversible à la membrane cellulaire. Lorsque ces hématies sont mises en contact avec le plasma à tester, les monomères de fibrine présents dans le plasma s'agrègent à ceux fixés sur les globules rouges, et on observe alors une hémagglutination [32]. La sensibilité de ce test est supérieure à celle des techniques précédentes, mais reste une méthode opérateur dépendante manquant de précision.

Plusieurs méthodes quantitatives ont été développées, notamment le test « COA-SET fibrin-monomer » développé à la fin des années 80 par le laboratoire Kabi Vitrum Diagnostica®, aujourd'hui disparu. Il s'agit d'une réaction enzymatique utilisant le plasminogène et un substrat chromogénique (peptide + p-nitroaniline), permettant un résultat quantitatif des monomères de fibrine (figure 8)[33]. En présence d'un excès d'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA), et d'une quantité connue de plasmine, les monomères de fibrine du plasma à doser vont servir de support à la fixation du t-Pa, et ainsi permettre l'activation du plasminogène en plasmine. La plasmine hydrolyse ensuite le substrat chromogénique entraînant la libération de 4-nitroaniline. La quantité de 4-nitroaniline libérée est directement proportionnelle avec la quantité de monomères de fibrine à doser et est détectée par spectrophotométrie à 405nm.

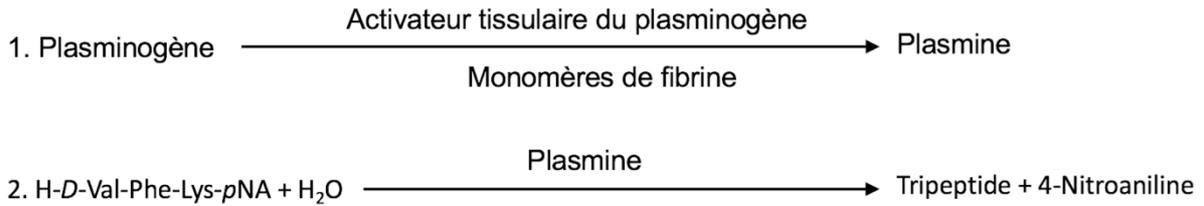


Figure 8 : Réaction enzymatique du dosage quantitatif des monomères de fibrine par la méthode COA-SET FM de Kabi Vitrum Diagnostica® d'après [33].

L'utilisation des anticorps monoclonaux a permis par la suite de gagner en sensibilité et en spécificité. G. Soe et al. ont créé un anticorps monoclonal reconnaissant un épitope qui est situé sur la chaîne $A\alpha$, au niveau du domaine E du FM. Cet épitope n'est exposé qu'après clivage du FpA par la thrombine. L'inconvénient de cette méthode est que cet anticorps ne reconnaît pas l'épitope du FM monomoléculaire. Un changement de conformation de cet épitope via la liaison du FM au fibrinogène ou un de ses dérivés semble nécessaire pour que l'anticorps le reconnaisse [34]. Cette méthode dose donc les complexes solubles, mais pas les FM qui circulent seuls.

La méthode STA® LIA-TEST FM® utilisée dans ces travaux est également une méthode utilisant un anticorps monoclonal, mais possède l'avantage d'être rapide et automatisée.

3.1.2.2. Méthode STA® LIA-TEST® FM :

La méthode de dosage des FM proposée par Stago® est une méthode immuno-turbidimétrique automatisée.

Le plasma à doser est mis en contact avec des microparticules de latex sensibilisées avec un anticorps monoclonal dirigé contre les FM (anticorps F405). La fixation des FM par les anticorps provoque l'agrégation des microparticules de latex entre elles, ce qui va augmenter la turbidimétrie du milieu. Cette variation est détectée par spectrophotométrie, et sera proportionnelle à la quantité de FM présente dans le plasma à doser.

L'anticorps monoclonal utilisé est dirigé contre le domaine E du monomère de fibrine. L'épitope correspond à la région N-terminale de la chaîne $A\alpha$, accessible à l'anticorps uniquement après libération des FpA par la thrombine (région située sur le knob 'A') [35]. Le fibrinogène possédant 2 fibrinopeptides A, il existe donc 2 sites de liaisons de l'anticorps sur une molécule de FM.

Hamano et al. montrent qu'il n'existe pas de réaction croisée avec le domaine D, les D-dimères ou le fibrinogène et ses produits de dégradation (figure 9). L'anticorps reconnaît uniquement le monomère de fibrine, le fragment X de la fibrine (qui ne diffère du FM que par l'absence des régions αC), le fragment Y de la fibrine, et le fragment E de la fibrine, cf Figure 5.

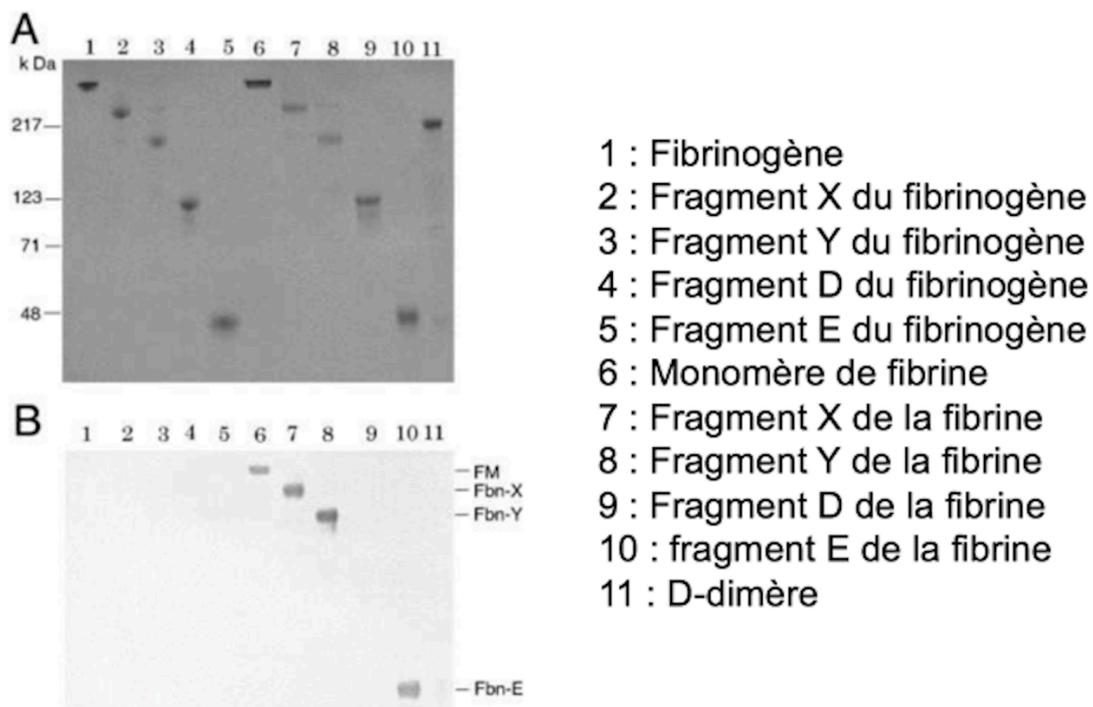


Figure 9 : *spécificité de l'anticorps monoclonal F405 d'après [35]. A : migration des différentes formes de fibrinogène et de fibrine (molécules de 1 à 11). B : migration des espèces reconnues par l'anticorps F405.*

La spécificité de l'anticorps réside dans le fait que l'épitope est masqué par les liaisons hydrogènes entre le domaine D et E (interactions knob-to-hole). En effet, il

est montré que l'anticorps n'a pas de réactivité avec le fragment DD/E (voir figure 5) [28]. Ceci implique que pour qu'un fragment soit reconnu par l'anticorps, il faut que le domaine E soit débarrassé des fibrinopeptide A, mais que les épitopes ne soient pas masqués par liaison aux domaines D.

La complexité ne s'arrête pas là. La description précise de la totalité des espèces moléculaires reconnues par l'anticorps n'est pas clairement définie dans la littérature. Hamano et al. montrent que l'anticorps est capable de réagir avec les monomères de fibrine au sein des complexes solubles (FM liés à une molécule de fibrinogène ou de PDF). Or la liaison entre un FM et le fibrinogène passe par l'interaction knob-to-hole entre le domaine D du fibrinogène et le domaine E du FM, qui masque l'épitope de l'anticorps F405. Comme l'anticorps possède 2 domaines de fixation par monomère de fibrine, l'hypothèse que l'on peut émettre est donc que les complexes solubles reconnus par la méthode STA® Liatest® FM correspondent à une molécule de FM liée à une molécule de fibrinogène ou à un PDF, tout en gardant un site de liaison pour l'anticorps.

3.1.3. Intérêts du dosage des monomères de fibrine

Les monomères de fibrine sont le témoin d'une activation de la coagulation, et au sein de l'organisme, reflètent l'action de la thrombine sur le fibrinogène. Si son intérêt dans le diagnostic de certains états pathologiques comme la CIVD est reconnu, l'utilité de ce paramètre biologique reste à démontrer dans de nombreux autres domaines.

3.1.3.1. CIVD

➤ Définition

La coagulation intravasculaire disséminée ou CIVD, est un syndrome acquis, toujours secondaire à une situation pathologique, caractérisé par une activation excessive et non contrôlée de la coagulation. La thrombine générée par ce

phénomène est à l'origine de thromboses, majoritairement dans la microcirculation, qui peuvent entraîner un dysfonctionnement d'organe pouvant mener à une défaillance multiviscérale.

Parallèlement au phénomène de thrombose, la consommation de facteurs de la coagulation et de plaquettes lors du phénomène de CIVD engendre des complications hémorragiques[36].

Les situations pathologiques pouvant entraîner une CIVD sont multiples et très hétérogènes ; le sepsis, et le trauma grave restant les 2 situations les plus associées à ce syndrome (tableau 1).

Cause de CIVD	Exemples de situations pathologiques pouvant être à l'origine de CIVD
Infections	Bactériennes : gram positif = gram négatif, leptospirose, rickettsioses... Virales : CMV, HIV, Hépatites, dengue Fongiques : Aspergillose pulmonaire invasive Parasitaires : paludisme
Cancers	Tumeurs solides, adénocarcinome de la prostate, LAM3.
Origines obstétricales	Rétention fœtale intra-utérine, pré-éclampsie, hématome rétroplacentaire,
Origines toxiques et immunologiques	Morsure de vipère, Incompatibilité ABO, GVH...
Origines inflammatoires	Traumatisme sévère, brûlures sévères, hypothermie sévère, pancréatites aiguës
Origines vasculaires	Anévrisme aortique, hémangiomes...
Pathologies hépatiques	Cholestase gravidique, hépatites fulminantes

Tableau 1 : *situations pathologiques susceptibles d'entraîner une CIVD d'après [37].*

➤ Physiopathologie de la CIVD

Les situations pathologiques mentionnées précédemment sont généralement accompagnées d'un syndrome de réponse inflammatoire systémique, avec libération de nombreux médiateurs de l'inflammation, qui peuvent avoir pour conséquence de déclencher une CIVD. L'inflammation et la coagulation sont 2 entités intriquées qui,

grâce à des interactions complexes, peuvent avoir un impact l'une sur l'autre [38]. Les mécanismes à l'origine de la survenue de la CIVD sont de mieux en mieux connus, et le rôle de l'inflammation et de ses médiateurs de plus en plus précisément décrit. Plusieurs phénomènes sont impliqués de façon simultanée : activation de la coagulation et génération de thrombine par la voie du facteur tissulaire, dépassement des systèmes inhibiteurs, et dysfonctionnement de la fibrinolyse.

Activation de la coagulation

Tout d'abord, une activation systémique de la coagulation est mise en jeu. Elle conduit à la génération d'un excès de thrombine par la voie du facteur tissulaire. Le facteur tissulaire n'est physiologiquement pas en contact avec la circulation sanguine. Lors de situations pathologiques, le facteur tissulaire est libéré, ou exposé à la circulation sanguine et initie le processus de coagulation.

Si l'inflammation, et les médiateurs libérés lors d'une réponse inflammatoire systémique, sont considérés comme les principaux facteurs permettant l'augmentation de l'expression et de l'exposition du facteur tissulaire, son origine est multiple [39] :

- Produit par les cellules endothéliales et les cellules mononuclées en réponse aux stimuli inflammatoires
- Exposé après une lésion vasculaire
- Libéré lors de la nécrose cellulaire
- Exprimé à la surface de cellules tumorales

Dysfonctionnement des systèmes inhibiteurs

La CIVD est marquée par un dysfonctionnement et un dépassement des systèmes inhibiteurs de la coagulation mis en jeu pour limiter la formation de thrombine. Ces 3 systèmes, l'antithrombine, le système PC-PS, et le tissue factor pathway inhibitor (TFPI), sont rapidement dépassés et ne suffisent généralement pas à freiner l'hypercoagulabilité. L'excès de thrombine non inhibée est alors capable d'amplifier

sa propre génération, et ainsi de provoquer un véritable embrasement du secteur intravasculaire.

Défaillance de la fibrinolyse

L'activation importante de la coagulation entraîne une défaillance de la fibrinolyse expliquée par une augmentation du taux de PAI-1. Cet inhibiteur du t-PA est sécrété par les cellules endothéliales et les plaquettes activées, empêchant l'activation du plasminogène en plasmine. Il en découle une aggravation du phénomène pro-thrombotique pouvant aboutir à la défaillance multiviscérale observée dans la CIVD.

Enfin, la résultante de tous ces phénomènes reste une consommation excessive des facteurs de la coagulation, et des plaquettes, qui associée à la fibrinolyse secondaire réactionnelle, provoquent le risque hémorragique décrit lors des CIVD.

Autres processus à l'origine de l'apparition et de l'aggravation des troubles de la coagulation lors d'une CIVD

La survenue d'une CIVD ne se résume pas à cette conception de base. Selon l'intensité de la situation pathologique de départ et le niveau d'inflammation résultant, de nombreux autres processus sont mis en jeu :

Les cytokines précoces de l'inflammation auraient un rôle important dans l'activation de la coagulation et l'apparition de la CIVD. Ainsi, l'administration d'IL-6 chez des patients d'oncologie a entraîné une élévation de la génération de thrombine [40], et de façon contraire, l'administration d'anticorps anti-IL-6 chez des chimpanzés a permis une atténuation de l'activation de la coagulation [41]. Le TNF et l'IL-1, possèdent des propriétés procoagulantes *in vitro*, mais leur effet *in vivo* reste à démontrer.

D'autres observations ont permis de mettre en évidence le rôle pro-coagulant des acides nucléiques libres provenant de la nécrose cellulaire, ou de la dégradation des

cellules endommagées. Kannemaier et al. ont ainsi montré que l'ARN libre augmente l'auto-activation des protéases de la voie intrinsèque de la coagulation, notamment les facteurs XI et XII [42].

Plus récemment, le rôle des polynucléaires neutrophiles, et plus particulièrement des NETs (neutrophil extracellular traps) dans la coagulation a été mis en évidence. Les NETs sont un réseau fibrillaire extracellulaire constitué principalement de débris de polynucléaires neutrophiles activés, d'histones et d'ADN. Ces formations ont pour principal but de piéger et de détruire les micro-organismes, mais pourraient avoir un rôle dans le déclenchement de la CIVD lors du sepsis. Plusieurs études ont montré le rôle procoagulant des NETs, via plusieurs mécanismes, incluant l'activation du facteur XII [43], et l'inhibition du TFPI [44]. De plus, ces NETs pourraient servir de support pour l'activation et l'agrégation plaquettaire [45].

L'apparition et l'évolution de la CIVD sont donc des phénomènes très complexes à appréhender, tant le nombre d'effecteurs impliqués est important. Les dernières représentations insistent sur les interactions entre coagulation et inflammation qui, agissant l'une sur l'autre permettent de créer une boucle d'amplification procoagulante. Ainsi, certains effecteurs et protéases de la coagulation sont capables de se lier à des récepteurs transmembranaires telles que les toll-like receptors (TLR), et les protease-activated receptors (PARs) qui sont présents sur les cellules de l'inflammation. Quatre récepteurs PARs ont été identifiés comme récepteurs des médiateurs de l'inflammation : les PAR1, PAR3, et PAR4 sont récepteurs de la thrombine, et le PAR2 est activé par le facteur Xa et le complexe FT-FVIIa. Le TLR4, quant à lui est récepteur de la fibrine. L'activation des voies de signalisation médiées par ces récepteurs permet l'amplification de la réponse inflammatoire et de la sécrétion de médiateurs de l'inflammation, aboutissant à la majoration des perturbations de la coagulation et de la fibrinolyse (figure 10) [38].

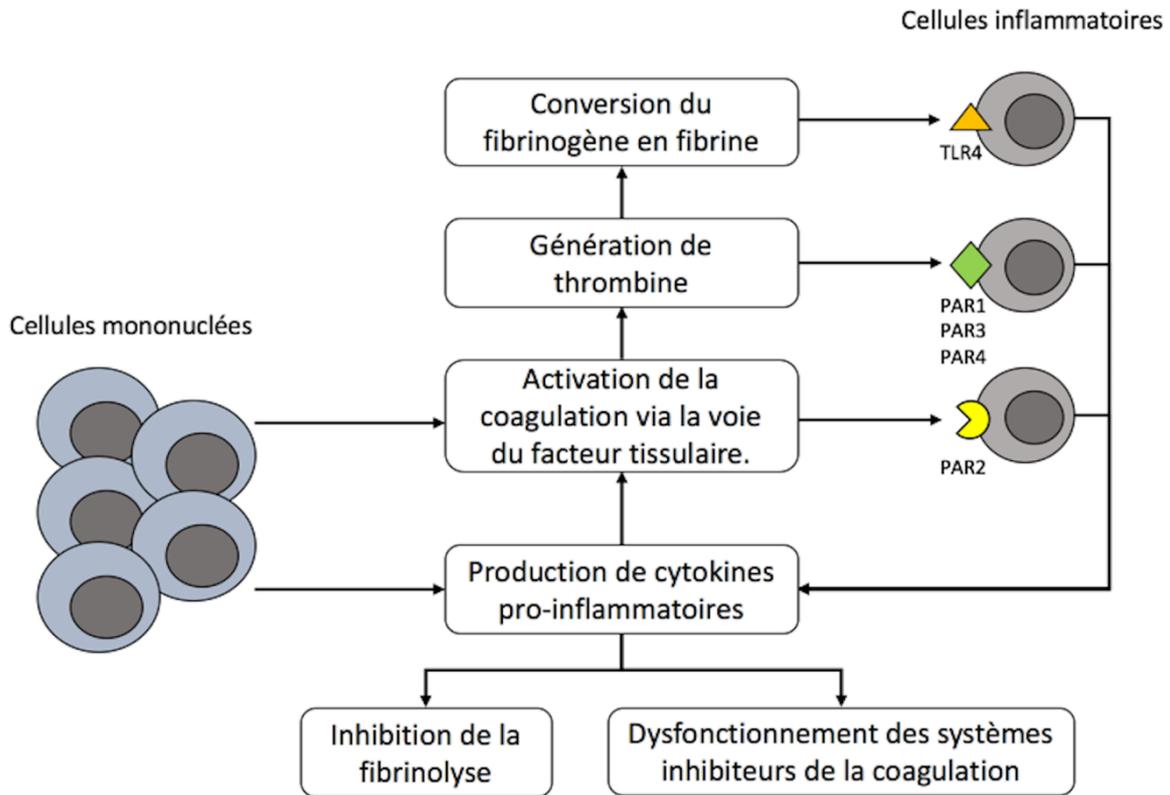


Figure 10 : *interactions entre inflammation et coagulation lors de la CIVD d'après [38].*

➤ Place des FM dans le diagnostic de la CIVD

Le taux de mortalité lié à la CIVD est important, et nécessite donc un diagnostic qui doit être le plus précoce possible. Ce diagnostic est à la fois clinique et biologique, et sa complexité réside dans le fait qu'aucun paramètre biologique simple permet d'affirmer ou d'exclure le diagnostic de CIVD [39].

Cependant, plusieurs sociétés savantes ont proposé des recommandations pour faciliter le diagnostic de CIVD. L'ISTH est à l'origine d'une harmonisation récente de ces recommandations [46] :

- L'utilisation d'un système de score est conseillée, le score reflète l'état, et l'évolution clinique des patients.

- Il est important de répéter les tests selon les résultats du laboratoire et l'évolution clinique du patient, notamment pour le diagnostic de CIVD dite latente ou compensée.
- L'association du dosage de paramètres biologiques non spécifiques est conseillée, avec *a minima* : TP, numération plaquettaire, fibrinogène, et un marqueur de la formation/dégradation de la fibrine.

Les scores proposés par le comité scientifique de standardisation de l'ISTH depuis 2001 sont présentés en figure 11 et 12.

1- Evaluation du risque : la clinique du patient correspond-elle à une situation pathologique connue comme étant associée à la CIVD ?

- Si oui : utiliser l'algorithme,
- Si non : ne pas utiliser l'algorithme.

2- Prescrire les tests de la coagulation suivants : TP, numération plaquettaire, Fibrinogène, marqueur de la fibrine.

3- Etablir le score :

- Plaquettes (G/L) : > 100 = 0 ; <100 = 1 ; <50 = 2.
- Elévation des marqueurs de fibrine : absence = 0 ; élévation modérée = 2 ; forte élévation = 3.
- Taux de prothrombine allongé : < 3s = 0 ; entre 3s et 6s = 1 ; > 6s = 2.
- Fibrinogène : > 1g/L = 0 ; < 1g/L = 1.

4- Calculer le score :

- ≥ 5 : compatible avec une CIVD décompensée : répéter le score quotidiennement.
- < 5 : possible CIVD compensée ou latente : répéter le score en fonction des paramètres biologiques et de l'état clinique du patient.

Figure 11 : Score ISTH pour le diagnostic de CIVD décompensée (overt-DIC) d'après [47].

