



Institut national
de la santé et de la recherche médicale

UNIVERSITÉ DE LILLE

ÉCOLE DOCTORALE 446 BIOLOGIE-SANTE

Année : 2022

THÈSE DE DOCTORAT D'UNIVERSITÉ

Déterminants cliniques, physiopathologiques et pronostics associés aux complications liées à l'hémostase au cours des assistances circulatoires de courte durée à pompe centrifuge

Présentée et soutenue publiquement le 02 décembre 2022 à 14 heures à la faculté de médecine de Lille, pôle formation

par **Mouhamed Djahoum MOUSSA**

Laboratoire d'accueil : INSERM UMR1011, Récepteurs Nucléaires, Maladies Métaboliques et Cardiovasculaire (Équipe 2 : Pathologies cardiaques, anomalies de flux sanguin et hémostase)

JURY

Président

Monsieur/Madame le Professeur Benoit Vallet

Rapporteurs

Monsieur le Professeur Alain Stepanian

Madame le Docteur Isabelle Gouin

Examineurs

Monsieur le Professeur Benoit Vallet

Madame la Professeure Anne Godier

Directeurs de thèse

Madame la Professeure Sophie Susen

Monsieur le Docteur Emmanuel Robin

Avertissement

**La Faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses :
celles-ci sont propres à leurs auteurs.**

Remerciements

Remerciements

A mes maîtres et juges,

Monsieur le Professeur Benoît VALLET

Directeur général de l'Agence régionale de santé Hauts-de-France

EA2694, Université de Lille.

Par vos accomplissements au service de la nation et de la communauté hospitalière, pour vos engagements auprès des anesthésistes-réanimateurs, vous êtes un exemple pour notre génération de praticien.

Pour vos enseignements depuis le début de mon internat, votre accompagnement au cours de mon clinicat, pour vos conseils avisés et votre disponibilité, recevez ici l'expression de toute ma gratitude, de mon profond respect et de mon admiration.

Madame la Professeure Sophie SUSEN

Professeure des universités — Praticienne Hospitalière,

Pôle d'Hématologie-Transfusion, CHU Lille.

Univ. Lille, INSERM, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1011—EGID, F-59000

Lille, France.

Pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe 2 de l'unité INSERM U1011.

Ces quelques années passées à observer la vie de l'unité m'ont permis d'appréhender l'énergie, le dynamisme et la pugnacité nécessaires pour porter une telle équipe et ses beaux projets.

Pour avoir accepté de co-encadrer ce travail de thèse. Recevez ici le témoignage de ma gratitude.

Madame la Professeure Anne GODIER

Professeure des universités — Praticienne Hospitalière

Service d'Anesthésie Réanimation HEGP, AP-HP, France

INSERM UMR-S1140, Innovations Thérapeutiques en Hémostase

Faculté de Pharmacie, Université Paris Descartes

Durant ces 5 longues années, votre implication et vos conseils avisés lors des différents comités de suivi de cette thèse ont permis l'aboutissement de ce travail. Je vous remercie pour votre accompagnement, pour votre disponibilité et pour l'honneur que vous me faites de juger ce travail.

Monsieur le Professeur Alain STEPANIAN

Professeur Associé - Praticien Hospitalier, Service d'Hématologie biologique.

Correspondant d'Hémovigilance et de sécurité transfusionnelle.

Hôpital Lariboisière, Paris.

Vous me faites l'honneur d'accepter d'être rapporteur et de juger ce travail de thèse, je tiens à vous témoigner ma sincère reconnaissance.

A mes juges,

Madame le Docteur Isabelle GOUIN

Maîtresse de conférences — Praticienne hospitalière

Department of Biological Hematology

Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail — IRSET, Inserm

UMR_S 1085, Univ Rennes, CHU Rennes, France.

Vous me faites l'honneur d'être rapporteur et de juger ce travail de thèse, veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance.

Monsieur le Docteur Emmanuel ROBIN

Maître de conférences — Praticien hospitalier

Pôle d'Anesthésie — Réanimation, Clinique Cardiovasculaire et Pulmonaire

Univ. Lille, INSERM, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1011 — EGID, F-59000

Lille, France. CHU Lille, Pôle d'Anesthésie-Réanimation.

Pour ces années d'enseignement et de compagnonnage, puis pour celle qui ont suivi faite d'engagement et de collaboration parfois à des heures improbables, pour tes conseils et ta disponibilité, et pour avoir permis l'aboutissement de cette thèse. Je tiens à te témoigner ici toute ma gratitude et mon profond respect.

A ma famille,

A Rahma,

Merci pour ces années de patience, de compréhension et pour ton acceptation (partielle) de ce troisième membre du couple qui s'est imposé peu à peu « La Thèse » ? Ce manuscrit sonne le glas de se « Troupe » , pour que s'épanouisse encore plus vivace notre vie à deux.

A mon Ismaël, à toi mon Elyas,

Vous me comblez de tant de fierté et de bonheur ! Du temps, cette thèse nous en aura privé ! En plus de l'amour, du réconfort et des souvenirs partagés, je vous dois de l'exemplarité. C'est aussi le sens de cette thèse.

A ma mère,

Parce que ce parcours est important pour moi, tu m'as soutenu par tes mots, ta tendresse et tes prières. À jamais, je te remercie pour tes gestes d'amour inconditionnel et pour ces valeurs que tu nous as inculqué : l'effort, la pugnacité et la quête du savoir.

A mon père,

Le souvenir de ce mois de décembre il y a 32 ans me fragmente encore l'âme. Tu es parti trop tôt, mais tu as eu le temps de m'insuffler le goût de la curiosité et l'amour du savoir. J'espère te combler de fierté par ce travail là où tu es.

A Arafat et à Talkinedi,

Vous êtes indispensable pour mon équilibre, je souffre de vous savoir si loin. Merci !

A Mounir, rien n'aurait été possible sans ton soutien, merci pour tout !

A ces belles rencontres professionnelles et aux amis d'ici et d'ailleurs !

A la Team MAR de la CCV, celle des origines et d'aujourd'hui, pour votre soutien indéfectible, pour votre joie de vivre, et pour votre professionnalisme, recevez ici l'expression de ma gratitude et de mon amitié. Nous avons encore beaucoup à construire ensemble !

A Delphine D., pour le temps passer à relire ce manuscrit, pour ton engagement et ta constance au quotidien, je t'exprime ici ma reconnaissance et mon respect.

À nos chirurgiens de l'ICP, à quelques rares exceptions que je tiens à souligner, merci pour la qualité de notre collaboration au quotidien.

A toutes et tous les Paramédicaux de l'ICP, Cardioperfusionnistes, IADE, IDE, AS, ASH, Cadres, plusieurs de ces travaux n'auraient pu aboutir sans votre aide. Tout simplement, merci.

A Delphine C. et Éric, Emmanuelle, Mickael, Madjid, Alexandre, Bénédicte, Antoine de l'équipe 2 INSERM U1011, merci pour votre accueil et votre aide durant ces 5 années.

Aux Amis Nordistes (Tutur, Jamal, Medhi, Medhi, Nico, Shérif...), à **ceux de Paname** (Joh, José, Phil, Naelle, Jehane, Astrid, Vani, Céline, Marjorie...), à **Osama, mon Jumeaux Amiénois, aux copains de Lomé** (Paul, John, Sylvestre, Karim, Ashok et les autres), ce travail vous est également dédié.

Au nos patients et à leurs familles qui ont permis l'existence de ces travaux, merci.

Table des matières

LISTE DES FIGURES	14
LISTE DES TABLEAUX	15
LISTE DES ABREVIATIONS	16
AVANT – PROPOS	18
INTRODUCTION GENERALE	20
I. CHOC CARDIOGENIQUE ET ASSISTANCES CIRCULATOIRES MECANQUES DE TYPE EXTRACORPOREAL	
MEMBRANE OXYGENATION	20
A. ASPECTS EPIDEMIOLOGIQUES.....	20
B. DESCRIPTION DES DIFFERENTS COMPOSANTS DE L’ECMO.....	22
1. <i>Canules</i>	23
2. <i>Pompes</i>	24
3. <i>Oxygénateurs</i>	31
4. <i>Revêtements de surface</i>	35
C. DIFFERENTES CONFIGURATIONS D’ECMO.....	37
1. <i>ECMO-VV versus ECMO-VA</i>	38
2. <i>Canulations centrale et périphérique</i>	40
D. INDICATIONS DE L’ECMO-VA	41
E. PRONOSTIC LIE A L’ASSISTANCE PAR ECMO-VA.....	45
II. COMPLICATIONS HEMORRAGIQUES ET THROMBOTIQUES SOUS ECMO-VA	47
A. COMPLICATIONS THROMBOTIQUES LIEES A L’ECMO-VA	47
B. COMPLICATIONS HEMORRAGIQUES LIEES A L’ECMO-VA.....	50
III. ANOMALIES DE L’HEMOSTASE SURVENANT SOUS ECMO-VA	53
A. ANOMALIES BIOLOGIQUES PROTHROMBOTIQUES SOUS ECMO-VA	54
1. <i>Activation de la coagulation</i>	54
a) Effraction vasculaire et activation de l’hémostase primaire et de la coagulation	54
b) Réaction inflammatoire aseptique, facteur tissulaire et NETose.....	57
c) Activation de la voie du facteur XII.....	60
2. <i>Activation plaquettaire dépendante des conditions de flux</i>	64
3. <i>Impact de l’hémolyse sur l’activation plaquettaire flux-dépendante</i>	64
4. <i>Génération des anticorps anti-facteur 4 plaquettaire et conséquences cliniques</i>	65
5. <i>Production de microparticules plaquettaires sous ECMO-VA</i>	66
B. ANOMALIES BIOLOGIQUES PRO-HEMORRAGIQUES SOUS ECMO — VA.....	68
1. <i>Syndrome de von Willebrand acquis</i>	68
2. <i>Thrombopénie sous ECMO-VA</i>	73
3. <i>Thrombopathie sous ECMO-VA</i>	74
4. <i>Anémie sous ECMO-VA</i>	75
5. <i>Hypofibrinogénémie sous ECMO-VA</i>	76
6. <i>Tissue Factor Pathway Inhibitor et ECMO-VA</i>	77
7. <i>Coagulation intravasculaire disséminée</i>	78
IV. THERAPEUTIQUES ANTITHROMBOTIQUES UTILISEES SOUS ECMO-VA	78
A. L’HEPARINE NON FRACTIONNEE.....	78
B. LA BIVALURIDINE.....	79
C. L’ARGATROBAN	80
OBJECTIFS DE LA THESE	81
TRAVAUX DE L’AXE THROMBOSE	84

I. MANUSCRIT 1: THROMBUS FORMATION DURING ECMO : INSIGHTS FROM A DETAILED HISTOLOGICAL ANALYSIS OF THROMBUS COMPOSITION²⁰⁹	84
A. RESUME DU MANUSCRIT 1	85
B. MANUSCRIT INTEGRAL (PUBLIE)	88
II. MANUSCRIT 2 : HEPARIN VERSUS PHOSPHORYLCLOLIN SURFACE COATINGS AND OUTCOMES DURING VENO-ARTERIAL ECMO SUPPORT: A PROPENSITY WEIGHTED MULTICENTER CLINICAL STUDY AND AN HISTOLOGICAL ANALYSIS	100
A. RESUME DU MANUSCRIT 2	101
B. MANUSCRIT INTEGRAL (EN REVISION)	104
III. SYNTHESE DE L'AXE THROMBOSE	151
TRAVAUX DE L'AXE HEMORRAGIE	153
I. MANUSCRIT 3 : COMPARISON OF MAJOR BLEEDING DEFINITIONS FOR THE PREDICTION OF 28-MORTALITY DURING PERIPHERAL VENO-ARTERIAL ECMO SUPPORT	153
A. RESUME DU MANUSCRIT 3	154
B. MANUSCRIT INTEGRAL (EN REVISION)	157
DISCUSSION GENERALE	202
CONCLUSIONS	219
PERSPECTIVES	220
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	222
ANNEXES	246
I. ILLUSTRATION DES PERFORMANCES D'ECHANGE ET DE RESISTANCE A L'ECOULEMENT D'UN OXYGENATEUR : EXEMPLE DE L'OXYGENATEUR NAUTILUS (MEDTRONIC)	247
II. PUBLICATION EN RAPPORT AVEC LA THÉMATIQUE DE LA THÈSE : EVALUATION OF ANTI-ACTIVATED FACTOR X ACTIVITY AND ACTIVATED PARTIAL THROMBOPLASTIN TIME RELATIONS AND THEIR ASSOCIATION WITH BLEEDING AND THROMBOSIS DURING VENO-ARTERIAL ECMO SUPPORT: A RETROSPECTIVE STUDY	248
A. RESUME	249
B. MANUSCRIT INTEGRAL (PUBLIÉ)	252
RESUME GENERAL	267
I. RESUME EN FRANÇAIS	267
II. ABSTRACT	270

Liste des figures

FIGURE 1. ÉVOLUTION DU NOMBRE DE CENTRES IMPLANTEURS PARTICIPANTS ET DE SESSIONS D'ECMO DEPUIS 1990. D'APRES LE REGISTRE ELSO ¹⁴	21
FIGURE 2. DESCRIPTION D'UN CIRCUIT D'ECMO VEINO-ARTERIEL PERIPHERIQUE.	23
FIGURE 3. DESCRIPTION D'UNE TETE DE POMPE. ADAPTE D'UNE TETE DE POMPE REVOLUTION DE LA MARQUE LIVANOVA.....	24
FIGURE 4. PROFILS DE VITESSES GENEREES PAR DIFFERENTS TYPES DE POMPES DONT DEUX POMPES CENTRIFUGES (CENTVAD1 ET CENTVAD2). D'APRES FRASER K. ET AL. ³¹	28
FIGURE 5. NIVEAUX DE CONTRAINTES DE FLUX GENERES PAR 5 TYPES DE POMPES DONT DEUX POMPES CENTRIFUGES (CENTVAD1 ET CENTVAD2). D'APRES FRASER K. ET AL. ³¹	29
FIGURE 6. OXYGENATEURS CYLINDRIQUES ET QUADRANGULAIRES, RESPECTIVEMENT AL. ONE ECMO (EUROSET) ET QUADROX (MAQUET).....	31
FIGURE 7. CLASSIFICATION DE LA SEVERITE DU CHOC CARDIOGENIQUE D'APRES LE CONSENSUS D'EXPERT DE LA SOCIETY FOR CARDIOVASCULAR ANGIOGRAPHY AND INTERVENTIONS ⁶¹⁶¹	44
FIGURE 8. PROBABILITE DE SURVIE DES PATIENTS ASSISTES PAR ECMO EN FONCTION DE LA CLASSIFICATION SCAI D'APRES METHA ET AL. ⁷⁵	46
FIGURE 9. DESCRIPTION DES PRINCIPAUX RECEPTEURS PLAQUETTAIRE ET DE LEURS LIGANDS. D'APRES SANG ET AL. ⁹⁴	55
FIGURE 10. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DECRIVANT DES POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES AU REPOS (A) AVEC UNE STRUCTURE SPHERIQUE HOMOGENE TYPIQUE ET APRES ACTIVATIONS (B).	59
FIGURE 11. INTERACTION ENTRE DAMPS/PAMS, NETOSE, LIBERATION DE FACTEUR TISSULAIRE MONOCYTAIRE ET LA GENERATION DE THROMBINE. D'APRES T. ITO ¹²³	60
FIGURE 12. STRUCTURE DE DOMAINE DE FXII ET FXIIA D'APRES NAUDIN ET AL. ¹²⁴	61
FIGURE 13. ACTIVATION DE LA VOIE INTRINSEQUE DE LA COAGULATION ET DE L'INFLAMMATION FACTEUR XII-DEPENDANTES. ¹²⁴	63
FIGURE 14. DESCRIPTION DES DIFFERENTS DOMAINES DU VWF D'APRES ZHOU ET AL. ¹⁴⁶	70
FIGURE 15. DESCRIPTION SCHEMATIQUE DU CLIVAGE DES MULTIMERES DE HAUT POIDS MOLECULAIRE DE LA PROTEINE DE VWF SOUS ASSISTANCE CIRCULATOIRE.	72

Liste des tableaux

TABLEAU 1. DESCRIPTION DES CARACTERISTIQUES DES PRINCIPALES TETES DE POMPE UTILISEES DANS LES SYSTEMES ECMO EN ROUTINE CLINIQUE.....	30
TABLEAU 2. DESCRIPTION DES CARACTERISTIQUES PRINCIPAUX OXYGENATEURS ADULTES ET PEDIATRIQUES UTILISES EN ROUTINE CLINIQUE.....	34
TABLEAU 3. STRATIFICATION DE LA GRAVITE DU CHOC CARDIOGENIQUE D'APRES LA CLASSIFICATION INTERMACS (INTERAGENCY REGISTRY FOR MECHANICALLY ASSISTED CIRCULATORY SUPPORT) D'APRES L'EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY ¹	43
TABLEAU 4 SYNTHESSES DES APPORTS DU TRAVAIL DE THESE POUR LA PRATIQUE CLINIQUE.....	217

Liste des abréviations

ADAMTS-13	A Disintegrin And Metalloprotease with Thrombospondin Type I Repeats-13
ADP	Adenosine Diphosphate
Anti-FXa	Activité Anti-Facteur X Activé
ATP	Adénosine TriPhosphate
AVWS	Acquired Von Willebrand Syndrome/Syndrome de Von Willebrand Acquis
CO₂	Dioxyde de Carbone
CRP	C-Reactive Protein
DAMP	Damage Associated Molecular Pattern
DO₂	Délivrance en Oxygène
ECLS	Extracorporeal Life Support
ECMO	Extracorporeal Membrane Oxygenation
ELSO	Extracorporeal Life Support Organization
EO₂	Extraction en Oxygène
GP	Glycoprotéine
HA	Héparine-Albumine
HR	Hazard Ratio
IABP/BCPIA	Intraaortic Balloon Pumping/ Ballon de ContrePulsion Intra Aortique
IGS II	Indice de Gravité Simplifié
KD	Kilo Dalton
LDH	Lactate Deshydrogénase
LVAD	Left Ventricle Assist Device/ Dispositif d'Assistance Ventriculaire Gauche
NETs	Neutrophile Extracellular Traps
PAMPs	Pathogen Associated Molecular Patterns
PPC	Phosphorylcholine
PRR	Pattern Recognition Receptor
OR	Odd ratio
O₂	Oxygène
SIRS	Syndrome de Réponse Inflammatoire et Systémique
TCA	Temps de Cephaline Activé
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor

TIH	Thrombopénie Induite à l'Héparine
TLR	Tool Like Receptor
TP	Temps de Prothrombine
VAD	Ventriple Assist Devices/ Dispositif d'Assistance Ventriculaire
VO₂	Consommation en Oxygène
VWF	Facteur Von Willebrand
VWF : Ag	Von Willebrand : Antigène
VWF : CB	Von Willebrand : Activité Collagen Binding
VWF : CO	Von Willebrand : Activité Cofacteur de la Ristocetin

Avant – propos

La réponse thérapeutique actuelle au choc cardiogénique réfractaire repose sur l'assistance circulatoire mécanique de courte durée.

Depuis l'échec de l'utilisation du ballon de contre-pulsion intra-aortique dans cette indication dans l'étude randomisée contrôlée IABP Shock II,¹⁻³ la technique d'assistance circulatoire de courte durée de référence pour la prise en charge du choc cardiogénique réfractaire est l'« extracorporeal membrane oxygenation » (ECMO) ou « extracorporeal life support » (ECLS) veino-artérielle (VA).^{4,5} L'objectif de cette technique est de permettre un support hémodynamique en attendant une récupération éventuelle du cœur défaillant, de permettre un relais vers une assistance de longue durée ou vers une transplantation cardiaque en fonction des critères d'éligibilités. Le choc cardiogénique réfractaire assisté reste cependant associé à un pronostic sombre. Le taux de mortalité à 30 jours des patients adultes sous support circulatoire par ECMO est en effet de l'ordre de 45 à 80 % en fonction de l'étiologie de l'état de choc.⁵ C'est le reflet d'une morbidité extrêmement marquée, faite de défaillances d'organes, de complications secondaires liées à la gravité initiale du patient et également de complications spécifiques liées à l'ECMO-VA dont l'impact sur la mortalité est non négligeable.

Parmi les complications spécifiques à l'assistance circulatoire, les complications hémorragiques et thrombotiques sont particulièrement fréquentes et sont des déterminants pronostiques majeurs. La caractérisation physiopathologique et clinique de ces complications liées à l'hémostase reste encore très parcellaire. Il en résulte un vaste champ d'investigation scientifique d'intérêt croissant dans la littérature. Notre travail de recherche portera sur certaines facettes de ces problématiques.

La suite du manuscrit reviendra sur le contexte nosologique globale qu'est le choc cardiogénique, les spécificités de l'assistance circulatoire de type ECMO-VA et son interaction avec l'hémostase. Enfin nous aborderons nos questions de recherche centrée sur cette dualité de complications opposées, puis nous présenterons les avancées et leurs valorisations scientifiques obtenues.

Introduction générale

I. Choc cardiogénique et assistances circulatoires mécaniques de type extracorporel membrane oxygenation

A. Aspects épidémiologiques

Si l'incidence du choc cardiogénique toutes gravités confondues reste stable depuis ces dix dernières années en France et dans le monde, le recours à l'assistance par ECMO-VA connaît lui un essor quasi exponentiel^{6,7} durant la même période.

L'incidence du choc cardiogénique est évaluée à 60 000 à 70 000 cas par an en Europe, avec pour principale étiologie l'infarctus du myocarde, même si celle-ci tend à reculer du fait des progrès de la revascularisation coronaire et des stratégies de prise en charge connexes.⁸

La prévalence du choc cardiogénique est de 2 à 5 % des admissions hospitalières en fonction des définitions utilisées, et de 14 à 16 % des causes d'admissions dans les unités de soins intensifs⁹. Dans le registre français FAST-MI qui a inclus 10 000 patients consécutifs victimes d'infarctus du myocarde (IDM) sur 10 ans, le pourcentage de patients qui évolue vers un choc cardiogénique à la suite d'un IDM a baissé de 5,9 % en 2005 à 2,8 %, en 2015.¹⁰

La mortalité liée au choc cardiogénique est restée stable autour de 40-50 % durant cette période. Ces évolutions sont proches de celles observées aux états unis et au Canada.

En réponse à cette stagnation de la mortalité, plusieurs approches sont évaluées. Le recours à l'ECMO-VA qui connaît une nette accélération au cours de la dernière décennie participe à cette réponse.^{6,7,11,12}

En considérant les patients adultes assistés par ECMO-VA sur les 5 dernières années (analyse datée du 02/10/2021) dans le registre international ELSO, 26 492 patients dans le monde et 3518 patients en Europe ont été assistés pour choc cardiogénique.¹³ Sur l'ensemble des 30

années d'inclusion dans ce registre (fondé en septembre 1989), 35 797 patients à l'échelle globale et 4953 patients européens ont été inclus. L'observation est similaire lorsque l'on s'intéresse à la seconde cause de recours à L'ECMO-VA qu'est l'arrêt cardiaque extrahospitalier. En effet, 8 317 patients dans le monde et 1786 en Europe ont été assistés pour un arrêt cardiaque extrahospitalier ces 5 dernières années alors que 11 224 et 2395 patients l'avaient été sur toute la période d'inclusion depuis l'année 1990.¹³ Ces chiffres traduisent une nette augmentation par rapport aux années précédentes telle qu'exprimée par la Figure 1.

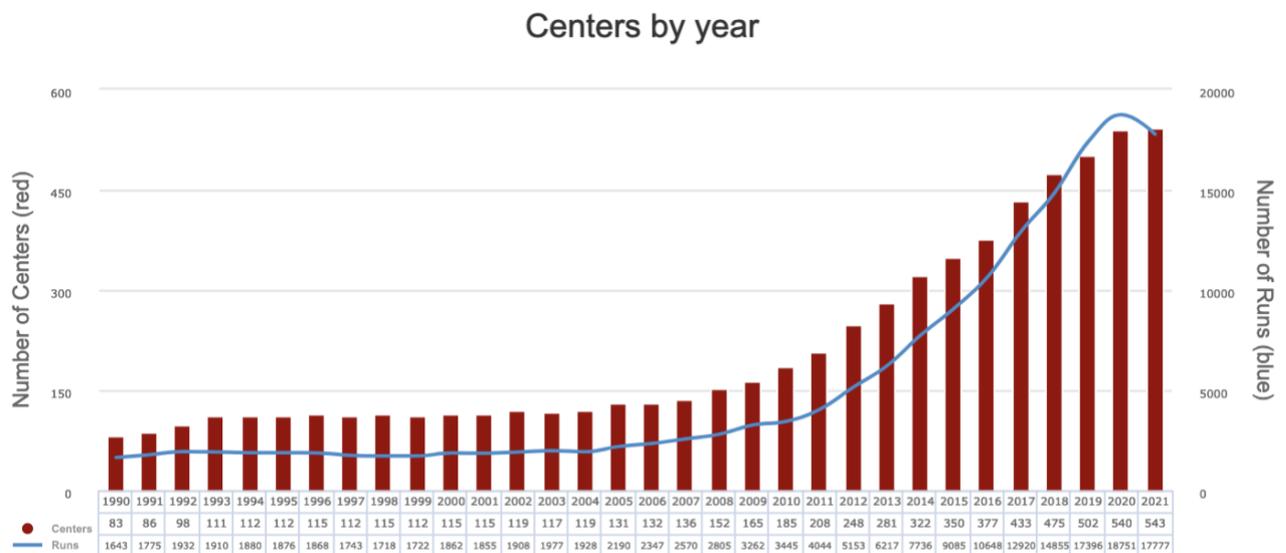


Figure 1. Évolution du nombre de centres implanteurs participants et de sessions d'ECMO depuis 1990. D'après le registre ELSO¹⁴

Ces évolutions sont liées à la fois à des améliorations techniques des systèmes ECMO, aux évolutions structurelles des unités de prise en charge de choc cardiogénique et aux recommandations des sociétés savantes qui positionnent dorénavant l'ECMO comme assistance de recours en remplacement du ballon de contre pulsion aortique (BCPIA ou IABP pour intra-aortic balloon pumping pour les Anglo-saxons) dans le choc cardiogénique post ischémique.^{4,15-17}

En effet les performances du BCPIA, dispositif qui délivre un débit supplémentaire de l'ordre de 0,5 à 1 L/min et une baisse de la postcharge ventriculaire gauche, se sont révélées insuffisantes pour améliorer la mortalité à court terme^{1,2} ou à long terme (6 ans)³ au cours des chocs cardiogéniques post-ischémiques dans les différentes analyses de l'étude IABP-SHOCK II. Ces résultats ont été confirmés par une méta-analyse récente qui colligeait 12 études randomisées contrôlées et 15 registres.¹⁸

Les alternatives à l'ECMO dont le premier chef de file et le plus mature est l'Impella® restent sous-utilisées du fait de leurs coûts élevés, de l'absence de possibilité d'oxygénation, du caractère monogauche de l'assistance et d'un niveau d'assistance limité à un support maximal théorique de 5 L/min.^{17,19,20}

B. Description des différents composants de l'ECMO

Chaque système d'ECMO est constitué de plusieurs éléments dont chacun a une fonction spécifique, organisés en série le long d'un circuit dont les deux extrémités sont branchées en parallèle sur le système circulatoire des patients assistés (Figure 2).

Un circuit complet dans sa version la plus simple comprend une canule d'admission sanguine ou canule veineuse implantée dans le système cave, un circuit fermé qui conduit à une canule d'éjection ou canule artérielle positionnée dans un gros tronc artériel en général l'artère fémorale ou axillaire pour l'ECMO-VA périphérique droite-gauche. Le circuit ainsi formé est interrompu de façon séquentielle par une pompe qui génère une dépression dans le système cave générant ainsi une aspiration du sang qu'elle propulse vers un oxygénateur avant de cheminer vers la canule éjection.

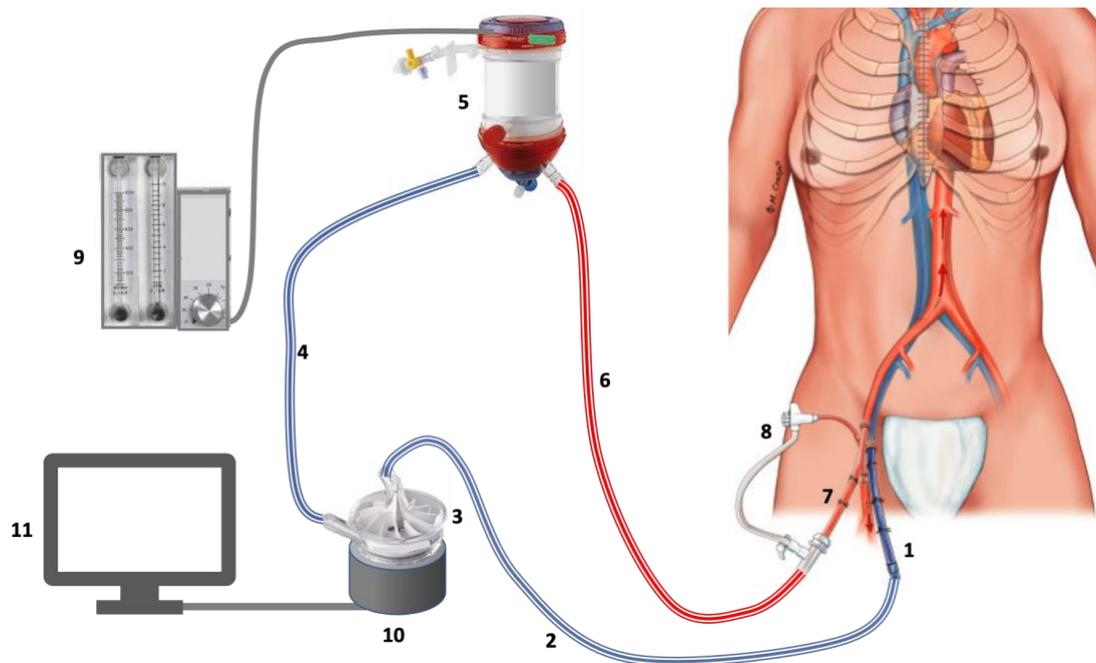


Figure 2. Description d'un circuit d'ECMO veino-artériel périphérique.

1=canule veineuse, 2=ligne veineuse, 3=tête de pompe, 4=ligne veineuse en pression positive, 5=oxygénateur, 6=ligne artérielle, 7=Canule artérielle, 8=cathéter de reperfusion fémorale, 9=régulateur de débit d'air et d'oxygène, 10= moteur, 11=moniteur. Figure anatomique adaptée d'après Larusso et al.²¹

1. Canules

Dans la configuration la plus commune, les canules modernes sont généralement dessinées pour être implantées spécifiquement dans une veine ou dans une artère. Les sections et les longueurs des canules veineuses sont de calibres bien supérieurs à celle des canules artérielles.

De façon spécifique, des canules à doubles lumières destinées à l'ECMO OD/VD artère pulmonaire ont récemment été mise sur le marché (PROTEKDuo Cannula).²²

Les canules sont généralement armées par une armature métallique fine intégrée et nécessitent une connectique pour être liées au tube reliant les différents composants du circuit.

Le tube reliant les différents composants est généralement en chlorure de polyvinyle.

2. Pompes

Les premières expériences d'assistance circulatoire de type ECMO reposaient sur les pompes péristaltiques du fait de la disponibilité de ce type de pompe, de leurs coûts raisonnables et de l'immatunité des technologies des pompes centrifuges destinées aux soins.