<p>1- Evaluation du risque : la clinique du patient correspond-elle à une situation pathologique connue comme étant associée à la CIVD ?</p> <ul style="list-style-type: none"> • Si oui : utiliser l'algorithme, • Si non : ne pas utiliser l'algorithme <p>2- Critères majeurs :</p> <p>Numération plaquettaire</p> <ul style="list-style-type: none"> • Taux de départ : > 100 G/L = 0 ; < 100 G/L = 1 • Evolution : Augmentation = -1 ; Stable = 0 ; Diminution = 1 <p>Taux de prothrombine</p> <ul style="list-style-type: none"> • Taux de départ : < 3 secondes = 0 ; > 3 secondes = 1 • Evolution : Augmentation = -1 ; Stable = 0 ; Diminution = 1 <p>Marqueurs liés à la fibrine :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Taux de départ : Normaux = 0 ; Augmentés = 1 • Evolution : Augmentation = -1 ; Stable = 0 ; Diminution = 1 <p>3- Critères spécifiques :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Antithrombine : Normal = -1 ; Anormale = 1 • Protéine C : Normal = -1 ; Anormale = 1 • Autre : Normal = -1 ; Anormal = 1 <p>4- Calculer le score</p> <ul style="list-style-type: none"> • ≥ 5 : compatible avec une CIVD compensée. • < 5 : non en faveur d'une CIVD compensée.

Figure 12 : Score ISTH pour le diagnostic de CIVD compensée (non-overt DIC) d'après [43].

Les marqueurs de dégradation de la fibrine dans le diagnostic de CIVD ont toute leur place. En effet ils reflètent l'ampleur des phénomènes de coagulation survenus chez le patient. Les marqueurs les plus utilisés sont les D-Dimères. Ils sont simples d'utilisation, leur dosage est robuste et rapide, et ils ont fait l'objet de nombreuses études.

Il faut néanmoins noter que les seuils permettant de définir l'« élévation modérée », et la « forte élévation » des marqueurs de fibrine ne sont pas explicites dans le score ISTH de CIVD décompensée. L'utilisation de ces scores nécessite donc au préalable la définition des seuils, qui varie selon les publications.

Les FM, qui sont le reflet de l'action de la thrombine, et donc de la formation active de fibrine, peuvent sembler intéressants dans le diagnostic de CIVD. Les données de

la littérature mettent en évidence plusieurs avantages à l'utilisation préférentielle des FM dans ce contexte :

- L'augmentation de la concentration en FM serait plus spécifique d'un processus de coagulation actif, les D-dimères et PDF pouvant rester élevés après arrêt du processus de formation de fibrine.
- La spécificité des FM pour la CIVD tiendrait également au fait qu'ils reflètent majoritairement la formation de fibrine intravasculaire, leur concentration n'étant pas affectée par la formation de fibrine dans le secteur extra-vasculaire (inflammation, chirurgie, cancers...) [48].
- Le dosage des FM et son utilisation dans le score ISTH, permet de diagnostiquer plus de patients en CIVD décompensée [49][50], mais cette sensibilité accrue dépend des seuils utilisés.
- L'utilisation de ce paramètre pourrait permettre de mieux cibler les populations à haut risque de mortalité. Mathonnet et al. ont montré qu'une concentration inférieure à 100 µg/mL de FM serait associée à un pronostic vital plus favorable [51].

3.1.3.2. Evènements thrombotiques.

Actuellement, le diagnostic biologique d'exclusion de thrombose repose sur les D-dimères, dont un taux inférieur à 500 ng/mL permet de conclure à l'absence de thrombose. Cependant, ce paramètre n'est pas spécifique de la thrombose, et la concentration en D-dimères est augmentée dans de nombreuses situations (grossesse, maladies inflammatoires, personnes âgées, infections, brûlures...) [52].

L'avantage des FM dans ce contexte réside dans le fait que l'augmentation de leur concentration reflète le processus de formation d'un caillot, et non le processus de dégradation du caillot (PDF et D-dimères). Selon Wada et al. le pic de concentration de FM serait concomitant de l'installation de la thrombose, alors que le pic de concentration des PDF ou D-Dimères n'apparaîtrait que secondairement (figure 13) [53].

Cependant ce schéma est contradictoire avec l'utilisation largement validée des D-dimères dans l'exclusion de thrombose qui ne nécessite pas de respecter un délai minimum entre les signes cliniques faisant suspecter la présence du thrombus et son exclusion en fonction des taux de D-dimères.

Selon Wada, le dosage des FM pourrait contribuer à déceler les états pré-thrombotiques.

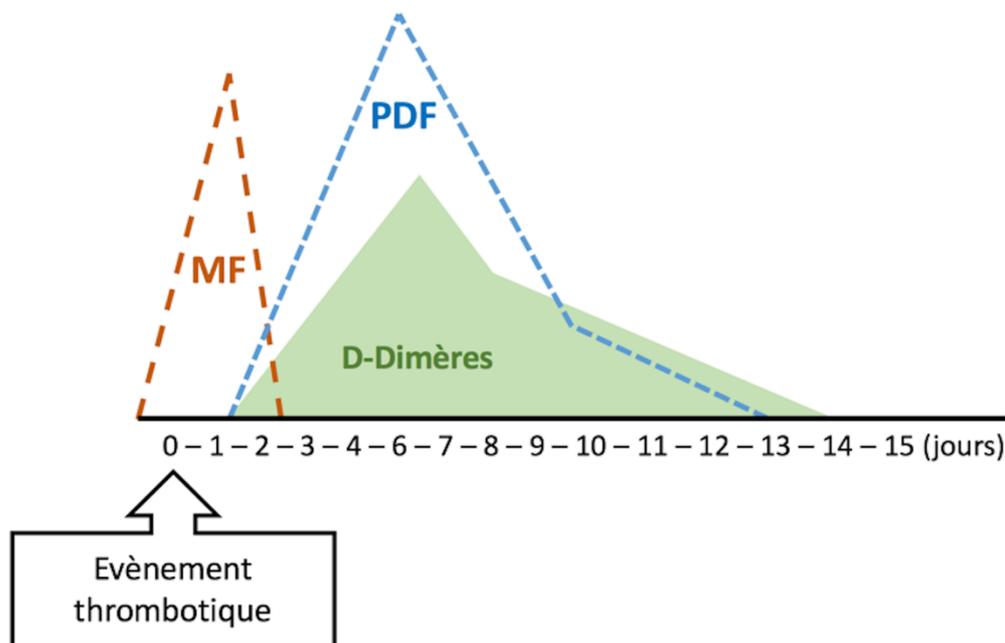


Figure 13 : élévation des marqueurs liés à la fibrine après apparition d'un événement thrombotique d'après [53].

De plus, contrairement aux D-dimères, il a été montré que le taux de FM ne varie pas au cours de la grossesse normale [54], et n'augmente pas avec l'âge [25]. Il pourrait donc être intéressant de suivre l'évolution de ce marqueur chez ces populations à risque, afin de mieux évaluer les états pro-thrombotiques.

Le taux de FM augmente dans de nombreuses autres situations, tels que les cancers solides, la cirrhose... Mais leur intérêt dans ces situations, ainsi que la définition des seuils décisionnels nécessitent de mener d'avantages d'études.

3.2. Les D-dimères

3.2.1. Définition

Les D-dimères représentent un groupe hétérogène de molécules résultant de la lyse de la fibrine par la plasmine. Le terme D-dimère fait référence à la présence dans ces molécules, du motif D-dimère, correspondant à 2 domaines D portés par deux monomères de fibrine adjacents, reliés entre eux par la liaison covalente due au facteur XIII. Sur le plan biochimique, les D-dimères possèdent une grande variabilité de structure et de taille, selon les sites de clivage de la fibrine par la plasmine. Les D-dimères sont le reflet de la lyse par la plasmine, de molécules de fibrine polymérisées ayant subi l'action du facteur XIII.

3.2.2. Méthodes de dosage

Le dosage de D-dimères est réalisé, le plus souvent, par des méthodes immunologiques, basées sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux reconnaissant divers épitopes situés uniquement sur les dimères de domaines D. La méthode de référence est l'ELISA, mais les contraintes relatives à la technique font que d'autres méthodes sont majoritairement utilisées aujourd'hui. De nombreux laboratoires utilisent l'agglutination de microparticules de latex, sensibilisées avec l'anticorps monoclonal dirigé contre les D-dimères. Cette méthode a l'avantage d'être rapide et automatisée mais sa reproductibilité dans la zone de décision est moins bonne que celle de la méthode ELISA.

Le test « Vidas D-dimer » de Biomérieux®, disponible au laboratoire, utilise le principe de l'enzyme linked fluorescent assay ou ELFA, proche de l'ELISA. C'est une méthode immunoenzymatique automatisée de type sandwich en 2 étapes à une détection finale en fluorescence. Dans un premier temps, l'échantillon est mis en contact avec des anticorps anti-D-dimères fixés sur un cône, puis un 2^{ème} anticorps

anti-D-dimères couplé à la phosphatase alcaline vient se fixer à l'antigène déjà fixé sur le cône formant ainsi un sandwich. Après plusieurs étapes de lavages, le substrat est ajouté et hydrolysé par la phosphatase alcaline en un produit (4-méthyl-ombelliférol) dont la fluorescence émise est mesurée à 450nm. La valeur du signal de fluorescence est proportionnelle à la concentration en D-dimères de l'échantillon.

La spécificité de ces méthodes réside dans le fait que l'épitope reconnu est absent de la molécule de fibrinogène, et de la fibrine non stabilisée par le facteur XIII. Il n'existe donc pas de réaction croisée avec le fibrinogène, ou ses produits de dégradation, faisant ainsi des D-dimères un marqueur de la formation et de stabilisation de la fibrine.

3.2.3. Utilisation en clinique

L'utilisation du dosage des D-dimères est largement reconnu dans le diagnostic d'exclusion de thrombose veineuse profonde (TVP) et d'embolie pulmonaire (EP) [55]. La valeur prédictive négative de ces tests est très élevée et permet d'exclure, en dessous d'un certain seuil, la présence de ces pathologies. Les trousse commerciales disponibles sont nombreuses et les méthodes de dosages hétérogènes. Certains tests, comme les Vidas® de BioMérieux, sont très documentés et le cut-off validé (500 ng/mL). Il est donc primordial de choisir une méthode de dosage des D-dimères ayant fait l'objet d'études cliniques approuvées [52].

La valeur prédictive positive du dosage des D-dimères dans le diagnostic de TVP ou d'EP est mauvaise [56]. En effet, il existe de nombreux états physiologiques ou pathologiques au cours desquels le taux de D-dimères augmente sans qu'il y ait de thrombose (tableau 2). Même si la valeur prédictive positive augmente avec la concentration, un taux élevé de D-dimères ne peut en aucun cas affirmer la présence d'une thrombose veineuse.

Situations physiologiques et pathologiques associées à une élévation des D-dimères	
Femmes enceintes	Hémolyses
Patients âgés	Hémorragies
Patients hospitalisés	Pathologies rénales ou hépatiques
Chirurgie récente	Etats infectieux et inflammatoires
Période néonatale	Dissection aortique
Traumatismes récents	CIVD
Néoplasies	Maladies inflammatoires de l'intestin
Cardiopathies ischémiques	etc.

Tableau 2 : *Situations physiologiques et pathologiques associées à une élévation des D-dimères, adapté de [52].*

L'utilisation du dosage des D-dimères dans ces populations est donc réduite, et nécessite éventuellement la détermination de nouveaux cut-offs pour pouvoir interpréter convenablement le taux de D-dimères.

Le dosage des D-dimères est également largement utilisé dans le diagnostic de la CIVD, et est inclus dans le score diagnostique de l'ISTH.

3.3. Les Produits de dégradation de la fibrine et du fibrinogène (PDF).

3.3.1. Définition

Les PDF sont un ensemble hétérogène de molécules, provenant de la dégradation de la fibrine et du fibrinogène par la plasmine.

3.3.2. Méthodes de dosage

Les principaux tests quantitatifs pour la détermination du taux de PDF utilisent des méthodes automatisées d'agglutination de particules de latex sensibilisées par un anticorps monoclonal anti-PDF.

Jusqu'en 2015, le laboratoire utilisait une méthode semi-quantitative manuelle pour le dosage des PDF. Il s'agissait du test « FDP Plasma » du laboratoire Stago®, dont le principe repose sur l'utilisation de billes de latex recouvertes d'un anticorps monoclonal dirigé contre les PDF. Une quantité précise de plasma est mélangée au réactif et déposée sur une plaque rotative. L'observation d'une agglutination permet de conclure à la présence de PDF. Pour rendre un résultat semi quantitatif, des dilutions au demi successives du plasma à doser sont réalisées et le dernier mélange où l'on observe une agglutination correspond au taux de PDF rendu (ex : 5, 10, 20, 40 µg/mL).

Désormais, la méthode utilisée au laboratoire est le « FDP Hemosil » de Werfen®. C'est une méthode quantitative automatisée qui utilise une suspension de particules de latex de taille uniforme adsorbées avec un anticorps monoclonal hautement spécifique du fragment D compris dans les dérivés de fibrine/fibrinogène. En présence de PDF, les particules de latex adsorbées s'agglutinent. L'importance de l'agglutination est directement proportionnelle à la concentration en PDF déterminée par diminution de la lumière transmise à 671 nm. Cependant, il n'existe pas d'interférence avec le fibrinogène plasmatique car l'épitope reconnu par l'anticorps n'est accessible qu'après protéolyse de la fibrine ou du fibrinogène par la plasmine.

De même que dans le cas des D-dimères, il est montré que la réactivité des anticorps monoclonaux est différente selon le fournisseur du test. Madoiwa et al. ont montré que certains anticorps reconnaissent mieux les PDF de petits poids moléculaires [57], soulignant ainsi l'hétérogénéité des espèces reconnues lors du dosage des PDF.

3.3.3. Utilisation en clinique

Les PDF sont utilisés en clinique pour le diagnostic et le suivi de la fibrinolyse, qu'elle soit primitive (situation pathologique rare), ou secondaire. La principale utilisation des PDF correspond au diagnostic et au suivi de la CIVD, et font partie du score de l'ISTH. Dans cette indication, les PDF reflètent la fibrinolyse secondaire liée à l'activation excessive de la coagulation. Leur gros avantage par rapport aux D-dimères est de couvrir une plage dynamique dix à vingt fois plus élevée.

3.4. Données sur la cinétique d'apparition et la clairance des marqueurs de fibrine

3.4.1. Apparition des marqueurs de fibrine

Peu d'études ont permis de décrire de façon précise la cinétique d'apparition des différents marqueurs de fibrine après un événement thrombotique. La figure 13 proposée par Wada et al. ne repose que sur des données théoriques, sans que la précocité relative du pic de monomères de fibrine ne soit démontré *ex vivo*.

L'apparition des monomères de fibrine est très précoce après activation de la coagulation. *In vitro*, le taux de fibrinogène décroît à mesure que le fibrinopeptide A est relargué, et donc que les monomères de fibrine sont formés. Mais Brummel et al. démontrent que l'apparition des ponts formés par le facteur XIII activé entre 2 monomères de fibrine adjacents est également concomitante à l'augmentation des taux de FpA. Ceci implique que la thrombine agit sur le fibrinogène et le facteur XIII dès l'initiation de la formation du caillot, et que le clivage du FpA, les liaisons hydrogènes entre FM et la consolidation du réseau de fibrine par le facteur XIII activé, sont des phénomènes se déroulant simultanément [10].

La complexité de la fibrinofomation ne s'arrête pas là. En effet, Rand et al. ont montré que le caillot initial renferme une importante quantité de fibrinogène non clivé par la thrombine. En effet, lorsque 80% du fibrinogène libre est consommé et inclus

dans le caillot, seul 35 à 45% des fibrinopeptides A sont relargués [58]. Le fibrinopeptide B est relargué secondairement à la formation du caillot initial, puisque l'augmentation du taux fibrinopeptide B apparaît lorsque 95% du fibrinogène a été consommé [10]. Cette chronologie confirme que l'action de la thrombine sur le fibrinogène, et la formation du caillot de fibrine ne sont pas deux phénomènes distincts et séquentiels.

Le caillot de fibrine commence à se former dès les premières traces de FM formées. Une grande quantité de fibrinogène est incorporé au caillot initial, au sein duquel la thrombine continue de cliver les fibrinopeptides A, puis B.

Si l'on considère que le processus de fibrinolyse démarre dès les premières traces de fibrine (sur laquelle vient se fixer et s'activer le plasminogène en plasmine), on peut alors émettre l'hypothèse que l'apparition des D-Dimères et des PDF est très précoce après le début de formation du caillot.

3.4.2. Clairance des marqueurs de fibrine

Peu d'études récentes s'intéressent à la clairance des monomères de fibrine et des produits de dégradation de la fibrine.

En se basant sur l'étude et la comparaison de la demi-vie de différentes formes de monomères de fibrine, plusieurs études ont montré que la clairance du monomère de fibrine dont seul le FpA est clivé (FpB non clivé, appelé alpha-fibrine) est la plus rapide [59]. Sa demi vie est de l'ordre de 1 à 2,6 heures selon les études [60][61][62], alors qu'elle est d'environ 10h pour le monomère de fibrine sans FpA et sans FpB [61], et atteint 39 à 62 heures pour le fibrinogène[60][63]. Ceci serait dû au fait que l'alpha-fibrine est plus facilement dissociable des complexes qu'elle forme avec le fibrinogène dans le sang[59].

Les D-dimères ont une demi-vie proche à celle des FM, de l'ordre de 8h [64][65], mais en post-chirurgie, la résorption des hématomes peut-être longue, ce qui explique que le retour à la normale des concentrations en D-dimères puisse

demander plusieurs semaines[66]. Le mécanisme principal expliquant la clairance des monomères de fibrine est le passage dans le secteur extravasculaire[60][62]. D'autres mécanismes y participent tels que la phagocytose des complexes solubles par le système réticulo-endothélial [67], ou leur internalisation par les plaquettes [68], et les cellules monocytoïdes [69]. Lio et al. ont également montré que le rein possède un rôle dans le catabolisme de certains produits de dégradation du fibrinogène et de la fibrine [70].

L'analyse de ces données peut donc étayer le fait que le suivi des monomères de fibrine après un événement thrombotique peut être utile, car la décroissance de son taux pourrait signifier l'arrêt de génération de thrombine et d'un processus thrombotique.

4. La coagulopathie associée au traumatisme

4.1. Généralités

La coagulopathie associée au traumatisme (ou TIC pour « trauma-induced coagulopathy ») est fréquente, complexe, et associée à une mortalité élevée. L'hémorragie massive chez le patient polytraumatisé constitue, avec le traumatisme crânien, la première cause de mortalité [71], et la présence d'au moins une anomalie du bilan de coagulation à l'admission (TP, TCA, thrombopénie...) est associée à un taux de mortalité plus élevé [72], mais également à une durée de séjour plus importante et à une plus grande incidence de syndrome de défaillance multiviscérale [73].

Il n'existe pas de consensus sur la définition de la TIC. Elle varie en fonction des études et des pays mais repose généralement sur la perturbation d'un ou plusieurs tests de coagulation de routine associé à un phénotype hémorragique [72][73][74].

La coagulopathie liée au traumatisme s'inscrit dans ce qu'on appelle la « triade létale » aux côtés de l'hypothermie et de l'acidose. Il est prioritaire de lutter contre

ces éléments chez le patient polytraumatisé, et la coagulopathie semble être le phénomène le plus complexe à appréhender, tant sur le plan diagnostique, que thérapeutique.

4.2. Physiopathologie

La coagulopathie liée au traumatisme est multifactorielle, et l'importance relative de chacun des facteurs est débattue. Dans la littérature, 2 conceptions physiopathologiques s'opposent.

Pour Frith et al. les deux facteurs les plus importants dans le développement de la TIC, sont les dommages tissulaires, et l'hypoperfusion. Ces deux phénomènes entraîneraient une activation de la voie de la protéine C, provoquant une anticoagulation systémique, et une hyperfibrinolyse. Ce schéma fait de la TIC une entité nouvelle de trouble de la coagulation. Selon ces auteurs, l'acidose, et l'hypothermie aggravent la coagulopathie secondairement [74].

Pour Gando et al. la TIC ne constitue pas une nouvelle entité, mais correspond à une CIVD avec phénotype fibrinolytique. Pour ces auteurs, les lésions tissulaires entraîneraient une libération importante de facteur tissulaire, provoquant une génération massive de thrombine, à l'origine de la coagulopathie [75].

La physiopathologie précise de la TIC est complexe à établir, notamment l'impact de la CIVD et de la fibrinolyse dans la coagulopathie.

Considérer la TIC comme une CIVD à phénotype fibrinolytique est discutable. En effet, une étude de prélèvements faits 1h après un traumatisme a pu montrer qu'aucun patient ne présentait de CIVD (d'après les critères ISTH), alors que 15% des patients avaient une coagulopathie associée au traumatisme (définie par un temps de coagulation allongé). Ceci implique que la CIVD ne semble pas faire partie de la réponse précoce au traumatisme, mais pourrait apparaître en second lieu, déclenchée par les lésions tissulaires prolongées, le dysfonctionnement endothélial,

le dépassement des systèmes inhibiteurs, et l'inflammation intense liée au traumatisme [76].

D'un autre côté, la proportion de patients présentant une hyperfibrinolyse liée au traumatisme n'est pas constante, et varie selon les publications (tableau 3) [77] :

	population	incidence d'hyperfibrinolyse	mortalité
Levrat	87	6%	100%
Caroll	161	2,50%	67%
Tauber	334	6,80%	85,70%

Tableau 3 : *Incidence d'hyperfibrinolyse et mortalité associée chez des patients polytraumatisés selon 3 études [78][79][80].*

Ces études montrent qu'il existe une corrélation étroite entre le taux de mortalité, et la présence de l'hyperfibrinolyse. Mais l'hyperfibrinolyse liée au traumatisme est d'interprétation difficile. Tout d'abord, les critères définissant l'hyperfibrinolyse sont différents. Pour Levrat et al. l'hyperfibrinolyse est définie par un temps de lyse des euglobulines < 90 minutes, alors que pour Caroll et al. le critère retenu est une lyse du caillot à 60 minutes (LY60) > 15% en thromboélastométrie. Les critères ne sont pas définis dans l'étude de Tauber et al.