Ces pompes péristaltiques posent plusieurs problèmes de sécurité dont le plus prégnant est le risque de rupture du fait de leur totale indépendance des conditions de charge. Elles sont également à risque d'hémolyse accrue en cas d'utilisation prolongée et plus généralement de traumatisme des éléments figurés du sang. Pour ces raisons et du fait des améliorations technologiques des pompes centrifuges, les pompes péristaltiques ont été progressivement abandonnées dans les circuits modernes d'ECMO au profit des pompes centrifuges.

Les pompes centrifuges utilisées dans les circuits d'ECMO sont des pompes rotatives composées d'un boîtier statique ou corps de pompe comprenant un tube connecteur (ou « port ») d'entrée d'axe perpendiculaire à un tube connecteur de sortie, les deux étant séparés par un boîtier hermétique appelé volute (Figure 3). Cet ensemble contient un élément mobile nommé le rotor, lui-même composé d'un impulseur ou roue (monté de plusieurs pales) et d'une tige de rotation dans la plupart des cas. Cette tige de rotation est inexistante dans le cas de certaines pompes utilisant une technologie de sustentation magnétique plus récente utilisant un rotor flottant (Centrimag, Thratec).



Figure 3. Description d'une tête de pompe. Adapté d'une tête de pompe Revolution de la marque Livanova.

Le sang issu du secteur veineux remplit la volute en entrant par le tube connecteur d'entrée dans un trajet perpendiculaire à l'axe du tube connecteur de sortie. Il est alors accéléré radialement par la rotation de l'impulseur qui lui délivre une énergie cinétique, puis est refoulé radialement vers l'oxygénateur par le tube connecteur de sortie.

Par ailleurs cette architecture induit inévitablement un contact entre le sang et les différents composants de l'impulseur (palles, tiges, roue) qui peuvent générer des frottements, des anomalies de flux qui sont à l'origine de contraintes de flux supra physiologiques, phénomène qui ont des conséquences directes sur l'homéostasie sanguine. L'intensité de ces contraintes de flux générées dépend en partie du nombre de tours/min prescrit et par conséquent des différents déterminants du débit de pompe.

Le débit continu issu de la tête de pompe est en effet modulé par les différents composants du circuit d'ECMO et par le système cardiovasculaire du patient. La relation entre rotation et débit sanguin est définie par la loi des similitudes. Ainsi le débit de pompe, les pressions générées et leurs variations de part et d'autre du circuit (notion de pertes de charge) sont liés par les relations mathématiques suivantes :

$$Q = W \times D^3 \quad \text{où}$$

Q = débit volumique de la pompe (l/min), D= diamètre de l'impulseur (m), W=vitesse de rotation imprimée (RPM) (tr/min)

De façon simplifiée, les principales caractéristiques des pompes centrifuges utilisées en routine sont : (1) un débit continu généré par la pompe, proportionnel à la révolution par minute (RPM) de l'impulseur. (2) un débit dépendant des conditions de charge existantes sur le circuit, en amont et en aval de celui-ci *i.e.* dans le système circulatoire du patient. Cela se traduit par une baisse du débit lorsque la précharge diminue ou lorsque la précharge augmente et inversement. (3) Les autres particularités de ces pompes à prendre en considération sont leurs incapacités à s'autoamorcer et (4) la possibilité de générer un flux inverse (backflow)

lorsque la postcharge est supérieure à la pression générée dans le circuit ECMO en réponse au RPM imprimé. Selon le théorème de Bernoulli, la relation entre de débit (Q) et la puissance hydraulique P peut s'écrire :

$$P = \rho g Q h$$

Où

ρ = masse volumique du fluide (kg/m^3), g =accélération de la pesanteur ($9,81 \text{ m/s}^2$), Q = débit volumique du fluide, h =hauteur manométrique.

Les pompes centrifuges disponibles sur le marché sont ainsi définies par leurs performances hydrauliques grâce à leurs courbes caractéristiques établies in vitro, mais également aux techniques développées pour réduire leurs impacts sur les différents composants du sang circulant. Plusieurs différences techniques existent entre les modèles actuellement disponibles sur le marché sans que la démonstration de la supériorité de l'une par rapport aux autres n'ait été apportée pour des critères d'évaluations en clinique humaine.

Un nombre croissant de travaux comparatifs portant sur les performances mécaniques de ces pompes est publié depuis quelques années. Il en ressort que chacune des pompes revêt des caractéristiques mécaniques propres qui peuvent se traduire par des conséquences biologiques spécifiques. Ainsi, dans un travail expérimental sur banc avec un amorçage du circuit par un mélange de cristalloïdes et de culots globulaires érythrocytaires, la pompe Rotaflow (Maquet) développait un débit maximal et une pression de coupure plus élevés que celle de la pompe Centrimag (Abbott Cardiovascular).²³ Malgré cette différence, le niveau d'hémolyse observé était équivalent, observation corroborée par un autre travail similaire.²⁴ Dans une autre étude, les auteurs avaient rapportés des différences marquées en comparant en plus des courbes caractéristiques, l'importance de la chaleur générée par trois pompes utilisées en routine (la Biomedicus Bio-Pump BP80 (Medtronic), la Rotaflow (Maquet), et le

DeltaStream™ DP2 (MEDOS Medizintechnik AQ).²⁵ Des résultats similaires sont suggérés par des travaux de mécanique des fluides numériques (computational fluids dynamics).²⁶⁻³⁰

Ces différences de performances mécaniques sont rarement disponibles en routine et peu considérées par les cliniciens.

Une étude menée par Fraser K. et *al.* publiée en 2012 apportait un éclairage nouveau sur l'importance des contraintes de flux, des profils de vitesses générées, des temps de transit et de l'hémolyse associés aux pompes d'assistances circulatoires mécaniques. Trois pompes axiales et deux pompes centrifuges différentes étaient étudiées à cet effet. Les résultats montrent des profils de vitesses très variables (Figure 4) et des niveaux de contraintes de flux au-delà des observations physiologiques (Figure 5). Les contraintes de flux étaient plus importantes dans les pompes axiales que dans les pompes centrifuges. Des différences significatives étaient également observées entre les deux pompes centrifuges étudiées.³¹

À l'aune des connaissances actuelles qui suggèrent une participation importante des contraintes de flux excessives sur l'hémostase au cours de ces assistances circulatoires mécaniques, une attention particulière devrait être portée aux performances mécaniques des pompes utilisées.

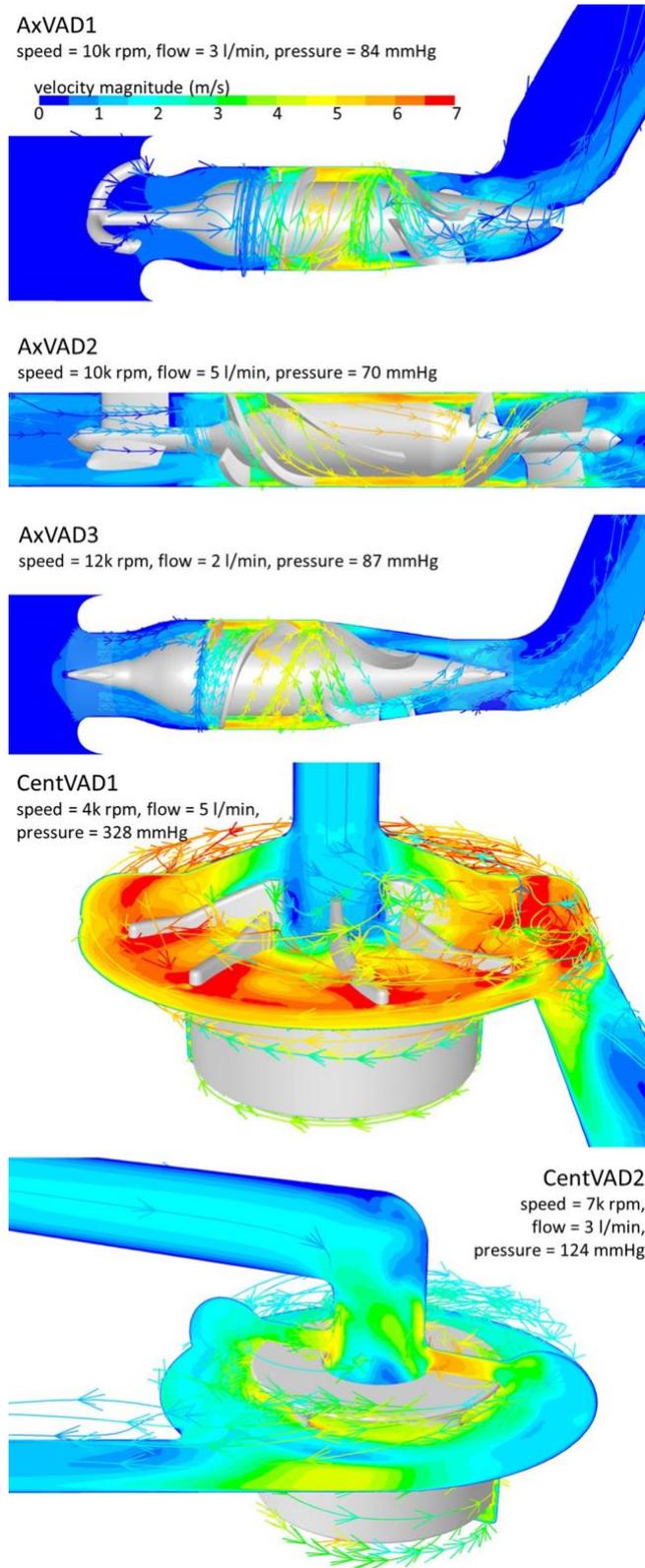


Figure 4. Profils de vitesses générées par différents types de pompes dont deux pompes centrifuges (CentVAD1 et CentVAD2). D'après Fraser K. et al.³¹

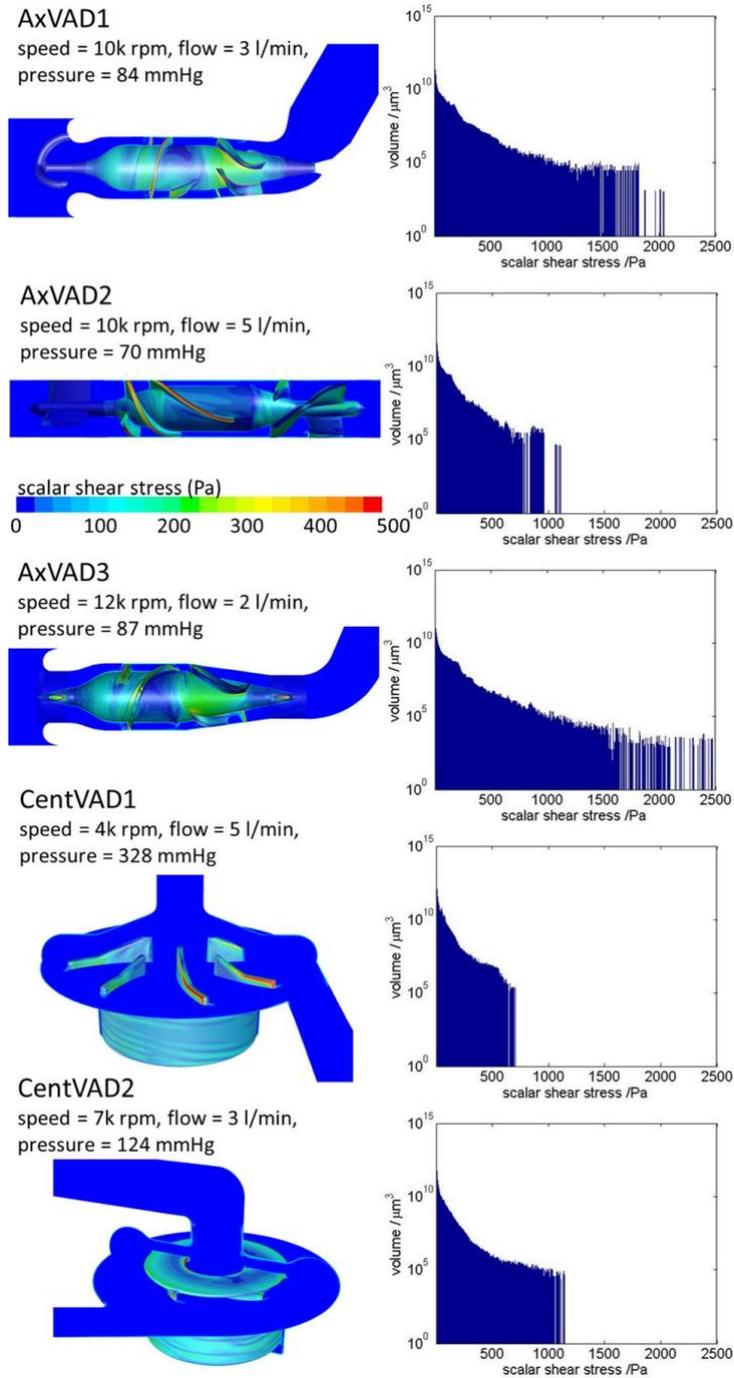


Figure 5. Niveaux de contraintes de flux générés par 5 types de pompes dont deux pompes centrifuges (CentVAD1 et CentVAD2). D'après Fraser K. et *al.*³¹

Tableau 1. Description des caractéristiques des principales têtes de pompe utilisées dans les systèmes ECMO en routine clinique.

	BPX-80 Bio Pump™	Rotaflow RF-32	Revolution	DeltaStream DP3	Cardiohelp HLS	Centrimag	ECMOLIFE
Fabricants	Medtronic ®	Gentige Group	LivaNova®	Xenios AG	Gentige Group	Abbott® cardiovascular	Euroset®
Technologie	Centrifuge	Centrifuge	Centrifuge	Diagonale	Centrifuge	Centrifuge	Centrifuge
Volume volute, mL	80	32	57	16		32	39
RPM maximal, tour/min	4500	5000	3500	10 000	5000	5500	5000
Débit maximal, L/min	9,9	9,9	8,0	2,4 8,0	5 (HLS 5.0) 7 (HLS 7.0)	9,9	10
Particularités	Sustentation magnétique	Sustentation magnétique	Sustentation magnétique	Pompe intégrée	Sustentation magnétique	Sustentation magnétique	Sustentation magnétique
Tige de rotation	1	1	2	1	1	Aucune	Aucune
Revêtement de surface	Cortiva bioactive surface/Trillium® Héparine- PEO /sulphate/sulfonate	Bioline®* Héparine- albumine	P.H.I.S.I.O® coating Phosphorylcholine	Rheoparin Héparine	Bioline®* Héparine- albumine	–	AGILE™ Phosphorylcholine
Durée du circuit, jour	–	14	5	–	30	–	14
Taille des ports,’’	3/8’’ - 3/8’’	3/8’’ - 3/8’’	3/8’’ - 3/8’’	3/8’’ - 3/8’’*	3/8’’ - 3/8’’	3/8’’ - 3/8’’	3/8’’ - 3/8’’

*Alternative sans héparine Softline (durée de circuit de 5 jours) ; Gentige Group anciennement Maquet® ; Abbott cardiovascular anciennement Thoratec® ; 3/8’’ (9,5 mm). ** Existe en 1/4’’-1/4’’(6,4 mm). POE=Oxyde de polyéthylène

3. Oxygénateurs

En plus de la production d'un débit sanguin, l'ECMO a une fonction d'échangeur de gaz. Cette fonction d'échangeur consiste en une oxygénation et une décarboxylation continue du sang grâce à un échangeur appelé oxygénateur.



Figure 6. Oxygénateurs cylindriques et quadrangulaires, respectivement AL ONE ECMO (Euroset) et Quadrox (Maquet)

Les oxygénateurs modernes sont faits de milliers de fibres capillaires creuses et microporeuses, généralement fait en polyméthylpentène organisées soit sous formes cylindrique ou quadrangulaire. D'un point de vue architectural, les capillaires sont tressés pour former des feuilles puis ces dernières sont ensuite entrecroisées sur plusieurs épaisseurs afin de démultiplier les surfaces d'échange et les performances d'échanges. Cette organisation détermine deux secteurs d'écoulement des fluides, une phase gazeuse et une phase sanguine qui sont séparés par les parois des capillaires microporeuses. La phase gazeuse correspond à la lumière des capillaires de polyméthylpentène ou les gaz échangés circulent librement sans jamais être directement en contact le sang circulant. La phase sanguine correspond à l'environnement autour des

capillaires microporeux. Cette organisation prend en comptes les différences de viscosités entre les deux fluides et leurs conséquences en termes d'écoulement. L'écoulement d'un fluide non newtonien à viscosité relativement élevée comme le sang, au sein d'un capillaire, entraînerait des contraintes de flux supra physiologiques à haute vitesse (jusqu'à 9,9 L/min) et serait associé à une perte de charge excessive. En conséquence l'intensité du support circulatoire délivré serait amoindrie. À l'inverse lorsque l'on considère des fluides non newtoniens, typiquement le débit de gaz circulant dans les lumières capillaires de l'oxygénateur et diffusant au travers de sa paroi, l'impact sur la rhéologie sanguine et les contraintes de flux est théoriquement plus limité. Cette observation est corroborée expérimentalement puis modélisée par plusieurs auteurs, dont Wickramasinghe et al.³² Quant aux capacités diffusives des gaz échangés de part et d'autre de la membrane des capillaires, plusieurs variables sont à considérer. Parmi celles-ci notons le gradient de concentration, mais également les interactions chimiques entre les gaz échangés et les molécules des parois capillaires, le phénomène de mouillage de cette paroi, la perte de charge et enfin les variations de flux au sein de l'oxygénateur.³³ De façon plus triviale, le risque associé à une réduction de la lumière capillaire de faible section par les dépôts fibrineux ou de sa thrombose serait plus important en cas d'écoulement de sang.

Par ailleurs, il est essentiel de comprendre que l'oxygénateur représente une zone de résistance à l'écoulement qui induit non seulement une perte de charge, mais également un régime d'écoulement qui peut être turbulent avec des conséquences en termes de bio-traumatisme du sang circulant. Peu d'études ont comparé les nouveaux oxygénateurs de polyméthylpentènes à ce jour. Concernant les membranes en polypropylène utilisées lors des circulations extracorporelles (CEC) pour chirurgie cardiaque, plusieurs comparaisons existent dans la littérature sans qu'aucune différence flagrante en termes de pertes de charge, d'hémolyse ou de transfert en oxygène et en dioxyde de carbone ne soit mise en

évidence.^{37,34,35} Ces résultats ne sont pour autant pas totalement transposables aux oxygénateurs utilisés pour l'ECMO du fait de l'utilisation prédominante de polyméthylpentène, de différence dans l'architecture des oxygénateurs et enfin des différences de durée d'utilisation attendue.

Les performances des différents oxygénateurs disponibles sur le marché sont analysées en prenant en compte leur capacité de transfert de l'oxygène, et d'épuration du CO₂, d'échange thermique et de la perte de charge qu'ils induisent en fonction du débit pompe. À titre d'exemple, les performances détaillées des quelques oxygénateurs utilisés en routine clinique sont présentées à l'Annexe 1. Le Tableau 2 ci-dessous expose quelques exemples d'oxygénateurs utilisés en routine en France, leurs fabricants, leurs caractéristiques et leurs performances.

Tableau 2. Description des caractéristiques des principaux oxygénateurs adultes et pédiatriques utilisés en routine clinique

	Quadrox PLS	HLS Module advanced 5.0/7.0	EOS ECMO	Nautilus	Hilite 7000 LT	A.L. ONE ECMO
Fabriquant	Maquet®	Maquet®	LivaNova®	Medtronic	Medos®	Euroset®
Type	Quadrangulaire	Quadrangulaire	Cylindrique	Cylindrique	Cylindrique	Cylindrique
Matériaux	PMP	PMP	PMP	PMP	PMP	PMP
Surface Gaz, m²	1,8	1,3/1,8	1,2	1,8	1,9	1,81/1,35
Surface T°, m²	0,6	0,3 /0,4	0,14	0,3	0,45	0,08/0,08
Volume statique, ml	250	240 /273	150	226	320	225/190 :
Durée de vie, jours	14	30 (5 *)	14	2**		14
Admission/sortie, Fr	3/8-3/8	3/8-3/8	3/8-3/8	3/8-3/8	3/8-3/8	3/8-3/8
Revêtement de surface	Bioline®	Bioline®/Softline®*	P.H.I.S.I.O®	Balance™ Biosurface	Rheoparin/ uncoated	AGILE™
	Héparine	Héparine/Albumine	Phosphorylcholine	NA	Héparine	Phosphorylcholine
Particularités		SvO ₂ , Hb, Ht, T°, Pressions.		SvO ₂ , Hb, T°, SaO ₂ , pressions		SvO ₂ , Hb, T°, SaO ₂ , pressions, VCO ₂ , VCO ₂ '.

Surface Gaz, surface d'échange gazeux ; Surface T°, surface d'échange thermique ; * version avec revêtement de surface non hépariné (Softline) ; ** données autorisation aux états unis ; Hb, hémoglobine ; Ht, hématocrite ; T°, température.

4. Revêtements de surface

Le contact entre le sang et les surfaces inertes du circuit d'ECMO est à l'origine de l'activation de la coagulation via la voie du facteur XII ou voie contact. Cette activation de la coagulation que nous détaillerons plus loin dans le manuscrit justifie l'utilisation d'une anticoagulation systématique sous ECMO-VA. Afin de limiter son intensité et donc de réduire les besoins en anticoagulants tout en prévenant le risque de complications thrombotiques, des revêtements de surfaces ont été développés par les fabricants de circuits d'ECMO. Leur principal objectif est l'amélioration de la biocompatibilité de surfaces en contact avec le sang par la limitation de thrombinoformation et de l'inflammation dépendant de la voie du facteur XII.

Plusieurs revêtements de surface ont été développés dans cet objectif. Ils utilisent des composants primaires que sont les polysaccharides comme l'héparine, l'albumine, le polyéthylène-glycol, la phosphorylcholine, ou encore le poly (2-méthoxyéthyl acrylate).³⁶ Les revêtements technologiquement matures actuellement en usage en clinique humaine sont présentés dans les Tableaux 1 et 2. Les deux technologies les plus utilisées sont les revêtements à base polysaccharidique essentiellement des dérivés d'héparine, et ceux basés sur l'utilisation de phospholipides membranaires dont la plus répandue est la phosphorylcholine.

Les revêtements à base d'héparine sont actifs du fait de leur richesse en charge négative. Ils exposent cependant à un risque de thrombopénie induite à l'héparine. À l'inverse, l'action de la phosphorylcholine est biochimiquement passive.³⁷

Les techniques de fixation physicochimique des fragments polysaccharidiques et de phosphorylcholine sur les surfaces inertes de l'ECMO varient en fonctions des fabricants et sont en général protégées par le secret industriel. Au-delà du risque évident qu'apporte cette technologie en ce qui concerne la thrombopénie induite à l'héparine, la comparaison formelle

de ces deux technologies de revêtement de surface sur la biocompatibilité et leurs conséquences cliniques n'existe pas à ce jour dans la population de patients assistés par ECMO.

Les résultats disponibles concernant l'efficacité et la tolérance des différentes méthodes de revêtements de surfaces sont une fois encore issus de travaux réalisés au bloc opératoire sur circuits de CEC. Il est essentiel de garder à l'esprit que ces comparaisons ne reflètent que très partiellement l'impact potentiel de ces revêtements dans le contexte de l'ECMO. En effet le contact surface inerte - sang dure plusieurs jours sous ECMO et non seulement quelques heures comme c'est le cas lors d'une CEC à visée chirurgicale.

La recherche actuelle semble se focaliser sur le développement de nouveaux polymères Zwitterioniques à forte biocompatibilité.^{38,39} Ces polymères ont été inspirés de la présence de groupement Zwitterion et certains phospholipides membranaires chez les mammifères à l'exemple de la phosphatidylcholine.³⁹ Ces groupements sont caractérisés par la présence de charges opposées au sein de la même molécules et un pouvoir tension actif puissant.

C. Différentes configurations d'ECMO

Bien que les circuits d'ECMO soient identiques dans la plupart des contextes cliniques, certaines particularités techniques et de montage des différents éléments doivent être considérées dans le type de support envisagé. Ces éléments permettent de distinguer différents types configurations techniques. Le choix de la configuration technique du circuit d'ECMO dépend de plusieurs éléments de réflexions que sont : la finalité de l'assistance (sevrage envisagé ou non), la fonction d'organe à suppléer (oxygénation, circulation ou mixte) et les indications (hypoxémie réfractaire, choc cardiogénique réfractaire ou arrêt cardiaque réfractaire, support procédural préventif à l'exemple de la coronarographie à haut risque ou de la chirurgie aortique, etc.).⁴⁰

Les finalités de ce traitement sont généralement le support en attendant la récupération de l'organe agressé ou d'emblée un support transitoire dans l'attente d'un support de longue durée ou encore d'une transplantation d'organe. Dans certaines situations cliniques et/ou éthiques complexes, un support dans l'attente d'une prise de décision thérapeutique peut-être envisagé.

Concernant la fonction d'organe à suppléer, celle-ci se superpose à l'étiologie de l'agression dans la plupart des cas. On oppose alors l'ECMO-VV pour le support respiratoire exclusif à l'ECMO-VA pour le support cardiaque avec ou sans composante respiratoire. Des configurations mixtes associant ECMO-VV et ECMO-VA sont possibles (ECMO VA-veineuse).

Un dernier niveau de segmentation est le caractère périphérique de l'ECMO par opposition à son caractère central.

1. ECMO-VV versus ECMO-VA

Lorsque les deux extrémités de l'ECMO sont branchées en parallèle exclusivement sur le système cave, on parle d'ECMO-VV. Dans cette configuration les canules sont positionnées dans l'oreillette droite ou à son entrée, et séparées l'une de l'autre par une distance suffisante afin d'éviter le phénomène de recirculation.^{41,42} Cette configuration est destinée à assurer une oxygénation du sang dans le cadre des syndromes de détresse respiratoire aiguë réfractaires ou des pathologies pulmonaires parenchymateuses chroniques terminales en prélude à la transplantation pulmonaire. L'enjeu dans le cadre de l'ECMO-VV est l'oxygénation du sang à un niveau suffisant pour empêcher les conséquences de l'hypoxémie.

L'ECMO-VV capte une proportion du débit sanguin dans le système cave qu'il oxygène et décarboxyle avant de la restituer dans l'atrium droit. La portion résiduelle non aspirée par l'ECMO-VV (donc désoxygénée) aboutit également au même site. Le mélange de ces deux débits doit permettre d'obtenir une pression partielle d'oxygène et une saturation en oxygène suffisante pour pallier la fonction d'oxygénation défaillante ou insuffisante des poumons natifs.

Dans cette configuration, la fonction pompe myocardique gauche reste le plus souvent préservée, le régime de flux dans le système circulatoire reste pulsatile et les compétitions de flux entre le cœur natif et l'ECMO sont inexistantes.

Cette configuration veino-veineuse s'oppose à l'ECMO-VA dont l'objectif principal est de suppléer la fonction pompe d'un cœur défaillant et non répondre aux traitements conventionnels. Afin de restaurer cette fonction, une canule d'admission sanguine est positionnée dans le système cave inférieur à proximité immédiat ou dans l'atrium droit et une canule de sortie ou d'éjection est positionnée dans une artère majeure de l'organisme. On distingue l'ECMO-VA droite-droite où la canule d'éjection est positionnée dans l'artère pulmonaire de l'ECMO-VA droite-gauche où la canule artérielle est positionnée dans l'aorte

ou une de ces branches majeures. La configuration ECMO-VA droite-droite est destinée à suppléer à la défaillance du ventricule droit sans augmenter la postcharge du ventricule gauche comme on l'observe en cas de canule artérielle positionnée sur le réseau artériel aortique. Elle expose cependant le réseau pulmonaire à basse pression à un régime de pression possiblement élevée avec des conséquences vasculaires encore peu explorées.

La configuration droite-gauche de loin la plus utilisée, permet de répondre à la fois à une défaillance isolée du cœur gauche comme du cœur droit et à une défaillance biventriculaire. Plusieurs caractéristiques rhéologiques de l'ECMO-VA sont importantes à noter. Dans cette configuration, avant la récupération du cœur natif défaillant, le flux prédominant dans le système vasculaire est majoritairement continu avec une perte de la pulsatilité artérielle. L'intensité de cette perte de pulsatilité artérielle dépend de la fonction résiduelle du cœur natif, de l'importance du débit d'ECMO-VA et de la postcharge que peut supporter le cœur natif. Par ailleurs l'exposition au traitement antiagrégant est plus fréquente sous ECMO-VA comparativement à l'ECMO-VV du fait de la prééminence de l'étiologie ischémique myocardique dans les indications d'ECMO-VA. À l'inverse, la prévalence du choc septique est plus fréquente dans l'ECMO-VV, les pneumopathies et le choc septique étant les premiers pourvoyeurs du SDRA réfractaire.

Il est important de préciser ces différences fondamentales entre ces deux configurations d'ECMO, car la littérature est riche en publication mélangeant ces deux populations de patients⁴³⁻⁵⁰ très différentes à la fois en termes d'indication, de modalité de gestion et de conséquences rhéologiques sur le sang. Enfin le pronostic attendu en fonction des deux types de support est très différent avec une mortalité à 30 jours attendus de l'ordre de 30 à 40 %^{51,52} dans l'ECMO-VV pour SDRA dans la littérature contre 48 à 60 %^{53,54,49,55,56} pour l'ECMO-VA hors assistance pour arrêt cardiaque réfractaire.

La distinction de ces deux populations est donc indispensable pour appréhender la complexité des conséquences rhéologiques et hémostatiques de l'ECMO.

2. Canulations centrale et périphérique

La canulation centrale se distingue de la canulation périphérique par le positionnement des canules directement sur le cœur lui-même ou sur les premiers segments de l'aorte, de l'artère pulmonaire ou de la veine cave inférieure. Par opposition la canulation est dite périphérique lorsque les canules sont implantées dans des veines et des artères périphériques telles que les veines fémorales ou jugulaires et les artères fémorales ou sous-clavières.

Des modalités de canulation hybrides qui combinent les caractéristiques des deux types d'ECMO (*i.e.* ECMO-VA et ECMO-VV) peuvent être rencontrées, on parle alors d'ECMO veino-veino-artérielle ou de veino-artério-veineuse. De façon similaire des configurations combinant une canulation périphérique et centrale restent possible.^{41,57} Ces différentes configurations reflètent la variété de présentations cliniques possible sous assistance. Néanmoins, leurs caractéristiques hémodynamiques, rhéologiques et les pronostics qui y sont associés ont été peu ou pas explorés. Afin d'apporter une cohérence dans la sémantique utilisée pour la présentation des différentes modalités d'ECMO, la conférence d'expert « ELSO Maastricht Treaty » publiée en 2019 par Broman et *al.* proposent une nomenclature universelle. Cette nomenclature utilise les 4 critères suivants pour définir le type d'ECMO : la direction du flux, le site d'entrée de la canule, la position de son extrémité et la taille de la canule utilisée⁴¹.

En cohérence avec ces différences majeures entre ECMO-VV et ECMO-VA, ce travail de thèse porte exclusivement sur les patients ayant un choc cardiogénique et assisté par ECMO-VA.

D. Indications de l'ECMO-VA

Les indications d'assistances par ECMO-VA actuellement reconnues chez l'adulte sont le choc cardiogénique réfractaire et l'arrêt cardiaque réfractaire.

Dans le cadre du choc cardiogénique, les recommandations actuelles préconisent le recours à cette assistance circulatoire mécanique lorsque la prise en charge conventionnelle devient insuffisante. Ce positionnement de l'ECMO comme première assistance de recours fait suite à l'accumulation de preuves démontrant l'échec du BCPIA à améliorer le pronostic de ces patients dans le cadre du choc cardiogénique post-ischémique. En effet, BCPIA fut historiquement le support recommandé dans cette indication, il permettait de diminuer la postcharge ventriculaire gauche en créant une dépression en diastole et améliore la perfusion coronaire par son gonflement en diastole qui majorait et prolongeait la perfusion coronaire (et possiblement cérébrale). Plusieurs preuves cliniques ont conduit au déclin de ce support. En premier lieu, la preuve a été apportée que le niveau de débit supplémentaire généré par le BCPIA était plutôt faible de l'ordre de 0,5 L/min.¹⁰ Par ailleurs les résultats des études positifs préliminaires rapportés dans des travaux observationnelles ou comparatives de faibles puissances ont été infirmés par la série d'études IABP Shock II.¹⁻³ Cette famille d'études est issue de l'analyse de l'étude princeps et des analyses post-hoc à 12 mois et à 6 ans. L'étude multicentrique IABP Shock II avait randomisé 600 patients présentant un choc cardiogénique dans les suites d'un syndrome coronarien avec (STEMI) ou sans élévation du segment ST (NSTEMI) avec une revascularisation prévue en deux groupes. Le groupe interventionnel recevait un support par le BCPIA en plus du traitement médical qui était la référence dans le groupe contrôle. L'objectif principal qui était la mortalité à 30 jours, analysée en intention de traiter, s'est révélé similaire dans les deux groupes tous comme les objectifs secondaires.¹ Par ailleurs les analyses post hoc à 12 mois² puis à 6 ans³ confirmaient l'absence de différence significative entre les deux groupes étudiés en termes de mortalité. De plus une analyse

médico-économique réalisée sur cette population s'était révélée en défaveurs du BCPIA. Enfin la méta-analyse publiée par Ahmad et al. en 2015 est venu confirmer la futilité de cette assistance.¹⁸

Fort de ces résultats la plupart des sociétés savantes ont déclassé le BCPIA dans leurs recommandations sur la prise en charge de choc cardiogénique au profit de l'ECMO-VA dans un premier temps et plus récemment aux pompes axiales de type Impella.^{17,58}

En conséquence l'ECMO est devenu le traitement de premier recours dans le choc cardiogénique qu'il soit d'étiologie médicale ou secondaire à une chirurgie cardiaque.

Une problématique d'importance demeure cependant, celle la définition du caractère réfractaire du choc cardiogénique. Cette définition est non consensuelle et dépendante des auteurs, des sociétés savantes et des pratiques cliniques de chaque centre.

Ainsi la définition de la gravité de l'insuffisance cardiaque chronique et de son aggravation aiguë proposée par le registre américain INTERMACS (Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support), assorti de recommandation de prise en charge, préconise l'utilisation d'une assistance de courtes durées aux stades I (crash and burn) et II (sliding under inotropes).⁵⁹ Pour mémoire, sur les 25 551 patients insuffisants cardiaques ayant bénéficié d'un LVAD entre 2010 et 2019 aux états unis, 16,2 % et 35,2 % étaient au stade I et II respectivement.⁶⁰

Dans ces recommandations de 2017,⁵⁸ actualisée en 2021,¹⁷ la société européenne de cardiologie positionne les assistances circulatoires de courte durée (dont l'ECMO-VA) comme recours dans les stades INTERMACS 1 et 2 en attendant l'élaboration d'une stratégie, ou en vue d'une récupération du myocarde, d'une assistance longue durée ou d'une transplantation cardiaque .

INTERMACS level	NYHA Class	Description	Device	1y survival with LVAD therapy
1. Cardiogenic shock "Crash and burn"	IV	Haemodynamic instability in spite of increasing doses of catecholamines and/or mechanical circulatory support with critical hypoperfusion of target organs (severe cardiogenic shock).	ECLS, ECMO, percutaneous support devices	52.6±5.6%
2. Progressive decline despite inotropic support "Sliding on inotropes"	IV	Intravenous inotropic support with acceptable blood pressure but rapid deterioration of renal function, nutritional state, or signs of congestion.	ECLS, ECMO, LVAD	63.1±3.1%
3. Stable but inotrope dependent "Dependent stability"	IV	Haemodynamic stability with low or intermediate doses of inotropics, but necessary due to hypotension, worsening of symptoms, or progressive renal failure.	LVAD	78.4±2.5%
4. Resting symptoms "Frequent flyer"	IV ambulatory	Temporary cessation of inotropic treatment is possible, but patient presents with frequent symptom recurrences and typically with fluid overload.	LVAD	78.7±3.0%
5. Exertion intolerant "Housebound"	IV ambulatory	Complete cessation of physical activity, stable at rest, but frequently with moderate fluid retention and some level of renal dysfunction.	LVAD	93.0±3.9% ^a
6. Exertion limited "Walking wounded"	III	Minor limitation on physical activity and absence of congestion while at rest. Easily fatigued by light activity.	LVAD / Discuss LVAD as option	-
7. "Placeholder"	III	Patient in NYHA Class III with no current or recent unstable fluid balance.	Discuss LVAD as option	-

ECLS = extracorporeal life support; ECMO = extracorporeal membrane oxygenation; INTERMACS = Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support; LVAD = left ventricular assist device; NYHA = New York Heart Association.

^aKaplan-Meier estimates with standard error of the mean for 1 year survival with LVAD therapy. Patients were censored at time of last contact, recovery or heart transplantation. Due to small numbers outcomes for INTERMACS levels 5, 6, 7 were combined⁶¹⁰.

Tableau 3. Stratification de la gravité du choc cardiogénique d'après la classification INTERMACS (Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support) d'après l'European Society of Cardiology⁴¹

Dans le cadre du choc cardiogénique aigu, le positionnement des recommandations de l'ESC est plus ambigu. L'ECMO est recommandée avec un grade de recommandation IIa alors que le recours aux inotropes et aux vasoconstricteurs font tous deux l'objet d'une recommandation de grade IIb.¹⁷ Le ou les critères devant justifier d'un support par ECMO n'y étaient pas précisés.

Récemment une nouvelle classification du choc cardiogénique aigu a été proposée par la Society for Cardiovascular Angiography and Interventions⁶¹. Prenant note de la complexité du choc cardiogénique et de la très grande hétérogénéité de la population concernée, les auteurs ont proposé une classification permettant d'hiérarchiser de façon objective et reproductible le choc cardiogénique. Cette classification permettrait de mieux stratifier la gravité des patients, de mieux rationaliser les approches thérapeutiques et d'espérer améliorer le pronostic des patients souffrant d'un choc cardiogénique. Elle est construite sur le modèle de la

classification INTERMACS avec à chacun des 5 stades de gravité croissante de A à E, une proposition d'approche thérapeutique à considérer (Figure 7). Ainsi l'ECMO est proposée dès le stade C de cette classification, mais là encore sans préciser son positionnement par rapport à l'utilisation des amines vasoactives.⁶¹

Cette attitude est liée au fait qu'à ce jour, il n'existe pas de preuve formelle de la supériorité d'une approche préconisant le recours aux amines vasoactives préalablement aux assistances mécaniques. Elle prend également en compte l'incertitude concernant le délai à l'assistance circulatoire dans cette indication. Trois études randomisées contrôlées multicentriques sont en cours pour répondre à ces interrogations (EURO-SHOCK, NCT03813134 ; ECLS-SHOCK, NCT03637205 ; ANCHOR, NCT04184635).

Dans l'attente de leurs résultats, il est important de rappeler que la seule approche thérapeutique qui a montré une efficacité en termes de survie dans le choc cardiogénique est la mise en place de protocole de prise en charge multidisciplinaire incluant les critères de recours de l'assistance circulatoire.



Figure 7. Classification de la sévérité du choc cardiogénique d'après le consensus d'expert de la Society for Cardiovascular Angiography and Interventions.⁶¹⁶¹

E. Pronostic lié à l'assistance par ECMO-VA

La probabilité de survie en cas de choc cardiogénique réfractaire est <80 % en l'absence d'assistance circulatoire (Figure 8). Cette survie est nulle lorsque dans le cas des arrêts cardiaques réfractaires.

L'assistance circulatoire par ECMO-VA apporte un réel bénéfice en termes de survie à court terme. En considérant les données du registre ELSO sur ces 5 dernières années, le taux de mortalité hospitalière dans la population adulte est de 47 % pour les chocs cardiogéniques et de 31 % pour les arrêts cardiaques extrahospitaliers.⁶²

Dans l'une des rares études randomisées contrôlées concernant les patients en choc cardiogénique, le taux de mortalité observé à 30 jours était de 42 % dans le groupe interventionnel et atteignait 51 % dans le groupe contrôle.⁶³ Concernant la mortalité à long terme, les données disponibles sont limitées, mais encourageantes. Dans un travail monocentrique Australien, la mortalité post hospitalière semblait rester stable 12 mois après la sortie hospitalière, avec un gain sensible de qualité de vie évaluée de façon multiparamétrique.⁶⁴

Ces résultats cachent de grandes disparités en fonction des centres, des étiologies d'assistances.⁶⁵ Concernant les étiologies, la mortalité observée chez les patients en postcardiotomies reste plus élevée que celle observée dans la population de patients assistées pour une étiologie médicale. Au sein même de cette dernière sous catégories, des différences majeures existent en fonction de l'étiologie considérée.⁶⁶ Pour prendre en compte ces écueils dans le pronostic de la survie, quelques scores pronostiques ont été développés ces dernières années. Le SAVE score,⁶⁷ le plus utilisé et le plus cité, est issue d'une large cohorte d'étiologies variées. Les autres scores émergents sont le score ENCOURAGE⁶⁸ dévolu exclusivement aux causes ischémiques d'assistances, le score REMEMBER⁶⁹ pour les patients en postcardiotomie et CardShok⁷⁰ plus généraliste.

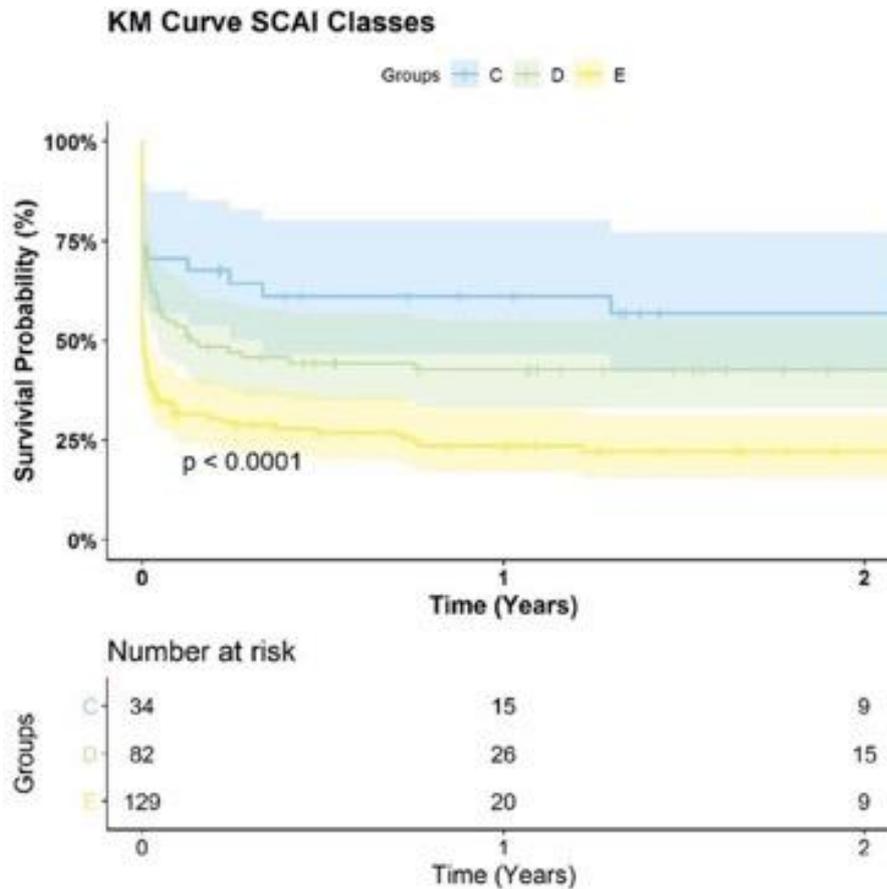


Figure 8. Probabilité de survie des patients assistés par ECMO en fonction de la classification SCAI d'après Metha et al. ⁷⁵

Les facteurs de risque de mortalité étudiés sont en général des facteurs pré-assistance pour des raisons méthodologiques et statistiques.^{21, 71-73} Cependant, les complications survenant pendant le support ne sont pas évaluées dans les modèles de risque qui prédisent le devenir des patients. C'est le cas par exemple des complications hémorragiques ou thrombotiques qui ne sont pas explorées dans les outils de pronostications.

L'ECMO-VA est également associée à une morbidité élevée. Parmi les complications les plus rapportées, l'insuffisance rénale aiguë et les complications hémorragiques sont au premier plan. Dans une méta-analyse portant sur des patients assistés par ECMO-VA en postcardiotomie, l'incidence à 30 jours des complications hémorragiques observées était de 42,9 % et celle de l'insuffisance rénale aiguë était de 47,1 % des 2986 patients inclus. Les

complications neurologiques concernaient 11,3 % et les ischémies de membres 10,8 % des patients.⁷⁴

Ces résultats positionnent les complications liées à l'hémostase comme la première cause de morbidité associée à l'ECMO-VA.

II. Complications hémorragiques et thrombotiques sous ECMO-VA

A. Complications thrombotiques liées à l'ECMO-VA

Deux types de complications thrombotiques sont à considérer au cours de l'assistance par ECMO-VA. Les complications thrombotiques systémiques qui surviennent chez le patient assisté et les complications thrombotiques non systémiques qui intéressent le circuit d'ECMO. Les complications non systémiques semblent être les plus fréquentes et de diagnostic plus aisé. Ces complications peuvent concerner chacun des composants du circuit d'ECMO-VA. Ainsi les thromboses peuvent survenir sur chacune des canules, sur le circuit, l'oxygénateur ou la tête de pompe.

Du fait de leurs caractéristiques rhéologiques, les zones les plus concernées par ces complications sont l'oxygénateur et les zones de jonctions tubulaires.

Ces zones sont caractérisées par des profils de flux turbulents ou par l'existence de résistance à l'écoulement du sang conduisant à une stagnation de ce dernier.⁷⁶ La conséquence la plus commune de cette complication est le changement du circuit d'ECMO. Cette procédure est fréquente et concerne jusqu'à 35 % des patients assistés dans une série récente, elle expose à un risque de complications hémodynamiques et emboliques et s'avère être couteuse.⁷⁷

D'un point de vue physiopathologique, la principale cause de la thrombinoformation sur le circuit d'ECMO serait l'activation de la voie intrinsèque de la coagulation. Cette activation est liée à l'interaction entre les surfaces inertes de l'ECMO chargées négativement et le

facteur XII qui après une cascade d'activation impliquant plusieurs facteurs de la coagulation aboutit à l'activation de la prothrombine en thrombine par le complexe prothrombinase. Dans un travail élégant publié par Larrson et *al.*, l'inhibition de la voie du facteur XII par un anticorps spécifique permettait de réduire de façon significative la formation de thrombi dans un circuit d'ECMO appliquée à un modèle de lapin. Les performances de cet anticorps anti-facteur XII étaient supérieures à celle d'une anticoagulation systémique par HNF.⁷⁸ À l'activation de la voie du facteur XII s'ajoutent plusieurs autres anomalies de la coagulation induites par l'ECMO-VA et le régime de flux qui y est associé. Ces anomalies sont décrites dans un chapitre dédié ci-après.

Les complications thrombotiques systémiques peuvent être emboliques ou non. Dans le cas des complications emboliques, ces emboles proviennent soit du circuit d'ECMO-VA et sont de natures fibrino-cruoriques ou gazeuses (par « bullage du circuit »), soit des cavités cardiaques ou du culot aortique. La formation des thrombi dans les cavités cardiaques et/ou dans le culot aortique est généralement en rapport avec la stagnation du sang dans ces cavités. Cette stagnation est en lien avec une majoration de la postcharge du fait du flux rétrograde que génère l'ECMO-VA associée à un effondrement de la fonction pompe incapable de générer le moindre débit imposant une ouverture valvulaire aortique.⁷⁹ La présence d'anomalie pariétale à l'exemple des remodelages anévrysmes post-infarctus du myocarde peuvent également les favoriser.

Leurs conséquences sont les accidents vasculaires cérébraux, les embolies pulmonaires (ECMO droite-droite), les ischémies mésentériques, spléniques, hépatiques, rénales ou des membres d'origine emboliques. Leurs incidences ne sont rapportées de façon détaillée que dans quelques rares séries rétrospectives pédiatriques⁸⁰ et adultes.⁸¹ Il est important de noter que ces complications peuvent être frustes et être sous-estimé par l'examen clinique de routine. Dans une série autopsique rétrospective de patients pédiatriques,⁸² les complications

thrombotiques constatées après nécropsie étaient de 63 % bien au-delà des incidences autour de 30 % souvent rapportées révélant ainsi un taux de complications cryptiques de quasiment 50 %. Un travail similaire plus ancien portant sur une population adulte rapportait déjà cette tendance à une sous-estimation par l'examen clinique de routine.⁸³

Les causes de cette incidence plus élevée des complications thrombotiques cliniques et cryptiques sont multifactorielles en rapport avec une activation générale de la coagulation issue de l'activation de la voie du facteur XII sur le circuit artificiel inerte de l'ECMO, mais aussi à des anomalies procoagulantes en rapport avec la gravité du tableau clinique et le SIRS induit, mais aussi à des anomalies flux dépendants en relation avec l'ECMO. Ces complications sont décrites de façon extensive dans le paragraphe correspondant dans les lignes à suivre.

L'ischémie aiguë des membres est une complication fréquente qui concerne plus de 10 %⁷⁴ des patients et dont la gravité peut aller de la simple atteinte des téguments à l'ischémie dépassée nécessitant une amputation du membre. Sa physiologie est ici particulière et nécessite d'être soulignée. L'occlusion de la lumière vasculaire par la canule artérielle, l'existence d'artériopathie oblitérante des membres inférieurs et l'absence d'un cathéter de reperfusion portent une grande responsabilité dans la survenue de cette complication. Le rapport entre la taille de la canule et la section de l'artère canulée doit ainsi guider le choix de la canule artérielle afin de minimiser ce risque. L'utilisation d'une reperfusion rétrograde nourrie par le flux artériel devrait être la règle. L'hyperpression veineuse liée à la présence d'une canule veineuse dans la veine fémorale homolatérale à l'artère fémorale canulée pourrait également participer à l'aggravation de ce risque d'ischémie de membre inférieure.

De façon générale ces complications thrombotiques semblent être associées à un pronostic défavorable dans la population de patients assistés par ECMO-VA.⁸⁴ L'impact des

complications thrombotiques sur la mortalité est plus inconstante en cas de support par ECMO-VV.^{85,86}

Une des questions importantes est le lien entre la survenue de complications thrombotiques non systémiques et celle des complications thrombotiques systémiques. Les évidences actuellement disponibles ne permettent pas d'y répondre.

B. Complications hémorragiques liées à l'ECMO-VA

Les complications hémorragiques représentent la principale cause de morbidité associée à l'assistance circulatoire dans le cadre de l'insuffisance cardiaque réfractaire dans le rapport général du registre de l'ELSO de 2016,⁸⁷ Leurs prévalences s'étendent entre 57,5 % et 63,1 % avec une prédominance des saignements autour des sites d'incisions chirurgicaux et autour des canules. Cette incidence peut dépasser 70 % lorsque l'on s'intéresse au sous-groupe des patients assistés par ECMO-VA en postcardiotomie. Dans une étude rétrospective portant sur une population hétérogène de patients assistés par ECMO-VV et ECMO-VA, Mazzeffi et *al.* rapportaient une incidence du saignement sévère de 56,1 %. Une analyse en sous-groupe de ces résultats montre une augmentation de l'incidence des saignements sévères à 68,5 % chez patients sous assistance VA et de 74,4 % en considérant la fraction de patients sous ECMO-VA lorsque l'étiologie était un choc cardiogénique en postcardiotomie.⁴⁵

De façon similaire, Aubron et *al.*, qui rapportait une incidence des épisodes hémorragiques sévère de 60 % dans l'ensemble de leur population retrouvait une incidence de 74 % lorsque l'on cible la population d'ECMO-VA.⁴⁸

Un problème fondamental dans la description des complications hémorragiques sous ECMO-VA est la très grande hétérogénéité des définitions des saignements et des critères de sévérités

retenues. Dans une revue systématique avec méta-analyse publiée en 2017 portant sur l'anticoagulation et la prévalence des saignements sous ECMO-VA, parmi les 26 études observationnelles incluses dans l'analyse, la définition du saignement majeur utilisée était extrêmement hétérogène avec une hétérogénéité inter étude calculée à $I=91\%$. La Table 1 de cette étude illustre parfaitement la profusion de définitions du saignement majeur retenue dans les études sélectionnées.⁸⁸ Les critères de sévérité des saignements sont elles aussi hétérogènes et plusieurs définitions différentes sont utilisées dans la littérature. Dans un effort d'harmonisation, l'ELSO propose une définition du saignement sévère nommé « serious bleeding », celle-ci connaît un réel succès dans la littérature récente, mais reste empirique et n'a pas formellement fait l'objet d'une validation.

Par ailleurs, l'incidence des complications hémorragiques varie en fonction des localisations anatomiques. Cette variabilité pourrait traduire des différences mécanistiques à l'origine du saignement. Une première approche descriptive pertinente est de distinguer les saignements chirurgicaux des saignements non chirurgicaux. Les premières étant liées à l'effraction cutanée nécessaire à la réalisation d'un acte chirurgical ou pour les canulations vasculaires indispensable à l'implantation de l'ECMO, alors que les secondes (saignements dits non chirurgicaux) ne sont pas explicables par une quelconque agression chirurgicale. Les saignements chirurgicaux sont les plus fréquemment observés et interviennent en premiers lieux dans le péricarde et autour des sites de canulations.^{56,89} Parmi les saignements non chirurgicaux, les complications muqueuses sont particulièrement fréquentes. Il s'agit de saignements digestifs, oro-pharyngo-laryngée et pulmonaire. Ces saignements seraient liés à des anomalies de la protéine de Von-Willebrand ou à des malformations vasculaires induites par le haut niveau de contrainte de flux et le caractère continu du flux généré sous ECMO-VA.⁹⁰ D'autres complications non chirurgicales moins fréquentes, mais potentiellement plus

graves doivent également être considérées avec en premier lieu les saignements intracrâniens, mais également rétropéritonéaux et/ou encore pleuraux.^{91, 92, 90}

Une large étude rétrospective récente qui a analysé 54 644 adultes assistés par ECMO dont 30 696 ECMO-VA issues du registre ELSO et qui porte sur l'évolution de l'incidence des saignements permet d'appréhender l'évolution comparée des différents types de saignement sur les 20 dernières années (1^{er} janvier 2000 au 31 décembre 2020). Dans ce travail, bien que la définition du saignement soit différente de celle proposée par l'ELSO pour le saignement sévère et qui fait référence dans le domaine de l'ECMO, on observe une tendance à une régression des saignements chirurgicaux alors que les saignements non chirurgicaux notamment gastro-intestinaux semblent stagner.⁹³

Quelle que soit l'étiologie initiale, la majorité des patients assistés par ECMO reçoivent au moins une transfusion de culot globulaire érythrocytaire. Ces données interpellent, dans la mesure où la survenue des épisodes hémorragiques serait associée à un pronostic défavorable dans plusieurs séries publiées. De façon contre-intuitive, la transfusion de culot érythrocytaire serait elle aussi associée à une augmentation de la morbidité et de la mortalité indépendamment de la présence ou de la sévérité d'un saignement.^{45, 47, 50}

Ainsi, dans une autre étude rétrospective récente portant sur l'incidence et le pronostic lié à l'hémorragie sévère et à la transfusion de culots globulaires érythrocytaires, il apparaît que 89 des 147 patients inclus (60 %) avaient présenté au moins un épisode hémorragique sévère. La survenue d'une hémorragie était associée à une augmentation de la mortalité avec un odd ratio de 2,2 (IC 95 % 1,00-4,95). La transfusion de chaque unité de culot globulaire était également indépendamment associée à la mortalité [OR 1,03 (IC95 % 1,01-1,04)].⁴⁷

En synthèse, à la lumière de la littérature actuelle, l'on peut considérer que les complications liées à l'hémostase sont d'origines multifactorielles, et semblent être associées aux :

- Particularités cliniques des patients et aux spécificités liées à la pathologie causale,
- Contraintes chirurgicales à risque ischémique par l'obstruction relative de la lumière vasculaire (canulation) ou à risque thrombotique par la majoration de la stase sanguine intra cavitaire (flux rétrograde et thrombose intra cavitaire ou du culot aortique) ou intravasculaire (stase veineuse cave et thrombose cave inférieure ou supérieur) qu'elles induisent,
- Contraintes chirurgicales à risque hémorragiques que sont l'effraction cutanée et vasculaire (canulation et incision pour une voie d'abord chirurgicale spécifique à l'exemple de la sternotomie),
- Thérapeutiques antithrombotiques systémiques prophylactique (héparinothérapie, argatroban, bivalirudine) ou curative dans le cadre de certaines étiologies à l'exemple des SCA ST+ (antiagrégants plaquettaires, agents fibrinolytiques) ou encore ou de l'embolie pulmonaire grave (héparinothérapie curative et agents fibrinolytiques).
- Anomalies spécifiques induites par la nature continue du flux, les contraintes rhéologiques dont des contraintes de flux supra maximales que génèrent l'ECMO-VA.

L'ensemble de ces phénomènes concourant à constituer un phénotype sous ECMO marquée par la sensibilité à ces complications duales que sont la thrombose et l'hémorragie. Les données de la littérature convergent à suggérer l'existence d'anomalies biologiques dont les effets favorisent ou aggravent ces complications liées à l'hémostase.

III. Anomalies de l'hémostase survenant sous ECMO-VA

L'ECMO-VA peut être résumée comme l'association de deux circulations sanguines en parallèle, l'une native endothélialisée et l'autre non-endothélialisée faite de matériaux inertes. Ces deux circulations se distinguent également par des contraintes de flux différentes, la circulation native est à bas niveaux de contrainte de flux particulièrement dans le secteur

veineux, alors que la circulation inerte (ECMO) est caractérisée par des zones à hautes contraintes de flux bien au-delà de celle observée dans les artères résistives.³¹ Enfin le flux généré par la pompe centrifuge dans de la circulation inerte est systématiquement continu alors que celle de la circulation native pourra être exclusivement continue ou avec la possibilité d'un flux pulsatile surajouté dès l'amorce de récupération du cœur natif.

Les conséquences biologiques sur l'hémostase et la coagulation qui résulte de ces particularités sont multiples et peuvent être classées en deux catégories : les anomalies prothrombotiques et celles qui sont pro-hémorragiques.

A. Anomalies biologiques prothrombotiques sous ECMO-VA

1. Activation de la coagulation

L'activation de la coagulation est multifactorielle sous ECMO-VA. Parmi ses 3 principaux déclencheurs, il faut noter :

- L'activation de l'hémostase primaire et de la coagulation en réponse à l'effraction vasculaire nécessaire aux canulations ou celle liée à la sternotomie et la cardiectomie (en cas d'ECMO-VA postcardiectomie).
- La réaction inflammatoire aseptique liée à la gravité de l'état de choc cardiogénique réfractaire cela indépendamment de l'ECMO et qui promeut la production du facteur tissulaire.
- L'activation spécifique de la voie du facteur XII par l'interaction entre le sang et le circuit inerte de l'ECMO.

a) Effraction vasculaire et activation de l'hémostase primaire et de la coagulation

L'infraction vasculaire liée à l'incision chirurgicale entraîne l'activation de l'hémostase primaire. Dans ce processus, la mise à nue du sous-endothélium entraîne le recrutement

plaquettaire et leurs adhésions au site d'agression grâce à des récepteurs de surfaces spécifiques de leurs ligands sous-endothéliaux respectifs (Figure 9).

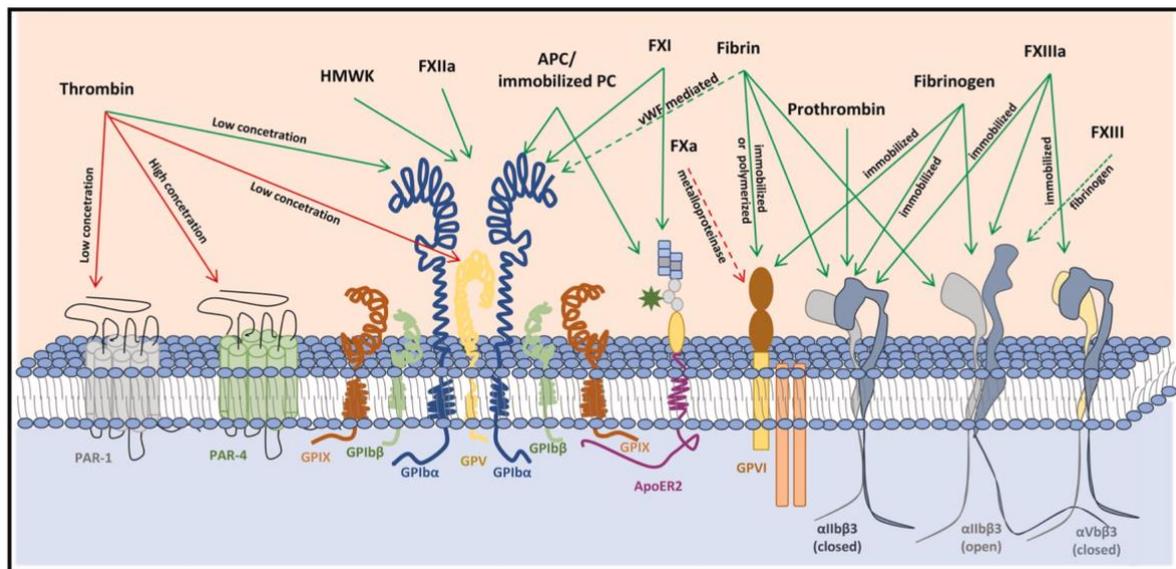


Figure 9. Description des principaux récepteurs plaquettaire et de leurs ligands. D'après Sang et al.⁹⁴

L'action de certains de ces récepteurs dépend des contraintes de flux locales. En situation de contrainte de flux basse ($100 - 1000 \text{ s}^{-1}$), l'adhésion plaquettaire est médiée par l'interaction entre le collagène du sous-endothélium et les récepteurs glycoprotéines (GP) VI ou l'intégrine $\alpha 2\beta 1$. Des ligands secondaires, complémentaires au collagène, participent au phénomène d'adhésion plaquettaire avec chacune un récepteur plaquettaire spécifique (Intégrine $\alpha 6\beta 1$ et la laminine ; Intégrines $\alpha \text{II}\beta 3$, $\alpha \text{V}\beta 3$ ou $\alpha 5\beta 1$ et la fibronectine).

En situation de contraintes de flux physiologiques élevées ($1000 - 4000 \text{ s}^{-1}$), l'interaction Collagène/GP IV ou $\alpha 2\beta 1$ est insuffisamment ferme pour assurer l'adhésion plaquettaire. Une phase de ralentissement et de fixation des plaquettes est nécessaire. L'interaction Collagène/GP IV ou $\alpha 2\beta 1$ est ainsi précédée par celle entre la protéine de Von Willebrand (VWF) enchâssée dans le sous-endothélium et l'intégrine GPIb-IX-V plaquettaire.⁹⁵ En situation contrainte de flux élevé, le VWF lié au collagène du sous-endothélium subit un changement conformationnel dont la conséquence est l'exposition de son domaine A1. Le domaine A1 de la protéine VWF correspond au site de liaison avec la sous-unité GPIIb du

complexe GPIb-IX-V.⁹⁵ Cette liaison à un rôle de freinage des plaquettes au niveau du site de liaison, ce qui permet l'interaction Collagène/GP IV décrite plus haut.⁹⁴

L'interaction Collagène/GP IV et VWF/GP Ib-IX-V induisent une signalisation intracellulaire complexe⁹⁶ passant par la liaison des domaines cytoplasmiques de ces deux intégrines aux kinases de la famille Src Family kinases (SFK) et les phosphoinositol 3-kinases (PI3Ks) aboutissant à l'activation de la phospholipase C (PLC).^{94,97} De façon simplifiée, la signalisation intracellulaire emprunte alors deux voies, l'une vers l'activation plaquettaire par l'induction de modifications cytosquelettiques impliquant la Talin et l'autre vers l'amplification du signal par la sécrétion granulaire.