De plus, l'origine de l'hyperfibrinolyse est multiple. Il existe une fibrinolyse primaire en lien avec la libération de t-PA par les cellules endothéliales et des tissus endommagés. L'hyperfibrinolyse peut également être secondaire à l'activation de la protéine C (qui provoque une augmentation indirecte du t-Pa via la neutralisation du PAI-1), et secondaire à l'activation excessive de la coagulation [81].

D'autre part, l'étude CRASH-2, a montré que l'administration d'antifibrinolytiques de manière précoce lors d'un traumatisme apportait un bénéfice en terme de survie globale, ce qui peut amener à penser que l'hyperfibrinolyse, à un degré plus modéré, est probablement plus fréquente que précédemment exposé [82].

La physiopathologie de la coagulopathie du traumatisme et celle de la CIVD à phénotype fibrinolytique possèdent donc des caractéristiques communes, aboutissant au versant hémorragique du déséquilibre de la coagulation. Gando et al se sont proposés d'éclaircir la physiopathologie de ces changements hémostatiques post-traumatiques, et de préciser les spécificités de chacune de ces entités. Ainsi d'après leur étude, la principale différence physiopathologique réside dans l'activation de la voie de la protéine C par le complexe thrombine-thrombomoduline.

En effet, l'activation de la voie de la protéine C est seulement identifiée dans la coagulopathie du traumatisme. Elle est due à la liaison de la thrombine à la thrombomoduline endothéliale et soluble, et conduit à l'inactivation des facteurs Va et VIIIa, freinant ainsi la formation de fibrine. En parallèle, la protéine C activée neutralise le PAI-1, inhibiteur de l'activateur du plasminogène, aboutissant à une stimulation de la fibrinolyse. La résultante de ces phénomènes étant le risque de saignement dû au dysfonctionnement de la coagulation et à l'augmentation de la fibrinolyse. Ces mécanismes ne sont pas retrouvés dans la CIVD à phénotype fibrinolytique. L'absence d'hyperactivation de la protéine C chez ces derniers peut être expliquée par une diminution de la thrombomoduline endothéliale [81].

Indépendamment de ces théories, d'autres facteurs sont impliqués dans l'apparition ou l'aggravation de la coagulopathie :

- L'hypothermie, qui fait partie de la triade létale, et qui est multifactorielle. Elle résulte de la diminution de la thermogénèse et de l'administration de solutés froids. L'hypothermie (surtout $\leq 34^{\circ}\text{C}$) provoque une diminution des fonctions plaquettaires ainsi qu'un ralentissement de l'activité enzymatique des facteurs de la coagulation, ce qui entraîne la formation plus lente d'un caillot fragilisé ne pouvant diminuer les saignements [83]. De plus, l'hypothermie entraîne une diminution de synthèse du fibrinogène [84].
- L'acidose provient de l'hypoxie tissulaire et de la production d'acide lactique suite à un traumatisme. Il est démontré que l'acidose entraîne l'accélération de la dégradation du fibrinogène, mais n'en modifie pas la synthèse. L'acidose et l'hypothermie ont donc une action complémentaire sur la diminution du taux

de fibrinogène et donc sur l'apparition et l'aggravation de la coagulopathie [85]. Dirkmann et al. en utilisant une méthode thromboélastographique d'évaluation de la coagulation, ont montré que l'acidose seule n'a pas d'impact significatif sur la coagulation. Néanmoins, lorsqu'associée à l'hypothermie, l'acidose amplifie de façon synergique les troubles de la coagulation [86].

- L'hémodilution provoquée par la transfusion de solutés dépourvus de facteurs de la coagulation (colloïdes, cristalloïdes), est également impliquée dans l'apparition de la coagulopathie. Les facteurs de la coagulation, et les plaquettes se trouvent dilués, et en quantité insuffisante pour maintenir l'hémostase normale.
- L'hypocalcémie, majoritairement provoquée par l'administration de solutés de remplissage et de produits sanguins, est fréquemment observée chez les patients polytraumatisés. Les solutés et produits sanguins provoquent une hémodilution, et contiennent également du citrate qui complexe le calcium [87]. Le calcium est le cofacteur des protéases de la coagulation. Vivien et al. ont montré qu'outre ses effets sur le système cardiovasculaire (vasodilatation, baisse de la contractilité cardiaque...), la diminution du taux de calcium chez ces patients est associée à une augmentation significative des troubles de la coagulation [88].
- Salomon et al. décrivent également l'apparition d'un dysfonctionnement plaquettaire dans la coagulopathie du traumatisme. En étudiant les fonctions plaquettaires par MEA (multiple electrode aggregometry) chez 163 patients polytraumatisés, ils ont pu mettre en évidence une diminution des fonctions plaquettaires. De plus cette diminution serait étroitement liée à une augmentation de la mortalité chez ces patients [89]. Ce phénomène peut être expliqué par l'association de plusieurs facteurs : l'exposition de collagène et de facteur tissulaire par les cellules endothéliales, la génération de thrombine et de plasmine, et la libération d'ADN, d'histones, et d'ADP par les cellules endommagées [90].

- De nombreux autres facteurs sont impliqués dans le développement ou l'aggravation de la coagulopathie lors d'un traumatisme tels que l'augmentation de la production de molécules anticoagulantes par les cellules endothéliales (type héparanes sulfate, chondroïtines sulfate), l'oxydation de molécules de la coagulation [91], ou bien encore l'augmentation du FXIa [90].

4.3. Diagnostic de la coagulopathie associée au traumatisme

Le diagnostic précoce et l'évaluation de la gravité de la coagulopathie chez un patient polytraumatisé permet l'instauration d'une thérapeutique adaptée pour réduire les complications liées au choc hémorragique. Si elle est aisément suspectée lors de saignements massifs, la coagulopathie est moins évidente chez des patients semblant stables sur le plan hémodynamique, qui peuvent néanmoins présenter d'importants troubles de la coagulation.

La clinique de la TIC reste un élément primordial (hémorragie importante, tachycardie, hypotension artérielle...), mais son diagnostic nécessite la réalisation d'examens biologiques complémentaires.

4.3.1. Tests standards de coagulation

Les tests de coagulation de routine (TP, TCA, facteurs de la coagulation, fibrinogène, numération plaquettaire) effectués au laboratoire de biologie médicale sont très utiles, et reflètent précisément l'état de coagulation du patient. Néanmoins, la réalisation de ces tests présente de nombreuses limites. Le principal inconvénient étant le délai d'obtention des résultats (en moyenne 78 minutes selon une étude de Davenport et al), délai au cours duquel l'état physiologique du patient évolue, rendant les résultats de coagulation rapidement ininterprétables [92]. Ensuite, ces tests sont réalisés sur plasma, et nécessitent donc une centrifugation du sang, les interactions entre facteurs de la coagulation et éléments figurés du sang sont par

conséquent négligées. De plus, la coagulation de routine s'effectue sur des tubes citratés, et donc sur du plasma recalcifié au moment du test ; ce qui ne reflète pas l'état physiologique d'un patient susceptible de présenter une hypocalcémie [93].

La pertinence de la biologie de routine dans le diagnostic et le suivi de la coagulopathie du traumatisme est relative, vu les délais de rendu et l'incomplétude des paramètres. Les techniques de biologie déportée ou délocalisée sur sang total se développent depuis une dizaine d'années, et permettent d'obtenir de nombreux paramètres biologiques, et de monitorer l'hémostase en continu.

4.3.2. Biologie délocalisée

La majorité des tests de biologie délocalisée pour le suivi de la coagulation au lit du malade détermine le TP/INR. David et al. ont montré que l'utilisation du test INRatio® permet de gagner 60 minutes pour l'obtention du résultat du TP, permettant ainsi la détection précoce de la coagulopathie et l'administration de plasma frais congelé [94].

Plusieurs études ont montré que la corrélation entre l'INR par biologie délocalisée et l'INR par biologie standard est satisfaisante ($R^2 > 0,93$) [94][95]. Cependant, cette corrélation est variable, et dépendante de la technique utilisée. Il est notamment démontré qu'en cas d'anémie (<10 g/dL), ou de taux de fibrinogène bas ($<1,5$ g/L), la précision du test par biologie délocalisée diminue [96]. L'impact de ces variations de mesure sur la prise en charge thérapeutique de ces patients reste à démontrer.

4.3.3. Thromboélastométrie, thromboélastographie

Des méthodes d'exploration de la coagulation globale sur sang total sont utilisées dans le suivi des patients polytraumatisés. Il s'agit de la thromboélastométrie (connue sous le nom de ROTEM ® pour rotational thrombelastometry) et la thromboélastographie (TEG®). Ces 2 méthodes sont basées sur le changement de

propriétés visco-élastométriques du sang total durant la formation du caillot. La principale différence entre ces 2 tests étant l'utilisation de cupules fixes pour le ROTEM® et de cupules rotatives pour le TEG® [97].

L'utilisation de ces tests permet de rendre compte de la dynamique de formation du caillot, de consolidation, ainsi que de dissolution. L'avantage réside également dans le fait que ces techniques prennent en compte les interactions entre les facteurs de la coagulation et de la fibrinolyse avec les globules rouges et les plaquettes, ce qui n'est pas le cas des analyses traditionnelles sur plasma.

Les résultats sont exploités sous forme d'une courbe qui représente la formation du caillot (en millimètres) en fonction du temps (en minutes), de laquelle sont déterminés plusieurs paramètres (figure 14). Ces différents paramètres possèdent des dénominations différentes selon les 2 techniques, mais leur interprétation est comparable (tableau 4).

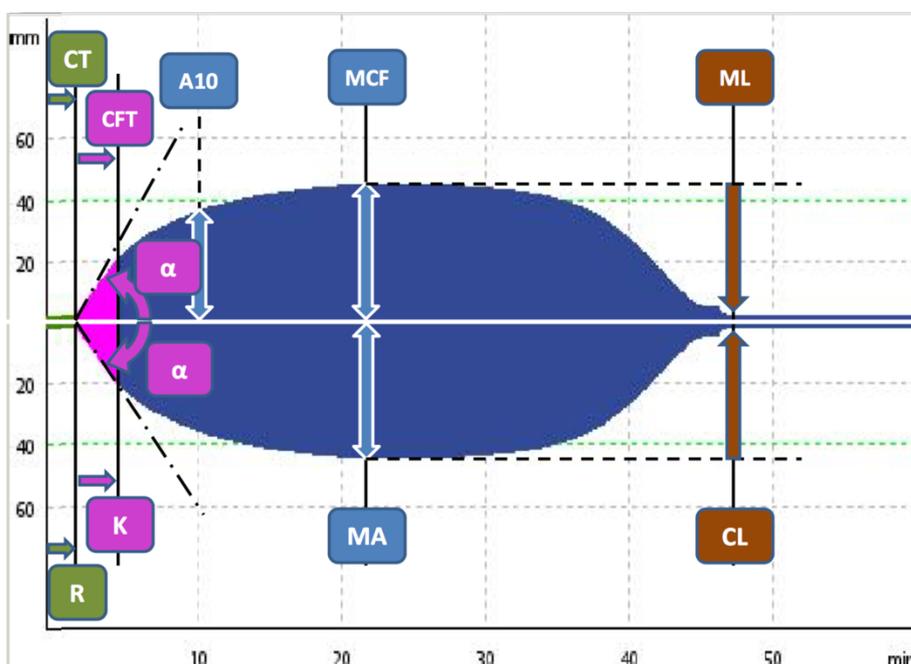


Figure 14 : Tracé de thromboélastométrie sur sang total, avec les dénominations des principaux paramètres rendus par le ROTEM® (partie supérieure), et le TEG® (partie inférieure).

Variable	Définition	Dénomination ROTEM®	Dénomination TEG®
Temps de formation du caillot	Temps entre le dépôt de sang dans la cupule et le début de la formation du caillot	CT = clotting time	R = reaction time
Vitesse de formation du caillot	Temps nécessaire pour que le caillot atteigne une fermeté de 20mm	CFT = clot formation time	K = kinetcis
Angle de formation du caillot	ROTEM® = tangente à la courbe au CT. TEG® = droite entre le point R et K.	α	α
Fermeté / Fermeté maximale du caillot	Fermeté maximale du caillot, ou fermeté à un temps défini	MCF = maximal clot firmness, A5, A10 = fermeté à 5 minutes, 10 minutes.	MA = maximal amplitude
Lyse du caillot	Lyse maximale du caillot, ou lyse à un temps défini après le MCF ou MA.	ML = maximal lysis. LY30, LY60 = Lyse du caillot à 30 minutes, 60 minutes après le MCF.	CL = clot lysis. CL30, CL60n = Lyse du caillot à 30 minutes, 60 minutes après le MA.

Tableau 4 : Liste et comparaison des principales variables des courbes ROTEM® et TEG® d'après [77].

Ces techniques connaissent un essor dans le suivi biologique du patient polytraumatisé et permettent d'aider le médecin à instaurer un traitement hémostatique adapté, et personnalisé [98].

De nombreuses études ont permis la mise au point de protocoles pour prédire les besoins transfusionnels en fonction des résultats des tests thromboélastométriques. Un modèle de prise en charge thérapeutique du patient polytraumatisé publié par Benes et al. est présenté en annexe 1.

4.4. Prise en charge de la coagulopathie liée au traumatisme

La prise en charge de la TIC est un réel enjeu chez les patients polytraumatisés. Le traitement de la coagulopathie est indissociable de celui du choc hémorragique en lui-même, responsable de la majorité des décès chez ces patients.

Il n'existe actuellement pas de recommandation globale concernant la prise en charge thérapeutique du choc hémorragique au niveau international [99]. Les protocoles thérapeutiques sont nombreux et varient fréquemment d'un établissement à l'autre.

Au niveau Européen, l'European Task Force for Advanced Bleeding Care a publié des recommandations pour la prise en charge des saignements massifs et de la coagulopathie après un traumatisme. Y sont renseignés les recommandations concernant les gestes de réanimations immédiats à adopter, les moyens de diagnostic et de suivi du saignement et de la coagulopathie, et l'administration de produits sanguins thérapeutiques [100].

Le contrôle rapide du saignement, associé au traitement le plus précoce possible de la coagulopathie, semble être le point clé de la prise en charge des patients présentant une hémorragie sévère. Nardi et al ont mis au point un protocole de « contrôle précoce de la coagulation », associant la réversion d'une potentielle prise d'anticoagulants, l'administration d'acide tranexamique, et la transfusion de produits sanguins. Ils ont pu montrer une réduction significative de la transfusion ultérieure de plasma frais congelé et de plaquettes, une diminution significative des coûts totaux de prise en charge, et une tendance à la réduction de la mortalité (non significative) [101].

4.4.1. Contrôle rapide du saignement

La réalisation la plus précoce de gestes d'hémostase afin de stopper le saignement est fondamentale. Il peut s'agir d'une simple suture de plaie, d'une mise en place d'un garrot, ou d'un acte chirurgical qui doit être le plus simple et efficace (on parle de « damage control surgery ») [100]. L'adjonction d'agents hémostatiques locaux peut également être envisagée afin de contrôler au mieux l'hémorragie [102].

4.4.2. Transfusion de culots érythrocytaires et de plasma frais congelé (PFC).

La transfusion de culots érythrocytaires est indispensable dans la prise en charge de l'hémorragie massive, afin de maintenir un taux d'hémoglobine suffisant et ainsi assurer l'oxygénation des tissus. Il est recommandé de maintenir l'hémoglobine entre 7 et 9 g/dL selon les recommandations européennes.

Le plasma frais congelé contient tous les facteurs de la coagulation (ainsi que ses inhibiteurs), et permet ainsi d'améliorer les troubles de la coagulation. Il est recommandé d'utiliser le PFC afin d'obtenir des temps de coagulation (TP, TCA) n'excédant pas 1,5 fois la normale [100]. L'administration de PFC présente tout de même de nombreux désavantages : conditions particulières de transport, nécessité de décongeler le produit, risques d'incompatibilité et d'hémodilution.

Il semblerait que la transfusion de PFC avec un ratio PFC : concentré érythrocytaire élevé (au moins 2 : 1) améliorerait la survie globale des patients en situation de choc hémorragique [103][104].

4.4.3. Transfusion de fibrinogène.

Le déficit en fibrinogène est fréquemment observé au cours des hémorragies massives, dû principalement à la coagulopathie de consommation. L'administration

de concentrés de fibrinogène a montré la diminution en besoins transfusionnels ultérieurs [105], et une relation a pu être établie entre l'augmentation de la survie et des taux de fibrinogène plus élevés [106]. La dose initiale conseillée est de 3 à 4g de fibrinogène, à répéter en fonction des résultats thromboélastométriques, ou du taux de fibrinogène.

4.4.4. Transfusion plaquettaire.

Il est recommandé de transfuser des plaquettes pour maintenir un taux supérieur à 50G/L. En cas de traumatisme crânien, il est recommandé d'élever ce seuil à 100G/L [100].

4.4.5. Transfusion de complexe prothrombinique

Le complexe prothrombinique contient les facteurs II, VII, IX, et X de la coagulation. Actuellement, son utilisation n'est recommandée que pour antagoniser les effets de la prise d'AVK. Cependant, une réduction des pertes sanguines, et une réduction des besoins transfusionnels ont été démontrées chez des patients en situation hémorragique, qu'ils soient sous AVK, ou non [107].

4.4.6. Antifibrinolytiques

L'étude CRASH-2 a montré que l'administration précoce d'acide tranexamique (3h après le traumatisme) permettait une réduction significative de la mortalité liée au saignement chez les patients traumatisés [82]. Mais les recommandations ne sont pas unanimes concernant l'administration de cet anti-fibrinolytique. Les doses et le délai optimal d'administration de l'acide tranexamique restent méconnus [108]. De plus, le mécanisme par lequel l'acide tranexamique permet de réduire la mortalité n'est pas clairement identifié [109], et il a été montré que l'administration d'acide tranexamique augmente significativement le nombre de convulsions [110].

4.4.7. Maintien de la calcémie

Le calcium est indispensable à la coagulation, et l'hypocalcémie est une complication commune des transfusions massives. Un niveau de calcium ionisé bas à l'admission est associé à une augmentation de la mortalité, et à des besoins transfusionnels plus importants [111]. Il est donc impératif de maintenir une calcémie normale tout au long de la prise en charge du patient.

4.4.8. Transfusion de facteur VII activé (FVIIa).

L'utilisation de FVIIa est recommandée en cas d'hémorragie réfractaire à toutes les autres tentatives visant à arrêter le saignement [100]. Cependant, le risque thromboembolique lié à l'administration de FVIIa est non négligeable, puisque Bucklin et al ont montré que 12,5% des patients traumatisés ayant reçu du facteur VIIa, ont développé un événement thromboembolique par la suite [112].

La prise en charge de l'hémorragie massive du patient polytraumatisé est complexe et les options thérapeutiques sont multiples. L'essentiel semble donc être d'élaborer au sein de chaque établissement, un protocole de prise en charge, qui tient compte des possibilités diagnostiques et thérapeutiques disponibles.

5. Objectif de l'étude

On se propose d'étudier le dosage des monomères de fibrine au travers de l'analyse des taux de FM :

- Au sein d'une population de sujets témoins ne présentant pas de troubles de la coagulation,
- Chez des patients polytraumatisés présentant potentiellement de très forts taux de FM,
- Au cours de la formation d'un caillot de fibrine *in vitro*.

Le laboratoire n'utilisant pas actuellement le dosage des monomères de fibrine, cette étude a tout d'abord permis d'évaluer les qualités analytiques du kit LIATEST-FM®.

L'analyse des taux de FM chez des patients polytraumatisés a été associée à l'étude de l'évolution des marqueurs de dégradation du fibrinogène et de la fibrine, en effectuant une analyse comparative des niveaux de monomères de fibrine, de produits de dégradation de la fibrine, et de D-Dimères.

De plus, le délai entre traumatisme et prélèvement des échantillons biologiques (dès 1h post-traumatisme), permet d'apprécier la réactivité précoce des marqueurs de fibrine après une activation de la coagulation, et ainsi de déterminer si le taux de monomères de fibrine présente une évolution comparable à celle des D-dimères et des PDF ou non. L'existence d'un différentiel entre l'évolution de la concentration en FM et en produits de dégradation de la fibrine pourrait théoriquement présenter un intérêt dans la prise en charge précoce, le suivi, et le pronostic des patients polytraumatisés, ou plus largement des patients présentant une activation de la coagulation.

DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES

1. Etude portant sur les patients traumatisés

1.1. Population étudiée

L'étude a porté sur des prélèvements de patients suspectés de présenter une coagulopathie liée au traumatisme. Ces prélèvements ont été récoltés dans le cadre de l'étude dénommée EXATEM, qui s'est déroulée d'octobre 2013 à avril 2014 au CHU de Bordeaux.

L'objectif principal de l'étude EXATEM était d'évaluer l'effet biologique de l'acide tranexamique (TXA) sur la coagulation des patients traumatisés, évaluée grâce au ROTEM® à l'admission et après traitement. En effet le TXA chez le patient traumatisé présentant un saignement est recommandé dans les 3 heures suivant le traumatisme. Ceci depuis l'étude CRASH-2 ayant montré la diminution de la mortalité due au saignement chez ces patients dans ces conditions [82]. L'hyperfibrinolyse est associée chez le patient traumatisé à plus de mortalité mais le lien entre les 2 événements n'est pas clairement démontré. L'objectif était donc d'objectiver l'effet du TXA sur la coagulation des patients et notamment la fibrinolyse grâce à un monitoring par ROTEM®.

La complexité de la réalisation des techniques thromboélastométriques dans de telles conditions d'extrême urgence, n'a pas permis de rendre les résultats exploitables dans le cadre de l'étude EXATEM. Cependant, les prélèvements ont été correctement réalisés, envoyés au laboratoire pour les tests de routine et conservés, ce qui nous a permis de réaliser les dosages de FM dans le cadre de notre étude.