L'activation plaquettaire (voie d'activation plaquettaire non exclusive) se traduit par un changement conformationnel plaquettaire marqué par le passage d'une forme discoïde à une forme sphérique avec l'émission de filopodes.⁹⁸ Cette transformation entraîne une augmentation de la surface plaquettaire et de ses possibilités d'interaction.

La sécrétion granulaire qui amplifie le phénomène libère plusieurs médiateurs dont l'objectif est le recrutement plaquettaire. Plusieurs agonistes activateurs de récepteurs plaquettaires sont ainsi libérés.^{99,100} Les granules denses libèrent de l'Adénosine di phosphate (ADP) (ligand des récepteurs plaquettaires P2Y et P2X), de la thromboxane (Ligand des récepteurs THA2) ou encore de sérotonine (ligand des récepteurs 5HT).¹⁰¹ Les granules α libèrent quant à elles en plus du VWF, le fibrinogène et des cytokines qui participent au phénomène d'hémostase et de coagulation.^{99,100} Plusieurs de ces activateurs interagissent avec des récepteurs à 7 domaines transmembranaires qui vont initier une signalisation intracellulaire cheminant via la PI3K pour aboutir à l'activation des MAPK promotrices de la sécrétion granulaire.

Ces étapes convergent vers l'activation de Rap 1 puis l'activation de l'intégrine α IIB β 3 membranaire.¹⁰²⁻¹⁰⁴ Ce processus reconnu sous la dénomination de signalisation « Inside-out », est l'activateur de l'étape majeure de l'hémostase primaire que constitue l'agrégation

plaquettaire finale dépendante de l'interaction entre l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ et le fibrinogène en présence de magnésium. En retour cette interaction induite une signalisation dite outside-in qui amplifie le phénomène grâce à la densité importante en récepteurs $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ ($2 \cdot 10^5$) à la surface plaquettaire et de son ligand.¹⁰⁵

Plusieurs voies de régulation de ce processus ont été décrites. La plus importante est celle de l'oxyde nitrique endothéliale qui par l'activation de la protéine kinase G entraîne la phosphorylation de plusieurs protéines impliquées dans la signalisation Inside — out. Une autre voie d'inhibition est celle des prostacyclines qui par l'intermédiaire de la protéine kinase A, induit l'inhibition des modifications cytosquelettiques et la variation de l'influx calcique intracytoplasmique généré lors des étapes de la signalisation Inside-out.^{97,106} Par ailleurs l'activité hémostatique du VWF est finement régulée par la métalloprotéase A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type-1 repeats member 13 (ADAMTS13), via un clivage flux dépendant non-réversible aboutissant à des multimères de VWF d'efficacité hémostatique réduite, cela en fonction de leurs poids moléculaires.^{95,107}

Par plusieurs aspects, l'activation plaquettaire peut promouvoir l'activation ou l'amplification de la coagulation. L'activation plaquettaire fournit une surface active négativement chargée permettant l'ancrage des serines protéines. Une des voies reliant hémostase primaire et coagulation est la libération des polypeptides plaquettaires contenue dans les granules denses et qui ont la capacité d'activer la voie du facteur XII.

b) Réaction inflammatoire aseptique, facteur tissulaire et NETose

L'activation de l'endothélium vasculaire et la production de facteur tissulaire peuvent être observées dans ce contexte en fonction de la gravité de l'état de choc cardiogénique réfractaire. Cette situation clinique est caractérisée par la production d'activateurs endogènes appelés Damage Associated Molecular Pattern (DAMP) dont l'action mime celui d'un Pathogen Associated Molecular Pattern et son récepteur Pattern Receptor Receptor (PRR)

dont le plus connu est le couple lipopolysaccharide bactérien et récepteur Toll-Like (TLR) 4 d'un choc septique. La liste non exhaustive des DAMPS identifiés comprend les fragments d'ADN et d'histone circulant, les protéines du high-mobility group box 1 (HMGB1) et les dérivées de l'oxydation lipidiques. La production de ces DAMP est commune aux formes les plus sévères de choc cardiogénique réfractaire et de choc septique.

Ces DAMPS interagissent avec plusieurs PRR intervenant dans la réponse inflammatoire non — infectieuse parmi lesquels des récepteurs de la famille TLR, les nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) — like receptors (NLRs) et les receptor for advanced glycation end products (RAGE). Des données récentes convergent vers l'implication de plusieurs TLR^{108,109} et NOD 2,¹¹⁰ tous deux présents sur la surface plaquettaire, dans l'activation plaquettaire et de la coagulation.

La reconnaissance des DAMPS par leur PRR aboutie à l'activation d'un complexe protéique pro-inflammatoire appelé inflammasome centré par le NFκB d'une part et la liaison NLRs/ Caspase 1 d'autre part.¹¹¹ Cette réaction aboutie à l'activation de l'immunité innée, à la production de médiateurs proinflammatoires (IL18 et IL1 β), au recrutement monocyttaire et macrophagique, à l'activation plaquettaire et endothéliales.¹¹¹⁻¹¹⁴ Il existe une relation complexe entre ces différentes voies activées et les plaquettes par la voie de l'IL1β¹¹², résultant en la promotion de l'activation et l'adhésion leucocytaires, la modulation de la fonction phagocytaire et de dégranulation des polynucléaires neutrophiles.^{113,114} Par ailleurs, des travaux expérimentaux ont montré un lien entre l'activation de la Caspase 1 et la production de microparticules prothrombotiques.¹¹¹ Les cellules endothéliales activées offrent une large surface négativement chargée pour la fixation des sérines protéines. Elles peuvent également exprimer à l'exemple des monocytes activés, du facteur tissulaire en mesure d'activer la voie extrinsèque de la coagulation en présence du facteur VII. Le recrutement et l'activation des cellules inflammatoires richement décrit dans le processus septiques a

également été observé dans les réactions inflammatoires aseptiques engageant les DAMPs.^{115,116}

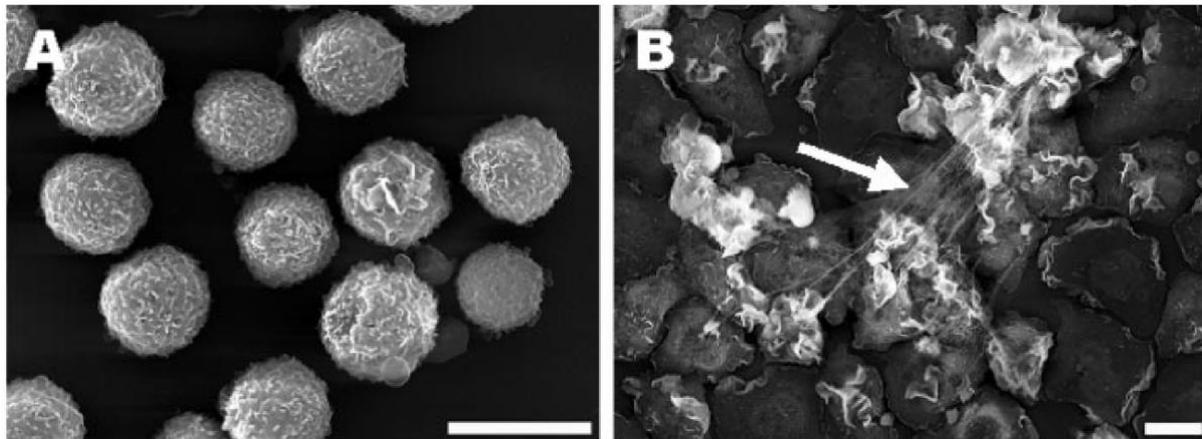


Figure 10. Microscopie électronique décrivant des polynucléaires neutrophiles au repos (A) avec une structure sphérique homogène typique et après activations (B).

Noter le changement morphologique en B avec le développement de phallopodies et de filaments correspondant aux NETs (Flèches). D'après Brinkmann et al.¹¹⁸

En effet l'activation monocyttaire en réponse à l'activation de l'inflammasome par les DAMPs est un levier important d'activation de la coagulation. Les monocytes produisent du facteur tissulaire, principale étape d'activation de la voie extrinsèque à l'origine des premières traces de thrombine puis de l'amplification de la coagulation.

Une autre voie majeure de l'activation du processus prothrombotique en réponse à la libération des DAMPs est l'activation leucocytaire et ses conséquences. L'activation des polynucléaires neutrophiles induit leurs réorganisations structurelles déclenchant la libération de neutrophiles extracellular traps (NETs). Les NETs correspondent à des structures en formes de toile faite d'ADN, d'histone, d'élastase et de myéloperoxydase initialement identifiées par leur capacité à piéger certains microorganismes pathogènes.^{117,118}

Depuis ces premières observations, plusieurs travaux ont démontré une action procoagulante de la NETose.¹¹⁹ En effet les NETs ont la capacité d'activer directement la voie du facteur XII,^{119,120} d'inhiber l'action du TFPI¹²¹ et de promouvoir l'adhésion plaquettaire.^{122,119} Par

cette action les NETs sont impliqués dans le phénotype prothrombotique observé dans les états septiques ou dans les agressions à risque de surexpression des DAMPS.

Dans le cas de l'ECMO la participation de cette voie dans la thrombinofomation sur les circuits n'est pas encore clairement établie. Par ailleurs l'on peut spéculer que la gravité initiale du patient avec une surexpression de DAMPS pourrait promouvoir une situation procoagulante indépendamment de l'ECMO. En cela l'activation de l'inflammation dans ce contexte peut majorer le risque thrombotique (Figure 11).

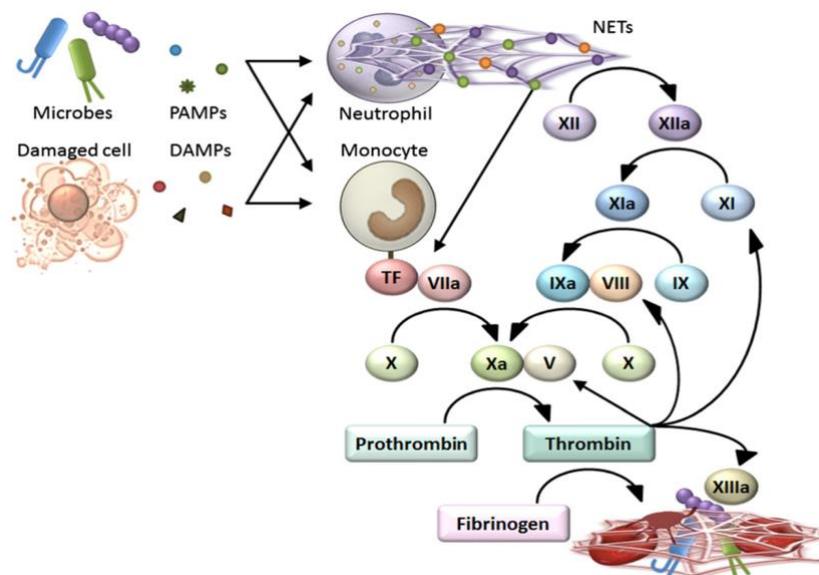


Figure 11. Interaction entre DAMPS/PAMS, NETose, libération de facteur tissulaire monocytaire et la génération de thrombine. D'après T. Ito¹²³

c) Activation de la voie du facteur XII

La voie du facteur XII (FXII) ou voie intrinsèque de la coagulation joue un rôle majeur dans l'activation de la coagulation dans le contexte du support par VA-ECMO. Cette voie également nommée « voie contact » est initiée par le clivage activateur du zymogène FXII (facteur Hageman) en FXII activé, cette dernière étant à l'origine de l'initiation d'une cascade protéolytique qui résulte en une action à la fois procoagulante et proinflammatoire.

L'utilisation de plusieurs modèles de souris K.O. à la fois pour le FXII et le facteur XI entre autres ont permis des avancées majeures dans la compréhension de cette voie.

Le FXII est un zymogène monocaténaire produit par les hépatocytes, dont l'activation protéolytique aboutie au FXIIa, protéine bicaténaire faite d'une chaîne lourde de 58 KD et d'une chaîne légère de 28 KD reliée par deux points disulfures. La description de chacune des deux chaînes est précisée par la Figure 12 ci-dessous.

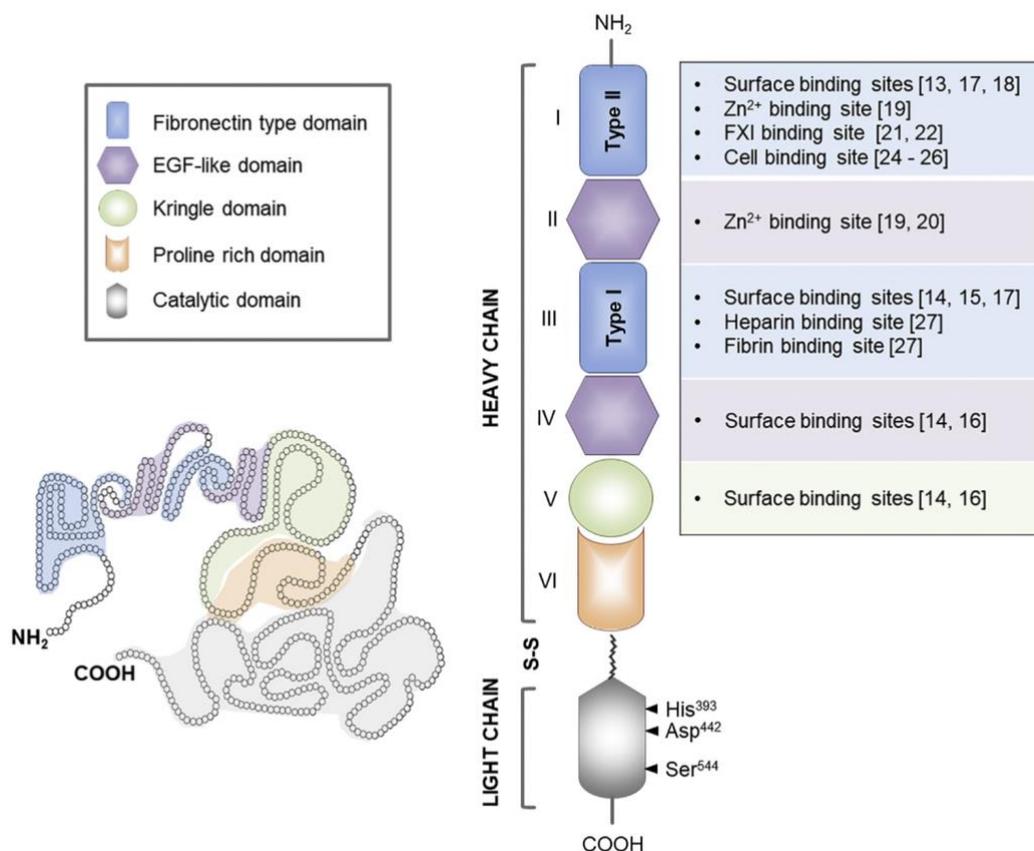


Figure 12. Structure de domaine de FXII et FXIIa d'après Naudin et al.¹²⁴

Le tableau de gauche représente la structure des différents domaines de FXII. Le tableau de droite montre la distribution des domaines dans la chaîne lourde et la chaîne légère du FXIIa. La chaîne lourde du FXIIa est constituée de six domaines : un domaine de fibronectine de type II, un domaine EGF-like, un domaine de fibronectine de type I, un second domaine EGF-like, un domaine kringle et une région riche en proline. La chaîne légère du FXIIa contient une triade catalytique His393-Asp442-Ser544. La chaîne lourde et la chaîne légère du FXIIa sont reliées l'une à l'autre par un pont disulfure (S-S). La chaîne lourde du FXIIa abrite les sites putatifs de liaison à la cellule et à la surface ainsi que les régions de liaison au Zn²⁺, au facteur XI (FXI), à l'héparine et à la fibrine. D'après Naudin et al.¹²⁴

Les coactivateurs classiques du FXII en FXIIa sont les surfaces et les protéines anioniques tels que les ARN, les endotoxines, les NETs, les PolyP plaquettaires, le collagène sous endothélial mis à nu, l'héparine excrétée et la phosphatidylsérine des cellules apoptotiques.

En présence de ces coactivateurs, ce facteur s'autoactive et clive le facteur XI (FXI) en FXI activée (FXIa), mais également la Prékalikréine en Kalikréine qui joue un rôle d'hétéroactivateur du FXII et amplifie son activation.¹²⁵

Les surfaces inertes des circuits d'ECMO à l'exemple des circuits de CEC sont riches en charges négatives et favorisent cette autoactivation du FXII. Quel que soit la modalité d'activation, le FXIIa en clivant le FXa en FXIa, aboutit à la formation d'un complexe activateur du facteur X ou complexe ténase comprenant les facteurs IX et VIII activés. Le facteur X ainsi activé s'associe au facteur V pour former le complexe prothrombinase qui active la prothrombine en thrombine, cette dernière va initier une action plurielle dont la phase critique est la protéolyse du fibrinogène en fibrine (Figure 13).

Parallèlement à cette activation de la coagulation, la voie contact active la prékalikréine plasmatique en kalikréine qui elle-même active le kininogène de haut poids moléculaire en bradykine. Il est à noter la possibilité de rétroactivation du FXII par la kalikréine. Cette voie est en lien avec l'activation de l'inflammation systémique et est dotée d'un système de régulation dont l'effecteur principal est une serpine spécifique, la C-estérase.¹²⁶

Dans le cadre de l'ECMO, l'interaction entre le sang circulant et les surfaces inertes est à l'origine de l'activation de la voie du FXII. Dans la conception actuelle, cette activation de la coagulation médiée par la voie contact justifie pour une grande part la nécessité d'une anticoagulation systématique chez les patients sous ECMO.

Des données animales suggèrent que l'inhibition de cette voie pourrait assurer une protection contre les complications thrombotiques tout en minimisant le surrisque hémorragique. Cette approche a également été testée dans le cadre de l'ECMO par Larsson et al. en utilisant avec succès un anticorps inhibiteur du FXII dans la prévention de complications thrombotiques en particulier ceux de l'oxygénateur.⁷⁸ Dans ce travail élégant, les auteurs ont étudié l'intérêt et le fonctionnement d'un anticorps monoclonal inhibiteur du FXII, le 3F7 et ont pu démontrer

l'action de cet anticorps sur le site de liaison enzymatique du FXII, son action inhibitrice sur l'activation du FXII in vivo et in vitro, et enfin son efficacité in vivo. Concernant ce dernier aspect, un modèle d'ECMO pédiatrique implanté chez le lapin était utilisé. L'efficacité comparée à celui de l'héparine non fractionnée était évaluée de façon quantitative par la mesure de TCA, du TP, de test de génération de thrombine, western blot et en microscopie électronique.⁷⁸ Ce travail montrait également l'efficacité de l'anticoagulation du circuit sans sur risque de complication hémorragique dans un contexte où la voie extrinsèque était préservée chez l'animal. Ces résultats offrent des perspectives d'applications cliniques dans la population des patients sous ECMO.

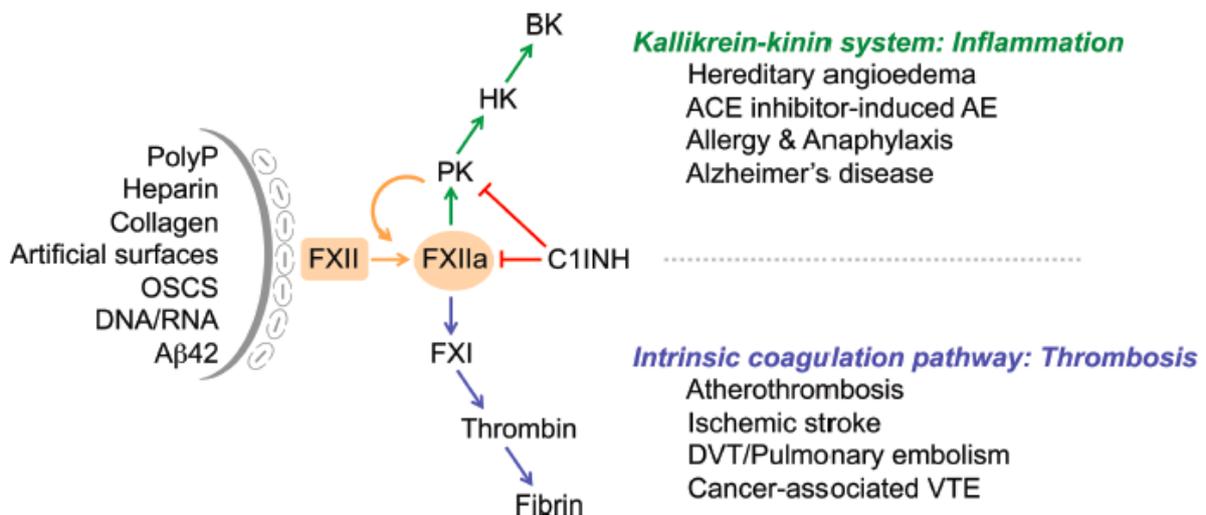


Figure 13. Activation de la voie intrinsèque de la coagulation et de l'inflammation facteur XII-dépendantes.¹²⁴

Par ailleurs, il est intéressant de noter que le déficit en FXII ne génère pas un profil hémorragique contrairement à celui du facteur XI. À l'inverse, le déficit en C1-estérase, serpine inhibitrice du FXII est associée à une surexpression de bradykine par l'activation excessive du système contact avec un retentissement clinique. En effet le déficit en C1-estérase se traduit par un état pro-inflammatoire biologique et une symptomatologie à type d'angioœdème pouvant atteindre diverses muqueuses, dont les voies aériennes hautes avec un pronostic sévère.

2. Activation plaquettaire dépendante des conditions de flux

Nous avons décrit plus haut l'importance de l'interaction intégrine GPIV/collagène dans l'activation plaquettaire en situation de contrainte de flux basse (<1000/s), et avons précisé le rôle de l'interaction entre la sous-unité GPIb α du complexe GPIb-IX-V et le VWF lorsque les contraintes de flux deviennent élevées (1000-10000/s).

Cette interaction est rendue possible par la liaison entre le VWF au collagène sous-endothélial qui conjuguée à l'effet elongationnel du flux artériel induisent un changement conformationnel du VWF. Le site de liaison de la sous-unité GPIb α sur le VWF est alors démasqué favorisant l'interaction VWF/GPIb-IX-V.

Les contraintes de flux supra physiologiques > 10 000/s comme celles observables sous ECMO-VA,³¹ peuvent aboutir à l'activation plaquettaire par l'interaction GPIb α /VWF sans que la VWF n'ait été préalablement liée au collagène sous-endothélial. L'élongation de la VWF dans ce contexte particulier expose plusieurs de ses domaines à l'action de leurs effecteurs ou leurs régulateurs respectifs. Dans le cadre de l'activation plaquettaire, le domaine A1 du VWF ainsi mis à nu interagit avec la sous-unité GPIb α et entraîne une activation plaquettaire.

3. Impact de l'hémolyse sur l'activation plaquettaire flux-dépendante

L'anémie hémolytique mécanique avec libération d'hémoglobine libre plasmatique est l'une des conséquences reconnues du traumatisme corpusculaire et protéique induit par l'ECMO.¹²⁷ Cette complication est associée à un pronostic défavorable sous ECMO.¹²⁸⁻¹³⁰ Plusieurs données récentes suggèrent que l'hémoglobine libre issue de l'hémolyse n'était pas qu'un simple produit de dégradation inactif, mais un régulateur de l'hémostase et de l'inflammation.¹³¹

L'hémoglobine libre par son action adsorption de l'oxyde nitrique (inhibiteur effectif de l'activation plaquettaire) va promouvoir l'activation plaquettaire.¹³¹

De plus, des données nouvelles démontrent que l'hémoglobine libre a la capacité de se lier au domaine A2 de la protéine de VWF suite à son élongation flux dépendent, phénomène largement observé sous ECMO.¹³² Il est actuellement reconnu que le domaine A2 du VWF participe à la régulation du domaine A1 dont le ligand est la sous unité plaquettaire GPIIb/IIIa. Dans cette perspective, Da et al. ont examiné la capacité de l'hémoglobine libre à se lier au domaine A2 du VWF et à moduler l'interaction VWF/GPIIb/IIIa.¹³⁶ Les auteurs ont observé que l'hémoglobine libre à des taux >50 mg/dL, taux régulièrement atteint chez les patients sous ECMO-VA, était associée à une augmentation de l'adhésion plaquettaire et de la thrombinoformation. Cette action était perdue lors d'une déplétion en VWF ou lors de l'utilisation d'un anticorps anti-GPIIb/IIIa ciblant la sous-unité GPIIb/IIIa, ce qui suggère un mécanisme médié par l'interaction VWF/GPIIb/IIIa. Ce travail suggère également la possibilité d'une interaction directe de l'hémoglobine libre avec le domaine A1, ce qui pourrait faciliter la liaison entre le domaine A1/GPIIb/IIIa.

4. Génération des anticorps anti-facteur 4 plaquettaire et conséquences cliniques

Le facteur plaquettaire 4 (ou CXCR4) est une chémokine contenue dans les granules plaquettaires et libérée par les granules alpha des plaquettes activées. Il s'agit d'une protéine cationique de 70 acides aminés ayant une forte affinité pour les glycosaminoglycanes dont elle lie les formations héparanes sulfates, favorisant ainsi l'agrégation plaquettaire¹³⁷. Elle possède une affinité encore plus élevée pour l'héparine dont elle neutralise les charges négatives et participe ainsi à promouvoir la thrombinoformation. Elle intervient également dans la modulation de l'inflammation et de la cicatrisation. Cette protéine peut être la cible d'anticorps neutralisant anti-PF4 qui peuvent être produits dans certains contextes cliniques.

La circulation extracorporelle appliquée à la chirurgie cardiaque est une de ces situations cliniques. Elle est associée à une incidence élevée d'anticorps anti-PF4 dont la capacité de neutralisation des PF4 reste méconnue tout comme leur impact clinique réel.¹³⁸ En effet, bien

que l'incidence des anticorps anti-PF4 avoisine les 70 % sous circulation extracorporelle pour chirurgie cardiaque, moins de 1 % des patients développent effectivement une TIH¹³⁸. Dans un travail rétrospectif multicentrique français qui avait inclus 5000 patients assistés par ECMO, l'incidence de la TIH n'était que de 0,4 %.¹³⁹

Il est montré que les anti-PF4 ont la capacité d'activer les plaquettes via le récepteur FcγRIIA.^{137,140} Ce faisant, ils participent à la génération du phénotype qui caractérise la TIH par l'induction de la génération de thrombine, de la thrombogènes et de l'apoptose plaquettaire par la voie de la calpaïne.

Ces anticorps anti-PF4 sont produits lorsque le rapport entre la concentration d'héparine et celui du PF4 approche 1 (0,7-1,4).¹⁴⁰ Le PF4 étant issue de l'activation plaquettaire, sa concentration dans le contexte de l'ECMO est élevée du fait de l'activation plaquettaire d'origine multiple. Le caractère immunogène et neutralisant des anticorps anti-PF4 est maximal lorsque la concentration > 50 µg/mL.¹⁴⁰ Dans l'analyse d'une cohorte de 20 patients assistés par ECMO-VA et retrouve une concentration de PF4 médian de 0,21 [0,12 -0,34] µg/mL au moment du pic qui survient dans les 48 premières heures. Le ratio PF4/héparine correspondant n'était que de 0,04 [0,02 - 0,06].¹⁴⁰ Ce résultat permet de mieux appréhender la dichotomie existante entre incidences élevées des anticorps anti-PF4 et la présence d'une TIH effective. Ainsi, il n'est pas exclu que les anticorps anti-PF4 aient une action délétère sur la survie et la fonction plaquettaire même en l'absence de TIH cliniquement et biologiquement confirmée.

5. Production de microparticules plaquettaires sous ECMO-VA

Les microvésicules (MV), encore dénommées microparticules ou exosomes, sont des particules circulantes dans le plasma dont le diamètre varie entre 100 à 1000 nm. Elles sont généralement issues de l'agression, de l'activation ou de l'apoptose de la plupart des cellules humaines. Les plaquettes et les cellules endothéliales et les monocytes sont les plus concernés

du fait de leurs positionnements comme fournisseur d'interfaces majeurs dans des phénomènes biologiques cardinaux que sont la coagulation et l'inflammation. Ces microvésicules endothéliales et plaquettaires ont la propriété de diffuser le phénotype prothrombotique et/ou proinflammatoire issu de l'activation de leurs cellules mères au-delà du site d'activation initial de ces dernières.

Peu de données existent à ce jour sur la production de microvésicules au cours de l'ECMO. Cependant les multiples voies d'activations plaquettaires et le traumatisme corpusculaire infligé par le régime de flux sous ECMO amènent à supposer une large expression de ces microvésicules. Dans ce cadre particulier, ces microvésicules pourraient être à l'origine de la dissémination du signal prothrombotique et proinflammatoire généré dans la circulation parallèle de l'ECMO vers la circulation systémique, et pourraient ainsi favoriser la survenue des complications thrombotiques cliniques. La confirmation de la présence de microvésicules plaquettaires sous ECMO a été apportée *in vitro* par les travaux de Meyer et al. dans un modèle d'ECMO utilisant du sang porcin.¹⁴¹ La concentration des microvésicules plaquettaires était mesurée en cytométrie en flux après marquage du GPIIb/IIIa plaquettaire par un anticorps anti-CD61 fixé au FITC. L'analyse quantitative était réalisée selon les recommandations en vigueur en utilisant des billes de comptage (Megamix, BioCytex, Marseille, France) et une stratégie de standardisation utilisant des calibrants en taille et en fluorescence.¹⁴² Les auteurs ont montré une concentration importante en MV et rapporté une variation de cette concentration en fonction du type de pompe utilisé. En effet les pompes centrifuges qui génèrent des hauts niveaux de contraintes de flux et de bio-traumatisme produisaient 2,5 fois plus de MV que les pompes péristaltiques. La concentration en MV n'était cependant, pas influencée par le type d'oxygénateur.

La présence d'une production importante de MV chez les patients sous ECMO en comparaison à une population de volontaires sains ont été rapportée dans une

population pédiatrique¹⁴³ et dans une cohorte de patients adultes.¹⁴⁴ Dans une étude récente, Siegel et al. ont précisé les caractéristiques de ces MV dans une population de patients présentant un choc cardiogénique de plusieurs étiologies différentes assistés par ECMO-VA, le groupe contrôle était des patients présentant un infarctus du myocarde constitué sans support circulatoire.¹⁴⁵ La charge globale en MV évaluée par un marquage à l'Annexine V (qui révèle le phénotype apoptotique), et 5 types de MV spécifiques à savoir leucocytaires, plaquettaires, endothéliaux, érythrocytaires et celles générées par les cardiomyocytes (caveolin-3) étaient étudiés par cytométrie en flux. Le pourcentage de MV plaquettaires, endothéliales, leucocytaires était plus important dans le groupe ECMO-VA alors que le pourcentage de MV cardiomyocytaires et érythrocytaires étaient plus importants dans le groupe infarctus du myocarde. De façon intéressante, ces MV pouvaient avoir une valeur pronostique, la concentration en MV Annexine V+ mesurée à J1 du support par ECMO-VA étant associée à la mortalité.¹⁴⁵

B. Anomalies biologiques pro-hémorragiques sous ECMO — VA

1. Syndrome de von Willebrand acquis

La protéine de von Willebrand est une glycoprotéine synthétisée par les cellules endothéliales et les mégacaryocytes dont les rôles physiologiques principaux sont l'hémostase primaire en facilitant l'activation plaquettaire en condition flux élevé et le transport de plusieurs protéines dont le facteur VIII. Une littérature de plus en plus fournie démontre le rôle majeur que joue cette protéine dans les complications observées sous assistance circulatoire de courte durée comme l'ECMO-VA ou de longue durée à l'exemple du HeartMate 3 (Abbott Cardiovascular).

Le gène codant pour la protéine de VWF est localisé sur le chromosome 12 (12p13.31). L'ARN messager mature issue de l'épissage de ce gène code pour un peptide monocaténaire de 2813 acides aminés comprenant un peptide signal, un propeptide et la forme mature de la protéine. Après l'adressage et l'élimination du peptide signal, le proVWF subit une série de modifications post-traductionnelles impliquant plusieurs de ses domaines caractéristiques aboutissant à une protéine multimérique. Les différents domaines de la proVWF ainsi que les zones de dimérisation (Intermonomer SS) puis de multimérisation (Interdimer SS) par la formation de pont disulfure sont décrites par la Figure 11. tirée des travaux de Zhou et *al.*¹⁴⁶

Le processus de multimérisation au sein de l'appareil de Golgi aboutit à la formation de multimères de poids moléculaires variables, puis d'un clivage du propeptide qui reste cependant rattaché à l'ensemble par une liaison non covalente. La forme mature de la protéine est stockée sous forme multimérique dans les corps de Weibel-Palade endothéliale ou dans les granules α des mégacaryocytes et des plaquettes.

Dans des situations à contrainte de flux élevée, les multimères de hauts poids moléculaires (MHPM) de VWF subissent un changement conformationnel qui se traduit par une élongation. Cette conformation expose le VWF à une mise à nu de plusieurs de ces domaines fonctionnels. La plupart des interactions avec les principaux domaines exposés induisent un fonctionnement spécifique tout en conservant le poids moléculaire de la protéine (Figure 14).

L'exposition du domaine A2 expose à une probabilité accrue au clivage des MHPM du VWF par l'ADAMTS13 résultant en une réduction de leurs poids moléculaires unitaires. Ce clivage se traduit par une altération des fonctions hémostatiques de cette protéine. Cette composante fonctionnelle de la VWF est évaluée en routine par le VWF activité cofacteur de la ristocétine ou de liaison du collagène. Et la visualisation et la quantification directe de la perte des MHPM sont quant à elles effectuées par électrophorèse.

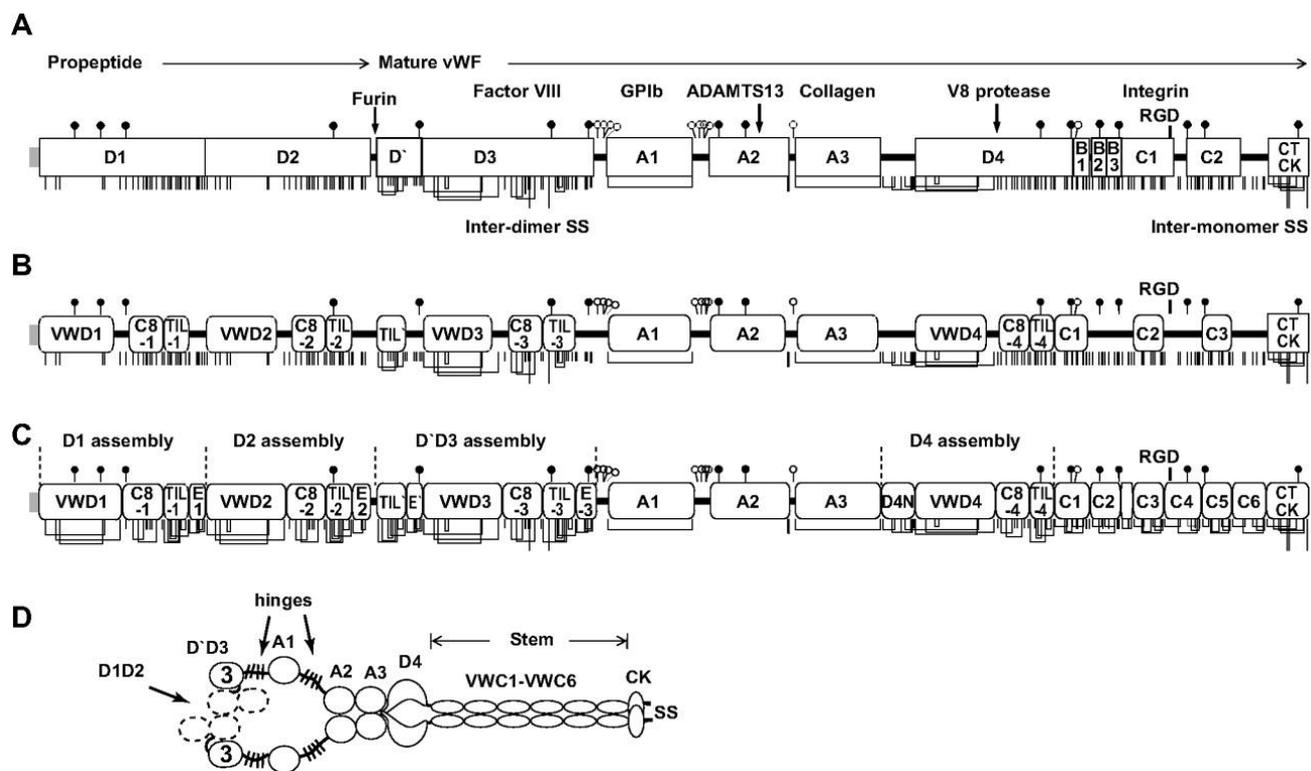


Figure 14. Description des différents domaines du VWF d'après Zhou et al.¹⁴⁶

Les cystéines sont représentées par des lignes verticales et sont reliées par des liaisons disulfures chimiquement définies. (A) Description des domaines couramment utilisés dans la littérature. (B) Annotation dans les bases de données de protéines selon les régions d'homologie de séquence. (C) Architecture des domaines attribuée dans l'étude de Zhou et al. Les liaisons disulfures supplémentaires proviennent de prédictions décrites par les auteurs dans leur publication. Les limites des assemblages D sont représentées par des lignes pointillées verticales. (D) Bouquets dimères à pH acide tels que trouvés dans le Golgi.

La perte de fonction hémostatique (VWF activité) alors que la concentration globale de VWF reste conservée (Fonction antigène), traduisant la protéolyse des MHPM sans anomalie de synthèse constitutionnelle définit le syndrome de VWF acquis (aVWS) (Figure 15).

Le modèle classique de l'aVWS est apporté par le syndrome de Heyde décrit en 1958¹⁴⁷, il associe la triade rétrécissement aortique serrée, hémorragique digestif et une anémie. La description initiale dans une série de 10 patients associait la sténose aortique et l'hémorragie digestive.

Depuis lors, les caractéristiques cliniques et biologiques de l'aVWS ont été largement étudiées à la fin du 20^e siècle.¹⁴⁸⁻¹⁵² L'association entre aVWS et la survenue d'une angiodysplasie à l'origine du saignement digestif a été évoquée par Warkentin et al.¹⁵³ et confirmé par

Veyradier et *al.*¹⁵⁴ L'implication des niveaux de contrainte de flux élevé dans la protéolyse du VWF a été rapporté quelques années plutôt par Tsai HM et *al.*¹⁰⁷ et le site de clivage des MHPM proposé quelques années plus tôt par Dent JA et *al.*¹⁴⁹ Le lien entre ces mécanismes et la clinique observée a été apporté par un travail pivot issu de notre équipe. Ce travail de Vincentelli A. et *al.* a permis d'associer sur le plan mécanistique la sévérité du rétrécissement aortique serrée au aVWS, à la perte des MHPM, la dysfonction plaquettaire ainsi que la restauration d'un phénotype non hémorragique en cas de correction chirurgicale effective du rétrécissement aortique. Une correction partielle était associée à une récurrence des anomalies initiales à 6 mois.¹⁵⁵

Dans le cadre des assistances circulatoires, Giesen et *al.* ont été les premiers à rapporter l'association entre ces dispositifs et la survenue de aVWS.¹⁵⁶ Cette équipe a également apporté la preuve que le déterminant principal est le niveau de contraintes de flux supra physiologiques généré par les assistances monoventriculaires gauches (LVADs) en comparant l'incidence de l'aVWS dans une population de patients assistés par des LVADs comparée à une cohorte de patients porteurs d'un cœur artificiel total à débit pulsatile et à faible contrainte de flux.¹⁵⁷

Si le clivage par l'ADAMTS13 semble être la principale cause de la perte des MHPM en condition de contrainte de flux élevée, d'autres travaux suggèrent également que la liaison plaquettaire flux dépendante au niveau du domaine A1 pourrait favoriser le clivage protéolytique de cette protéine.¹⁵⁸ Par ailleurs, d'autres protéases telles que la thrombine ou la plasmine¹⁵⁹ ou encore les protéases leucocytaires¹⁶⁰ pourraient participer au clivage des MHPM.

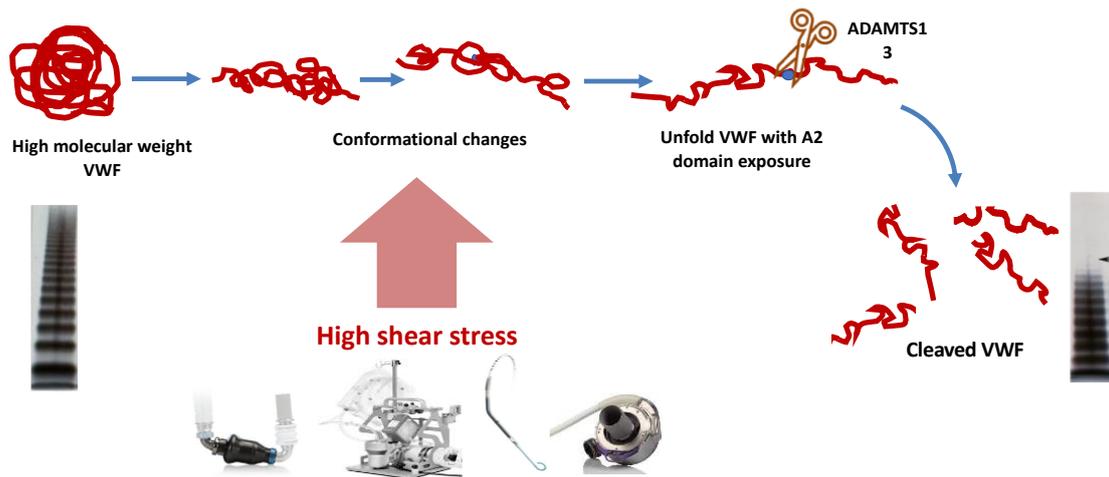


Figure 15. Description schématique du clivage des multimères de haut poids moléculaire de la protéine de VWF sous assistance circulatoire.

En ce qui concerne l'ECMO-VA, Heilmann C et *al.* furent les premiers à démontrer l'existence de l'aVWS dans cette population en cohérence avec leurs observations précédentes chez les patients bénéficiant d'un LVAD.^{90,16190} Dans une cette étude l'aVWS était confirmé la perte des MHPM en électrophorèse et un ratio VWF:CB/VWF:Ag abaissé chez 31 des 32 étudiées, le ratio VWF:RCo/VWF:Ag avaient une sensibilité moindre avec 28/32 patients montrant une baisse de ce ratio. Les anomalies observées étaient résolutive à la cessation du support par ECMO.⁹⁰ L'aVWS sous ECMO est fait l'objet de confirmation secondaire dans des populations mixtes de patients assistés par ECMO-VA et ECMO-VV.¹⁶²⁻¹⁶⁵ Le seuil de VWF:RCo/VWF:Ag <0,7 a été montré comme prédictif de l'aVWS dans cette population par le travail de Tauber et *al.*¹⁶⁴ L'intérêt éventuel de la supplémentation par du concentré de VWF se pose donc en cas de complications hémorragiques sous ECMO, les résultats disponibles sont limités et les travaux d'envergures sont en attente.¹⁶⁶ Mais le mécanisme de dégradation étant pérenne en présence de l'ECMO lors de l'administration de ces concentrés, il est peu probable que ceux-ci ne soient pas dégradés rapidement après leur administration. Une approche alternative basée sur la préservation de la pulsativité a été proposée par notre équipe et publiée par Vincent et *al.*¹⁶⁷ Dans cette étude qui reposait sur un modèle porcin, des pompes axiales Impella® étaient utilisées simultanément pour faire varier

le niveau de contraintes de flux et de pulsatilité artérielle résiduelle. La préservation puis la restauration d'une pulsatilité semblaient limitées la dégradation des MHPMs voir les restauraient partiellement. L'hypothèse était un relargage du VWF contenu dans les corps de Weibel Palade sous l'effet de la pulsatilité.

2. Thrombopénie sous ECMO-VA

La thrombopénie est une complication fréquente sous ECMO. Elle concerne plus de 20 % des patients assistés en fonction de la définition retenue. Ces thrombopénies seraient associées dans certains travaux à une augmentation du risque hémorragique et justifient dans les formes les plus sévères des transfusions plaquettaires. Ces transfusions exposent à un risque d'immunisation HLA qui chez les patients assistés en pont vers une transplantation pourrait réduire l'accès à un greffon compatible.

Les mécanismes connus de la thrombopénie sous ECMO-VA sont multiples, mais ne suffisent pas à expliquer l'ensemble des cas et la sévérité des défauts observés. Des données récentes suggèrent cependant un mécanisme indépendant du type d'ECMO et du niveau d'assistance.¹⁶⁸ Les causes évidentes sont les pertes corpusculaires liées aux complications hémorragiques, à l'hémodilution et à la consommation par l'adhésion sur les surfaces inertes du circuit d'ECMO une fois la phase contacte activée avec adsorption de fibrinogène.

Si la gravité générale des patients assistés par ECMO-VA peut expliquer une part de la thrombopénie observée à l'exemple des patients de réanimation non assistés, une implication directe de la circulation extracorporelle ne peut être exclue. En effet les thrombopénies observées sont en partie résolutive dès l'explantation de l'ECMO dans cette population de patient qui présente d'autres défaillances d'organe justifiant leur prise en charge réanimatoire. Une cause importante par son impact pronostique est la thrombopénie immuno-induite à l'héparine. Le diagnostic reste difficile, car les critères cliniques classiques s'appliquent difficilement à cette population.¹⁶⁹ Cette complication doit être suspectée devant une

thrombopénie profonde et persistante. La confirmation diagnostique est apportée par la présence d'anticorps anti-PF4 et une confirmation par un test à la sérotonine marquée.

3. Thrombopathie sous ECMO-VA

La dysfonction plaquettaire sous ECMO est illustrative de la compréhension parcellaire que nous avons des complications liées à l'hémostase et la coagulation sous ECMO. Dans une revue systématique de la littérature proposée par Jiritano F. et *al.* en juin 2020 dont la finalité est la synthèse des connaissances disponibles sur la fonction plaquettaire sous ECMO, sur les 21 publications sur plus 1700 sélectionnées, seule 7 rapportaient des données sur la fonction plaquettaire. La majeure partie de ces travaux était essentiellement descriptive et peu apportaient des données physiopathologiques nouvelles.¹⁷⁰ L'altération de l'agrégation plaquettaire étaient observée dans 5 études et une perte des récepteurs plaquettaires étaient décrite dans une seule étude.¹⁷⁰⁻¹⁷⁷

L'agrégation plaquettaires était étudiée la plus part du temps de façon fonctionnelle essentiellement par leur réponse à plusieurs antagonistes sur la plateforme de l'analyseur Multiplate® (ADP, Thrombine Receptor Activator Peptide (TRAP), éphédrine, cyclooxygénase, ristocetine, collagène ou éphédrine).¹⁷¹⁻¹⁷⁴ Dans une approche plus précise grâce à utilisation de la cytométrie en flux, Lukito et *al.*¹⁷⁸ ont pu démontrer une perte des récepteurs GPIIb/IIIa et GPVI plaquettaire chez les patients sous ECMO en comparaison à une cohorte de volontaires sains.¹⁷⁵ Cette perte des récepteurs GPIIb/IIIa est en cohérence avec l'augmentation des formes solubles circulantes de ce même récepteur également décrit dans la littérature.¹⁷⁹ Ces résultats font également écho à l'observation de la perte de l'ectodomaine du récepteur GPIIb/IIIa sous LVAD à flux continue antérieurement rapporté.¹⁷⁷

Par ailleurs, une perte du CD63 (granulophysine, traduisant la fusion des granules dense avec la membrane plaquettaire) et de la P-Selectine ont également été décrites.¹⁷⁶

L'ensemble de ces anomalies concourent à définir la thrombopathie observée sous ECMO

4. Anémie sous ECMO-VA

L'anémie est une complication fréquente sous ECMO-VA. Elle traduit à la fois l'agression corpusculaire à l'origine de l'hémolyse, une hémodilution, les conséquences des saignements fréquents sous ECMO. Un autre déterminant majeur de l'anémie est la gravité intrinsèque du patient en rapport avec le syndrome inflammatoire systémique.

L'anémie est généralement décrite en tant que conséquence passive du support par ECMO ou pour son intérêt critique dans la baisse de la délivrance en oxygène aux tissus périphériques. Elle participe activement à favoriser certaines complications pouvant favoriser l'hémorragie sous ECMO.

Il est important de noter que l'anémie favorise la transition du flux sanguin d'un régime laminaire vers un régime turbulent. Or, la présence ce régime de flux semble indispensable pour que les modifications conformationnelles et fonctionnelles des MHPM de la VWF en condition de contraintes de flux supra physiologiques soient observées.¹⁸⁰

En rhéologie, la viscosité est un déterminant majeur du régime de flux observé. Le sang est un fluide non newtonien fluidifiant ce qui traduit la dépendance de sa viscosité au temps et sa décroissance en fonction du taux de cisaillement. Cette caractéristique est principalement liée aux propriétés de déformabilité, de filtrabilité et d'agrégation des érythrocytes donc de l'hématocrite.^{181,182} En déterminant en grande partie le profil du flux de l'écoulement sanguin, les érythrocytes influencent le comportement des autres corpuscules sanguines.¹⁸¹ Ainsi, l'anémie est associée à une réduction de la margination endothéliale des plaquettes, une réduction de la biodisponibilité du NO avec un impact clinique directe. Ces modifications peuvent se traduire par un surrisque hémorragique.¹⁸³

L'allongement du temps de saignement en contexte anémique malgré un compte plaquettaire normal est connu de longue date.¹⁸² Plusieurs travaux suggèrent un rôle prothrombotique des érythrocytes, fonction qui serait réduite en cas d'anémie. Ainsi, les érythrocytes peuvent

formés des co-aggrégats avec les plaquettes à faible contraintes de flux.¹⁸⁴ De plus en produisant de l'ADP, de l'ATP et de la thromboxane A₂, ils promeuvent l'agrégation plaquettaire.¹⁸⁵ Ils interviennent dans l'architecture du caillot en modifiant la structure du réseau de fibrine, en favorisant la concentration locale du facteur XIII¹⁸⁶ au sein du caillot et participent à son imperméabilisation, sa contraction et à sa stabilisation.^{187,188} Des données récentes montrent que les érythrocytes, à l'exemple de plaquettes, exprime à leurs surfaces la phosphatidylsérine offrant de surface d'ancrage supplémentaire au motif GLA des sérines protéines de la coagulation.¹⁸⁹ Cette propriété peut être disséminer par la production de microvésicules procoagulantes recouvert de phosphatidylsérine.^{189,190} Il faut noter que la production de ce phospholipide n'est observée qu'en condition pathologique et/ou à des concentration élevées d'érythrocytes.^{191,192} Enfin les érythrocytes tendent vers une agrégations spontanée en condition d'hyperfibrinogénémie.^{193,194} Il est cependant à noter que ces mécanismes ne sont pas encore spécifiquement valider dans la population de patients sous assistance circulatoire.

5. Hypofibrinogénémie sous ECMO-VA

L'hypofibrinogénémie est démontrée être associée à un risque hémorragique après chirurgie cardiaque. Dans ce contexte, sa correction dès une baisse <1,5 g/L (voir dès 2 g/L) a fait l'objet de recommandations par plusieurs sociétés savantes. L'incidence de cette complication est imparfaitement décrite dans la population de patient assisté par ECMO de façon générale et encore moins dans chez le patient sous ECMO-VA. Dans un travail monocentrique qui portait sur une cohorte hétérogène de patients assistés par ECMO-VA, un seuil de fibrinogène abaissé était identifié comme un facteur de risque de saignement majeur d'après la définition de l'ELSO.⁵⁶

Le mécanisme de l'hypofibrinogénémie sous ECMO est multifactoriel, cela en lien avec une consommation accrue et/ou une perte relative ou effective. La principale cause de

consommation de fibrinogène est l'activation de la phase contact sur le circuit inerte de l'ECMO qui aboutit à l'adsorption du fibrinogène sur les surfaces inertes puis à son hydrolyse en fibrine. L'adsorption des protéines plasmatique avec au premier plan le fibrinogène survient dès les premières minutes du contact sang – surface inerte.¹⁹⁵ Cette consommation est majorée par l'activation de la phase externes grâce à la production de facteur tissulaire issue de l'activation monocytaires en réponse à l'activation de la voie de la phase contact.^{196,197}

La consommation de fibrinogène est donc d'autant plus importante que l'anticoagulation est défaillante et qu'un revêtement de surface est appliqué sur le circuit extracorporel.

À l'exemple de l'anémie ou de la thrombopénie, l'hémodilution liée au priming et à la balance hydrique positive pourrait également réduire la concentration de fibrinogène dans cette population. Enfin le saignement, complication fréquente sous ECMO est à l'origine de la spoliation en fibrinogène (à l'exemple des autres facteurs) et à l'origine d'une activation de la coagulation au site de l'agression vasculaire.

6. Tissue Factor Pathway Inhibitor et ECMO-VA

Le Tissue factor inhibitor pathway (TFPI) est une serpine présente sous deux types TFPI α and TFPI β chez l'homme à la suite d'épissage alternatif au niveau de la traduction de son gène. Le TFPI est pourvu de 2 domaines inhibiteurs de sérine protéase K1, K2 active sur le facteur VIIa et le facteur X. L'isoforme TFPI α possède un troisième domaine K3 liant la protéine S, ce qui permet d'amplifier son activité protéolytique du facteur X.¹⁹⁸

Alors que la voie extrinsèque et sa régulation sont peu explorées dans les mécanismes associés à la coagulopathie liée à l'ECMO, un travail récent de Mazzeffi et *al.* amène à reconsidérer l'implication de cette voie dans ce phénomène chez les patients sous ECMO-VA.¹⁹⁹ En effet ces auteurs rapportent pour la première fois une surexpression du TFPI chez les patients sous ECMO comparative à un groupe contrôle de patients non assistés. Cette surexpression était associée à un allongement du lag time du test de génération de thrombine.

Aucune explication mécanistique n'est apportée par ce travail descriptif, mais ses résultats suggèrent une probable implication du TFPI dans la coagulopathie liée à l'ECMO-VA.

7. Coagulation intravasculaire disséminée

Bien plus rare dans les étiologies cardiogéniques d'assistance par ECMO-VA, il s'agit d'un contributeur plus fréquent de l'état d'hypercoagulabilité chez les patients assistés par ECMO-VV ou l'étiologie initiale est souvent un sepsis. Dans ce cadre la coagulation intravasculaire disséminée préexiste à l'assistance par ECMO.²⁰⁰ De rares cas de CIVD ont été rapportés chez des patients assistés par ECMO-VA dans un contexte peri-partum.²⁰¹ La problématique ici est que la part d'une réelle CIVD est difficile à dissocier des conséquences de la coagulopathie induite par l'ECMO-VA.

IV. Thérapeutiques antithrombotiques utilisées sous ECMO-VA

A. L'héparine non fractionnée

L'héparine non fractionnée représente l'anticoagulation de référence dans la prévention des complications thrombotiques chez le patient assisté par ECMO. Il s'agit d'un polysaccharide dont l'effet anticoagulant est obtenu par l'amplification de l'activité de l'antithrombine sur la thrombine lors de sa liaison, et de son effet sur le facteur X.

L'utilisation de l'anticoagulation par héparine non fractionnée est consensuelle dans la plupart des centres pratiquant l'assistance par ECMO. Cette stratégie est confortée par les recommandations de l'ELSO et a pour principal objectif la limitation de l'activation de la coagulation par la voie du facteur XII. Le choix de l'HNF est empirique par translation des pratiques existantes en chirurgie cardiaque avec circulation extracorporelle. Si cette pratique est soutenue par une forte expérience clinique de plusieurs années de pratiques, plusieurs questions concernant son efficacité et la sécurité de son utilisation se posent.

En effet l'usage de ce traitement ne prévient suffisamment la survenue des complications thrombotiques évaluée à plus de 30-50 % en considérant les séries autopsiques.^{82,83} Cette anticoagulation est utilisée alors que le taux de complications hémorragiques atteint 40 à 80 % chez les patients assistés par ECMO-VA.^{45,48,91,202} Par ailleurs ce traitement expose à un risque non négligeable de thrombopénie immuno-induite à l'héparine. De plus, il existe une forte hétérogénéité dans les pratiques concernant les doses utilisées, les outils de suivi de l'efficacité et de la sécurité et des seuils d'efficacité à utiliser. Enfin l'efficacité de l'HNF dépend de la concentration en Antithrombine et justifie en cas de déficit sensible une supplémentation potentiellement coûteuse. Il est important de noter que l'utilisation de seuil, une baisse d'anticoagulation voire l'arrêt de l'HNF chez le patient assisté par ECMO-VA sera associé à une réduction des complications hémorragiques sans majoration des complications thrombotiques.¹

Peu d'alternatives à l'HNF existent pour chez les patients sous ECMO, parmi ces rares molécules la bivaluridine et l'arganova sont les molécules les plus matures et disponibles pour un usage clinique.

B. La bivaluridine

La bivaluridine est un oligopeptide analogue de l'hirudine possédant une action anti-IIa directe.²⁰³ L'indication habituelle de cette molécule chez les patients sous ECMO est la survenue d'une TIH en remplacement de l'héparine non fractionnée. Dans cette indication, le profil de sécurité et d'efficacité de cette molécule a été démontré. La facilité de son utilisation et ses propriétés pharmacodynamiques ont amené plusieurs auteurs à s'interroger sur son intérêt en tant qu'anticoagulation de première ligne hors TIH. En effet la bivaluridine offre une action anti-IIa directe et n'expose pas à une activation plaquettaire ou un risque de TIH comme l'HNF.²⁰⁴

Ranucci et *al.* ont étudié l'intérêt de la bivalirudine dans une population de patients assistés par ECMO-VA en postcardiotomie et retrouvaient une supériorité de la bivaluridine en termes de réduction des complications hémorragiques et de réduction de la consommation en produits sanguins labiles et en antithrombine. Un travail rétrospectif plus récent retrouvait même une réduction de la mortalité chez les patients traités par bivaluridine.²⁰⁵ Ces résultats favorables sont corroborés par des travaux dans la population de patients pédiatriques,²⁰⁶ et confirmés partiellement dans une métaanalyse récente de Ma M., et *al.*²⁰⁷ Plusieurs écueils subsistent cependant. Le risque d'accumulation en cas d'insuffisance rénale sévère est non négligeable et l'absence d'antidote interpelle même si la demi-vie de la molécule est courte. Par ailleurs le coût associé à la prescription de la bivaluridine reste élevé en considérant le coût direct de la molécule en comparaison à l'HNF.

C. L'Argatroban

L'argatroban est un anti-IIa direct de courte demi-vie positionnée dans l'arsenal thérapeutique actuelle comme une alternative à l'HNF en cas de TIH. Les données disponibles qu'en a son usage en alternative à l'héparine non fractionnée sont limitées. Cependant le profil pharmacologique particulier amène à le considérer comme une alternative valable à l'anticoagulation par HNF. Il s'agit d'un dérivé de la L-arginine inhibiteur spécifique, directe et réversible de la thrombine circulante comme celle liée au caillot. Elle possède une demi-vie courte et a l'avantage de pouvoir lyser la thrombine libre et celle liée au caillot contrairement à l'HNF. Cette dernière particularité le rend particulièrement intéressant dans le contexte de l'ECMO-VA où la pression thrombotique reste importante malgré une anticoagulation systémique. A l'exemple de la bivaluridine, elle ne possède pas d'antidote spécifique. Il existe un risque d'accumulation et de surdosage associé à cette molécule en cas d'insuffisance hépatocellulaire, amenant à des ajustements de dose.

Objectifs de la thèse

L'assistance circulatoire par ECMO-VA pour choc cardiogénique réfractaire est grevée par la survenue de complications thrombotiques et hémorragiques dont la caractérisation clinique et la compréhension physiopathologique sont parcellaires.

L'analyse de la littérature permet de confirmer l'existence d'un phénotype hémostatique particulier chez le patient sous ECMO génériquement appelée « coagulopathie » liée à l'ECMO, avec des particularités en fonction du type d'ECMO. Cette anomalie de la coagulation liée à l'ECMO est d'origine multifactorielle, la compréhension de sa physiopathologie est encore limitée et les données disponibles à ce sujet restent le plus souvent que descriptives. Les connaissances actuelles permettent cependant d'affirmer qu'elle implique l'activation de la coagulation par la voie contact, des anomalies induites par les contraintes de flux supra physiologiques liées à l'ECMO-VA, la nature et la gravité de la pathologie initiale.

Malgré l'existence de ce phénotype particulier, une anticoagulation prophylactique reste d'usage eut égard au risque thrombotique associé à l'activation du facteur XII sur les surfaces inertes de l'ECMO-VA. Ce recours à l'anticoagulation ne permet pas d'exclure complètement la survenue de complications thrombotiques sur le circuit, l'oxygénateur et/ou chez le patient.^{48,208} Par ailleurs, la nature de l'anticoagulant utilisée reste empirique, choisie par analogie à celle utilisée en chirurgie cardiaque et par l'expérience accumulée sur l'efficacité et l'innocuité relative de l'héparine non fractionnées (HNF). Dans ce contexte de phénotype hémostatique particulier lié à l'ECMO-VA et de la fréquence élevée des complications hémorragiques, cette stratégie d'anticoagulation interroge.

La première des deux problématiques de cette thèse est donc la persistance du risque de complications thrombotiques malgré l'usage des thérapeutiques prophylactiques actuelles,

l'anticoagulation systémique et la biocompatibilisations par le revêtement des surfaces des circuits d'ECMO-VA. La seconde est la persistance d'un surrisque hémorragique imparfaitement caractérisé au cours des assistances par ECMO-VA.

Le premier axe de ce travail de cette thèse, l'axe thrombose, a donc pour objectif la caractérisation des mécanismes associés à la thrombinoformation sous ECMO afin d'en déduire une stratégie clinique antithrombotique rationnelle à même de réduire l'incidence des complications thrombotiques. Deux travaux ont été réalisés dans ce sens :

- Une première étude qui porte sur la caractérisation clinique et histologique détaillée de la composition des thrombi extraits de circuits d'ECMO-VA.
- Une seconde étude qui compare l'efficacité des revêtements de surface à base d'héparine à celle à base de phosphorylcholine, les plus utilisés en routine clinique, sur la survenue de complications thrombotiques, l'évolution des paramètres biologiques d'intérêt, la composition des thrombi et sur la mortalité.