Les données cliniques recueillies comprennent :

- L'âge
- Le sexe
- Le score de Glasgow et le score ASA (American society of anesthesiologists) à l'admission
- La mortalité éventuelle

- Le recueil des heures et quantités prescrites d'acide tranexamique n'a pas pu être réalisé

1.2. Echantillons biologiques

1.2.1. Caractéristiques des prélèvements

Les échantillons biologiques ont été recueillis le plus rapidement possible après l'arrivée des équipes soignantes sur le lieu de l'événement traumatique. Plusieurs prélèvements devaient être récoltés (3 idéalement) à différents temps pour surveiller l'hémostase avant et après injection de TXA. Cependant, selon leur évolution clinique, certains patients n'ont pas été prélevés 3 fois, par conséquent, le nombre de prélèvements par patient varie de 1 à 3. Le nombre total de patients s'élève à 35, auxquels correspondent 84 prélèvements biologiques.

Les plasmas étudiés ont été conservés à -80°C après l'étude EXATEM. En fonction des aliquotes de plasma restant par patient, le dosage des FM a pu être réalisé ainsi que les paramètres classiques de la coagulation lorsqu'ils n'étaient pas renseignés.

Parallèlement au dosage des FM chez ces patients, nous avons également dosé les FM sur une série de 49 sujets témoins n'ayant pas de trouble de la coagulation, afin de préciser la répartition des valeurs de FM au sein d'une population normale. Ces échantillons ont été prélevés chez des sujets se présentant au point central de prélèvement du Tripode avec leur accord, et déclarant être en bonne santé et n'avoir aucune pathologie pouvant altérer la coagulation.

1.2.2. Principe et méthodes de dosage des paramètres étudiés :

La majorité des données biologiques (exceptés les plaquettes) ont été recueillies sur plasma citraté après centrifugation de 15 minutes à 2000g (tubes BD Vacutainer® citrate de sodium 0,109M).

1.2.2.1. Paramètres de coagulation de routine

La majorité des tests d'hémostase dits « de routine » (TP, TCA, fibrinogène, facteurs de la coagulation) sont des méthodes chronométriques automatisées réalisées sur l'ACL TOP® 700 du laboratoire Werfen®. Le principe repose sur le temps de formation du caillot de fibrine au sein d'une prise d'essai de plasma. Le détecteur consiste en un système optique qui mesure la variation de la densité optique au travers de la cuve lors de la formation du caillot.

- Le temps de Quick : le temps de quick correspond au temps de coagulation d'un plasma recalcifié en présence d'un excès de thromboplastine (équivalent de facteur tissulaire). Même si les 2 voies de la coagulation ne sont plus distinguées et séparées *in vivo*, le TQ permet l'exploration de la voie exogène de la coagulation (facteurs II, V, VII et X). Le réactif utilisé est la Recombiplastin 2G® de Werfen®, qui contient du facteur tissulaire humain recombinant, des phospholipides et du chlorure de calcium. Le résultat est exprimé en seconde par rapport au temps témoin normal (environ 12 secondes) ou alors exprimé en pourcentage sous forme de taux de prothrombine (TP).
- Le temps de céphaline activé (TCA) : le TCA correspond au temps de coagulation d'un plasma recalcifié en présence de phospholipides et d'un activateur de la phase de contact. Le TCA permet l'exploration de la voie endogène et est sensible aux déficits en facteurs II, V, VIII, IX, X, XI et XII. Le réactif utilisé est l'APTT® de Werfen®, qui contient des phospholipides synthétiques, de la silice, et du chlorure de calcium. La réaction s'effectue en

2 temps : tout d'abord, il y a ajout du réactif permettant l'activation de la phase contact (production de facteur XIIa et interaction entre le kininogène de haut poids moléculaire, la kallikréine, et le facteur XIIa), puis le calcium est ajouté, permettant la cascade de réaction enzymatique aboutissant à la formation du caillot. Le résultat est exprimé en secondes, ou en ratio, par rapport à un temps témoin normal (environ 30 secondes).

- Le fibrinogène : la mesure du fibrinogène a été réalisée par la méthode dérivée du TP et par la technique de von Clauss en cas de fibrinogène inférieur à 1 g/l.
- Facteurs de la coagulation (II, V et X) : l'activité des facteurs de la coagulation est déterminée par mesure d'un temps de quick modifié. Le principe repose sur l'utilisation de plasma artificiellement déplété en facteur que l'on souhaite doser. Le temps de coagulation de ce plasma déficient est alors proportionnel à la concentration (ou activité en %) de ce facteur apporté uniquement par le plasma à doser. Par interpolation sur une droite d'étalonnage, l'automate donne l'activité exacte du facteur.

1.2.2.2. L'antithrombine

L'antithrombine (AT) est le cofacteur de l'héparine, et l'inhibiteur principal de la coagulation. Contrairement aux paramètres précédents, son dosage repose sur une méthode chromogénique. Le réactif AT® de Werfen® permet un dosage basé sur l'inactivation du facteur Xa et l'utilisation d'un substrat chromogène synthétique. Le réactif contient du facteur Xa bovin, de l'héparine, et un substrat chromogène. Le plasma à tester est incubé en présence d'un excès d'héparine et d'une quantité connue de facteur Xa. Après incubation, le facteur Xa résiduel, non inhibé par le complexe AT-héparine, peut alors hydrolyser le substrat et libérer la paranitroaniline. La quantité de paranitroaniline libérée est mesurée à 405 nm. Elle est inversement proportionnelle à la quantité d'antithrombine dans le plasma à doser.

1.2.2.3. Les marqueurs de fibrine

- Les D-dimères : les D-dimères ont été dosés sur l'automate Vidas® de BioMérieux. Le principe de dosage associe une méthode immunoenzymatique de type sandwich en 2 étapes à une détection finale en fluorescence (technique ELFA, présenté au point 3.2.2. de la première partie). L'intervalle de mesure de cette méthode est compris entre 45 et 10000 ng/mL. Les valeurs élevées de D-dimères sont donc écrêtées, et rendues > 10000 ng/mL. Pour l'analyse des données, ces valeurs sont considérées comme étant égales à 11111 ng/mL.
- Les PDF : les produits de dégradation de la fibrine ont été dosés par la méthode semi-quantitative de Stago® décrite au point 3.3.2. de la première partie. Cette méthode n'est actuellement plus utilisée au laboratoire, qui dispose désormais de la technique automatisée de Werfen®.
- Les monomères de fibrine : Les monomères de fibrine ont été dosés selon la méthode STA® LIATEST® FM de Stago® décrite au point 3.1.2.2. de la première partie. Les dosages ont été réalisés sur l'automate STA-R Max qui a ensuite été remplacé par le STA-R Evolution. Le réactif, les calibrants, et les contrôles internes de qualité ont été fournis par Stago® à titre gratuit pour la durée de notre étude. Le taux de FM d'un plasma normal est inférieur à 6 µg/mL. L'intervalle de mesure est compris entre 5 et 150 µg/mL. Pour les échantillons contenant un taux supérieur à 150 µg/mL de FM, deux dilutions (au 1/5^{ème} et au 1/10^{ème}) sont effectuées pour obtenir une concentration réelle de FM.

1.2.2.4. Les marqueurs de la fibrinolyse

- L'activateur tissulaire du plasminogène ou t-PA : le dosage du t-PA est une méthode antigénique réalisé grâce à la trousse commerciale « ZYMUTEST tPA Antigen » du laboratoire HYPHEN BioMed®. Le dosage repose sur une

méthode ELISA en sandwich, utilisant un anticorps monoclonal spécifique du t-PA. Le plasma à doser est introduit dans l'un des puits d'une plaque sensibilisée par l'anticorps monoclonal spécifique. Le t-PA se fixe sur l'anticorps immobilisé. Après lavage, le t-PA fixé sur la plaque est révélé par un second anticorps couplé à la peroxydase. Après un second lavage, et addition de substrat, une coloration bleue se développe. Enfin, l'ajout d'acide sulfurique stoppe la réaction, et fait virer la coloration au jaune. Cette coloration est proportionnelle à la quantité de t-PA présente dans l'échantillon à tester. Une courbe d'étalonnage est constituée à chaque dosage grâce aux standards fournis dans la trousse. Ainsi, un résultat quantitatif de t-PA peut en être déduit. Le taux de t-PA d'un plasma humain normal est généralement inférieur à 10 ng/mL.

- L'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 ou PAI-1 : le dosage du PAI-1 est une méthode antigénique réalisée grâce à la trousse commerciale « ZYMUTEST PAI-1 Antigen » du laboratoire HYPHEN BioMed®. Le dosage repose sur une méthode ELISA en une étape. Dans un premier temps, un anticorps monoclonal spécifique du PAI-1 est introduit dans les puits d'une plaque sensibilisée par un autre anticorps monoclonal également spécifique du PAI-1. Ensuite, le plasma à doser est introduit, le PAI-1 présent dans l'échantillon se fixe sur l'anticorps fixé dans le puit et également à l'anticorps couplé à la peroxydase. Après lavage, la révélation est identique à celle du t-PA. Un résultat quantitatif de PAI-1 peut en être déduit. Le taux de PAI-1 dans un plasma normal est compris entre 1 et 25 ng/mL, mais il existe une grande hétérogénéité pour les concentrations de PAI-1 en fonction de la trousse utilisée. Les résultats doivent donc être interprétés en fonction du dispositif utilisé.
- Le temps de lyse du caillot des euglobulines ou TLCE est une méthode permettant d'apprécier l'activité lytique globale du plasma. La méthode nécessite une dilution du plasma, puis une acidification par l'acide acétique. L'acidification du plasma permet la précipitation des euglobulines : fraction plasmatique exempte des inhibiteurs de la fibrinolyse (exceptée une partie des PAI). Après élimination du surnageant, et remise en suspension du culot

contenant les euglobulines, un mélange thrombine-calcium est ajouté afin de déclencher la formation du caillot des euglobulines. Après formation du caillot (5 minutes généralement), sa lyse est évaluée visuellement toutes les 10 minutes pendant la 1^{ère} heure, pour déceler les états d'hyperfibrinolyse, puis toutes les 30 minutes pendant les 4 heures suivantes. Le temps de lyse est évalué sur 5 heures et le résultat est rendu en minutes. Le temps de lyse du caillot des euglobulines est normalement de 175 +/- 45 minutes.

1.2.2.5. Les plaquettes

La numération plaquettaire, a été réalisée sur sang total EDTA, par l'automate LH 750 de Beckman-Coulter®. Le principe de mesure des plaquettes repose sur la mesure de variation d'impédance.

2. Analyse *in vitro* des taux de marqueurs de fibrine au cours de la formation d'un caillot.

Pour étudier l'évolution des taux de marqueurs de fibrine au cours de la formation d'un caillot *in vitro*, nous avons décidé de déclencher la formation d'un caillot de fibrine à partir d'un plasma citraté normal, et ensuite de stopper la formation à différents temps, pour doser les marqueurs de fibrine et obtenir une cinétique.

2.1. Echantillon biologique utilisé

La première étape de cette manipulation est de former un pool de plasma citraté normal, ne contenant pas de marqueurs de fibrine. Le pool est constitué par un mélange de plasmas de patients récoltés le même jour, et testés pour s'assurer de

l'absence de marqueurs de fibrine. Les caractéristiques du mélange final utilisé pour la manipulation sont les suivantes :

- TQ = 11,5s ; TP = 100%
- TCA = 28,6 s ; rTCA = 1,04
- Fibrinogène = 4,92g/L
- Monomères de fibrine = <5µg/mL
- PDF = 0,96µg/mL.
- D-Dimères = 474ng/mL.

2.2. Formation du caillot de fibrine

La formation du caillot a été réalisée par ajout de thrombine grâce au réactif Triniclot® fibrinogène de Stago®, normalement utilisé pour déterminer le taux de fibrinogène par la méthode Clauss. Le réactif est constitué de thrombine, mais également de calcium, indispensable à la coagulation sur plasma citraté.

L'ajout du réactif au plasma citraté initie la formation du caillot qui est ensuite stoppée à différents temps par ajout d'une quantité définie de citrate, qui vient complexer le calcium contenu dans le réactif.

La réaction s'effectue sous agitation au bain-marie à 37°C, sur une prise d'essai de 540µL de plasma. Le réactif Triniclot® fibrinogène est reconstitué par 1mL d'eau distillée, afin d'obtenir une concentration finale de 75 UI/mL de thrombine et de 84 mM de calcium. 60 µL de réactif sont ajoutés au plasma, et la réaction est stoppée par ajout de 450µL de citrate à 30s, 1min, 5min, 20min, 1h, 2h, et 3h. Une fois le caillot de fibrine retiré du plasma, les marqueurs de fibrine sont dosés sur les 3 automates et leur concentration est calculée en tenant compte de la dilution provoquée par l'ajout du réactif et du citrate.

2.3. Dosage des marqueurs de fibrine

Les marqueurs de fibrine ont été dosés par les mêmes méthodes que décrites précédemment, exceptés pour les PDF, le laboratoire disposant désormais d'une méthode quantitative entièrement automatisée sur l'ACL TOP® de Werfen® décrite au point 3.3.2. de la première partie.

3. Analyse des données

Les données biologiques ont été recueillies sur un tableur Excel®.

Les variations des concentrations en monomères de fibrine au cours du temps, et des autres paramètres biologiques ont été représentées sous forme de graphique.

Une analyse en composantes principales a été réalisée sur Statbox pour situer la réactivité du FM par rapport aux autres tests réalisés sur les 84 échantillons.

Les variables quantitatives sont exprimées en moyennes \pm écart-type lorsque la distribution est normale ou en médiane et écart interquartile (25e-75e percentile) lorsque la distribution n'est pas normale.

Le test de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer la moyenne de paramètres biologiques entre 2 populations.

Les corrélations entre facteurs ont été étudiées par un modèle de régression linéaire par la méthode des moindres carrés.

TROISIEME PARTIE : RESULTATS

1. Analyse des données cliniques

Trente-cinq patients ont été inclus dans l'étude. La majorité des patients sont des hommes (69%). L'âge moyen de la population étudiée est de 45 ans.

Les types de traumatismes principaux correspondent à des fractures osseuses uniques ou multiples (76%) et au traumatisme crânien (33%). Seuls 2 patients ont été inclus pour hémopéritoine sans traumatisme crânien ni fractures. La mortalité lors de la prise en charge initiale concerne 6 patients (17% de la population étudiée).

2. Analyse des paramètres biologiques

2.1. Données thromboélastométriques

La difficulté de mettre en œuvre les techniques thromboélastométriques dans de telles conditions d'extrême urgence n'a pas permis d'utiliser le ROTEM® pour tous les patients. Un total de 11 patients, correspondant à 18 prélèvements, ont pu être obtenus. Les tracés thromboélastométriques de ces 18 prélèvements sont représentés sur la figure 15 :

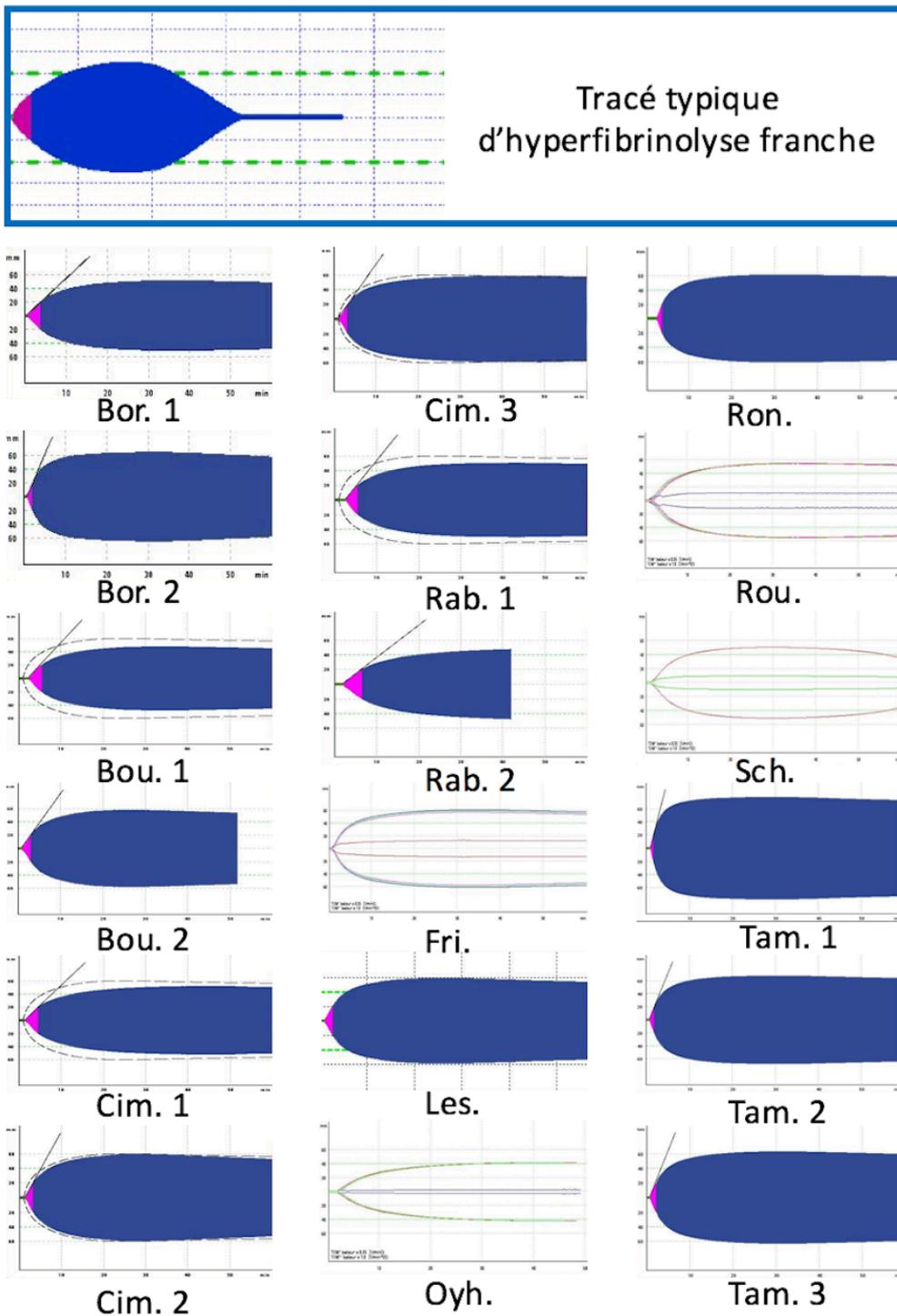


Figure 15 : Tracés thromboélastométriques obtenus pour les patients EXATEM (tests EXTEM).

Aucun profil hyperfibrinolytique n'a été obtenu parmi l'ensemble des patients testés.

2.2. Données biologiques générales

La variabilité des paramètres biologiques est exprimée sous la forme médiane et écart interquartile (25e-75e percentile). La médiane des paramètres des 1^{ers} prélèvements est comparée à celle des prélèvements suivants (après injection d'acide tranexamique). Ces valeurs sont consignées dans le tableau 5. Le délai moyen du premier prélèvement est de 2,7h après l'événement traumatique.

Paramètres	Premier prélèvement	Prélèvements suivants
TP (%)	78 [65 – 95]	76 [68 – 93]
TCA (s)	30 [26 – 37]	30 [27 – 34]
Fg (g/L)	2.3 [1.5 – 3.1]	2.4 [1.7 – 3.0]
AT (%)	78 [64 – 91.0]	72.0 [58.0 – 84.0]
FII (%)	70 [55.5 – 82.5]	66 [49 – 78]
FV (%)	66 [42 – 94]	65 [49 – 86]
FX (%)	76 [57 – 92]	73 [55 - 83]
t-PA (ng/mL)	13 [9 – 17]	11 [7.2 – 13]
PAI-1 (ng/mL)	22 [13 – 44]	23 [11 - 149]
TLCE (min)	195 [37.5 – 308]	240 [146 - 333]
D-dimères (ng/mL)	11111 [9581 - 11111]	11111 [7159 - 11111]
PDF (µg/mL)	80 [20 - 160]	40 [20 – 160]
FM (µg/mL)	90 [47 - 141]	85 [25 – 139]
Plaquettes (G/L)	193 [138 - 234]	142 [89 – 192]
Hématocrite (%)	36 [29 - 41]	32 [29 - 36]

Tableau 5 : Comparaison des médianes et écarts interquartiles des paramètres biologiques entre le premier prélèvement post-traumatisme et les prélèvements suivants.

On remarque qu'au moment de la prise en charge des patients, la majorité des paramètres de coagulation de routine sont normaux, hormis le facteur V qui est légèrement abaissé. Seuls les marqueurs de formation et de dégradation de la fibrine sont très fortement augmentés. La variation de concentration des paramètres biologiques entre le premier prélèvement post-traumatique et les prélèvements suivants n'est pas franche. On note tout de même une tendance à la diminution de la médiane du taux de plaquettes, et du taux de PDF.