Le second axe de cette thèse est l'axe hémorragie. La problématique identifiée la pauvreté voir l'absence de données descriptives et pronostiques portant sur la complication liée à l'hémostase dans la population homogène de patients assistés par ECMO-VA périphérique. En effet, l'analyse de la littérature montre que nos références actuelles concernant les complications hémostatiques reposent sur des travaux effectués dans des populations très hétérogènes en termes d'étiologies d'assistance, de configurations et de modalités de support (ECMO-VA et ECMO-VV, ECMO central et périphérique, *etc.*). Ainsi aucune étude ne décrit précisément les complications liées à l'hémostase dans une population homogène de patients assistés par ECMO-VA périphérique. Concernant les complications hémorragiques, au-delà de l'hétérogénéité ses données disponibles, se pose la question d'une stratification

cliniquement et scientifiquement pertinente de leurs sévérités. La définition de l'hémorragie majeure proposée par l'ELSO, qui fait référence à ce jour dans cette population est empirique, non issue d'une cohorte de dérivation et encore imparfaitement validée.

En réponse à ces observations, nous avons retenu comme objectifs de cet axe, l'analyse descriptive et pronostique des complications hémorragiques dans une population homogène de patients assistés par ECMO-VA pour choc cardiogénique, la proposition d'une définition cliniquement pertinente de l'hémorragie majeure et l'identification de ces facteurs de risque éventuel. Dans cette perspective, nous avons conduit une troisième étude clinique qui répond à chacun de ces objectifs.

Travaux de l'axe thrombose

I. **Manuscrit 1: Thrombus formation during ECMO : Insights from a detailed histological analysis of thrombus composition**²⁰⁹

Authorship

Senna Staessens^{1,2 *}, **Mouhamed D. Moussa**^{2 *}, Adeline Pierache³, Antoine Rauch², Natacha Rousse², Eric Boulleaux², Alexandre Ung², Linda Desender¹, Bénédicte Pradines², André Vincentelli², Olaf Mercier⁴, Julien Labreuche³, Alain Duhamel³, Eric Van Belle², Flavien Vincent², Annabelle Dupont², Karen Vanhoorelbeke¹, Delphine Corseaux², Simon F. De Meyer¹ and Sophie Susen²

1 Laboratory for Thrombosis Research, KU Leuven Campus Kulak Kortrijk, Kortrijk, Belgium

2 Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1011- EGID, F-59000 Lille, France

3 ULR 2694-METRICS (Evaluation des technologies de santé et des pratiques médicales), University of Lille, Centre Hospitalier Universitaire Lille, Lille, France

4 Research and Innovation Laboratory, INSERM U999, Marie Lannelongue Hospital, Paris Sud Saclay University, Le Plessis Robinson, France.

***These authors contributed equally to the article**

Valorisation

Travail publié dans Journal of Thrombosis and Haemostasis

Impact factor 2021 : 16,036

Rang : co-premier auteur

A. Résumé du Manuscrit 1

Caractéristiques histologiques des thrombi issus des circuits d'ECMO-VA

Introduction

Les complications thrombotiques demeurent fréquentes chez les patients sous ECMO-VA malgré l'utilisation d'une héparinothérapie systémique dont le choix est empirique sans support mécanistique solide. La compréhension de la formation des thrombi sur ces circuits, encore parcellaire, est donc nécessaire afin de mieux orienter le choix des stratégies d'anticoagulation prophylactiques et curatives sous ECMO.^{210,211}

L'objectif de cette étude est de décrire de façon extensive les caractéristiques histologiques des thrombi issus des circuits d'ECMO-VA et de rechercher leurs particularités en fonction de leurs localisations.

Matériel et méthodes

Nous avons collecté au cours de l'année 2018 les circuits d'ECMO issus de 25 patients consécutifs après leurs ablations pour un changement de circuit, un sevrage de l'ECMO ou un décès. Les données cliniques, les stratégies d'anticoagulation et les variables biologiques liées à l'hémostase des 7 jours précédant l'explantation de l'ECMO-VA étaient recueillies.

Les thrombi recueillis étaient immergés dans une solution de PBS et conservés entre 2 et 8 °C pour une durée maximale de 48 heures. Une analyse macroscopique et morphologique (taille, poids, coloration) des caillots était réalisée avant fixation dans la paraffine.

L'analyse histochimique reposait sur les colorations Hematoxyline/Eosine et Martius Scarlet Blue (Fibrine et érythrocytes). Elle était complétée par une analyse immunohistochimique ciblant le facteur Von Willebrand (VWF), les plaquettes (CD42b), les polynucléaires neutrophiles (CD66b et l'élastase), les « Neutrophil extracellular traps » (H3Cit). Les lames

issues des colorations étaient digitalisées puis l'intensité des colorations était quantifiée (logiciel ImageJ 1.49V) après exclusion des artefacts (logiciel Adobe Photoshop®).

Analyse statistique

En complément de l'analyse bivariée, une analyse en cluster hiérarchique était réalisée afin d'identifier des caractéristiques communes permettant de déterminer des groupes homogènes de thrombi. Cette analyse reposait sur 4 des paramètres histologiques quantifiés (érythrocytes, fibrine, plaquettes, VWF). Les groupes identifiés étaient comparés en fonction des locations d'intérêt sur l'ECMO (tête, oxygénateur, circuit). Une valeur de $p < 0,05$ était significative.

Résultats

Sur les 25 circuits collectés, 85 thrombi étaient extraits et retenus pour l'analyse histologique. La répartition du nombre de thrombi par localisation était de 23, 25 et 37 respectivement sur la tête de pompe, l'oxygénateur et les jonctions de tubes. Les proportions de patients ayant un thrombus sur la tête de pompe, l'oxygénateur et le circuit étaient respectivement de 19 (76 %), 16 (64 %), 23 (92 %).

Compositions des thrombi analysés

À l'analyse macroscopique, les thrombi avaient des dimensions variables avec un poids médian de 40,3 (23.7 to 113.7) mg, une taille médiane de 16 (9 to 30) mm et de coloration variable. Après analyse histochimique et immunohistochemique, les principaux composants des thrombi étaient en proportions variables les érythrocytes, les plaquettes, la fibrine et le VWF. Le marquage H3Cit était lui plus rarement retrouvé.

L'analyse en cluster hiérarchique mettait en évidence deux types de thrombi, l'une érythrocytes prédominants (Cluster 1) et la seconde pauvre en érythrocytes et riche en fibrine

(Cluster 2). L'analyse de la composition des thrombi en fonction de la localisation sur le circuit d'ECMO retrouvait une prédominance de marquage H3Cit sur les thrombi issues l'oxygénateur et de la tête de pompe comparativement à ceux issus du tube. On notait une tendance non significative à une prédominance de marquage érythrocytaire sur l'oxygénateur comparativement aux autres localisations. La répartition des deux types de clusters était similaire en fonction de la localisation de l'ECMO. La cinétique de la leucocytose et du LDH des 6 jours précédents l'ablation de l'ECMO montrait un compte plus élevé dans le cluster 2.

Conclusion, cette étude rapporte pour la première fois la forte implication du VWF et de la fibrine, et celle plus limitée des NETs dans la thrombino-formation au niveau des circuits d'ECMO-VA. Elle démontre également le caractère complexe et hétérogène des thrombi formés sous cette assistance circulatoire mécanique. Ces résultats ouvrent la voie à plusieurs questionnent la pertinence des stratégies antithrombotiques actuelles qui repose sur héparine non fractionnée.

Thrombus formation during ECMO: Insights from a detailed histological analysis of thrombus composition

Senna Staessens^{1,2} | Mouhamed D. Moussa² | Adeline Pierache³ | Antoine Rauch² | Natacha Rousse² | Eric Boulleaux² | Alexandre Ung² | Linda Desender¹ | Bénédicte Pradines² | André Vincentelli² | Olaf Mercier⁴ | Julien Labreuche³ | Alain Duhamel³ | Eric Van Belle² | Flavien Vincent² | Annabelle Dupont² | Karen Vanhoorelbeke¹ | Delphine Corseaux² | Simon F. De Meyer¹ | Sophie Susen²

¹Laboratory for Thrombosis Research, KU Leuven Campus Kulak Kortrijk, Kortrijk, Belgium

²Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1011-EGID, Lille, France

³ULR 2694-METRICS (Evaluation des technologies de santé et des pratiques médicales), University of Lille, Centre Hospitalier Universitaire Lille, Lille, France

⁴Research and Innovation Laboratory, INSERM U999, Marie Lannelongue Hospital, Paris Sud Saclay University, Le Plessis Robinson, France

Correspondence

Sophie Susen, Heart and Lung Institute, Hemostasis Department, Bd du Pr Leclercq, CHU Lille, 59037 Lille cedex, France.
Email: sophiesusen@aol.com

Funding information

Agence Nationale de la Recherche, Grant/Award Number: WILL-ASSIST HEART ANR-17-RHUS-0011; KU Leuven, Grant/Award Number: ISP/14/02L2 and PDM/20/147

Abstract

Objectives: Intra-device thrombosis remains one of the most common complications during extracorporeal membrane oxygenation (ECMO). Despite anticoagulation, approximately 35% of patients develop thrombi in the membrane oxygenator, pump heads, or tubing. The aim of this study was to describe the molecular and cellular features of ECMO thrombi and to study the main drivers of thrombus formation at different sites in the ECMO circuits.

Approach and Results: Thrombi ($n = 85$) were collected immediately after veno-arterial-(VA)-ECMO circuit removal from 25 patients: 23 thrombi from the pump, 25 from the oxygenator, and 37 from the tubing. Quantitative histological analysis was performed for the amount of red blood cells (RBCs), platelets, fibrin, von Willebrand factor (VWF), leukocytes, and citrullinated histone H3 (H3Cit). ECMO thrombi consist of a heterogenous composition with fibrin and VWF being the major thrombus components. A clustering analysis of the four major histological parameters identified two typical thrombus types: RBC-rich and RBC-poor/fibrin-rich thrombi with no significant differences in VWF and platelet content. Thrombus composition was not associated with the thrombus location, except for higher amounts of H3Cit that were found in pump and oxygenator thrombi compared to tubing samples. We observed higher blood leukocyte count and lactate dehydrogenase levels in patients with fibrin-rich thrombi.

Conclusion: We found that thrombus composition is heterogenous, independent of their location, consisting of two types: RBC-rich and a fibrin-rich types. We also found

Senna Staessens and Mouhamed D. Moussa contributed equally to the article.

Manuscript handled by: Keith Neeves Final decision: Keith Neeves, 10 June 2022

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

© 2022 The Authors. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* published by Wiley Periodicals LLC on behalf of International Society on Thrombosis and Haemostasis.

that NETs play a minor role. These findings are important to improve current anticoagulation strategies in ECMO.

KEYWORDS

ECMO, fibrin, histology, NETs, thrombosis, thrombus composition

1 | INTRODUCTION

Extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) provides temporary mechanical support to the heart, lung, or both in patients with cardiovascular and/or respiratory failure in the neonatal, pediatric, and adult population. The use of adult ECMO has considerably expanded during the past 2 decades and has become a valuable lifesaving therapy in critical care medicine. During ECMO support, blood is drained from the vascular system, circulated outside of the body by a mechanical pump, oxygenated, and decarboxylated using an oxygenator before it is reinfused into the patient's circulatory system.^{1,2}

Despite increasing experience, systemic anticoagulation and recent advances in ECMO technologies, device thrombosis is the most common source of technical complications during ECMO treatment. Indeed, in a recent ELSO registry analysis, it was shown that 17.2% of ECMO-supported patients experience thrombotic events of which the majority are related to intra-device thrombosis.³ Intra-device thrombosis can lead to decreased oxygenation and decarboxylation of the patient's blood, increased flow resistance, hemolysis, and embolic complications.^{1,4} This often results in equipment malfunctioning and circuit loss, necessitating elective or full system replacements, which are high-risk procedures. In fact, Lubnow et al. found that acute thrombosis of the oxygenator or blood pump is responsible for more than one-third of ECMO system exchanges.⁴ Furthermore, ECMO-induced thrombosis greatly affects patient outcomes, further emphasizing the relevance of understanding the underlying drivers of thrombosis in ECMO circuits.^{1,5} The exact mechanisms of in-device thrombus formation remain, indeed, poorly understood and involve different critical factors including long-lasting contact of blood with foreign bio-artificial surfaces, low flow zones and turbulences in connectors and high shear forces that prime the activation of platelets, leukocytes and the coagulation system.^{6,7}

In patients undergoing ECMO, adequate antithrombotic strategies are key to maintain circuit patency and to prevent thrombotic complications. Current anticoagulation strategy in ECMO mainly focuses on the use of unfractionated heparin (UFH) as a first-line therapy, with or without aspirin or other antiplatelet therapy.^{1,8,9} However, despite the release of anticoagulation guidelines by the Extracorporeal Life Support Organization (ELSO) in 2014,¹⁰ large variations still exist among ECMO centers, also including the use of direct thrombin inhibitors or single/dual antiplatelet therapy.^{8,11} An additional challenge is the increased risk of bleeding when using systemic anticoagulation during ECMO.^{1,2,12}

To date, little is known about the composition and architecture of thrombi formed in the different components of the ECMO circuit.

Essentials

- Intra-device thrombosis is a common complication in extracorporeal membrane oxygenation (ECMO).
- Little is known regarding the composition and main drivers of ECMO thrombus formation.
- ECMO thrombi are heterogenous, independent of their location, consisting of two thrombus types.
- The findings are important to improve anticoagulation and device modifications in ECMO.

NOVELTY AND SIGNIFICANCE

What Is Known?

- Despite anticoagulation, intra-device thrombosis remains one of the most common complications during extracorporeal membrane oxygenation (ECMO)
- Thrombi typically form in the blood pump, the membrane oxygenator and in the circuit's tubing
- This often results in equipment malfunctioning which necessitates hazardous elective or full system exchanges

What New Information Does this Article Contribute?

In contrast to previous studies, this study performed a detailed qualitative and the first quantitative histological description of veno-arterial (VA)-ECMO thrombi to better understand the underlying drivers of thrombus formation during ECMO. The study's main findings are that VA-ECMO thrombi consist of a heterogenous composition with fibrin and von Willebrand factor (VWF) being the main components. Using a novel unbiased clustering analysis for the main thrombus components (red blood cells, fibrin, platelets, and VWF), we identified two distinct thrombus types: (1) RBC-rich, fibrin-poor thrombi and (2) RBC-poor, fibrin-rich thrombi. Intriguingly, these thrombus types are not associated with the respective location of the thrombus within the device, but are associated with the leukocyte count further underscoring a role for immunothrombosis in ECMO. NETs are more frequent in pump and oxygenator thrombi. These results provide novel insights into the architecture and composition of these complication-causing ECMO thrombi, which are important to further improve current anticoagulation strategies (e.g., combination therapy) and device modifications in ECMO.

Clearly, better understanding of ECMO thrombus specimens could help to better understand the mechanisms leading to intra-device thrombosis and thus could be useful to improve current antithrombotic regimens and to develop safer ECMO technologies. The aim of this study therefore was to collect, analyze, and describe the most important molecular and cellular features of ECMO thrombi collected from different sites in ECMO circuits.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Patients

This study is ancillary to the WITECMO-H trial (NCT 03070912) multicenter study conducted in the intensive care units of the Lille University Hospital. The WITECMO-H trial was approved by the French National Ethic Review Committee (CPP No. 2017-A00256-47) and written informed consent was obtained from patients, their person of trust, or their next of kin, whomever was available first at the inclusion. From November 2017 until May 2019, consecutive adult patients aged 18 years and older referred to the intensive care unit for an ECMO were considered for inclusion in the WITECMO-H trial.

To limit the heterogeneity between patients in this ancillary study, we only included patients supported with a veno-arterial ECMO (VA-ECMO). This specific patient selection will exclude the ECMO type as a potential confounding variable (veno-venous vs. VA-ECMO). Patients were prospectively and consecutively considered for inclusion in case of VA-ECMO circuit change or removal during the study period and if thrombi extraction and fixation were feasible in the 48 following hours. The histological substudy started in 2018 after 2 months of feasibility of thrombi collection from November to December 2017. Clinical variables recorded include anthropometric data, comorbidities, and clinical management data. Characteristics of VA-ECMO support and course were also recorded (i.e., etiology of shock, peripheral or central cannulation, the type of circuit and oxygenator, the reason of ECMO weaning or circuit change, the duration of support and outcome).

2.2 | ECMO types and management

During the study period, centrifugal pump-based ECMO systems (Rotaflow [Maquet Gentige group], Revolution [LivaNova Group], Centrimag [Thoratec], or Biomedicus Bio-pump X 80 [Medtronic]) were used in combination with heparin-coated or phosphorylcholine-coated polyvinyl chloride tubing and a hollow fiber membrane oxygenator (Quadrox [Maquet Gentige group], Eos ECMO [LivaNova Group], or A.LONE ECMO [Euroset]) ventilated with an oxygen-air blender (Sechrist Industries). All cannulations were performed in the femoral vein and femoral or subclavian. Weaning modalities were recovery from initial disease, bridge to heart transplantation, temporary/long-term ventricular assist devices, or death. Weaning for recovery was considered for recovery when the aortic velocity time integral >10 to 12 cm/s despite lowering ECMO flow to minimal for

30 min, with no or reduced inotropic support. ECMO bridging to heart transplantation or long-term ventricle assist devices was considered after 5–7 days of support according to patients' conditions. Circuit change was considered by the attending physician in case of clinical suspicion of circuit thrombosis, breakdown of oxygenator performance, or severe hemolysis.

2.3 | Anticoagulation and transfusion management

In all patients, anticoagulation was initiated at the cannulation with a bolus of 100 IU/kg of UFH followed by a continuous infusion, adapted to obtain a target anti-factor Xa activity of 0.2–0.4 IU/ml with a monitoring of UFH performed according to the ELSO guidelines.¹⁰

2.4 | Thrombotic deposit collection, processing, and histology

Immediately after collection, each circuit was drained of its blood content and filled with 1000 ml of NaCl 0.9% solution. Thereafter, the NaCl 0.9% solution was removed and the whole ECMO circuit was inspected for thrombi. All pump heads, oxygenators, and circuit junctions isolated from the circuit were mechanically opened and were evaluated for the presence of thrombi. Identified thrombi were gently removed, kept in a phosphate buffered saline solution at 4°C for a maximum 48 h before fixation.¹³ Importantly, filling of the circuit was performed according to previous studies^{14,15} and does not alter the composition of ECMO thrombi as investigated during the feasibility study (November–December 2017). Furthermore, no clear signals were seen as to washing out of red blood cells (RBCs; main concern) from the thrombus. For each thrombus, a macroscopic photograph was taken and thrombus location in the circuit as well as thrombus shape, size, weight, and color were recorded. Thrombus color was scored as dark/red/brown, pink/mixed, or white. To fixate, retrieved thrombi were incubated in 4% paraformaldehyde for 24 h at room temperature, subsequently embedded in paraffin and sectioned into 5- μ m sections. One section per thrombus, exposing a large cross-sectional area of the entire thrombus and with a good tissue quality (e.g., limited amount of tissue folds), was used for every staining as this method allows for a representative measurement (as demonstrated in stroke thrombi).¹⁶

As previously described,^{17,18} thrombus sections were stained with hematoxylin and eosin and with Martius Scarlet Blue (fibrin [dark pink/red], RBCs [yellow], and collagen [blue]). In addition, immunohistochemical stainings were performed for platelets (GPIb α , MA5-11642, Invitrogen), von Willebrand factor (VWF; A008202-, Dako) and citrullinated histone H3 (H3Cit, ab5103, Abcam). For immunohistochemical staining procedures, nucleated cells were stained using a Methyl Green solution (H-3402, Vector Laboratories) and negative controls were obtained by omitting the primary antibody or by using isotype-matched primary antibodies (Figure S1). Isotype controls were performed by incubating a section with the respective isotype of

the primary antibody (polyclonal rabbit IgG isotype control antibody [910801, Biolegend] for VWF and H3Cit or a monoclonal mouse IgG1k isotype control antibody [401402, Biolegend]) for platelets to confirm the absence of aspecific binding of the primary antibodies to the tissue. A more detailed description of all histological methods is provided in the Online Supplementary Methods.

2.5 | Quantification of histological components

Stained thrombus sections were digitized using a slide scanner (Axio Scan Z1, Zeiss or Nanozoomer SQ, Hamamatsu Photonics). Images were exported at an 5x resolution using Zen Blue Edition version 3.1 (Zeiss) or NDP view2 (Hamamatsu). Next, background noise surrounding the thrombus section (e.g., dust particles, air bubbles) was removed using Adobe Photoshop CS5 to prevent noise-derived false-positive signals in the quantification. Histological stainings were examined using color segmentation and planimetric analysis to quantify the areas staining positive for fibrin (dark pink/red), RBCs (yellow), platelets (purple), VWF (purple), and H3Cit (purple) using ImageJ software 1.49v (National Institutes of Health, Bethesda, MD; <http://imagej.nih.gov/ij/>). For each staining, one section per thrombus was used for quantification.

2.6 | Statistical analysis

Categorical variables are presented as frequencies (percentage). Continuous variables are presented as medians (interquartile range). Normality of distributions was assessed using histograms and the Shapiro-Wilk test. Based on the non-normal distribution of the histological parameters, we assessed the correlations between the histological parameters by calculating Spearman rank correlation. To classify ECMO thrombi in different homogeneous groups, a principal component analysis and a hierarchical clustering analysis were performed. Four histological parameters (RBCs, fibrin, platelets, and VWF) were

considered for a cluster analysis. The cluster analysis was based on the k-means method, in which similarity between individuals is measured using the usual Euclidian distance. We performed several analyses with different numbers of clusters, and the optimal number was determined by consensus among three statistical properties: local peaks of the cubic cluster criterion, pseudo F, and R2 (ratio between inter-cluster variation and total variation). The distribution of the four parameters were compared between the two clusters (Mann-Whitney *U* tests), and represented after standardizations (z-scores), on a radar graph. A χ^2 test was used to assess whether the two clusters were associated with the respective location in the ECMO device. Comparisons of histological parameters with the respective location in the ECMO device were done using Kruskal-Wallis tests. Finally, the biological parameters assessed at six times (1, 2, 3, 4, 5 and 6 days) were compared between the two clusters using linear mixed models for longitudinal data (an unstructured covariance pattern model to account for the correlation between repeated measures within the same ECMO thrombi) with baseline values, times, clusters, and interaction between times and clusters as fixed effects. The overall effect of clusters (taken into account the heterogeneity in evolution) was assessed using likelihood ratio test. Adjusted means values of biological parameters were obtained from linear mixed model using the least-squares means values. Statistical testing was conducted at the two-tailed α -level of 0.05. Data were analyzed using SAS software package, release 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA) for all statistical tests except for the hierarchical clustering analysis where R (version 3.6.2, R Core Team) was used.

3 | RESULTS

3.1 | Patient population and thrombus collection

During the study period, a total of 29 ECMO circuits from 25 patients were collected at the time of ECMO explantation either for a circuit change or for weaning. A flow chart is given in Figure 1. Of

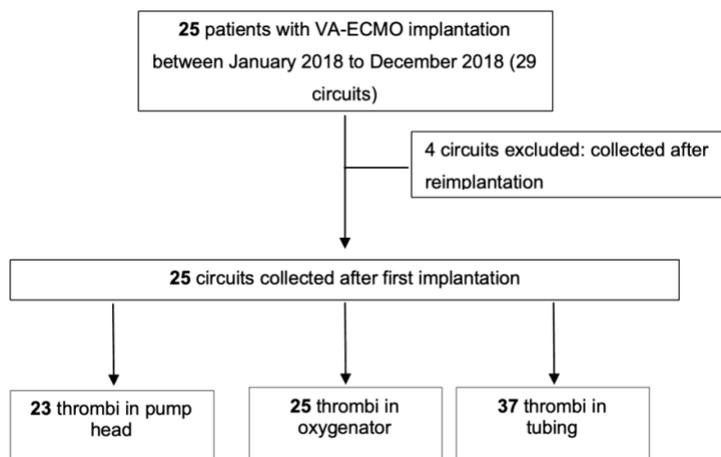


FIGURE 1 Study flow chart

those 29 circuits, four collected after reimplantation were excluded because only the first collected circuit from every patient is kept for analysis. We collected a median of three thrombi (interquartile range, 2–4) per circuit. A total of 85 thrombi were collected from these circuits, of which 23 thrombi originated from the pump head, 25 from the oxygenator, and 37 from the tubing. The demographic, clinical, and ECMO characteristics of the patient cohort are shown in Table 1. Fourteen patients (56%) were male. Hypertension (36%), chronic heart failure (52%), and/or coronary artery disease (40%) were the most frequent risk factors. Postcardiotomy accounted for the largest proportion of reason for ECMO support.

3.2 | Thrombus composition

To better understand the composition and potential mechanisms involved in thrombosis during VA-ECMO, all intra-device thrombi were macroscopically and histologically analyzed. Thrombi were highly heterogeneous in size, weight, and color. They had a predominate red or mixed color (combinations of red, white, and pink) (Table 2). Figure 2 shows representative images of all the histological staining procedures. In general, RBCs and fibrin are interspersed throughout ECMO thrombi (Figure 2), suggesting spatial segregation (most likely via clot contraction) of RBC, fibrin, and platelets into separate areas. Leukocytes (blue nuclei on hematoxylin and eosin staining) are not frequently present in ECMO thrombi (Figure S2A). VWF was found dispersed throughout both the RBC-rich areas and fibrin/platelet-rich areas (Figure S2B,C). Higher magnifications of the H3Cit staining indicate the presence of cellular and extracellular staining patterns (Figure 2D). A characteristic circular morphology was observed in some thrombi formed around the pump shaft and occurred in 9/23 (39.1%) of pump thrombi (Figure 2). Interestingly, higher magnification of this circular thrombi indicates a homogeneously stained yellow RBC-rich area in which the morphology of individual RBCs is lost (Figure 2E), whereas individual RBCs can be identified in other ECMO thrombi (Figure 2F). This suggests the presence of hemolyzed RBCs because the RBC morphology was lost but the specific yellow RBC staining was still present. Moreover, histological examination of these circular thrombi again suggests the spatial segregation (most likely mediated via clot contraction) of fibrin, platelets, and VWF to the thrombus periphery.

Quantification was performed to determine the relative contribution of RBCs, fibrin, platelets, VWF, and H3Cit for all thrombi via color segmentation and planimetric analysis. The color of thrombi was significantly associated with its composition, the content of RBC was the highest in dark to red thrombi whether the content of platelets was the highest in white thrombi, as expected (Table S1). As shown in Table 2, the amounts of the different components span wide ranges with fibrin and VWF being the major components, followed by platelets, RBCs, and smaller amounts of citrullinated histones.

To determine whether an association exists between the histological parameters, we performed a correlation analysis (Table 2).

TABLE 1 Clinical characteristics and thrombus load of the patient population

	Histologically analyzed patients (n = 25)
Demographics	
Age (years), median (IQR)	51 (47–67)
BMI ^a , median (IQR)	25.7 (21.9–30.1)
Male gender, n (%)	14 (56.0)
Comorbidities and chronic medical illness, n (%)	
Hypertension	9 (36.0)
Diabetes	7 (28.0)
Stroke	3 (12.0)
Chronic obstructive pulmonary disease	5 (20.0)
Atrial fibrillation	7 (28.0)
Chronic heart failure	13 (52.0)
Coronary artery disease	10 (40.0)
Chronic kidney disease	3 (12.0)
Venous thromboembolism	2 (8.0)
Thrombophilia	2 (8.0)
Neoplasia	2 (8.0)
Reason for ECMO support, n (%)	
Dilated cardiomyopathy	6 (24.0)
Myocardial infarction	3 (12.0)
Postcardiotomy	11 (44.0)
Pulmonary embolism	1 (4.0)
Cardiac arrest	1 (4.0)
Others	3 (12.0)
ECMO parameters	
ECMO circuit duration, days, median (IQR)	7 (3–9)
P2Y12 before ECMO, n (%)	1 (4.0)
P2Y12 during ECMO, n (%)	3 (12.0)
AAS, n (%)	22 (88.0)
Anticoagulation, n (%)	23 (92.0)
Pumps heads, n (%)	
Rotaflow (Maquet)	13 (52.0)
Revolution (Livanova)	10 (40.0)
Centrimag (Thoratec)	1 (4.0)
Biomedicus (Medtronic)	1 (4.0)
Oxygenators, n (%)	
Quadrox (Maquet)	12 (48.0)
Eos ECMO (Livanova)	10 (40.0)
A.L.ONE ECMO (Euroset)	3 (12.0)
Patients with thrombi per device location, n (%)	
Pump	19 (76.0)
Oxygenator	16 (64.0)
Tubing	23 (92.0)

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

	Histologically analyzed patients (n = 25)
Oxygenator type in patients with oxygenator thrombi, n (%)	
Quadrox (Maquet)	11 (68.75)
Eos ECMO (Livanova)	2 (12.5)
A.L.ONE ECMO (Euroset)	3 (18.75)
Pump type in patients with pump thrombi, n (%)	
Rotaflow (Maquet)	8 (42.1)
Revolution (Livanova)	10 (52.6)
Centrimag (Thoratec)	0 (0)
Biomedicus (Medtronic)	1 (5.3)
Ablation type, n (%)	
Change	7 (28.0)
Definitive ablation	18 (72.0)
Cause of system change, n (%)	
Thrombosis	2 (28.6)
Other ^b	5 (71.4)
Cause of definitive ablation, n (%)	
Death	1 (5.5)
Recovery	14 (77.8)
Heart transplantation	1 (5.6)
Ventricular assist device (LVAD/ BIVAD)	2 (11.1)

Abbreviations: AAS, acetylsalicylic acid; BIVAD, biventricular assist device; BMI, body mass index; ECMO, extracorporeal membrane oxygenation; IQR, interquartile range; LVAD, left ventricular assist device.

^a5 missing values.

^bOther: oxygenator failure, hemolysis, severe thrombocytopenia.

For the amounts of fibrin, a moderately inverse correlation exists with RBCs ($r = -.51$) and a weak positive correlation exists with VWF ($r = .24$) and H3Cit ($r = .24$). Platelets are weakly positively correlated with VWF ($r = .33$) and H3Cit ($r = .26$) and VWF is weakly positively correlated with H3Cit content ($r = .29$).

3.3 | Clustering analysis of thrombosis composition

We performed a hierarchical clustering analysis to identify potential subgroups of thrombi that are similar based on their composition (amounts of RBCs, fibrin, platelets, and VWF), without any a priori assumption. H3Cit was not included in this clustering analysis because it is a minor component in the majority of thrombi. Interestingly, the clustering analysis revealed two types of thrombi, as shown in Figure 3. Cluster 1 ($n = 24$) was mainly characterized by lower amounts of fibrin and higher amounts of RBCs, whereas thrombi in cluster 2 ($n = 61$) were fibrin-dominant and contained smaller amounts of RBCs. The histological composition of both clusters is given in Figure 3B and Table S2. Of note, a small overlap (<25%) in fibrin-composition of both clusters can be found

TABLE 2 Macroscopic and histological characteristics of ECMO thrombi

Macroscopic characteristics of ECMO thrombi (n = 85)	
Thrombus length ^a (mm), median (IQR)	16 (9–30)
Thrombus weight (mg), median (IQR)	40.3 (23.7–113.7)
Thrombus color ^b , n (%)	
Dark/red/brown	35 (42.2)
Pink/mixed	35 (42.2)
White	13 (15.6)
Histological parameters, median (IQR)	
RBCs (%)	11.8 (4–35.6)
Fibrin (%)	36.7 (18.9–58.6)
Platelets (%)	15.6 (6.8–36.9)
VWF (%)	24.4 (5.3–34.6)
H3Cit (%)	3.2 (1.2–5.4)

Abbreviations: ECMO, extracorporeal membrane oxygenation device; IQR, interquartile range; RBC, red blood cell; VWF, von Willebrand factor.

^a3 missing values.

^b2 missing values.

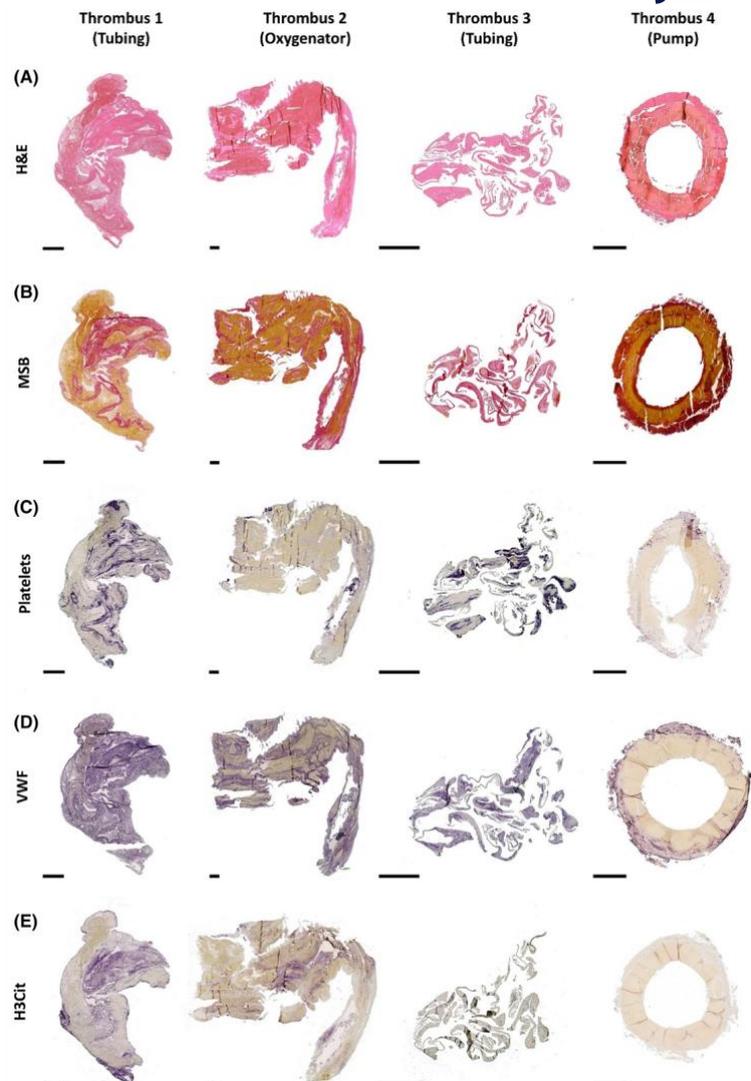
(Figure 3B). This overlap, however, does not influence the identification into two clusters because of the use of multiple histological parameters in concertation. Different thrombi from one patient are not necessarily similar in composition as approximately one half of the patients (44%) generated both thrombus types, whereas 4% of patients only had cluster 1-type thrombi and 52% of patients only cluster 2-type thrombi.

Clinical characteristics were well balanced according to the type of thrombus (Table S4). RBC-poor/fibrin-rich cluster 2-type thrombi were associated with higher blood leukocyte count ($p < .0001$) and higher lactate dehydrogenase (LDH) levels ($p < .001$) during the first 6 days of ECMO (Figure 4), but not with other clinical parameters (platelet count, hemoglobin level, aPTT, prothrombin time, fibrinogen, free hemoglobin, and anti-Xa activity).

3.4 | Thrombus composition versus thrombus location

Local differences in fluid dynamics could promote different thrombotic mechanisms, leading to the formation of thrombi that differ in cellular and biochemical makeup. When analyzing thrombus according to the different type of colors observed, we did not observe a significant relation with location (Table S1). Furthermore, we did not find a significant difference between RBC, fibrin, platelet, and VWF content or the two thrombi cluster-types and the respective location within the device (Table 3). H3Cit content was significantly

FIGURE 2 Examples of histologically stained ECMO thrombi. Thrombus sections were stained with (A) H&E to visualize overall thrombus composition and organization and (B) MSB to identify RBCs (yellow) and fibrin (dark pink/red). Immunohistochemical stainings were used to identify (C) platelets (CD42b; purple), (D) VWF (purple), and (E) H3Cit (purple). Examples of ECMO thrombi are shown in A-D, illustrating a broad heterogeneity in composition. Thrombus 1 consists of a mixed RBC/fibrin, platelet-poor and VWF-rich content containing a large H3Cit positive area. Thrombus 2 is a RBC/VWF-rich and fibrin/platelet/poor thrombus containing a small H3Cit positive area. Thrombus 3 is a RBC/platelet-poor, fibrin/VWF-rich thrombus containing little to no H3Cit. Thrombus 4 is a circular shaped, RBC-rich, and platelet/fibrin/VWF-poor thrombus containing no H3Cit positive signal. Scale bar: 1 mm (A-E). CD42b, cluster of differentiation 42b; ECMO, extracorporeal membrane oxygenation; H&E, hematoxylin and eosin; H3Cit, Citrullinated histone H3; MSB, Martius Scarlet Blue; RBCs, red blood cells; VWF, von Willebrand factor.



higher in the pump and oxygenator thrombi compared to the tubing thrombi ($p = .01$; [Table 3](#)). Taken together, these data indicate that major ECMO thrombus components are not associated with the respective location of the collected thrombus.

4 | DISCUSSION

Intra-device thrombosis remains an important challenge during ECMO. In this study, we performed a detailed histological examination of 85 thrombi collected from VA-ECMO circuits and provide a detailed qualitative and the first quantitative description of VA-ECMO thrombus composition with regard to the amount

RBCs, fibrin, platelets, VWF, and H3Cit. Our main findings are that VA-ECMO thrombi have a heterogenous composition, with fibrin and VWF as the major thrombus components. Second, we identified two histological thrombus types: (1) fibrin-poor, RBC-rich thrombi and (2) fibrin-rich, RBC-poor thrombi. Finally, the overall thrombus composition including thrombus types was not associated with the respective location, although we found higher amounts of H3Cit in the pump and the oxygenator compared to the tubing.

The macroscopic evaluation of ECMO circuits in this study reveal a considerable thrombus load at various locations within the device. These results are to some extent in line with a report by Hastings et al., illustrating that ECMO thrombi are predominantly located at

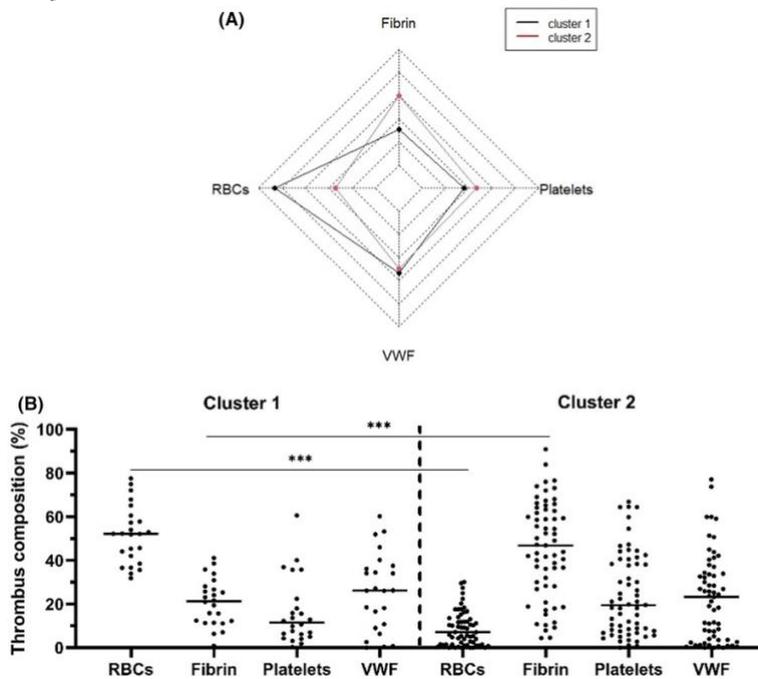


FIGURE 3 Hierarchical clustering identifies two histological cluster types. Hierarchical clustering analysis was performed using the quantitative histological RBC, fibrin, platelets, and VWF data. (A) Two histological cluster types were identified. (B) Cluster 1 ($n = 24$) was mainly characterized by significantly lower amounts of fibrin and higher amounts of RBCs compared with cluster 2, whereas thrombi in cluster 2 ($n = 61$) were fibrin-dominant and contained smaller amounts of RBCs compared with cluster 1. VWF and platelet content does not significantly differ between the two cluster types. RBCs, red blood cells; VWF, von Willebrand factor.

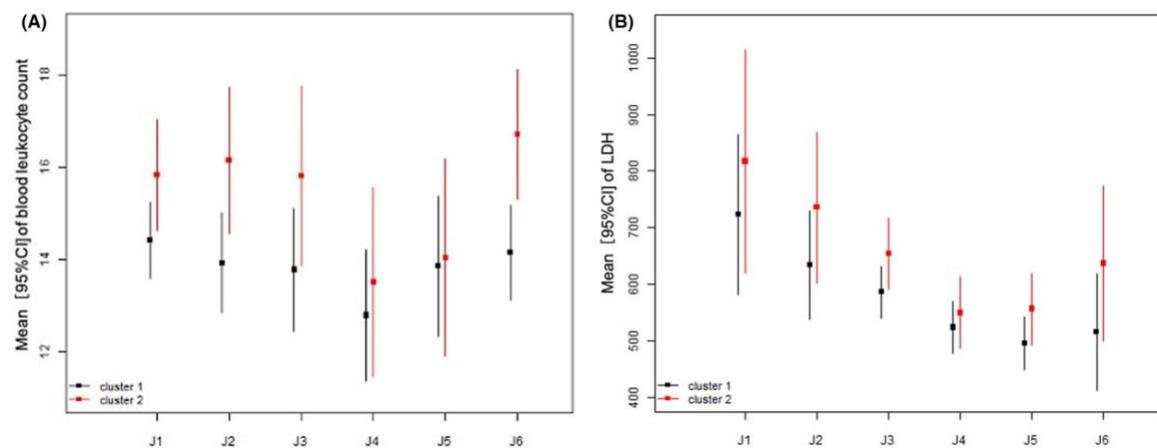


FIGURE 4 Blood leukocyte counts and LDH levels according to the two cluster-type thrombi. Using a linear mixed model including cluster and cluster*time interaction (to account the possibility of different evolution), in comparison to RBC-rich cluster 1-type thrombi (black), RBC-poor/fibrin-rich cluster 2-type thrombi (red) were associated with (A) significantly higher blood leukocyte counts ($p < .001$) and (B) significantly higher LDH levels ($p < .001$) during the first 6 days of ECMO support by comparison to RBC-rich cluster 1-type thrombi (black). LDH, lactate dehydrogenase; RBC, red blood cell.

tubing junction connectors and the pre-membrane side of oxygenators.¹⁴ In addition, our study also reveals the presence of pump thrombotic deposits in the majority of patients.

The exact mechanisms of in-device ECMO thrombosis remain poorly understood. Yet, only few studies investigated the composition of ECMO thrombi.^{14,15,19} These reports mainly focused on the descriptive analysis of ECMO thrombi in a pediatric population, in particular RBC, fibrin, platelets, and VWF content, and will

be compared with our findings throughout the discussion.^{14,15,19} Various elements are thought to contribute to ECMO thrombus formation, and good understanding of this multifactorial thrombogenicity can help design better therapeutic prevention strategies and circuit technologies. The continuous perfusion of blood over a large nonbiological surface, together with sites of high shear stress, particularly in the pump, remains a risk for thrombotic complications in ECMO. These conditions provoke activation of the platelets,

TABLE 3 Analysis of thrombus composition/cluster and thrombus location

Thrombus components (%), Median (IQR)	Thrombus location			Significance (p value)
	Pump (n = 23)	Oxygenator (n = 25)	Tubing (n = 37)	
RBCs	7.2 (1.2–42.0)	18.4 (10.3–52.2)	10.4 (2.5–22.4)	.070 ^a
Fibrin	36.6 (20.8–63.3)	30.0 (10.8–58.6)	40.0 (24.2–54.5)	.26 ^a
Platelets	26.3 (9.0–40.6)	12.8 (4.0–24.8)	15.9 (7.1–30.1)	.27 ^a
VWF	30.0 (10.8–42.2)	18.6 (3.7–34.3)	23.3 (2.6–34.0)	.24 ^a
H3Cit	4.2 (1.1–7.4)	4.1 (2.2–13.6)	1.8 (0.8–4.0)	.011^a
Thrombus cluster, n (%)	Pump (n = 23)	Oxygenator (n = 25)	Tubing (n = 37)	Significance (p-value)
Cluster 1 (n = 24)	7 (30.4)	9 (36.0)	8 (21.6)	.37 ^b
Cluster 2 (n = 61)	16 (69.6)	16 (64.0)	29 (78.4)	

Note: Significance level is $p < .05$. Bold values highlight the results that are statistically significant.

Abbreviations: RBCs, Red blood cells; VWF, von Willebrand factor; H3Cit, Citrullinated Histone H3; IQR, Interquartile range.

^aKruskall-Wallis test.

^b χ^2 test.

leukocytes, and coagulation factors, leading to fibrinogen deposition and surface-adherent clot formation.

We found that the major components of ECMO thrombi are fibrin and VWF. One of the possible reasons that fibrin is an important constituent is most likely related to the initiation of thrombus formation within the device. Exposure of blood to a nonbiological surface leads to immediate absorption of plasma proteins such as fibrinogen to the surface of these biomaterials, leading to the activation of the contact pathway.^{6,20} Moreover, also tissue factor-expressing monocytes potentially contribute to fibrin formation by receptor-mediated binding to the absorbed fibrinogen, resulting in tissue-factor pathway activation.^{21,22} This is further corroborated by the consumption of fibrinogen in these ECMO patients.^{14,23,24} Interestingly, in our data, fibrin deposition seems to occur despite anticoagulation therapy with UFH, raising an interesting perspective regarding the effectiveness of heparin in an ECMO setting.

VWF-mediated thrombus formation could provide another explanation as to why heparin is unable to prevent in device thrombotic complications. VWF mediates platelet adhesion to surface-absorbed fibrin(ogen) under conditions of high shear stress.^{25,26} In addition, with 18% of ECMO-treated patients having hemolytic complications, free hemoglobin has also been shown to enhance VWF-mediated platelet adhesion, followed by subsequent platelet activation and aggregation.^{12,27} Although VWF is abundantly present, it should also be noted that VWF might mainly act as a scaffold for platelets, RBCs, and fibrin. On the other hand, VWF has also been shown to contribute to the complex duality between bleeding and thrombosis in ECMO patients. Indeed, as a result of high shear stresses, the partial or complete loss of high molecular weight VWF leads to acquired von Willebrand syndrome in ECMO patients.^{28–30} Our results also show that platelets are an important constituent of almost all thrombi, independent of their location, suggesting that platelets, at least in part, might have contributed to thrombus formation in the

ECMO circuit, which is in line with previous reports that show the presence of platelets in ECMO thrombi.^{15,19}

Using an unbiased clustering analysis approach, we were able to identify two specific thrombus clusters: an RBC-rich and an RBC-poor/fibrin-rich thrombus type. These results suggest different thrombus formation mechanisms in the ECMO circuit. The predominant nature of the RBC-poor/fibrin-rich thrombus type in ECMO circuits further underscores the important role of fibrin deposition on the artificial surfaces, despite systemic anticoagulation with heparin. Moreover, the presence of a RBC-rich thrombus type hints toward low shear-mediated thrombus formation in the ECMO device.

One of the possible reasons for the variable composition and the different thrombus types in ECMO circuits is probably related to the different device components. It seems reasonable to speculate that low shear conditions in the circuit (e.g., oxygenator) favor coagulation driven-thrombosis, whereas high shear environments (e.g., pump) are prone to form platelet-driven thrombi. Our histological data, however, indicates that both the individual thrombus components (RBCs, fibrin, platelets, and VWF content) and the unbiased thrombus cluster-types are not associated with the respective location in the device. Similar as to our quantitative findings, a recent descriptive report, investigating 53 pediatric ECMO circuits, has shown that thrombi originating from different device locations consist of a mixture of fibrin, platelets, red blood cells, VWF, and leukocytes.¹⁹ In contrast, two descriptive reports by Hastings et al. have shown that oxygenator and tubing thrombi mainly consist of RBCs and fibrin, whereas pump thrombi are more platelet dominant.^{14,15}

In recent years, increasing knowledge indicates that also immunothrombotic components play a role in ECMO thrombogenesis. For instance, adhesion and activation of neutrophils, monocytes, and complement factors on the ECMO circuit's surface have been shown to activate both coagulation and platelets.^{7,31–33} Interestingly we observed a higher blood leukocyte count during ECMO support

in patients with fibrin-rich thrombi, supporting the involvement of leukocytes that trigger thrombus formation. However, although not specifically stained, our histological data indicate that only few leukocytes are present in VA ECMO thrombi, which could potentially be explained by the fact that the majority of VA-ECMO cases is related to noninfectious etiologies. In contrast to VA-ECMO, we have previously shown the abundant presence of leukocytes in a small cohort of COVID-19 patients using veno-venous ECMO support.³⁴ Apart from leukocytes, also H3Cit content of ECMO thrombi was measured to identify the presence of NETs. Our histological data indicate the presence of some intra- and extracellular H3Cit signal, suggesting the presence of neutrophils undergoing NETosis and NETs, respectively. In general, few NETs (H3Cit-positive signal) were observed. However, the (rather low) H3Cit levels were particularly increased in both the pump and the oxygenator thrombi compared with tubing thrombi which suggests at least in minor part a NET-related mechanism in both device locations as already hypothesized.³⁵ This is in line with recent *in vitro* studies which have shown platelet-dependent NET formation in ECMO circuits and high shear rate-induced NET formation in a microfluidic assay.^{36,37}

Our study shows the contribution of various factors, including fibrin, platelets, and VWF, which underscores the complexity of ECMO-induced thrombus formation. This indicates that other therapies besides the currently used heparin are worth investigating. These could include the use of direct thrombin inhibitors, FXII and/or FXI blocking and inhibition of the platelet-VWF interaction (e.g. blocking the GPIIb-A1 interaction).³⁸⁻⁴² Indeed, data from *in vivo* ECMO animal models suggest that FXII, alone or in combination with FXI inhibition, leads to reduced fibrin and platelet deposition and is associated with fewer bleeding complications, but remains to be evaluated in a clinical setting.^{43,44} Besides optimization of anticoagulation regimens, modification of ECMO materials, flow conditions, and device technology are also needed to prevent the deposition of prothrombotic factors to further minimize thrombosis. Future studies, however, are required to investigate the safety and efficacy of such potential strategies.

This study has several limitations that are worth considering. First, because different types of pumps or oxygenators are often composed of different biomaterials and surface coatings, it is plausible that the type of pump/oxygenator could influence the composition of thrombi.⁴⁵ However, we were unable to investigate this aspect because of the low sample sizes of thrombi formed in different oxygenators or pumps. Second, we cannot exclude that the oxygenator acted as a sieve for thrombi that were dislodged from other locations and might therefore not accurately reflect the composition of thrombi formed at the premembrane oxygenator side. Third, the weight of variation in flow shear rate according to location and during support periods should also be accounted in the interpretation of these results and was not captured in our study. Finally, even though most of our thrombi were kept in phosphate buffered saline solution for less than 24 hours, we cannot rule out bacterial growth and (even limited) protein degradation. Nevertheless, previous reports indicated very limited issues when thrombi are kept less than

48 hours in such condition.¹³ Furthermore, although our histological data also suggest that clot contraction may occur within ECMO thrombi, we are currently not able to investigate the presence of contracted RBCs (polyhedrocytes) via scanning electron microscopy because all samples were processed via routine paraffin-embedding procedures. Overall, despite the high number of thrombi analyzed in comparison to previous reports, our results and their interpretation are exploratory and need further confirmation.

In conclusion, our histological study provides insight into the possible underlying drivers of in-device VA-ECMO thrombus formation. We found that thrombus composition is heterogenous, consisting of two distinct thrombus types: an RBC-rich and a fibrin-rich thrombus type. These findings are important to further improve current anticoagulation strategies in ECMO, such as combination strategies. Future studies are needed to investigate the safety and efficacy of novel antithrombotic therapies in ECMO and to evaluate device-related modifications to minimize in-device thrombosis.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

S.Su., S.St., M.M., S.F.D.M., and A.R. contributed to the conception and design of the work. S.St., M.M., P.M., D.C., E.B., and K.V. contributed to the acquisition and analysis of data. A.P., J.L., A.D., B.P., and L.D. contributed to the biostatistics and data management. S.St., D.C., M.M., and S.F.D.M. contributed to the interpretation of data. S.St. drafted the manuscript. A.R., E.V.B., O.M., F.V., and S.S. critically revised the manuscript. All authors have approved the final version of the manuscript. They all agree to be accountable for all aspects of the work.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank all the study coordinators Laureline Bourgois, Catherine Marichez, and Anaïs Gaul (Lille University Hospital) for their contribution to the study, and all the members of the Hemostasis Department at Lille University Hospital, for their commitment to the project.

SOURCES OF FUNDING

This work was supported by research grants to S.F.D.M. from the KU Leuven (ISP/14/02L2 and PDM/20/147) and the Queen Elisabeth Medical Foundation. S.Su. received research grants from the French national Research Agency (Programme d'Investissement d'Avenir) with the Hospital-University Research in Health program (Recherche Hospitalo-Universitaire, WILL-ASSIST HEART ANR-17-RHUS-0011).

CONFLICT OF INTEREST

Authors have no relevant relationships to disclose with regard to the contents of this paper.

ORCID

Senna Staessens  <https://orcid.org/0000-0001-5530-6961>

Mouhamed D. Moussa  <https://orcid.org/0000-0003-3189-8119>

Adeline Pierache  <https://orcid.org/0000-0002-8999-8326>

Antoine Rauch  <https://orcid.org/0000-0002-1182-4131>

Natacha Rousseau  <https://orcid.org/0000-0003-2837-4285>
 Eric Bouleaux  <https://orcid.org/0000-0001-6507-3495>
 Alexandre Ung  <https://orcid.org/0000-0003-1946-4625>
 Linda Desender  <https://orcid.org/0000-0002-3449-792X>
 Bénédicte Pradines  <https://orcid.org/0000-0003-0371-1580>
 André Vincentelli  <https://orcid.org/0000-0003-4081-786X>
 Olaf Mercier  <https://orcid.org/0000-0002-4760-6267>
 Julien Labreuche  <https://orcid.org/0000-0002-3384-0423>
 Alain Duhamel  <https://orcid.org/0000-0003-0392-7701>
 Eric Van Belle  <https://orcid.org/0000-0001-6509-443X>
 Flavien Vincent  <https://orcid.org/0000-0002-1007-1473>
 Annabelle Dupont  <https://orcid.org/0000-0002-1554-9931>
 Karen Vanhoorelbeke  <https://orcid.org/0000-0003-2288-8277>
 Delphine Corseaux  <https://orcid.org/0000-0001-8642-1508>
 Simon F. De Meyer  <https://orcid.org/0000-0002-1807-5882>
 Sophie Susen  <https://orcid.org/0000-0001-5953-163X>

TWITTER

Sophie Susen  @https://twitter.com/sophie_susen

REFERENCES

- Makdasi G, Wang I-WW. Extra corporeal membrane oxygenation (ECMO) review of a lifesaving technology. *J Thorac Dis.* 2015;7:E166-E176.
- Murphy DA, Hockings LE, Andrews RK, et al. Extracorporeal membrane oxygenation—hemostatic complications. *Transfus Med Rev.* 2015;29:90-101.
- Chung M, Cabezas FR, Nunez JI, et al. Hemocompatibility-related adverse events and survival on venoarterial extracorporeal life support: an ELSO registry analysis. *JACC Heart Fail.* 2020;8:892-902.
- Lubnow M, Philipp A, Foltan M, et al. Technical complications during veno-venous extracorporeal membrane oxygenation and their relevance predicting a system-exchange - retrospective analysis of 265 cases. *PLoS One.* 2014;9:e112316.
- Zangrillo A, Landoni G, Biondi-Zoccai G, et al. A meta-analysis of complications and mortality of extracorporeal membrane oxygenation. *Crit Care Resusc.* 2013;15:172-178.
- Doyle AJ, Hunt BJ. Current understanding of how extracorporeal membrane oxygenators activate Haemostasis and other blood components. *Front Med.* 2018;5:352.
- Millar JE, Fanning JP, McDonald CI, McAuley DF, Fraser JF. The inflammatory response to extracorporeal membrane oxygenation (ECMO): a review of the pathophysiology. *Crit Care.* 2016;20:387.
- Protti A, Iapichino GE, Di Nardo M, Panigada M, Gattinoni L. Anticoagulation management and antithrombin supplementation practice during Venovenous extracorporeal membrane oxygenation: a worldwide survey. *Anesthesiology.* 2020;132:562-570.
- Vandenbrielle C, Vanassche T, Price S. Why we need safer anticoagulant strategies for patients on short-term percutaneous mechanical circulatory support. *Intensive Care Med.* 2020;46:771-774.
- ELSO. ELSO Anticoagulation Guidelines. 2014.
- Esper SA, Welsby IJ, Subramaniam K, et al. Adult extracorporeal membrane oxygenation: an international survey of transfusion and anticoagulation techniques. *Vox Sang.* 2017;112:443-452.
- Thomas J, Kostousov V, Teruya J. Bleeding and thrombotic complications in the use of extracorporeal membrane oxygenation. *Semin Thromb Hemost.* 2017;44:20-29.
- Douglas A, Fitzgerald S, Pandit A, Doyle KM. Storage of blood clots for histological analysis: how long is too long in saline and paraformaldehyde? *Histol Histopathol.* 2020;35:313-320.
- Hastings SM, Ku DN, Wagoner S, Maher KO, Deshpande S. Sources of circuit thrombosis in pediatric extracorporeal membrane oxygenation. *ASAIO J.* 2017;63:86-92.
- Hastings SM, Deshpande SR, Wagoner S, Maher K, Ku DN. Thrombosis in centrifugal pumps: location and composition in clinical and in vitro circuits. *Int J Artif Organs.* 2016;39:200-204.
- Staessens S, Fitzgerald S, Andersson T, et al. On behalf of the clot summit. Histological stroke clot analysis after thrombectomy: technical aspects and recommendations. *Int J Stroke.* 2020;15:467-476.
- Laridan E, Denorme F, Desender L, et al. Neutrophil extracellular traps in ischemic stroke thrombi. *Ann Neurol.* 2017;82:223-232.
- Staessens S, Denorme F, François O, et al. Structural analysis of ischemic stroke thrombi: histological indications for therapy resistance. *Haematologica.* 2020;105:498-507.
- Figueroa Villalba CA, McMullan DM, Reed RC, Chandler WL. Thrombosis in extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) circuits. *ASAIO J.* 2021. Online ahead of print. doi: [10.1097/MAT.0000000000001605](https://doi.org/10.1097/MAT.0000000000001605)
- Jaffer IH, Fredenburgh JC, Hirsh J, Weitz JI. Medical device-induced thrombosis: what causes it and how can we prevent it? *J Thromb Haemost.* 2015;13:S72-S81.
- Kappelmayer J, Bernabei A, Edmunds LH Jr, Edgington TS, Colman RW. Tissue factor is expressed on monocytes during simulated extracorporeal circulation. *Circ Res.* 2018;72:1075-1081.
- Fischer M, Sperling C, Tengvall P, Werner C. The ability of surface characteristics of materials to trigger leukocyte tissue factor expression. *Biomaterials.* 2010;31:2498-2507.
- Arnold P, Jackson S, Wallis J, Smith J, Bolton D, Haynes S. Coagulation factor activity during neonatal extra-corporeal membrane oxygenation. *Intensive Care Med.* 2001;27:1395-1400.
- Urlesberger B, Zobel G, Zenz W, et al. Activation of the clotting system during extracorporeal membrane oxygenation in term newborn infants. *J Pediatr.* 1996;129:264-268.
- Kwak D, Wu Y, Horbett TA. Fibrinogen and von Willebrand's factor adsorption are both required for platelet adhesion from sheared suspensions to polyethylene preadsorbed with blood plasma. *J Biomed Mater Res A.* 2005;74A:69-83.
- Keuren JFW, Baruch D, Legendre P, et al. Von Willebrand factor C1C2 domain is involved in platelet adhesion to polymerized fibrin at high shear rate. *Blood.* 2004;103:1741-1746.
- Da Q, Teruya M, Guchhait P, Teruya J, Olson JS, Cruz MA. Free hemoglobin increases von Willebrand factor-mediated platelet adhesion in vitro: implications for circulatory devices. *Blood.* 2015;126:2338-2341.
- Heilmann C, Geisen U, Beyersdorf F, et al. Acquired von Willebrand syndrome in patients with extracorporeal life support (ECLS). *Intensive Care Med.* 2012;38:62-68.
- Uriel N, Pak S-W, Jorde UP, et al. Acquired von Willebrand syndrome after continuous-flow mechanical device support contributes to a high prevalence of bleeding during long-term support and at the time of transplantation. *J Am Coll Cardiol.* 2010;56:1207-1213.
- Meyer AL, Malehsa D, Budde U, Bara C, Haverich A, Strueber M. Acquired von Willebrand syndrome in patients with a centrifugal or axial continuous flow left ventricular assist device. *JACC Heart Fail.* 2014;2:141-145.
- Meyer AD, Rishmawi AR, Kamucheka R, et al. Effect of blood flow on platelets, leukocytes, and extracellular vesicles in thrombosis of simulated neonatal extracorporeal circulation. *J Thromb Haemost.* 2020;18:399-410.