La représentation des paramètres biologiques par analyse en composante principale est représentée sur la figure suivante :

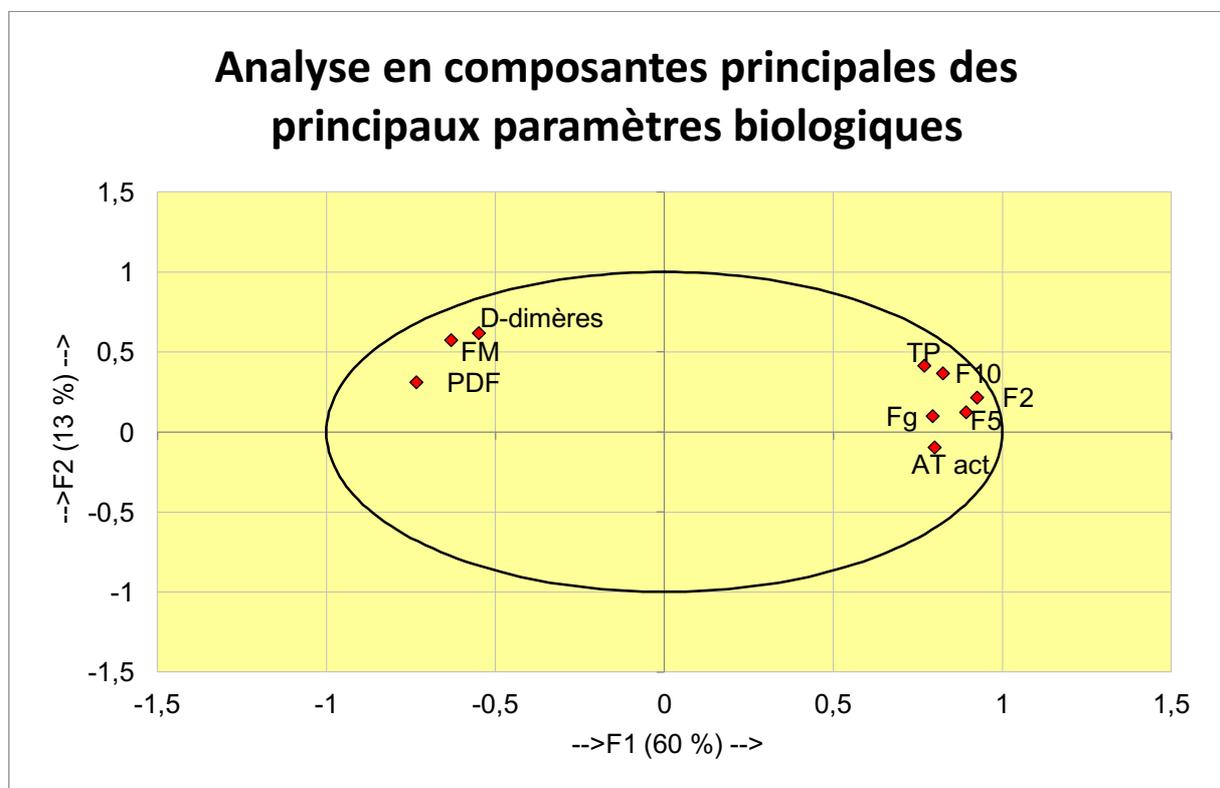


Figure 16 : analyse en composantes principales des principaux paramètres biologiques dosés chez les patients du protocole EXATEM.

On note la présence de 2 groupes de paramètres biologiques évoluant dans un sens opposé. Les marqueurs de fibrine d'un côté dont la concentration augmente, et les paramètres de coagulation de routine, dont les taux chutent, reflétant l'activation de la coagulation. La réactivité des monomères de fibrine est très proche de celle des D-dimères et des PDF.

2.3. Analyse des taux de FM

2.3.1. Qualités analytiques du kit LIATEST FM

La technique de dosage des FM présente une linéarité de 5 à 150 µg/mL. Selon la calibration, au-delà d'une certaine valeur de DO, l'automate rend un résultat écrêté à 150 µg/mL, ou alors, ne rend pas de valeur numérique, mais un code « > Mmax ». Pour obtenir une valeur réelle de FM pour chaque dosage, 2 dilutions ont été réalisées sur les prélèvements qui dépassent le seuil de linéarité : une au 1/5^{ème} et une au 1/10^{ème}. La valeur de FM retenue est par défaut, celle de la dilution au 5^{ème} recalculée. Pour les valeurs basses, inférieures à 5 µg/mL, l'automate rend le résultat comme étant égal à 5 µg/mL. Stago® indique que les valeurs normales sont inférieures à 6 µg/mL.

Les FM ont d'abord été dosés dans une population de témoins, puis chez les patients du protocole EXATEM, susceptibles de présenter de très forts taux de FM.

Lors du dosage des FM chez les patients EXATEM, plusieurs résultats se sont révélés surprenants. Trois prélèvements, contenant une grande quantité de PDF et de D-dimères ont paradoxalement présenté des concentrations normales en FM (5µg/mL). De plus, les prélèvements précédents et/ou suivants pour ces mêmes patients présentaient des concentrations élevées en FM. Après redosage, il s'est avéré que ces prélèvements contenaient une grande quantité de monomères de fibrine. Le tableau 6 suivant présente les résultats de ces prélèvements ainsi que leur redosage :

	PDF (µg/mL)	D-dimères (ng/mL)	Premier dosage FM (µg/mL)	Redosage FM (µg/mL)
Patient 3	20	11111	5	38
Patient 5	320	11111	5	160
Patient 6	80	11111	5	140

Tableau 6 : Variabilité des résultats de différents dosages de FM d'un même échantillon.

Les premiers dosages négatifs obtenus ont été rendus par l'automate sans aucune alarme. L'existence de résultats faussement abaissés nous a fait nous questionner sur les performances du test. S'agit-il d'un éventuel effet crochet, ou d'un problème sur l'échantillon primaire ?

Nous avons questionné le laboratoire Stago® à ce sujet, qui après vérification de la programmation du test, et de la calibration, a proposé que ces résultats faussement négatifs soient dus à l'utilisation de plasmas congelés depuis trop longtemps (délai de 2 ans). L'existence d'un effet crochet est démontrée, mais pour des plasmas contenant environ 400 µg/mL de FM, ce qui semble peu probable puisque 2 des échantillons ci-dessus montrent un taux de FM dans le domaine de mesure (5 à 150 µg/mL).

Afin de contrôler que le test ne rende pas de résultats faussement abaissés de façon aléatoire, un essai de répétabilité sur 2 niveaux, et un essai de linéarité par dilution d'un échantillon présentant un très fort taux de FM ont été réalisés.

Les essais de répétabilité ont été réalisés sur 2 niveaux : un niveau haut (124 µg/mL) et un niveau bas (7,3 µg/mL). Ne disposant pas de grandes quantités de réactif, chaque niveau de concentration a été dosé 10 fois. Les essais de répétabilité sur les 2 niveaux ont présenté de bons résultats, puisque les CV obtenus sont de 0.75% pour le niveau haut, et de 8.9% pour le niveau bas. Les CV proposés par le fournisseur sont de 3% pour le niveau haut, et de 8% pour le niveau bas. Le CV de 8,9% pour le niveau bas reste acceptable étant donné la très faible concentration utilisée (très proche de la limite de détection). Il n'a par ailleurs pas été constaté de résultats faussement abaissés lors de ces essais.

L'étude de linéarité présentée sur la figure 17 a été réalisée en effectuant le dosage de FM sur plusieurs dilutions progressives (de 0,1 à 1, par pas de 0,1) d'un échantillon présentant un très fort taux de FM. En ajoutant une droite de tendance aux dilutions comprises dans le domaine de mesure, on peut estimer que l'échantillon de départ présente une concentration aux alentours de 310 µg/mL. L'essai de linéarité s'est donc révélé correct dans le domaine de mesure, mais la

dilution au demi (dilution « 0.5 » sur la figure) a présenté un taux de FM à 13 μ g/mL alors que sa concentration théorique aurait dû être d'environ 155 μ g/mL.

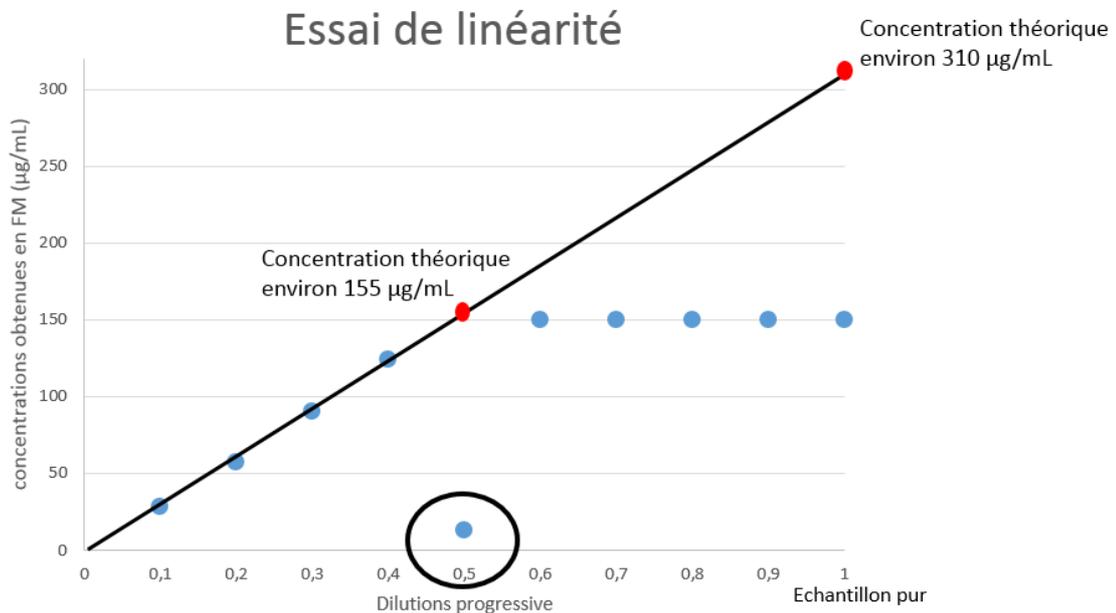


Figure 17 : *essai de linéarité à partir d'un échantillon contenant une concentration théorique en FM évaluée à 310 μ g/mL.*

Ce phénomène de taux beaucoup plus bas qu'attendus s'est reproduit lorsque les FM ont été dosés au cours de la formation d'un caillot de fibrine *in vitro*.

2.3.2. Analyse du taux de FM au cours de la formation d'un caillot de fibrine *in vitro*.

Le dosage des marqueurs de fibrine a été effectué à différents temps après le déclenchement de la coagulation *in vitro*. Les résultats sont représentés sur la figure 18. Les concentrations en FM rendues sont recalculées en tenant compte des dilutions effectuées (ajout thrombine et de citrate au plasma), c'est pourquoi la valeur peut dépasser 150 μ g/mL.

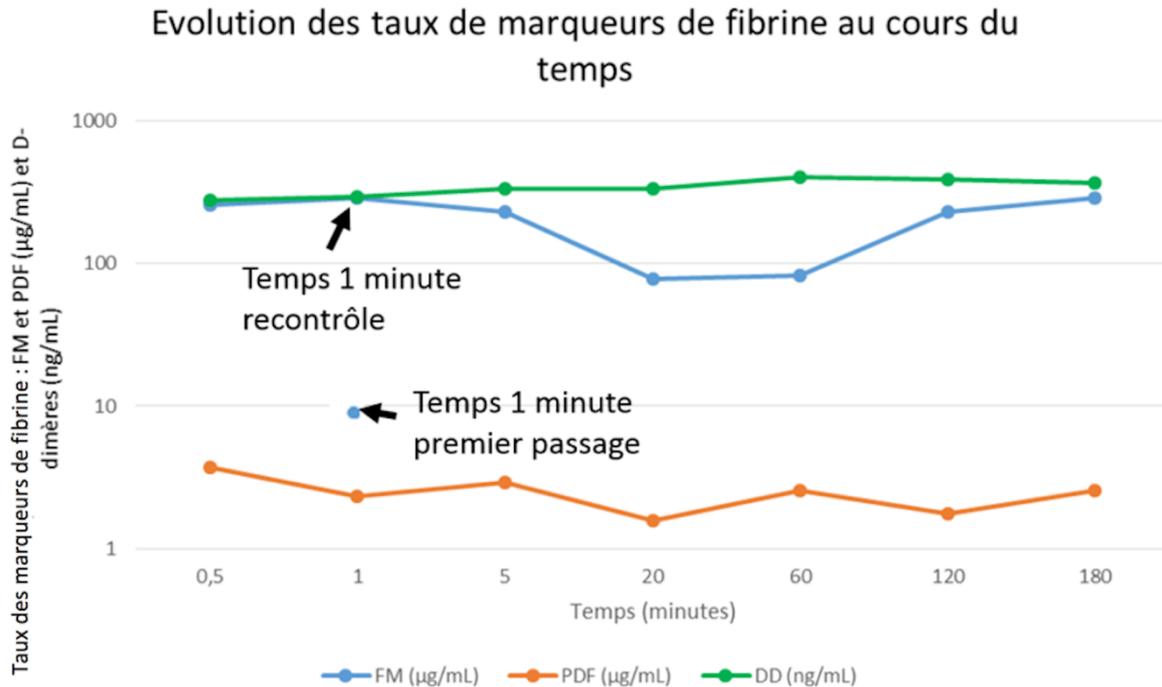


Figure 18 : évolution des taux de marqueurs de fibrine au cours de la formation d'un caillot *in vitro*.

Le taux de FM à 1 minute a été contrôlé. Le premier dosage est sorti à 27 µg/mL, ce qui nous a semblé suspect, car le taux précédent (30 secondes) était de 259 µg/mL, et le taux suivant (5 minutes) était de 233 µg/mL. Ce contrôle du temps 1 minute a donné un résultat à 289 µg/mL. L'existence de ce nouveau résultat faussement abaissé remet en question l'hypothèse avancée par Stago selon laquelle ces « accidents » de valeurs basses rendues pour des valeurs élevées seraient dus à l'utilisation de plasma congelé depuis trop longtemps. En effet, si les premiers résultats anormaux ont été obtenus sur du plasma congelé, ce dernier a été obtenu sur du plasma citraté prélevé le jour des dosages.

De façon plus générale, l'analyse des concentrations en marqueurs de fibrine au cours de la formation d'un caillot *in vitro* a pu mettre en évidence l'élévation franche et très rapide des taux de FM (dès 30 secondes). En revanche, comme attendu car aucun ajout de t-PA n'a été effectué, aucune élévation des PDF et des D-dimères n'a été constatée. En effet, *in vitro*, le t-Pa (activateur du plasminogène) est entièrement

complexé par son inhibiteur principal, le PAI-1, inhibant ainsi complètement la fibrinolyse et seul l'ajout de t-PA exogène pourrait déclencher la fibrinolyse du caillot.

2.3.3. Répartition du taux de FM dans la population témoin

Le graphique suivant (figure 19) présente la répartition du dosage des FM au sein d'une population de 49 sujets témoins, ne présentant pas de troubles de la coagulation (volontaires prélevés au point central de prélèvement de l'hôpital Pellegrin). La moyenne du dosage des FM chez ces témoins est de 7,6 µg/mL. On note que 41 patients présentent un taux de FM normal (<6 µg/mL). Il est intéressant de signaler que près d'un patient sur cinq présente un taux de FM augmenté (18%), dont un allant jusqu'à 72,4 µg/mL. Les deux sujets avec le résultat le plus élevé de FM ont des D-dimères normaux.

La figure présente également en parallèle le taux de D-dimères. Les résultats sont superposables, avec 41 patients présentant un taux de D-dimères normal (<500 ng/mL). Deux des 3 sujets ayant des D-dimères élevés ont un FM normal.

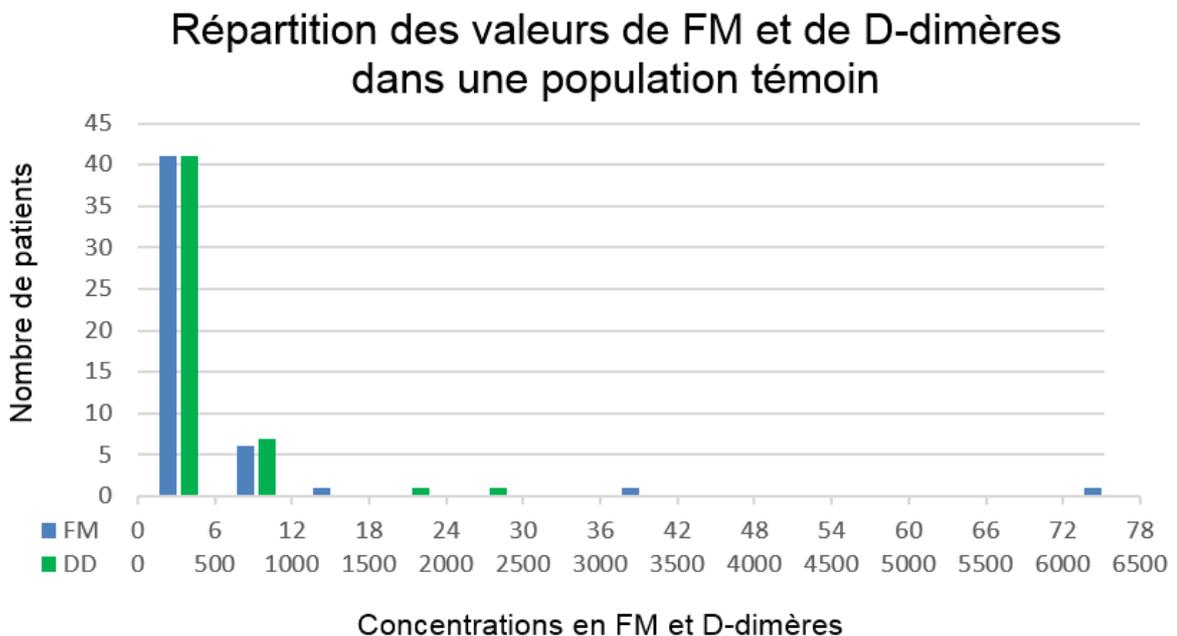


Figure 19 : Répartition des valeurs de FM et de D-dimères dans une population de 49 sujets témoins normaux.

2.3.4. Analyse des taux de FM chez les patients polytraumatisés

Le graphique de fréquence suivant (figure 20) permet de comparer la répartition du taux de FM de la population témoin avec celle des patients EXATEM. La figure présente le pourcentage de patients témoins par tranche de concentration de FM (courbe bleue claire), et à cette courbe sont superposées celles du pourcentage de patients EXATEM par tranche de concentration de FM (courbe bleue foncée) et de PDF (courbe orange).

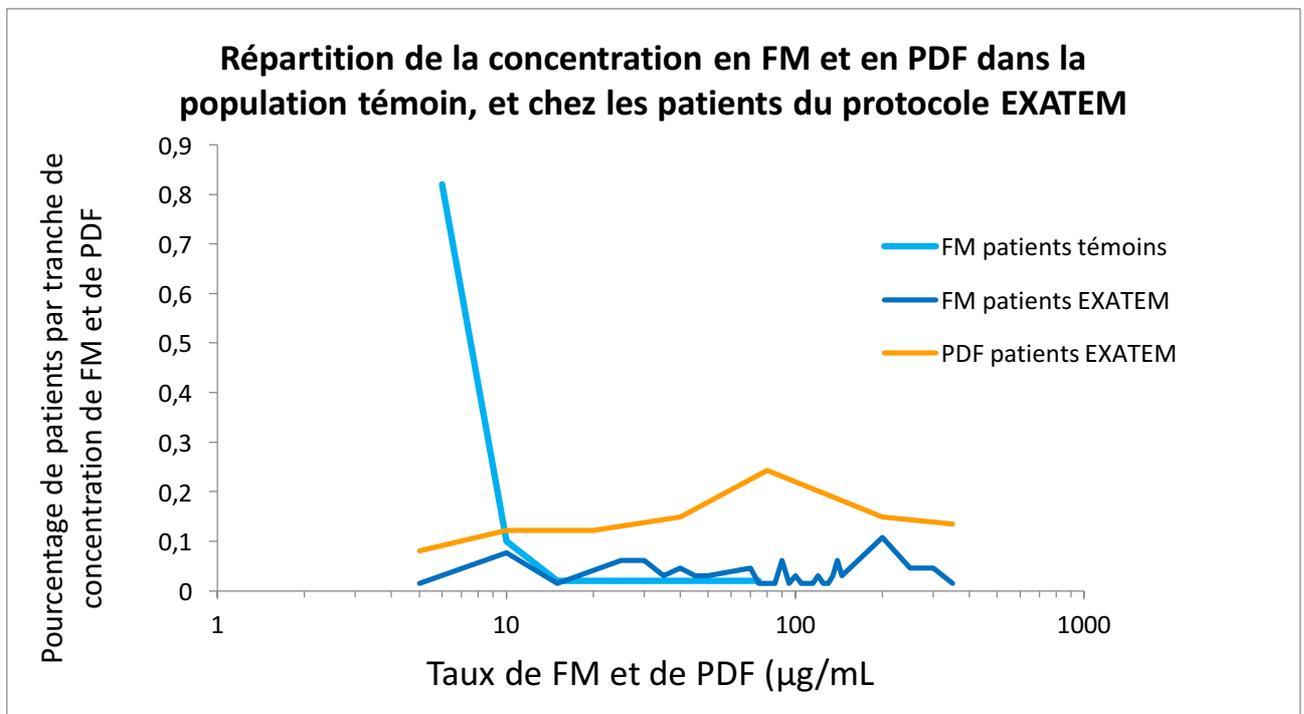
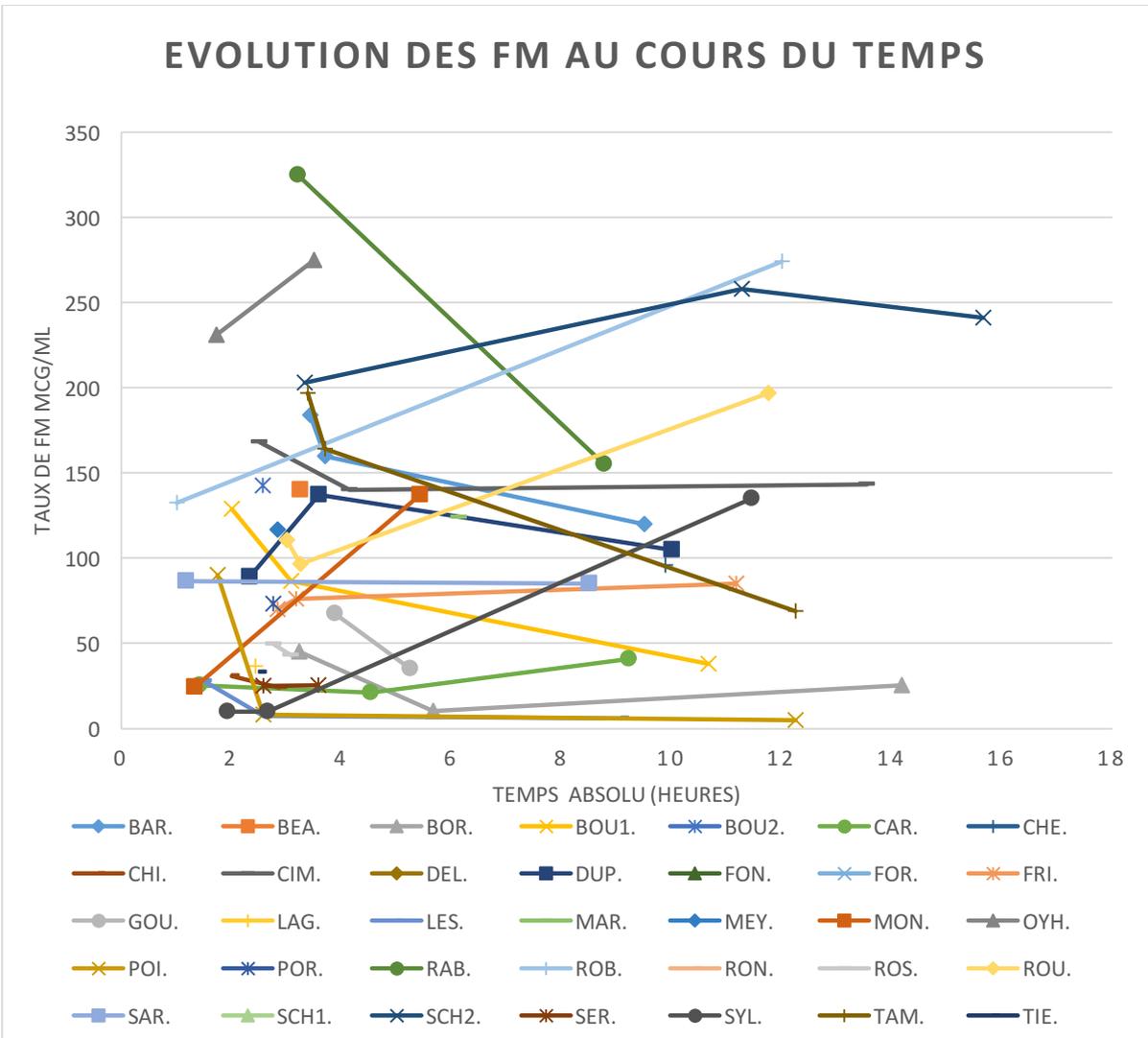


Figure 20 : Répartition de la concentration en FM dans la population témoin (courbe bleue claire) et comparaison avec la répartition de la concentration en FM et PDF chez les patients EXATEM (courbes bleue foncée et orange).

Cette représentation graphique permet de mettre en évidence la nette augmentation des marqueurs de fibrine chez les patients EXATEM. Très peu de patients polytraumatisés présentent un taux de FM normal (1,5% des prélèvements, soit un seul prélèvement), et de PDF normal (8% des prélèvements, soit 6 prélèvements).

L'évolution de la concentration en FM par patient au cours du temps est représentée sur le graphique suivant (figure 21). Le temps est exprimé en heures, et correspond au délai entre l'événement traumatique et le prélèvement sanguin, le T0 représentant l'événement traumatique pour chaque patient. Sur l'ensemble des dosages de FM, seul 1 prélèvement retrouve un résultat à 5 µg/mL. On note que le taux initial est très variable, allant de 10 µg/mL à 325 µg/mL, et également qu'il n'est pas possible de mettre en évidence une tendance générale de l'évolution du taux de FM au cours du temps. Les variations des taux de FM sont très hétérogènes, pendant toute la durée du monitoring de l'hémostase.



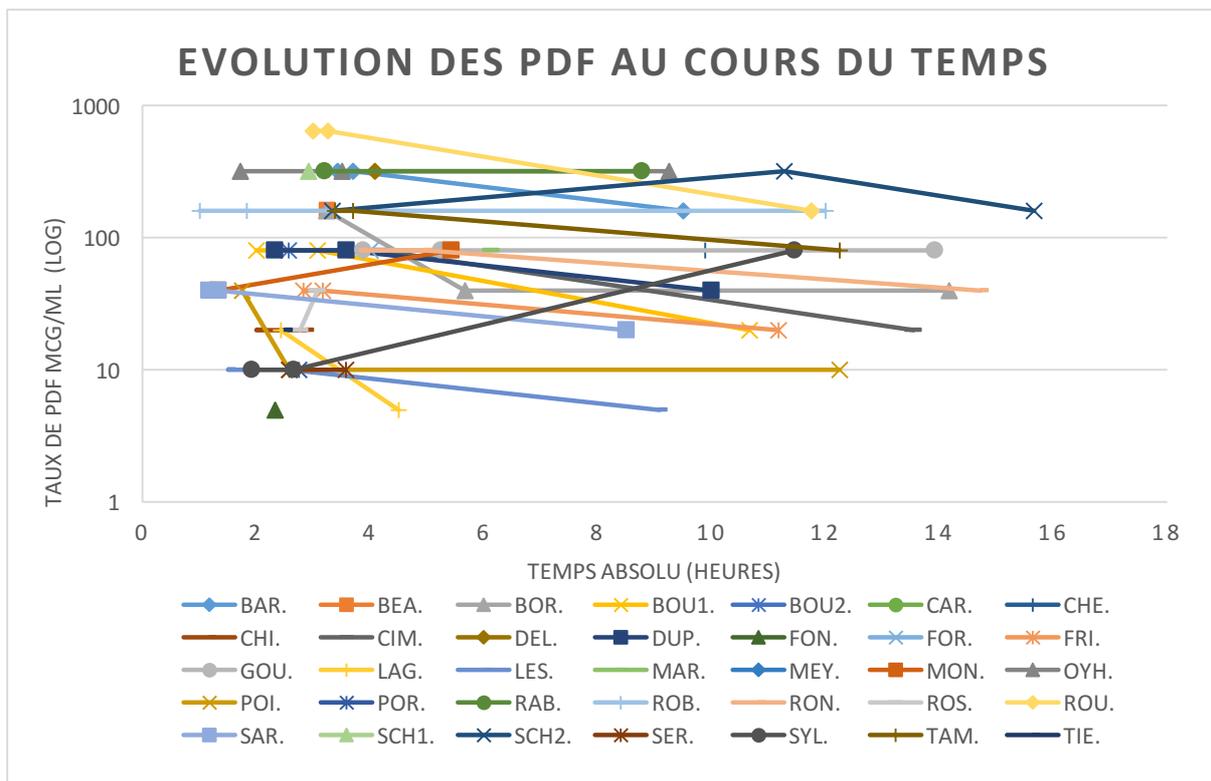


Figure 22 : évolution du taux de PDF au cours du temps.

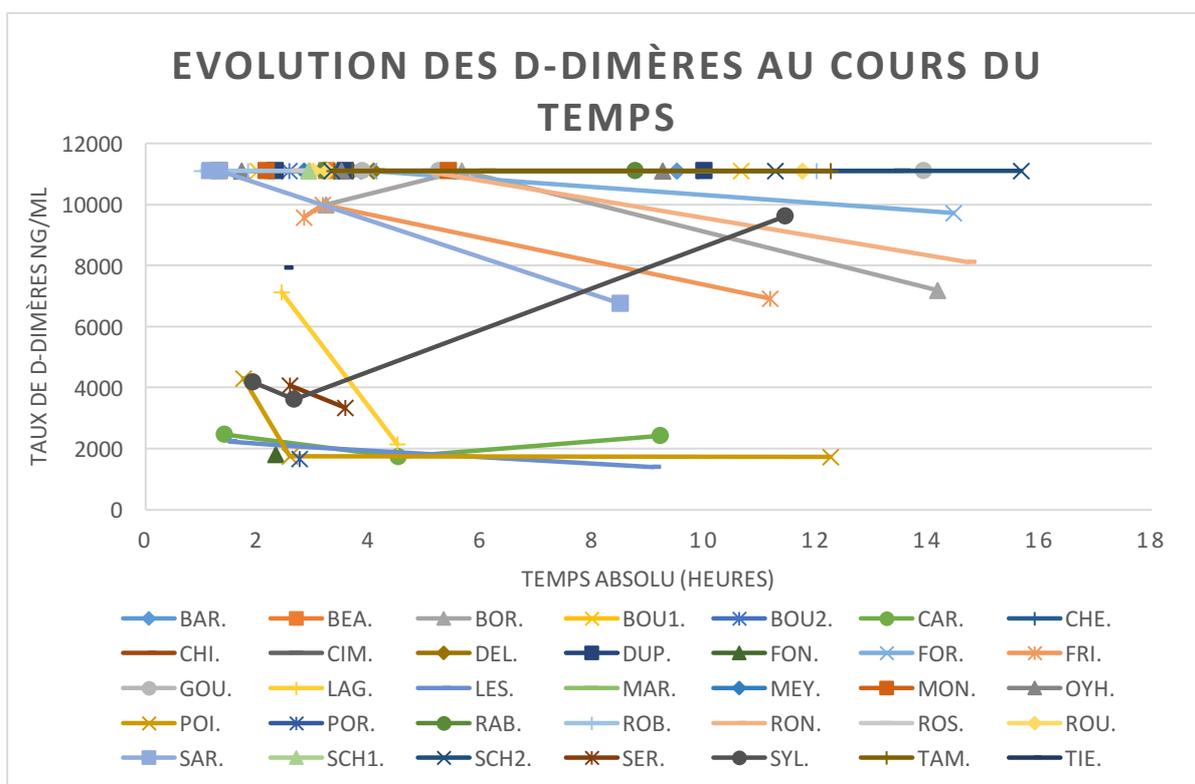


Figure 23 : évolution du taux de D-dimères au cours du temps.

La représentation de l'évolution des PDF et D-dimères au cours du temps permet de montrer que les patients présentent des taux élevés de D-dimères et de PDF dès les premiers prélèvements. On note que pour 5 patients, on observe une diminution du taux de D-dimères dès les premières heures du monitoring de l'hémostase. Cependant, il est impossible de mettre en évidence une tendance générale quant à l'évolution de leur concentration au cours du temps.

2.3.5. Corrélation entre les différents marqueurs de fibrine.

Les coefficients de corrélation ont été établis entre les différents marqueurs de fibrine et sont représentés sur le graphique suivant (figure 24) :

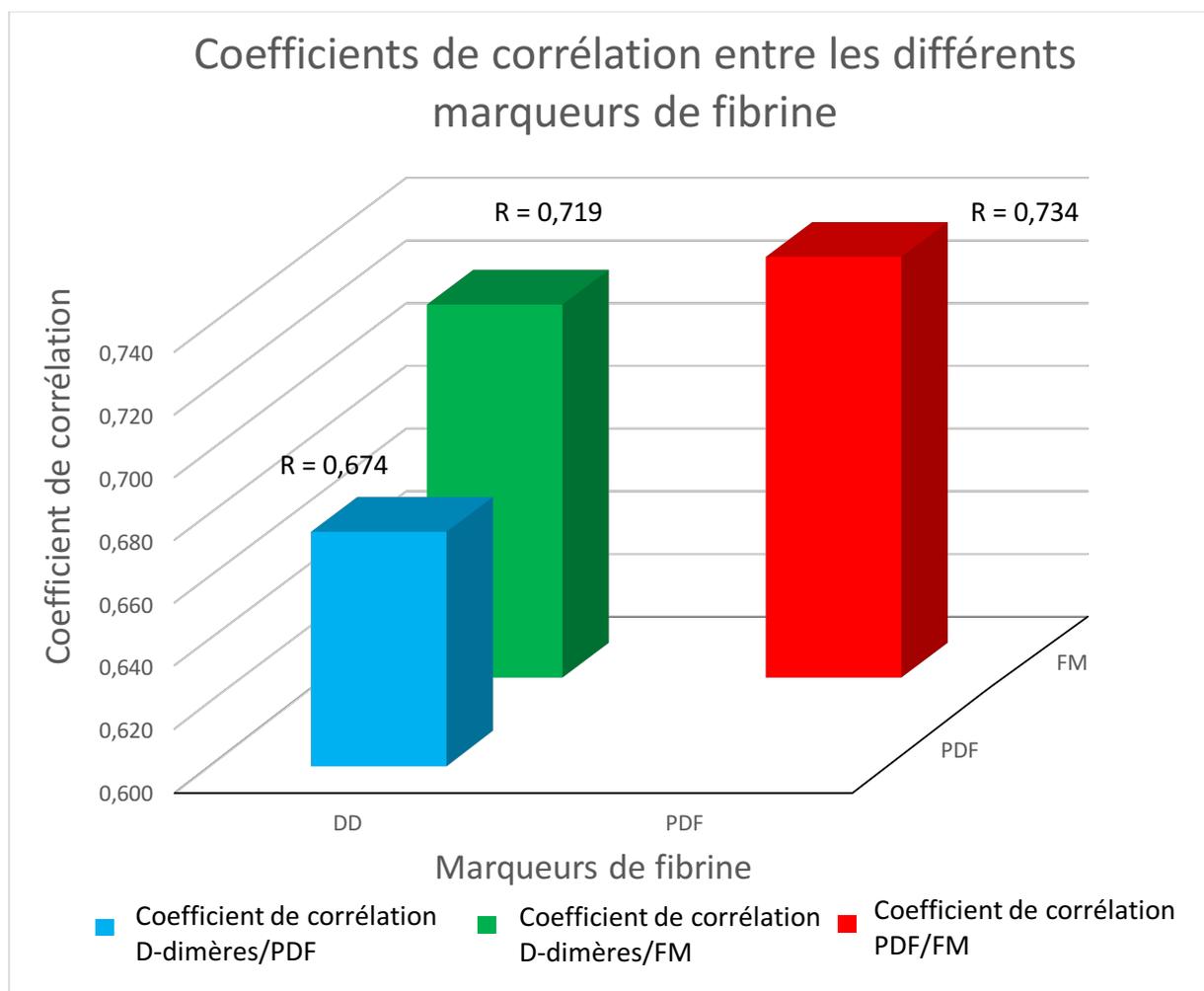


Figure 24 : représentation graphique des coefficients de corrélation entre les différents marqueurs de fibrine.

On constate que les coefficients de corrélation ne sont pas très élevés. Le coefficient de corrélation entre les PDF et les FM est le plus élevé, alors que les 2 coefficients impliquant les D-dimères sont moins bons. Ces résultats peuvent en partie être expliqués par le fait que les résultats élevés de D-dimères sont écrêtés à 10000 ng/mL. Nous ne disposons donc pas des vraies valeurs de D-dimères, ce qui n'est pas le cas pour les PDF et les FM.

2.4. Scores ISTH et CIVD

Pour déterminer si certains patients étaient en état de CIVD, les critères de diagnostic de CIVD de l'ISTH ont été appliqués à chacun des patients.

Les cut-offs concernant les marqueurs de fibrine sont variables selon les études. Les scores ont été calculés en tenant compte des recommandations du comité de la CIVD de la Japanese Society of Thrombosis and Haemostasis [113] et de l'ISTH [114]. Ces cut-offs sont présentés dans le tableau 7, aucune des deux sociétés ne présentant des scores pour chacun des marqueurs :

	0 points	2 points	3 points
FM ($\mu\text{g/mL}$)[114]	≤ 5	≥ 5	≥ 10
PDF ($\mu\text{g/mL}$)[113]	$\leq 8,3$	$\geq 8,3$	≥ 42
D-dimères (ng/mL)[114]	≤ 500	≥ 500	≥ 4000

Tableau 7 : *cut-offs des marqueurs de fibrine pour l'attribution du nombre de points du score de CIVD de l'ISTH.*

Les scores ont été réalisés avec chacun des marqueurs sur 54 prélèvements pour lesquels tous les paramètres nécessaires à leur calcul étaient disponibles (il manque au total 30 prélèvements, pour lesquels il manque un paramètre indispensable au calcul du score ISTH). Un score ≥ 5 permet de définir la CIVD biologique. On observe qu'en utilisant les monomères de fibrine et les D-Dimères, un score à 5 est attribué à 1 prélèvement de plus qu'avec le score utilisant les PDF : une CIVD

biologique a été retrouvé chez 5 patients (6 prélèvements) en utilisant les D-dimères et les FM comme marqueur de fibrine, et chez 4 patients (5 prélèvements) en utilisant les PDF.

Les scores ISTH attribués à chaque prélèvement en fonction des marqueurs de fibrine utilisés sont représentés dans le graphique suivant (figure 25) :

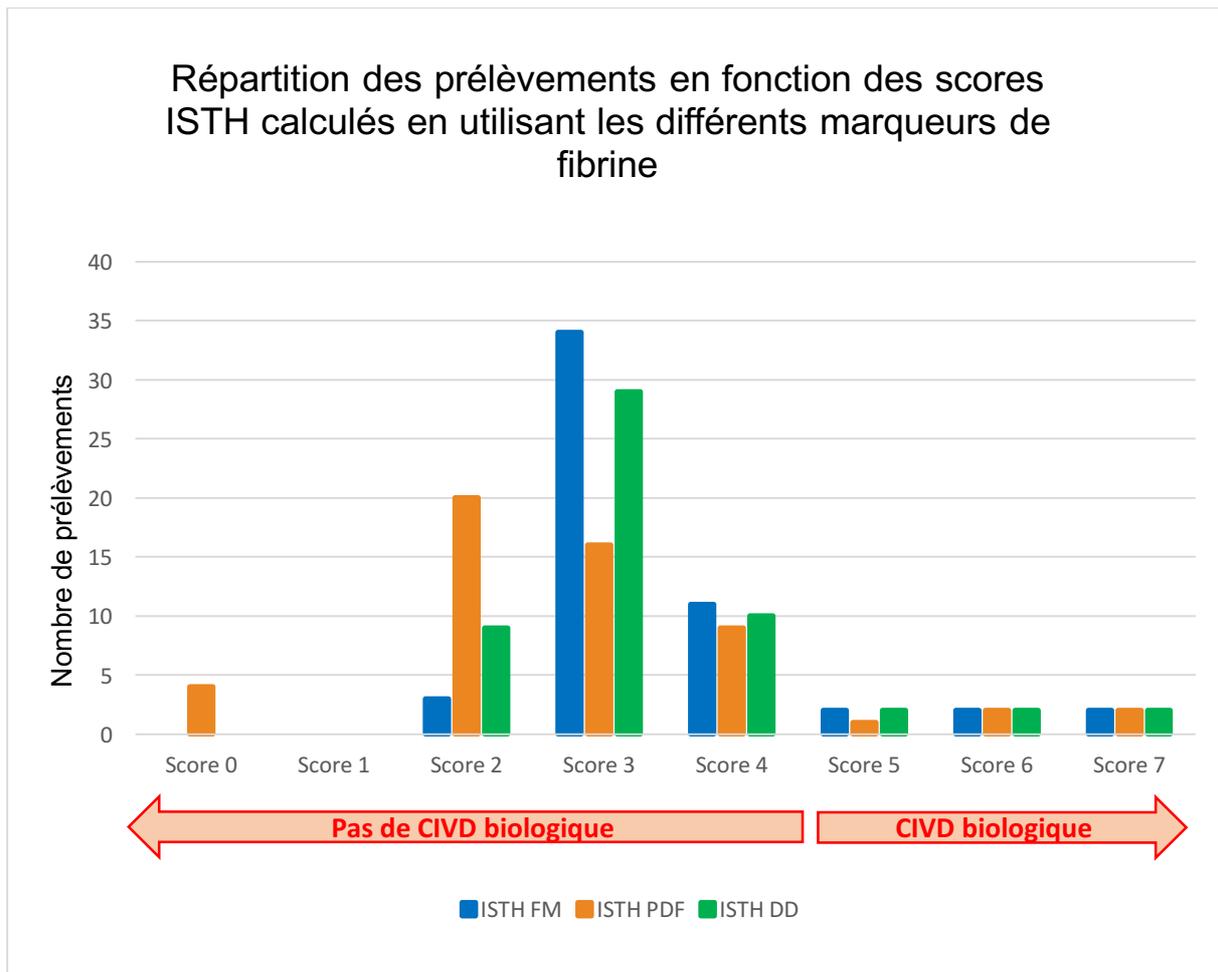


Figure 25 : calcul du score ISTH en fonction du marqueur de fibrine pris en compte. Pour les PDF, c'est le seuil proposé par la société japonaise qui est inclus dans le calcul du score ISTH, ce dernier ne proposant pas de valeur seuil.

2.5. Marqueurs de fibrine et mortalité

L'analyse des marqueurs de fibrine en fonction de la mortalité des patients montre que les patients qui décèdent à la suite de la prise en charge initiale présentent un taux de marqueur de fibrine significativement plus élevé que les autres patients. La moyenne, l'écart-type pour chacun des groupes, ainsi que la p -value calculée par le test de Mann-Whitney sont présentés dans le tableau 8 suivant :

	Prélèvements de patients décédés		Prélèvements de patients non décédés		p
	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart type	
FM ($\mu\text{g/mL}$)	193 n = 11	85	78 n = 53	56	0,0002
PDF ($\mu\text{g/mL}$)	221 n = 14	101	79 n = 59	124	< 0.0001
D-dimères (ng/mL)	11111 n = 16	0	8515 n = 64	3673	0.002

Tableau 8 : comparaison des taux de marqueurs de fibrine entre les patients décédés dans les suites de la prise en charge initiale, et les autres. p -value calculée grâce au test de Mann-Whitney.

La différence de taux de marqueurs de fibrine entre les patients décédés et les patients non décédés est significative pour les 3 marqueurs de fibrine, mais le paramètre le plus discriminant sont les PDF (p -value la plus faible). On peut noter que les trois patients ayant eu un dosage de FM supérieur à 200 $\mu\text{g/mL}$ sont décédés.

Par ailleurs, Tous les patients décédés présentent des D-dimères écrêtés à 10000 ng/mL (valeur arbitraire attribuée à 11111 ng/mL). Le fait de ne pas avoir la valeur réelle des D-dimères minimise très probablement la différence entre les moyennes des 2 groupes, rendant ainsi la p -value moins bonne pour ce paramètre.

En étudiant les taux d'autres paramètres en fonction de la mortalité lors de la prise en charge initiale, on observe une différence significative pour d'autres paramètres. Le tableau suivant présente la comparaison du TP, du fibrinogène, du facteur V et des plaquettes en fonction de la mortalité.

	Prélèvements de patients décédés		Prélèvements de patients non décédés		<i>p</i>
	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart type	
TP (%)	63 n = 15	37	81 n = 58	21	0.008
FV (%)	34 n = 16	18	76 n = 67	28	< 0.0001
Fg (g/L)	1.8 n = 16	0.8	2.5 n = 67	0.9	0.003
Plaquettes (G/L)	107 n = 15	52	178 n = 66	72	0.0004

Tableau 9 : Comparaison du TP, du fibrinogène, du facteur V et des plaquettes entre les patients décédés dans les suites de la prise en charge initiale, et les autres. *p*-value calculée grâce au test de Mann-Whitney.

On constate que les autres paramètres biologiques présentent également une différence significative entre les patients qui décèdent à la suite de la prise en charge initiale et ceux qui ne décèdent pas. Les paramètres les plus discriminants sont le facteur V et les PDF (*p*-value <0.0001).

2.6. Corrélation entre marqueurs de fibrine et scores cliniques.

Plusieurs scores cliniques sont établis par les équipes soignantes à leur arrivée sur le lieu d'un accident. Parmi eux, le score de Glasgow (GCS), indicateur de l'état de conscience d'un patient, et le score de l'American Society of Anesthesiologists (ASA), qui évalue l'état de santé pré-opératoire d'un patient. Le score de Glasgow va de 3 (coma profond) à 15 (personne parfaitement consciente) et le score ASA va de I

(patient normal) à VI (patient en état de mort cérébral). Les critères permettant d'établir le score de Glasgow, ainsi que la définition des scores ASA sont présentés en annexe 2.

La corrélation entre ces scores et les taux de marqueurs de fibrine ont été établis et sont représentés sur la figure suivante :

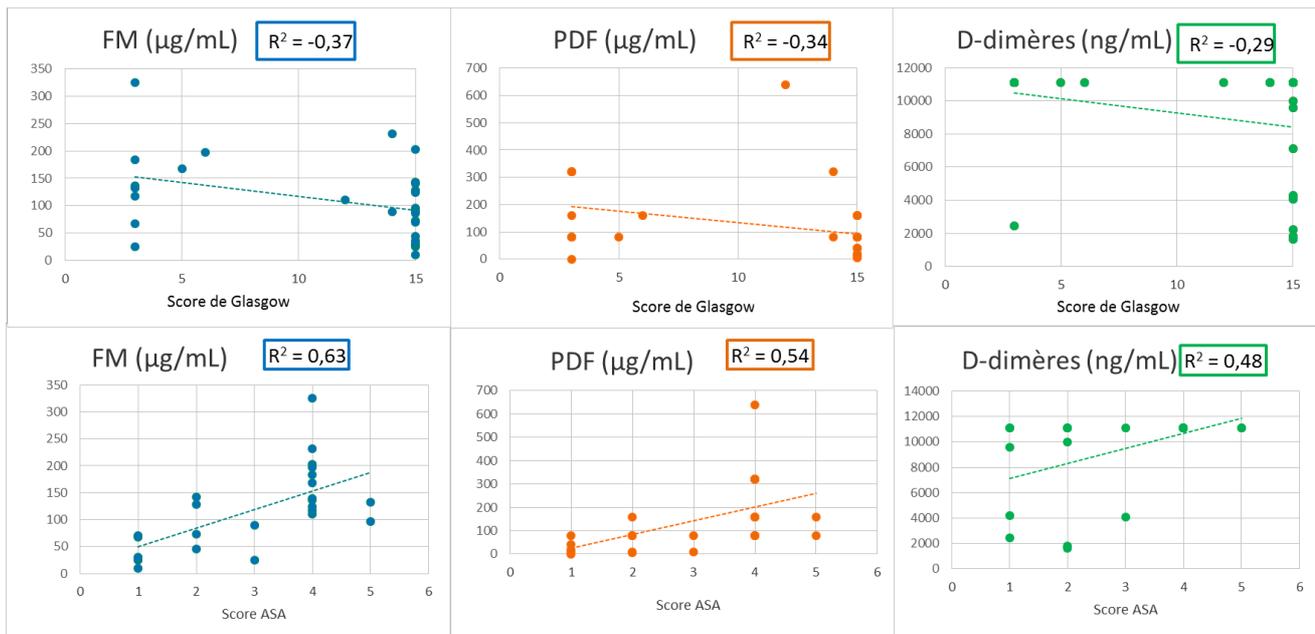


Figure 26 : Corrélation entre les taux de marqueurs de fibrine et les scores cliniques de Glasgow et ASA.

On constate que les marqueurs de fibrine ont une relation plus forte avec le score ASA qu'avec le score de Glasgow, notamment en utilisant les FM ($R^2 = 0,63$). Les D-dimères sont là encore pénalisés par l'écrêtage des valeurs $>10\ 000$ ng/ml.

Pour savoir si les taux de marqueurs de fibrine sont corrélés à la clinique, un test de Mann-Whitney a été réalisé pour comparer les taux de FM, PDF, et D-dimères en fonction des scores cliniques. La population a été séparée en 2 groupes pour chacun des scores : patients $GCS \leq 10$ vs. $GCS > 10$, et patients $ASA > 3$ vs. $ASA \leq 3$. Les résultats sont consignés dans les tableaux 10 et 11 suivants :

	Patients GCS ≤ 10		Patients GCS > 10		<i>p</i>
	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart type	
FM (µg/mL)	150 n = 9	85	92 n = 19	60	0.085
PDF (µg/mL)	175 n = 11	123	101 n = 21	145	0.047
D-dimères (ng/mL)	10391 n = 12	2495	8491 n = 21	3699	0.056

Tableau 10 : Comparaison des taux de marqueurs de fibrine à l'admission entre les patients présentant un GCS ≤ 10 et ceux présentant un GCS > 10.

	Patients ASA > 3		Patients ASA ≤ 3		<i>p</i>
	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart type	
FM (µg/mL)	167 n = 13	63	64 n = 11	43	0.001
PDF (µg/mL)	229 n = 14	156	50 n = 13	47	0.0002
D-dimères (ng/mL)	11111 n = 15	0	7727 n = 13	4108	0.002

Tableau 11 : Comparaison des taux de marqueurs de fibrine à l'admission entre les patients présentant un score ASA > 3 et ceux présentant un score ASA ≤ 3.

On constate que la différence entre les concentrations de marqueurs de fibrine n'est pas significative lorsque l'on compare les patients ayant un GCS ≤ 10 et ceux ayant un GCS > 10, excepté pour les PDF, même si la *p-value* n'est pas très significative. En revanche, cette différence est significative pour chacun des 3 marqueurs de fibrine, lorsqu'on prend le score ASA. Le paramètre le plus discriminant est à nouveau les PDF.

QUATRIEME PARTIE : DISCUSSION

1. Qualités analytiques du kit STA® Liatest® FM

Le kit STA® Liatest® FM est simple d'utilisation. Les réactifs sont prêts à l'emploi et le dosage est rapide (5 minutes par échantillon). Les essais de répétabilité et de linéarité ont été satisfaisants. Une approche de la reproductibilité a pu être calculée en tenant compte des contrôles de qualité internes utilisés tout au long des manipulations. Les résultats de cet essai sont limites puisqu'on a obtenu un CV de 8,1% pour le niveau bas (limite fournisseur 8%), et un CV de 3,1% pour le niveau haut (limite fournisseur 2,6%).

De façon générale, le principal problème rencontré lors des dosages est l'apparition de résultats faussement abaissés, rendus sans aucune alarme automate. Sur la totalité des dosages réalisés, 5 résultats faussement négatifs ont été décelés, soit un pourcentage de 1,7% des dosages de FM effectués.

Les interférences annoncées par Stago® pouvant entraîner une sous-estimation des monomères de fibrine sont soit un niveau de fibrinogène élevé, soit une forte turbidité du plasma. Ces 2 paramètres ne semblent pas responsables des problèmes rencontrés sur ces 5 échantillons puisque le taux de fibrinogène était compris entre 1,3 et 4,9 g/L, et l'aspect du plasma n'était pas trouble. D'autres interférences sont citées tels que la présence de facteur rhumatoïde, ou de fortes concentrations en hémoglobine, bilirubine, ou en héparine, mais les contrôles effectués sur les plasmas à taux faussement abaissés ayant donné la valeur élevée attendue écartent ces hypothèses.

Les réponses apportées par Stago® à la suite de nos interrogations concernant ces résultats erronés ne sont pas satisfaisantes. En effet, le phénomène s'est produit aussi bien sur des échantillons congelés que sur du plasma prélevé le jour de l'analyse. On ne peut pas écarter l'hypothèse que l'effet crochet annoncé par Stago® pour des échantillons contenant environ 400µg/mL de FM puisse apparaître pour des valeurs plus basses, entre 150 et 300 µg/ml.

Enfin, l'ensemble des dosages ont été réalisés sur 2 automates Stago®, le STA-R Max, et le STA-R Evolution, et des résultats faussement abaissés ont été observés sur ces 2 automates. Ceci implique que ce phénomène n'est probablement pas dû à une défaillance de l'automate ou à un problème lié au réactif lui-même.

2. Analyse des concentrations en marqueurs de fibrine

Chez les patients polytraumatisés, l'analyse des données biologiques générales montre qu'au début de la prise en charge, les marqueurs de fibrine sont les paramètres les plus perturbés. En effet, le 25ème percentile des D-dimères culmine déjà à 9581 ng/ml pour l'ensemble des premiers prélèvements post-traumatisme, et tous prélèvement confondus, seul un présente un taux de FM < 6µg/mL. Le dosage d'au moins un de ces marqueurs de fibrine semble indispensable lors du bilan biologique initial, en complément du bilan de coagulation standard, car le TP, le TCA, et le fibrinogène sont normaux dans la majorité des cas.

L'analyse comparative des concentrations de ces 3 marqueurs de fibrine montre une réactivité globale très proche. Effectivement, la répartition des FM et des D-dimères est superposable au sein d'une population témoin, et l'analyse en composante principale des dosages de ces marqueurs dans la population de patients polytraumatisés montre clairement l'évolution commune de ces paramètres.

Cette évolution commune est également montrée par l'évaluation des coefficients de corrélation entre les 3 marqueurs, même s'ils ne sont pas très élevés. Le calcul de ces coefficients est d'interprétation difficile étant donné que les résultats élevés de D-dimères sont écrêtés. Par raison d'économie, il n'avait pas été prévu de faire des dilutions pour les D-dimères supérieurs à 10000 ng/mL. L'utilisation récente au laboratoire d'une méthode de dosage automatisée des PDF ayant une gamme dynamique très élevée répond aux besoins de scoring des CIVD, l'indication des D-dimères restant l'exclusion de thrombose.

L'analyse de l'évolution des concentrations en marqueurs de fibrine au cours du temps montre que les taux de FM, de PDF, et de D-dimères sont d'emblée très élevés. Les données de la littérature, et l'analyse des taux de FM au cours de la formation d'un caillot *in vitro*, s'accordent sur le fait que l'apparition des FM après activation de la coagulation est très rapide. Pour autant, l'évolution au cours des prélèvements suivant est assez anarchique. Les 3 marqueurs de fibrine sont franchement positifs, et on ne peut pas déceler de variation significative de leur concentration pendant la période de suivi de l'hémostase.

L'évolution des taux de marqueurs de fibrine n'évoluent donc pas selon le schéma théorique proposé par Wada et al. (figure 13). On ne retrouve pas la notion de pic fugace d'augmentation des FM chez les patients de l'étude. En outre, nos résultats montrent une augmentation tout aussi rapide des D-dimères et des PDF, ce qui ne confirme pas la spécificité des FM à augmenter plus précocement *ex vivo* que les produits de dégradation de la fibrine.

3. Monomères de fibrine et applications cliniques

Les données de la littérature montrent que l'utilisation des FM permet de mettre en évidence plus de patients en état de CIVD décompensée. Dans notre étude, l'utilisation des FM et des D-dimères dans le calcul du score ISTH a permis de classer un patient de plus en CIVD biologique par rapport à l'utilisation des PDF. Cependant, les performances des 3 marqueurs de fibrine semblent superposables dans ce contexte, ne permettant pas de conclure à l'utilisation préférentielle d'un marqueur par rapport à l'autre.

La différence de taux de FM entre les patients qui décèdent au cours de la prise en charge initiale et ceux qui survivent est significative (p -value = 0.0002) et un taux de FM très élevé (>200 µg/mL) semble être de mauvais pronostic pour ces patients. Ces données se rapprochent de celles de la littérature qui montrent que des valeurs de FM inférieures à 100 µg/mL seraient associées à un pronostic vital plus favorable. Néanmoins, l'utilisation des FM à visée pronostique est délicate car Stago® préconise de ne pas diluer les échantillons. Dans la pratique courante, un résultat

élevé de FM n'est pas dilué, et est donc rendu égal à 150 µg/mL, ou « > Max ». Hors, ce sont les taux de FM très élevés (>200 µg/mL) qui semblent les plus corrélés au pronostic vital. L'utilisation des FM pour évaluer le pronostic de ces patients perd donc de sa pertinence s'il n'est pas dilué.

De plus, le dosage de ce paramètre n'apporte pas de bénéfice particulier par rapport aux autres. En effet, les FM ne sont pas le paramètre le plus corrélé à la mortalité. La différence de taux de facteur V et de PDF entre les patients qui décèdent lors de la prise en charge initiale et ceux qui survivent est plus significative que celle des FM (p -value <0.0001).

L'analyse des taux de marqueurs de fibrine à l'admission en fonction des scores cliniques a permis de montrer qu'il existe une liaison entre l'élévation de ces paramètres et l'aggravation clinique globale des patients (représentée par l'élévation du score ASA). En revanche, la liaison entre élévation des marqueurs de fibrine et aggravation de l'état de conscience des patients n'est pas franche (représentée par la diminution du score de Glasgow).

CONCLUSION

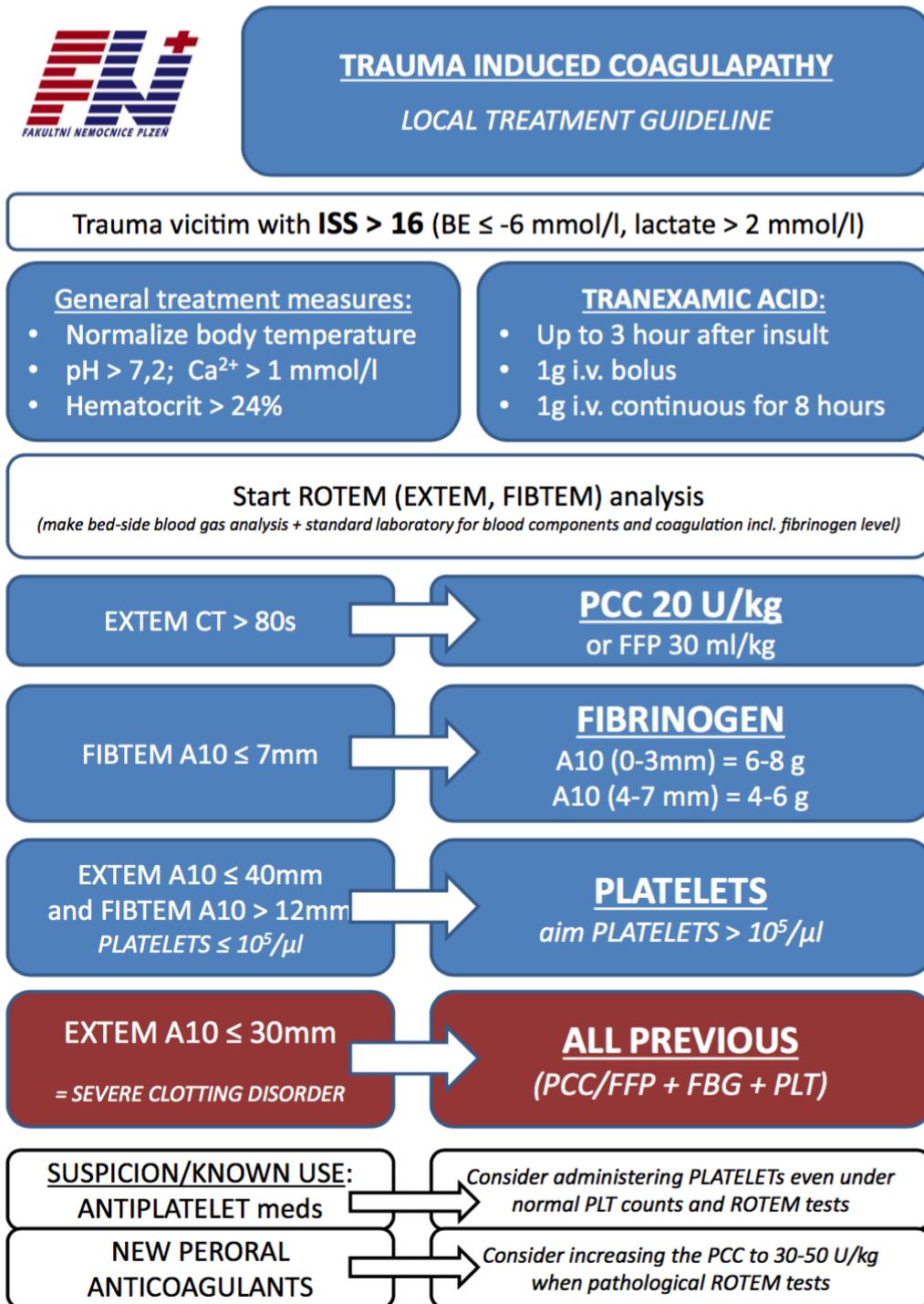
L'étude menée sur les patients polytraumatisés a permis d'évaluer la performance de la technique STA® Liatest® FM. Les limites de reproductibilité préconisées par le fournisseur n'ont pas été atteintes, même si elles étaient proches de l'intervalle recommandé, et nous n'avons pas d'explication acceptable pour l'obtention des résultats faussement abaissés obtenus sur plusieurs dosages. Nos résultats pointent donc la nécessité d'effectuer une étude de plus grande ampleur, afin de confirmer et de quantifier ces erreurs qui semblent aléatoires sur les plasmas à FM élevés.

L'analyse comparative des concentrations en marqueurs de fibrine dans la population saine, et chez les patients polytraumatisés a mis en évidence la réactivité comparable des FM, des D-dimères et des PDF. Les FM reflètent l'activité de la thrombine, et un processus de coagulation active, tandis que les D-dimères et les PDF sont le reflet de la coagulation suivie de la fibrinolyse. Pour autant, leur évolution est commune sur toute la durée du suivi des patients polytraumatisés.

Le dosage des FM ne semble pas apporter de bénéfice particulier en comparaison avec le dosage des D-dimères et surtout des PDF dans notre étude. Les marqueurs de fibrine dans ce contexte reflètent l'activation de la coagulation et restent pertinents dans le bilan biologique initial, afin de détecter une éventuelle CIVD, ou d'apprécier le pronostic vital des patients. Cependant, le dosage simultané de plusieurs marqueurs ne semble pas indiqué, tant leur évolution est superposable.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Exemple de protocole de traitement basé sur les résultats ROTEM [77].



ANNEXE 2 : score de Glasgow[115] et score ASA[116]

Calcul du score de Glasgow :

Ouverture des yeux	Réponse verbale	Réponse motrice
Spontanée : 4	Orientée : 5	Aux ordres : 6
Au bruit : 3	Confuse : 4	Orientée : 5
A la douleur : 2	Inappropriée : 3	Evitement : 4
Jamais : 1	Incompréhensible : 2	Flexion stéréotypée : 3
	Rien : 1	Extension stéréotypée : 2
		Rien : 1

Score ASA :

Score ASA	Définition	Exemple
I	Patient en bonne santé	
II	Patient présentant une maladie systémique légère	Diabète non insulino-dépendant, hypertension, obésité, insuffisance rénale modérée, infarctus ancien...
III	Patient présentant une maladie systémique sévère	Diabète insulino-dépendant, obésité morbide, insuffisance respiratoire modérée, syndrome apnée du sommeil...
IV	Patient présentant une maladie systémique sévère mettant en jeu le pronostic vital	Patient dialysé, insuffisance cardiaque ou respiratoire grave...
V	Patient moribond dont l'espérance de vie n'excède pas 24 heures en l'absence d'intervention chirurgicale	Etat de choc hémorragique, rupture d'anévrisme cérébral avec coma...
VI	Patient en état de mort cérébrale, candidat au don d'organes	

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Samama, M.M., Emile, C.: *Cahier de formation biologie médicale - Hémostase et thrombose*. 2000.
- [2] Javorschi, S. et al.: Relative influence of age and thrombotic history on hemostatic parameters. *Thromb. Res.*, 91 (5), 1998, p. 241–248.
- [3] Weisel, J.W., Litvinov, R.I.: Mechanisms of fibrin polymerization and clinical implications. *Blood*, 121 (10), 2013, p. 1712–1719.
- [4] Pechik, I. et al.: Structural basis for sequential cleavage of fibrinopeptides upon fibrin assembly. *Biochemistry (Mosc.)*, 45 (11), 2006, p. 3588–3597.
- [5] Medved, L. et al.: Recommendations for nomenclature on fibrinogen and fibrin. *J. Thromb. Haemost.*, 7 (2), 2009, p. 355–359.
- [6] Colas, L.: *Fibrinogène : nouveau facteur de risque cardiovasculaire*. *Act. Méd. Int. - Hypertension*. 2000.
- [7] Wei, A.H. et al.: New insights into the haemostatic function of platelets. *Br. J. Haematol.*, 147 (4), 2009, p. 415–430.
- [8] Monroe, D.M. et al.: Platelets and thrombin generation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 22 (9), 2002, p. 1381–1389.
- [9] Bayer: *La cascade de coagulation*, <https://www.levenmethemofilie.be/fr/hemophilie/la-coagulation-sanguine/la-cascade-de-coagulation/>. 2016.
- [10] Brummel, K.E. et al.: An integrated study of fibrinogen during blood coagulation. *J. Biol. Chem.*, 274 (32), 1999, p. 22862–22870.
- [11] Weisel, J.W. et al.: The sequence of cleavage of fibrinopeptides from fibrinogen is important for protofibril formation and enhancement of lateral aggregation in fibrin clots. *J. Mol. Biol.*, 232 (1), 1993, p. 285–297.
- [12] Fowler, W.E. et al.: Structure of the fibrin protofibril. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 78 (8), 1981, p. 4872–4876.
- [13] Weisel, J.W.: Which knobs fit into which holes in fibrin polymerization? *J. Thromb. Haemost. JTH*, 5 (12), 2007, p. 2340–2343.
- [14] Hantgan, R.R., Hermans, J.: Assembly of fibrin. A light scattering study. *J. Biol. Chem.*, 254 (22), 1979, p. 11272–11281.
- [15] Yang, Z. et al.: A model of fibrin formation based on crystal structures of fibrinogen and fibrin fragments complexed with synthetic peptides. *Proc. Natl. Acad.*

Sci. U. S. A., 97 (26), 2000, p. 14156–14161.

[16] Tsurupa, G. et al.: Structure, stability, and interaction of fibrin α C-domain polymers. *Biochemistry (Mosc.)*, 50 (37), 2011, p. 8028–8037.

[17] Litvinov, R.I. et al.: Direct evidence for specific interactions of the fibrinogen α C-domains with the central E region and with each other. *Biochemistry (Mosc.)*, 46 (31), 2007, p. 9133–9142.

[18] Thorsen, S., Philips, M.: Isolation of tissue-type plasminogen activator-inhibitor complexes from human plasma. Evidence for a rapid plasminogen activator inhibitor. *Biochim. Biophys. Acta*, 802 (1), 1984, p. 111–118.

[19] Brenner, B.: Haemostatic changes in pregnancy. *Thromb. Res.*, 114 (5–6), 2004, p. 409–414.

[20] Wang, W. et al.: A study of the mechanism of inhibition of fibrinolysis by activated thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 273 (42), 1998, p. 27176–27181.

[21] Dobrovolsky, A.B., Titaeva, E.V.: The fibrinolysis system: regulation of activity and physiologic functions of its main components. *Biochem. Biokhimiia*, 67 (1), 2002, p. 99–108.

[22] Yakovlev, S. et al.: Conversion of fibrinogen to fibrin: mechanism of exposure of tPA- and plasminogen-binding sites. *Biochemistry (Mosc.)*, 39 (51), 2000, p. 15730–15741.

[23] Suenson, E. et al.: Initial plasmin-degradation of fibrin as the basis of a positive feed-back mechanism in fibrinolysis. *Eur. J. Biochem. FEBS*, 140 (3), 1984, p. 513–522.

[24] Veklich, Y. et al.: Structural studies of fibrinolysis by electron microscopy. *Blood*, 92 (12), 1998, p. 4721–4729.

[25] Tournoy, A.: *Monomères de fibrine : quel intérêt en centre hospitalier?*. 2013.

[26] Sakharov, D.V. et al.: Rearrangements of the fibrin network and spatial distribution of fibrinolytic components during plasma clot lysis. Study with confocal microscopy. *J. Biol. Chem.*, 271 (4), 1996, p. 2133–2138.

[27] Boneu, B., Cazenave, J.-P.: *Introduction à l'étude de l'hémostase et de la thrombose*. 1982.

[28] Tanaka, S. et al.: *Monoclonal antibody specific to anti-human fibrin monomer, process for producing the same, hybridomas, and immunoassay method*. 2002.

[29] Stago: *STA Liatest FM - Dosage immuno-turbidimétrique des monomères de*

fibrine. 2015.

- [30] Godal, H.C., Abildgaard, U.: Gelation of soluble fibrin in plasma by ethanol. *Scand. J. Haematol.*, 3 (5), 1966, p. 342–350.
- [31] Kidder, W.R. et al.: The plasma protamine paracoagulation test: clinical and laboratory evaluation. *Am. J. Clin. Pathol.*, 58 (6), 1972, p. 675–686.
- [32] Largo, R. et al.: Detection of soluble intermediates of the fibrinogen-fibrin conversion using erythrocytes coated with fibrin monomers. *Blood*, 47 (6), 1976, p. 991–1002.
- [33] van Wersch, J.W.: Adaptation and evaluation of a chromogenic test procedure for fibrin monomers on a centrifugal analyzer. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem. Z. Für Klin. Chem. Klin. Biochem.*, 28 (3), 1990, p. 169–174.
- [34] Soe, G. et al.: A monoclonal antibody that recognizes a neo-antigen exposed in the E domain of fibrin monomer complexed with fibrinogen or its derivatives: its application to the measurement of soluble fibrin in plasma. *Blood*, 88 (6), 1996, p. 2109–2117.
- [35] Hamano, A. et al.: A novel monoclonal antibody to fibrin monomer and soluble fibrin for the detection of soluble fibrin in plasma. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.*, 318 (1–2), 2002, p. 25–32.
- [36] Wada, H. et al.: Diagnosis and treatment of disseminated intravascular coagulation (DIC) according to four DIC guidelines. *J. Intensive Care*, 2 (1), 2014, p. 15.
- [37] Venugopal, A.: Disseminated intravascular coagulation. *Indian J. Anaesth.*, 58 (5), 2014, p. 603.
- [38] Gando, S. et al.: Disseminated intravascular coagulation. *Nat. Rev. Dis. Primer*, 2, 2016, p. 16037.
- [39] Elalamy, I.: Coagulation intravasculaire disséminée. 2006.
- [40] Stouthard, J.M. et al.: Interleukin-6 stimulates coagulation, not fibrinolysis, in humans. *Thromb. Haemost.*, 76 (5), 1996, p. 738–742.
- [41] van der Poll, T. et al.: Elimination of interleukin 6 attenuates coagulation activation in experimental endotoxemia in chimpanzees. *J. Exp. Med.*, 179 (4), 1994, p. 1253–1259.
- [42] Kannemeier, C. et al.: Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104 (15), 2007, p. 6388–6393.

- [43] von Brühl, M.-L. et al.: Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J. Exp. Med.*, 209 (4), 2012, p. 819–835.
- [44] Massberg, S. et al.: Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat. Med.*, 16 (8), 2010, p. 887–896.
- [45] Fuchs, T.A. et al.: Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107 (36), 2010, p. 15880–15885.
- [46] Wada, H. et al.: Guidance for diagnosis and treatment of DIC from harmonization of the recommendations from three guidelines. *J. Thromb. Haemost. JTH*, 2013.
- [47] Toh, C.H. et al.: The scoring system of the Scientific and Standardisation Committee on Disseminated Intravascular Coagulation of the International Society on Thrombosis and Haemostasis: a 5-year overview. *J. Thromb. Haemost. JTH*, 5 (3), 2007, p. 604–606.
- [48] Dempfle, C.-E.: Coagulopathy of sepsis. *Thromb. Haemost.*, 91 (2), 2004, p. 213–224.
- [49] Dempfle, C.-E. et al.: Use of soluble fibrin antigen instead of D-dimer as fibrin-related marker may enhance the prognostic power of the ISTH overt DIC score. *Thromb. Haemost.*, 91 (4), 2004, p. 812–818.
- [50] Lavigne-Lissalde, G.: *Étude prospective validant l'intérêt du dosage des monomères de fibrine circulants comme marqueur d'activation et de fibrinoformation dans le choc septique.* 2009.
- [51] Mathonnet, F., Tetegani, M.: *Intérêt du dosage quantitatif des monomères de fibrine au cours des CIVD.* 2006.
- [52] Tripodi, A.: D-dimer testing in laboratory practice. *Clin. Chem.*, 57 (9), 2011, p. 1256–1262.
- [53] Wada, H., Sakuragawa, N.: Are fibrin-related markers useful for the diagnosis of thrombosis? *Semin. Thromb. Hemost.*, 34 (1), 2008, p. 33–38.
- [54] Feugeas, O.: *Etude des complexes solubles de monomères de fibrine pendant la grossesse.* 2010.
- [55] Lecourvoisier, C., Toulon, P.: [Value of D-dimer measurement in the exclusion diagnosis of pulmonary embolism]. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, 59 (6), 2001, p. 693–700.
- [56] Righini, M. et al.: D-Dimer for venous thromboembolism diagnosis: 20 years later. *J. Thromb. Haemost. JTH*, 6 (7), 2008, p. 1059–1071.

- [57] Madoiwa, S. et al.: Distinct reactivity of the commercially available monoclonal antibodies of D-dimer and plasma FDP testing to the molecular variants of fibrin degradation products. *Thromb. Res.*, 132 (4), 2013, p. 457–464.
- [58] Rand, M.D. et al.: Blood clotting in minimally altered whole blood. *Blood*, 88 (9), 1996, p. 3432–3445.
- [59] Shainoff, J.R., Dardik, B.N.: Effects of cross-linking on clearance of circulating alpha-fibrin monomer and its complexes. *J. Lab. Clin. Med.*, 115 (3), 1990, p. 314–323.
- [60] Shainoff, J.R., DiBello, P.M.: The circulatory half-lives of alpha-profibrin and alpha-fibrin monomer, and comparisons with other fibrin(ogen) derivatives. *Thromb. Haemost.*, 89 (1), 2003, p. 48–52.
- [61] Nilsen, D.W. et al.: Clearance characteristics of des-AA fibrin and des-AABB fibrin, and thrombus-related uptake of des-AABB fibrin as compared to fibrinogen. *Scand. J. Clin. Lab. Investig. Suppl.*, 178, 1985, p. 115–119.
- [62] Dardik, B.N., Shainoff, J.R.: Kinetic characterization of a saturable pathway for rapid clearance of circulating fibrin monomer. *Blood*, 65 (3), 1985, p. 680–688.
- [63] Nilsen, D.W. et al.: Thrombus-related uptake and vascular clearance of ¹³¹I-fibrin des-AABB as compared to ¹²⁵I-fibrinogen in patients with established venous thrombosis. *Thromb. Haemost.*, 51 (2), 1984, p. 165–168.
- [64] Franks, J.J. et al.: *Fibrinogen and fibrinogen-related peptides in cancer*. In: Pathophysiology of Plasma Protein Metabolism (Editor: G. Mariani). Boston, MA: Springer US, 1984, p. 265–278.
- [65] Conard, J. et al.: Normalization of markers of coagulation activation with a purified protein C concentrate in adults with homozygous protein C deficiency. *Blood*, 82 (4), 1993, p. 1159–1164.
- [66] Dindo, D. et al.: Kinetics of D-dimer after general surgery. *Blood Coagul. Fibrinolysis Int. J. Haemost. Thromb.*, 20 (5), 2009, p. 347–352.
- [67] Sherman, L.A. et al.: Quantitation of the reticuloendothelial system clearance of soluble fibrin. *Br. J. Haematol.*, 37 (2), 1977, p. 231–238.
- [68] Hörmann, H. et al.: Cell-binding and internalization of soluble fibrin by platelets. *Blood Coagul. Fibrinolysis Int. J. Haemost. Thromb.*, 1 (4–5), 1990, p. 547–549.
- [69] Simon, D.I. et al.: Fibrin(ogen) is internalized and degraded by activated human monocytoïd cells via Mac-1 (CD11b/CD18): a nonplasmin fibrinolytic pathway.

Blood, 82 (8), 1993, p. 2414–2422.

[70] Iio, A. et al.: The roles of renal catabolism and uremia in modifying the clearance of fibrinogen and its degradative fragments D and E. *J. Lab. Clin. Med.*, 87 (6), 1976, p. 934–946.

[71] Evans, J.A. et al.: Epidemiology of Traumatic Deaths: Comprehensive Population-Based Assessment. *World J. Surg.*, 34 (1), 2010, p. 158–163.

[72] MacLeod, J.B.A. et al.: Early coagulopathy predicts mortality in trauma. *J. Trauma*, 55 (1), 2003, p. 39–44.

[73] Maegele, M. et al.: Early coagulopathy in multiple injury: an analysis from the German Trauma Registry on 8724 patients. *Injury*, 38 (3), 2007, p. 298–304.

[74] Frith, D. et al.: Definition and drivers of acute traumatic coagulopathy: clinical and experimental investigations: Acute traumatic coagulopathy. *J. Thromb. Haemost.*, 8 (9), 2010, p. 1919–1925.

[75] Gando, S. et al.: Trauma, shock, and disseminated intravascular coagulation: lessons from the classical literature. *Ann. Surg.*, 254 (1), 2011, p. 10–19.

[76] Johansson, P.I. et al.: Disseminated intravascular coagulation or acute coagulopathy of trauma shock early after trauma? An observational study. *Crit. Care Lond. Engl.*, 15 (6), 2011, p. R272.

[77] Benes, J. et al.: Viscoelastic Methods of Blood Clotting Assessment – A Multidisciplinary Review. *Front. Med.*, 2, 2015.

[78] Levrat, A. et al.: Evaluation of rotation thrombelastography for the diagnosis of hyperfibrinolysis in trauma patients. *Br. J. Anaesth.*, 100 (6), 2008, p. 792–797.

[79] Carroll, R.C. et al.: Early evaluation of acute traumatic coagulopathy by thrombelastography. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.*, 154 (1), 2009, p. 34–39.

[80] Tauber, H. et al.: Prevalence and impact of abnormal ROTEM(R) assays in severe blunt trauma: results of the ‘Diagnosis and Treatment of Trauma-Induced Coagulopathy (DIA-TRE-TIC) study’. *Br. J. Anaesth.*, 107 (3), 2011, p. 378–387.

[81] Gando, S. et al.: Differentiating disseminated intravascular coagulation (DIC) with the fibrinolytic phenotype from coagulopathy of trauma and acute coagulopathy of trauma-shock (COT/ACOTS). *J. Thromb. Haemost. JTH*, 11 (5), 2013, p. 826–835.

[82] Effects of tranexamic acid on death, vascular occlusive events, and blood transfusion in trauma patients with significant haemorrhage (CRASH-2): a randomised, placebo-controlled trial. *The Lancet*, 376 (9734), 2010, p. 23–32.

[83] Watts, D.D. et al.: Hypothermic coagulopathy in trauma: effect of varying

levels of hypothermia on enzyme speed, platelet function, and fibrinolytic activity. *J. Trauma*, 44 (5), 1998, p. 846–854.

[84] Martini, W.Z.: Coagulopathy by hypothermia and acidosis: mechanisms of thrombin generation and fibrinogen availability. *J. Trauma*, 67 (1), 2009, p. 202-208-209.

[85] Martini, W.Z., Holcomb, J.B.: Acidosis and coagulopathy: the differential effects on fibrinogen synthesis and breakdown in pigs. *Ann. Surg.*, 246 (5), 2007, p. 831–835.

[86] Dirkmann, D. et al.: Hypothermia and acidosis synergistically impair coagulation in human whole blood. *Anesth. Analg.*, 106 (6), 2008, p. 1627–1632.

[87] De Robertis, E. et al.: Coagulopathy induced by acidosis, hypothermia and hypocalcaemia in severe bleeding. *Minerva Anesthesiol.*, 81 (1), 2015, p. 65–75.

[88] Vivien, B. et al.: Early hypocalcemia in severe trauma. *Crit. Care Med.*, 33 (9), 2005, p. 1946–1952.

[89] Solomon, C. et al.: Platelet function following trauma. A multiple electrode aggregometry study. *Thromb. Haemost.*, 106 (2), 2011, p. 322–330.

[90] Mann, K.G., Freeman, K.: TACTIC: Trans-Agency Consortium for Trauma-Induced Coagulopathy. *J. Thromb. Haemost. JTH*, 13 Suppl 1, 2015, p. S63-71.

[91] González-Guerrero, C.: Physiopathology and treatment of critical bleeding: a literature review. *Farm. Hosp.*, (6), 2015, p. 382–398.

[92] Davenport, R. et al.: Functional definition and characterization of acute traumatic coagulopathy. *Crit. Care Med.*, 39 (12), 2011, p. 2652–2658.

[93] Figueiredo, S., Duranteau, J.: *Actualités sur la coagulopathie du choc hémorragique traumatique*. 2013.

[94] David, J.-S. et al.: Utility of a point-of-care device for rapid determination of prothrombin time in trauma patients: a preliminary study. *J. Trauma Acute Care Surg.*, 72 (3), 2012, p. 703–707.

[95] Taborski, U. et al.: Analytical performance of the new coagulation monitoring system INRatio for the determination of INR compared with the coagulation monitor CoaguChek S and an established laboratory method. *J. Thromb. Thrombolysis*, 18 (2), 2004, p. 103–107.

[96] Christensen, T.D. et al.: International normalised ratio (INR) measured on the CoaguChek S and XS compared with the laboratory for determination of precision and accuracy. *Thromb. Haemost.*, 101 (3), 2009, p. 563–569.

- [97] Lancé, M.D.: A general review of major global coagulation assays: thrombelastography, thrombin generation test and clot waveform analysis. *Thromb. J.*, 13, 2015, p. 1.
- [98] Dutton, R.P.: Management of traumatic haemorrhage--the US perspective. *Anaesthesia*, 70 Suppl 1, 2015, p. 108–111, e38.
- [99] Simmons, J.W. et al.: Trauma-Induced Coagulopathy. *Curr. Anesthesiol. Rep.*, 4 (3), 2014, p. 189–199.
- [100] Rossaint, R. et al.: The European guideline on management of major bleeding and coagulopathy following trauma: fourth edition. *Crit. Care*, 20 (1), 2016.
- [101] Nardi, G. et al.: Trauma-induced coagulopathy: impact of the early coagulation support protocol on blood product consumption, mortality and costs. *Crit. Care*, 19 (1), 2015.
- [102] Seyednejad, H. et al.: Topical haemostatic agents. *Br. J. Surg.*, 95 (10), 2008, p. 1197–1225.
- [103] Borgman, M.A. et al.: The effect of FFP:RBC ratio on morbidity and mortality in trauma patients based on transfusion prediction score. *Vox Sang.*, 101 (1), 2011, p. 44–54.
- [104] Holcomb, J.B. et al.: Increased plasma and platelet to red blood cell ratios improves outcome in 466 massively transfused civilian trauma patients. *Ann. Surg.*, 248 (3), 2008, p. 447–458.
- [105] Danés, A.F. et al.: Efficacy and tolerability of human fibrinogen concentrate administration to patients with acquired fibrinogen deficiency and active or in high-risk severe bleeding. *Vox Sang.*, 94 (3), 2008, p. 221–226.
- [106] Wikkelsø, A. et al.: Fibrinogen concentrate in bleeding patients. *Cochrane Database Syst. Rev.*, (8), 2013, p. CD008864.
- [107] Leal-Noval, S.R. et al.: Efficacy of the prothrombin complex concentrate prothromplex in patients requiring urgent reversal of vitamin K antagonists or presenting with uncontrolled bleeding: a retrospective, single center study. *Blood Coagul. Fibrinolysis Int. J. Haemost. Thromb.*, 24 (8), 2013, p. 862–868.
- [108] Napolitano, L.M. et al.: Tranexamic acid in trauma: how should we use it? *J. Trauma Acute Care Surg.*, 74 (6), 2013, p. 1575–1586.
- [109] Maegele, M.: [Uncritical use of tranexamic acid in trauma patients: Do no further harm!]. *Unfallchirurg*, 2016.
- [110] Schwinn, D.A. et al.: Understanding the TXA seizure connection. *J. Clin.*

Invest., 122 (12), 2012, p. 4339–4341.

[111] Ho, K.M., Leonard, A.D.: Concentration-dependent effect of hypocalcaemia on mortality of patients with critical bleeding requiring massive transfusion: a cohort study. *Anaesth. Intensive Care*, 39 (1), 2011, p. 46–54.

[112] Bucklin, M.H. et al.: The effects of recombinant activated factor VII dose on the incidence of thromboembolic events in patients with coagulopathic bleeding. *Thromb. Res.*, 133 (5), 2014, p. 768–771.

[113] Hatada, T. et al.: Analysis of the cutoff values in fibrin-related markers for the diagnosis of overt DIC. *Clin. Appl. Thromb. Off. J. Int. Acad. Clin. Appl. Thromb.*, 18 (5), 2012, p. 495–500.

[114] Gris, J.-C. et al.: ISTH overt disseminated intravascular coagulation score in patients with septic shock: automated immunoturbidimetric soluble fibrin assay vs. D-dimer assay. *J. Thromb. Haemost. JTH*, 9 (6), 2011, p. 1252–1255.

[115] Teasdale, G., Jennett, B.: Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet Lond. Engl.*, 2 (7872), 1974, p. 81–84.

[116] Fitz-Henry, J.: *The ASA classification and peri-operative risk*. 2011.

SERMENT DE GALIEN

« Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

- D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque. »

RESUME

Le caillot de fibrine est principalement constitué d'un maillage de molécules liées entre elles, appelées monomères de fibrine (FM). Ils sont le produit de l'action de la thrombine sur le fibrinogène, et l'élévation de la concentration en FM traduit l'activation de la coagulation. Ce paramètre biologique fait partie des marqueurs de fibrine, aux côtés des D-dimères et des produits de dégradation de la fibrine (PDF). L'objectif principal de notre étude est d'évaluer la réactivité des FM par rapport à celle des D-dimères et des PDF. Nos travaux se sont portés sur une population de patients polytraumatisés, susceptibles de présenter de forts taux de FM, en réponse à l'activation de la coagulation chez ces patients. L'analyse comparative des concentrations en marqueurs de fibrine chez les patients polytraumatisés a mis en évidence une réactivité comparable des FM, des D-dimères et des PDF. De plus l'apparition de résultats faussement abaissés, sans alarme, ni explication acceptable, pointe la nécessité d'effectuer une étude de plus grande ampleur, afin de confirmer et de quantifier ces erreurs qui semblent aléatoires sur les plasmas à FM élevés.

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE :

Pharmacie (biologie médicale)

MOTS-CLES :

Monomères de fibrine, fibrinogène, fibrinof ormation, coagulopathie, traumatologie.

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :

Laboratoire d'hématologie – CHU de Bordeaux – Pellegrin – Place Amélie Raba Léon – 33000 Bordeaux

DIRECTRICE DE THESE : Docteur Geneviève FREYBURGER, PH