32. Graulich J, Walzog B, Marcinkowski M, et al. Leukocyte and endothelial activation in a laboratory model of extracorporeal membrane oxygenation (ECMO). *Pediatr Res*. 2000;48:679-684.
33. Fortenberry JD, Bhardwaj V, Niemer P, Cornish JD, Wright JA, Bland L. Neutrophil and cytokine activation with neonatal extracorporeal membrane oxygenation. *J Pediatr*. 1996;128:670-678.
34. Dupont A, Rauch A, Staessens S, et al. Vascular endothelial damage in the pathogenesis of organ injury in severe COVID-19. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2021;41:1760-1773.
35. Ki KK, Millar JE, Langguth D, et al. Current understanding of leukocyte phenotypic and functional modulation during extracorporeal membrane oxygenation: a narrative review. *Front Immunol*. 2021;0:3396.
36. Yu X, Tan J, Diamond SL. Hemodynamic force triggers rapid NETosis within sterile thrombotic occlusions. *J Thromb Haemost*. 2018;16:316-329.
37. Winnerbach P, Rossaint J, Buhl EM, et al. Platelet count reduction during in vitro membrane oxygenation affects platelet activation, neutrophil extracellular trap formation and clot stability, but does not prevent clotting. *Perfusion*. 2022;37:134-143.
38. Pollak U. Heparin-induced thrombocytopenia complicating extracorporeal membrane oxygenation support: review of the literature and alternative anticoagulants. *J Thromb Haemost*. 2019;17:1608-1622.
39. Pieri M, Agracheva N, Bonaveglia E, et al. Bivalirudin versus heparin as an anticoagulant during extracorporeal membrane oxygenation: a case-control study. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2013;27:30-34.
40. Menk M, Briem P, Weiss B, et al. Efficacy and safety of argatroban in patients with acute respiratory distress syndrome and extracorporeal lung support. *Ann Intensive Care*. 2017;7:82.
41. van Ryn J, Huel N, Waldmann L, Wiene W. Dabigatran inhibits both clot-bound and fluid phase thrombin in vitro: effects compared to heparin and hirudin. *Blood*. 2007;110:3998.
42. Burstein B, Wieruszewski PM, Zhao Y-J, Smischney N. Anticoagulation with direct thrombin inhibitors during extracorporeal membrane oxygenation. *World J Crit Care Med*. 2019;8:87-98.
43. Pireaux V, Tassignon J, Demoulin S, et al. Anticoagulation with an inhibitor of factors XIa and XIIa during cardiopulmonary bypass. *J Am Coll Cardiol*. 2019;74:2178-2189.
44. Wallisch M, Lorentz CU, Lakshmanan HHS, et al. Antibody inhibition of contact factor XII reduces platelet deposition in a model of extracorporeal membrane oxygenator perfusion in nonhuman primates. *Res Pract Thromb Haemost*. 2020;4:205-216.
45. Maul TM, Massicotte MP, Wearden PD. ECMO biocompatibility: surface coatings, anticoagulation, and coagulation monitoring. *Extracorporeal Membrane Oxygenation - Advances in Therapy*. InTechOpen; 2016.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Staessens S, Moussa MD, Pierache A, et al. Thrombus formation during ECMO: Insights from a detailed histological analysis of thrombus composition. *J Thromb Haemost*. 2022;00:1-12. doi: [10.1111/jth.15784](https://doi.org/10.1111/jth.15784)

II. Manuscrit 2 : Heparin Versus Phosphorylclolin Surface Coatings And Outcomes During Venous-Arterial ECMO Support: A Propensity Weighted Multicenter Clinical Study And An Histological Analysis

Authorship

Mouhamed D. Moussa *et al.*

Valorisation

- En révision interne avant soumission

A. Résumé du manuscrit 2

Comparaison des revêtements de surface à base d'héparine et de phosphorylcholine dans la prédiction des complications liées à l'hémostase sous ECMO-VA : Étude multicentrique avec pondération par score de propension et analyse histologique

Introduction

La prévention des complications thrombotiques sous ECMO-VA repose sur l'inhibition de l'activation de la voie du facteur XII par l'héparinothérapie systémique et par les revêtements de surface (RS) destinés à améliorer la biocompatibilité des surfaces inertes des circuits d'ECMO. Alors que ces RS ont été étudiés de façon extensive au cours des procédures de chirurgie cardiaque sous circulation extracorporelle (CEC), peu de données existent concernant leurs performances sous ECMO qui se distingue de la CEC par une utilisation prolongée des circuits traités et un niveau d'anticoagulation systémique plus réduit. Les revêtements à base d'héparine (Heparin-coating) et ceux à base de phosphorylcholine (PPC-coating) sont les plus utilisés en routine clinique.

L'objectif principal de cette étude est de comparer les performances de ces deux types de revêtement de surface dans la prédiction des complications thrombotiques. Les objectifs secondaires sont de les comparer sur (i) des critères d'évaluation cliniques : thrombose de circuit d'ECMO, survenue de complications hémorragiques et la mortalité à 28-jours (ii) des critères biologiques : cinétiques de l'hémoglobine (hb), des plaquettes, des leucocytes et de la CRP, enfin (iii) sur la description histologique des thrombi formés sur ces circuits.

Matériel et méthodes

Pour répondre à l'objectif histologique, nous avons réalisé une analyse post-hoc d'une cohorte histologique antérieurement publiée.²⁰⁹ L'analyse s'est portée exclusivement sur les thrombi issus des jonctions des tubes du circuit d'ECMO.

Les objectifs cliniques ont été étudiés sur une cohorte clinique rétrospective multicentrique agrégeant des patients issus de 3 centres référents en assistance circulatoire. Tous les patients adultes assistés pour la première fois par une ECMO-VA périphérique avec une survie > 48 h étaient inclus. Les critères d'exclusions étaient : un âge <18 ans, une ECMO centrale ou droite-droite, thrombopénie induite à l'héparine ou utilisation de l'Argatroban, syndrome des anti-phospholipides, administration de facteur VII activé recombinant ou d'anticoagulant oral direct, l'absence de données d'intérêt et les circuits d'ECMO peu utilisés (<5 par ans).

Le revêtement de surface Bioline® coating (Maquet, Gentige group, Rastatt, Germany) à base d'héparine et d'albumine étaient opposés aux revêtements P.H.I.S.O. coating et AGILE™ coating à base de phosphorylcholine [respectivement LivaNova Group (Saluggia, Italy) et Euroset (Medolla, Italy)].

Les stratégies d'anticoagulation étaient similaires en fonction des groupes, basées sur héparinothérapie non fractionnée. Les procédures transfusionnelles étaient protocolées par centres. La gestion hémodynamique était également similaire dans les deux groupes et dans les 3 centres.

Analyses statistiques

Les deux groupes ont été comparés après pondération par un score de propension en utilisant l'approche Propensity Score Overlap Weighting (IPTW). Le calcul des incidences cumulées des complications thrombotiques était estimé d'après la méthode de Kalbfleisch and Prentice. La mortalité à 28 jours était estimée d'après une analyse de Kaplan Meier. Les comparaisons intergroupes ont été réalisées par des modèles de régression de Cox's or Fine and Gray

régression en prenant en compte le risque compétitif induit par la durée de l'ECMO et la nature temps dépendant des variables étudiées. Une valeur de $p < 0,05$ était significative.

Résultats

Sur les 704 patients éligibles dans la cohorte clinique, 461 ont été inclus dont 155 (44 %) dans le groupe PPC-coating et 306 (66 %) dans le groupe Heparin-coating. Dans la cohorte histologique, 34 thrombi issus de 22 patients ont été analysés.

Les revêtements Heparin-coating étaient associés à une réduction des complications thrombotiques comparativement au revêtement PPC-coating avant et après PSOW, [unadjusted-HR=0,70 (IC 95 % 0,51- 0,95), $p=0,023$ and sub-HR = 0,60 (IC 95 % 0,37- 0,98), $p=0,041$ (Figure 1). Les changements de circuit étaient différents dans les deux groupes avant PSOW, mais pas après pondération (Figure 1). Aucune différence n'était observée en ce qui concerne les complications hémorragiques et la mortalité. Le taux d'hb et de plaquette étaient décroissants dans les deux groupes avec une décroissance plus marquée pour les plaquettes pour le Heparin-coating et plus marquée pour l'Hb pour le PPC-coating. La CRP et la Leucocytose étaient croissantes sous ECMO sans différence significative en termes de cinétique. La composition des caillots était différente en fonction du type de revêtement avec une prédominance significative de VWF dans les caillots PPC-coating.

Conclusion

Dans cette étude, le revêtement de surface Heparin-coating sont plus efficace que les revêtements PPC-coating sur la prévention des complications thrombotiques et la préservation de l'hémoglobininémie, mais plus délétères sur le compte plaquettaire. Les thrombi issus du PPC-coating étaient plus riche en VWF. Ces résultats suggèrent l'intégration du type de revêtement dans les stratégies d'anticoagulation sous ECMO-VA.

B. Manuscrit intégral (en révision)

Heparin Versus Phosphorylcholin Coating And Outcomes During Venous-Arterial ECMO

Support: A Propensity Weighted Multicenter Clinical Study And An Histological

Analysis

Mouhamed D. Moussa *et al.*

Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1011 — EGID, F-59000 Lille,
France

Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine, Amiens University Hospital,
France; MP3CV, EA7517, CURS, Jules Verne University of Picardie, Amiens, France

CHU Lille, Service de Chirurgie Cardiaque, F-59000 Lille, France

Univ. Lille, INSERM, CHU Lille, CIC-IT 1403, F-59000 Lille, France

CHU Lille, Department of Biostatistics, F-59000 Lille, France

Address for correspondence:

Mouhamed D. MOUSSA

Service d'Anesthésie-Réanimation Cardiovasculaire et thoracique,

Institut Cœur - Poumon, CHU Lille, 2 avenue Oscar Lambret, 59 037 Lille France

Tel number: (+33) 320,445,962; Fax number: (+33) 320,444,810

E-mail: mouhamed.moussa@chru-lille.fr

Abbreviations

Anti-Xa : anti factor X activated

aPTT : activated partial thromboplastin time

CI : Confidence interval

CS : Cardiogenic shock

ECMO: Extracorporeal membrane oxygenation,

ELSO: Extracorporeal life organization

INTERMACS : Interagency registry for mechanically assisted circulatory support

PSOW: Propensity score overlap weighting

SCAI : Society for cardiovascular angiography and interventions

VA : veno-arterial

Abstract

Introduction

Veno-arterial extracorporeal membrane oxygenation (VA-ECMO) is associated with a high rate of thrombotic complications which may worsen outcomes. Contact phase activation is among main drivers of this complication and justifies the use of systemic anticoagulation and the development surface coating technologies. Heparin (Heparin-coating) and phosphorylcholin (PPC-coating) based coatings are among the most used in clinical routine. If Evidence for their effectiveness is available during short duration of use in cardiopulmonary bypass for cardiac surgery but are scarce in VA-ECMO setting where support last several days. Our objectives were to compare Heparin-coating and PPC-coating performances for thrombotic complications, serious bleeding, blood trauma, systemic inflammation, thrombus composition and 28-day mortality.

Material and Methods

A retrospective clinical multicenter cohort was studied for clinical endpoint and a histologic cohort was investigated for thrombi composition. The clinical cohort included from January 2008 to December 2018, all adults supported by VA-ECMO for cardiogenic shock for ≥ 48 hours, free from any hemostasis disease or therapy that may impact thrombotic complications. Thrombi retrieved from circuit junction underwent histochemistry and immunochemistry analysis for red blood cells, Von Willebrand Factor (VWF), platelets, fibrinogen, and Neutrophil Extra-Cellular Traps contents. The clinical cohort was compared after a propensity score overlapped weighting and handling of missing variable using multiple imputation. p-value <0.05 was significant.

Results

Heparin-coating was associated with a lower occurrence of thrombotic complications as compared to PPC-coating before [unadjusted-HR=0.70 (95%CI 0.51;0.95), p=0.023] and after PSOW [sub-HR=0.60 (95% CI, 0.37;0.98), p=0.041] while serious bleeding and mortality were similar among groups. As compared with PPC-coating, Heparin-coating was associated with a lower drop in hemoglobin [Mean difference=0.064 g/dL per day (95%CI, 0.014;0.115), p=0.012] and a higher drop in platelets [Mean difference=-4.7 G/L per day (95%CI, -6.6;-2.8), p <0.001]. Leukocytes count and c-reactive protein kinetics were similar among groups. In the histologic analysis, PPC-coating showed a higher content in VWF.

Conclusion

Heparin coating is associated with a lower thrombotic complication but is associated with more sustain platelets drop during VA-ECMO as compared to PPC-coating. Thrombi developed on circuit-junction had different composition in relation with coating type. Anti-coagulation strategies should account.

Keys words: ECMO, surface coating, phosphorylcholin, heparin, thrombotic complications, serious bleeding, mortality

Introduction

During the last decades, the use of veno-arterial extracorporeal membrane oxygenation (VA-ECMO) for rescuing refractory cardiogenic shock has increased exponentially in response to new pathological considerations and technological developments.¹⁻³ VA-ECMO remains, however, associated with a high rate of thrombotic complications ranging from circuit or cannula thrombosis to systemic thrombotic events including limb ischemia, pulmonary embolism, intracardiac thrombi and stroke.⁴⁻⁷

Thrombotic complication prophylaxis is based primarily on systemic anticoagulation and on the surface coating which intended to improve devices biocompatibility by reducing the consequences of intrinsic coagulation or contact phase pathway.⁸⁻¹⁰ Indeed, the interaction between patient's blood and the inert non-endothelialized surfaces of ECMO circuitry promote the activation of the coagulation Factor XII-dependent coagulation, which induces both a pro-coagulant and pro-inflammatory response. Coating the inner surfaces of ECMO circuit is supposed to avoid or alleviate several of these side effects resulting from the activation of the Factor XII pathway activation by providing hydrophilic and negatively charged surfaces.^{8,10}

However, in a comprehensive perspective, even though surface coatings reduce these complications as compared to no coating strategy,¹¹⁻¹³ it seems not sufficient on its own to completely prevent the occurrence of thrombotic complications in ECMO setting. Therefore, systematic anticoagulation remains the norm, a strategy which unfortunately may contribute to the high frequency of bleeding complications observed under ECMO support.^{4,5,14,15}

Of interest, surfaces coating technologies use may differ from one manufacturer to another going from bioactive to biopassive coating made of different component.^{12,16-18} This suggests a possible difference in performances which have never been studied in VA-ECMO patients setting.

The aim of this work is therefore to compare in a clinical study, the performance of heparin-albumin and phosphorylcholin coating commonly used in clinical routine on the occurrence of thrombotic complications, bleeding, blood cells component trauma, systemic inflammation, and mortality.

Further we sought to describe the composition of clots retrieved from ECMO circuit junction according to the coating types in a thrombus histologic substudy.

Material and methods

Ethical considerations and study cohorts

The clinical study is a multicenter retrospective study, performed in 3 intensive care units of academic ECMO referral centers (Réanimation Cardio-Vasculaire, Institut Cœur-Poumon, Lille University Hospital; Pôle des Réanimations, Hôpital Salengro, Lille University Hospital; Réanimation Cardio-Thoracique, Vasculaire et Respiratoire, Cardiac and Thoracic Intensive Care Unit, Amiens University Hospital, France).

Approval was obtained from the Ethical Committee of French Society of Anesthesia and Intensive Care Medicine SFAR (Société Française d'Anesthésie Réanimation) which waived the need for informed consent because of the retrospective setting. All datasets analyzed in this study were declared to French authorities in compliance with national laws (Methodology MR-004).

The histologic substudy is a post hoc analysis of Clot-ECMO study, an ancillary study of the multicenter WITECMO-H study (NCT 03070912). This study is an observational prospective study approved by the French National Ethic Review Committee (CPP N°2017-A00256-47) with an informed written consent obtained from all patients or their person of trust. All patients analyzed here were included in the Lille university hospital centers.

Patients' Selection in the Clinical Cohort

We included consecutive adult patients aged 18 years and older, supported by peripheral VA-ECMO for refractory cardiogenic shock graded SCAI D or E, or INTERMACS 1 or 2 from January 2013 to January 2020 and that were supported for more than 24 hours with a coated ECMO circuitry. Exclusion criteria were : moribund patients (death within first 48 hours), heparin induced thrombocytopenia or argatroban infusion, administration of recombinant factor VII, s (the primary outcome), multiple VA-ECMO runs (only the first run was kept in the analysis), central and right ventricle to pulmonary artery VA-ECMO, antiphospholipid syndrome and oral anticoagulants in use at the baseline, missing coating/ECMO circuit brand information and thrombotic complication. The centrimag pump (Thoratec, Pleasanton, CA) head, which was uncoated and associated with other manufacturer oxygenator and coated tubing was also excluded, so was the BPX80 (Thoratec) and the MEDOS (Medos, Stolberg, Germany) ECMO systems because of the little number of patients supported in study centers.

Data Collection and Sources in the Clinical Cohort

We extracted anthropometric, anamnestic and outcomes variables from our electronic health records [Sillage (SIB, Rennes, France) and IntelliSpace Critical Care and Anesthesia (Philips Healthcare, Koninklijke Philips N.V. Netherlands) for Lille centers and Centricity Critical Care formerly known as Clinisoft (GE Healthcare, Barrington, IL, USA) for Amiens Center], and biological data were gathered from routinely used laboratory results restitution software [Molis® (CompuGroup Medical, Koblenz, Germany) software in Lille centers and Centricity Critical Care formerly known as Clinisoft (GE Healthcare, Barrington, IL, USA) in Amiens Center]. We further collected ECMO device particularities including, brands, type of coating, site of cannulations, devices changes and related complications.

ECMO Devices and Coating

Four ECMO systems with specific combination of pump head, oxygenator and coating from different manufacturers were used in both centers during the study periods and in accordance with exclusion criteria : E1-Maquet (Gentige group, Rastatt, Germany) ECMO system associating of Rotaflow centrifugal pump, Quadrox oxygenator, Bioline® coating; E2-Maquet (Gentige group, Rastatt, Germany) Cardiohelp with HLS set advanced 5.0/7.0 disposable, bearing specific centrifugal pump and Quadrox oxygenator with BIOLINE® coating. E3-LivaNova Group (Saluggia, Italy) ECMO system that combines the Revolution pump head and Eos ECMO oxygenator and P.H.I.S.I.O coating, E4-Euroset (Medolla, Italy)] ECMO system, an associating of Rotaflow centrifugal pump, A.L. ONE ECMO oxygenator, and AGILE™ Coating.

Two types of coating were used on these 4 ECMO systems and were studied: The phosphorylcholin based coating (PPC-coating) used in E3 and E4 and the heparin-albumin based (Heparin-coating) coating used for E1 and E2. All the circuitry, pump heads and oxygenator included, were coated in these ECMO systems.

Management of VA-ECMO

Arterial cannulations were performed in the femoral or subclavian arteries for peripheral ECMO and in the ascending aorta or pulmonary artery for central ECMO. Venous cannulations were performed the femoral vein, jugular vein or right atrium for central or peripheral ECMO as appropriated. Left ventricle (LV) unloading using additional LV venting cannulation or cannulation change for anterograde flow was considered in case of LV dilatation with spontaneous contrast in cardiac ultrasound or pulmonary edema. The pump flow was adjusted to target a mean arterial pressure >60 mmHg, SvO₂ >65% or ScVO₂ >70%, aortic valve opening and optimal right ventricle unloading. Weaning was considered for

recovery when cardiac output was acceptable after reducing the ECMO flow and inotropic support to minimal.

Anticoagulation, Thrombotic Complications and Bleeding Management

Generally, UFH was administered at 100 UI/kg before cannulation for patients not under cardiopulmonary bypass prior to support and followed by a continuous infusion to target an Anti-FXa of 0.2 to 0.4 UI mL⁻¹ in Lille centers or activated partial thrombin time (aPTT) of 1.5 to 2.0-fold the reference in Amiens centers. The target was modulated according to pump flow, the occurrence of bleeding or thrombotic complications.

Thrombotic complication led to UFH treatment intensification according to ECMO pump flow, the type of ischemic complication and the risk of further iatrogenic bleeding complications. ECMO circuit thrombosis led to circuit changes in case of reduced oxygenator or pump head performances or pending embolic complications.

Bleeding complications resulted in an interruption of UFH infusion or protamine reversal according to the severity of bleeding and at the discretion of the attending physician. Packed red blood cells (PRBC), fresh frozen plasma and platelets concentrated were transfused to maintain a hemoglobinemia >8 g dL⁻¹, normalized prothrombin time ratio > 50%, aPTT ratio <2 and platelets count > 50,000 mm⁻³ (increased to 70,000 mm⁻³ in case of bleeding).

Study outcomes

The primary endpoint was thrombotic complications during ECMO support, a composite of a stroke, limb ischemia and ECMO circuit changes for thrombosis or cannulation thrombosis or any thrombosis that led to medical or surgical intervention or death.

The secondary outcomes were: (i) ECMO circuit changes (ii) serious bleeding defined according to the ELSO bleeding management guidelines¹⁹ as a bleeding that led to surgical

exploration or characterized by its location (central nervous system, hemothorax, retro-peritoneal bleeding) or requiring immediate transfusion of at least 2 units of PRBC for either a sudden fall of hemoglobin of 2 g dL^{-1} in less than 24 hours or new hemodynamic instability or overt bleeding. (iii) systemic inflammatory response intensity using the kinetics of C-reactive protein (CRP) and leucocytes during ECMO support. (iv) blood cells component trauma evaluated by the platelets count and hemoglobin kinetics. (v) 28-day mortality defined as all-cause mortality censored at 28 days.

Histologic Cohort and Analyses

Clots collections, staining and analyses is described elsewhere and as supplementary data. For these analyses we analyze a specific cohort of patients from whom the ECMO circuit was collected after removal between January 2018 to December 2018 either for circuit change or definitive removal for native heart recovery, death, bridge to heart transplant or to long-term ventricular assist device support.

To analyze the weight of coating type on clot formation, we exclusively focused on the circuit junction clots. This allows avoiding confounders related to the difference in pump head and oxygenator design between ECMO circuits. The main objective was to compare the clots compositions among coating groups (Heparin-coating vs. PPC-coating).

Collected thrombi were incubated in 4% paraformaldehyde for 24 hours at room temperature before being embedded in paraffin and cut into $5 \mu\text{m}$ sections. These sections were used for histologic and immunohistological analyses to identify and quantify red blood cells, fibrine, collagen (hematoxylin eosin and Martius Scarlett Blue stainings) and platelets (GPIb α , MA5-11642, Invitrogen, Waltham, MA, USA), Von Willebrand factor (VWF, A008202-, Dako, Glostrup, Denmark) and citrullinated histone H3 (H3Cit, ab5103, Abcam, Cambridge, UK) for NETosis as appropriated. Stained thrombus sections were digitized (Axio Scan Z1, Zeiss,

Oberkochen, Germany or Nanozoomer SQ, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) and quantified using Adobe Photoshop CS5 (San José, CA, USA) and ImageJ software 1.49v (National Institutes of Health, Bethesda, MD; <http://imagej.nih.gov/ij/>). For each staining, one section per thrombus was used for quantification.

Statistical Analysis

Quantitative variables are expressed as means (standard deviation) in the case of normal distribution or medians (interquartile range) otherwise. Categorical variables are expressed as numbers (percentage). Normality of distributions was assessed using histograms and the Shapiro-Wilk test. 28-day cumulative incidences of thrombotic, circuit change and serious bleeding events from implantation to ECMO removal were estimated using Kalbfleisch and Prentice method, by considering ECMO removal (whatever the reason) as competing events and cumulative incidence of all-cause mortality was estimated using Kaplan-Meier method; any events occurred after 28 days were not considered and were treated as censored events at day 28. As main analysis, patients were divided in two groups according to coating type (heparin vs. PPC). Baseline and ECMO support characteristics and cumulative incidences of each outcome were described according to the two coating groups. To evaluate between-group imbalance in pre-specified potential confounding factors (namely age, gender, body mass index, SAPS II, dilated cardiomyopathy, postcardiotomy, prior ECMO implants cardiac arrest, LV unloading, maximum fibrinogen and platelets, and minimum value of Anti-FXa), absolute standardized differences were calculated; an absolute standardized difference >10% was interpreted as a meaningful difference.²⁰ We assessed the effect of coating type on each outcome using a Cox's proportional regression model with cause-specific approach to account competing risk for regarding the causal question.²¹ Using PPC-coating group as reference, we derived from the Cox' regression models, hazard ratios (HRs) with their 95% confidence

intervals (CIs) as treatment effect size measures. For each outcome, the proportional hazard assumption was assessed using the Schoenfeld residual plot. The effect of the coating type on each outcome was further estimated after mitigating the potential confounding factors using propensity score overlap weighting (PSOW) method. The propensity score was estimated using a non-parsimonious multivariable logistic regression model, with coating type as dependent variable and the pre-specified confounders as covariates. The adjusted (Overlap-Weighted HRs) effect sizes and cumulative incidences were obtained by using Cox's regression models weighted by the overlap weight (by assigning a weight to each patient that is proportional to the probability of that patient belonging to the opposite coating group).²² Because of missing data in covariates including in propensity score (range from 0 to 36%, see table 1), we estimated the effect sizes after handling missing covariate values by multiple imputation,²³ using a regression switching approach (chained equations with m=10 imputations obtained). Imputation procedure was performed under the missing at random assumption using all variables listed in Table 1 (including coating groups) with a predictive mean matching method for continuous variables and multinomial or binary logistic regression model for categorical variables. In each imputed dataset, we calculated the propensity score and estimated the overlap-weighted adjusted effect sizes, which were later combined by using the Rubin's rules.²⁴ As secondary analysis, we performed pairwise comparisons of ECMO devices regarding the coating type using the same methodology as described in main analysis. Evolution of laboratory variables (hemoglobin, platelets count, leukocytes, and CRP) were estimated using shared random-effect model weighted by overlaps weights for the joint analysis of longitudinal data (biological evolution) and time-to event data (ECMO removal); to account that the biological evolution was censored by ECMO removal. Statistical testing was conducted at the two-tailed α -level of 0.05. Data were analyzed using the SAS software version 9.4 (SAS Institute, Cary, NC)

Results

Study population

Clinical cohort

Among the 704 assessed for inclusion, 243 were excluded and 461 were included in this study, 319 (69%) and 142 (31%) from Lille and Amiens centers, respectively. As depicted by the study flowchart in Figure 1, 155 (44%) patients had a PPC-coating device and 306 (66%) Heparin-coating device. The detailed description of patient's baseline characteristics and VA-ECMO support is reported in Supplemental Table S1.

Briefly, patients were mostly male, severely ill as shown by the SAPS II score (57.8 ± 21.5) and baseline lactate ($6.7 \text{ mmol/L} \pm 5.2$), mostly supported for postcardiotomy (30%) and for myocardial infarction (28%). Peripheral femoro-femoral cannulation was performed in 410 (91%) patients and the median (IQR) ECMO support duration was 7.0 days (4.0; 12.0), The Rotaflow (Maquet®) head pump and polymethylpenthen oxygenators with exchange surface of 1.80 m^2 and higher (73%) were mostly used.

Propensity Score Overlap Weighted Clinical Cohort

Figure 2 showed the absolute standard differences between coating groups before PSOW and after missing variable handling. All patients were kept in the final PSOW analysis. Patients' characteristics according to coating groups and ECMO circuit types are described in Table 1. Supplemental Table 2 described patients characteristics considering the four ECMO systems studied.

Histologic Cohort

We analyzed 37 circuit junctions coming from 25 included patients in this cohort (Supplemental Figure S1). Patients' characteristics in this cohort are shown in Table 2.

Association of Coating Types and Thrombotic Complications

Thrombotic complications occurred in 180 (39%) patients. The cumulative incidence curve of these events according to cannulation groups is shown in Figure 3. Heparin-coating was associated with a reduce occurrence of thrombotic complications as compared to PPC-coating before and after PSOW, [unadjusted-HR=0.70 (95%CI 0.51 to 0.95), p=0.023 and sub-HR = 0.60 (95% CI, 0.37 to 0.98), p=0.041, respectively (Figure 4)].

Association of Coating Types With Circuit Changes

We observed 62 (14%) circuit changes during the study period. The cumulative incidence according to coating groups were significantly different (Figure 3). Heparin-coating was associated with reduced occurrence of circuit change as compared to PPC-group [Unadjusted-HR 0.51 (95%CI 0.30 to 0.84), p=0.008] before PSOW. This difference was no longer significant after PSOW [sub-HR 0.49 (95%CI 0.22 to 1.09), p=0.08] (Figure 4).

Association of coating types with serious bleeding

Serious bleeding occurred in 281 (61%) patients with a similar rate between groups before and after PSOW (Figure 4).

Association of coating type with mortality

The 28-day mortality rates were 64 (41.3%) in PPC-coating group and 133 (43.6%) in Heparin-coating group. The Kaplan Meir survival plot showed no difference in probability of survival (Figure 3). This result was confirmed before and after PSOW (Figure 4).

Effect of Coating Types of Hemoglobin and Platelets Count Kinetics

Hemoglobin and platelets count were similar in both coating groups the first day of VA-ECMO support followed by a significant decrease. As compared to PPC-coating, the mean difference (MD) in hemoglobin decrease was lower [MD=0.064 g/dL per day (95%CI, 0.014 to 0.115), p=0.012] (Figure 5A) while the MD in daily platelets count decrease was higher [MD=-4.7 G/L per day (95%CI, -6.6 to -2.8), p <0.001], (Figure 5B) in Heparin-coating.

Effect of Coating Types on Leucocytes Counts and on CRP Kinetics

While leucocytes count and CRP were similar the first day of support, a significant increase was observed in both groups. The MD in leucocytes count changes [MD=-0.024 G/L per day (95% CI -0.29 to 0.24), p=0.86] and in CRP changes [MD=1.5 mg/L per day (95% CI -3.5 to 6.5), p=0.55] between coating types were nonsignificant (Figure 5C and 5D).

Comparison of Thrombus Composition Between Coating Groups in the Histologic Cohort

Proportion of VWF was significantly higher in PPC-coating group as compared to Heparin-coating groups. The percentage of fibrin, platelets, red blood cells and NETs were found similar among groups (Figure 6).

Discussion

This study is to our knowledge the first to provide a comprehensive comparison of PPC-coating and Heparin-coating in both a clinical cohort and a histologic cohort. In the clinical cohort, we observed that Heparin-coating as compared to PPC coating was associated with a reduced thrombotic complication, a lesser decrease in hemoglobin concentration but a sharper decrease in platelet count during VA-ECMO course, despite a similar rate of serious bleeding. The 28-day mortality rate was similar among groups.

Additionally, the histologic analysis of thrombi retrieved from circuit junction showed differences in thrombus composition with a lower rate of VWF in Heparin-coating as compared to PPC-coating.

Several studies have reported a better performance of surface coating as compared to coating-free CPB circuit for the reduction of thrombus formation, inflammation, complement activation and various clinical endpoints.^{11,12,16,25-31} However, comparison of surface coating technologies one to another in this regard remains limited to the setting of CPB and generally, results of experimental and clinical performance reported were conflicting and vary according to study endpoints. This is typically the case when considering investigation comparing either heparin coating, PPC-coating or Poly-2-methoxyethylacrylate coatings.^{9,17,18,32,33}

These results can hardly be transferred to the ECMO setting because of the fundamental differences between CPB and ECMO. First, ECMO involves several days of support, typically 6 to 8 days,^{4,5,14,15} whereas CPB is used for a few hours during cardiac surgery. Thus, the performance seen during CPB may not be maintained during the longest duration of ECMO support. Second, many CPB configurations involve air-blood contact in addition to inert surface contact with blood, which is absent under ECMO. This justifies the important differences in coagulation patterns between the two types of extracorporeal circulation. The difference in pathology profile must also be considered, as all patients under VA-ECMO are in refractory shock with a systemic inflammation response and endothelial damage existing prior to assistance, a phenomenon participating in a pro-coagulant phenotype. This is not the case in most elective cardiac surgery procedures. Therefore, comparison of surface coating in VA-ECMO setting is of interest.

In this study, a significant difference in thrombotic complications was observed before and after PSOW whereas the difference in circuit changes observed was lost after PSOW. Knowing that the primary objective of the surface coating is to avoid or alleviate several

complications of the activation of the Factor XII pathway in the inner surface of the ECMO circuitry, this observation may be concerning. We believe that the limited number of events for circuit change endpoint and the size of studied the population may have limited the statistical power to reach a significant difference.

Thiara AS. et al. published an interesting comparison of heparin coated vs. PPC coated CPB circuitry investigating a wide range of biological endpoints and observed, similarly to our finding, a decrease in hemoglobin, in platelets and an increase in inflammatory cytokines with no difference between groups. The study included 15 patients per group resulting in underpowered analysis to observe significant differences. Of note duration of CBP were 128 (102–151) min vs 101 (77–122) min.³⁴ We observed a less drop in hemoglobin count in Heparin-coating group as compared to PPC group without difference in serious bleeding. Consequently, we can hypothesize that difference in mechanical hemolysis constrain may explain this observation. Comparison of daily free hemoglobin may have strengthened this hypothesis, but this variable was lacking in our dataset.

The greatest decrease in platelet count in the Heparin-coating group, while fewer thrombotic complications are observed in this group, implies other mechanisms of platelet loss related to this treatment. In contrast to PPC-coating, the Heparin-coating could induce a higher level of anti-platelet 4 antibodies with possible occurrence of heparin induced thrombocytopenia. Although heparin complexes are covalently attached to the surface of the inert ECMO material, leaching of some fragments which were excluded in CBP setting cannot be excluded in ECMO setting because durability issues.^{35.36} This could favor the formation of heparin/platelet complexes.

Anti-PF4 antibody production is associated with the concentration of circulating heparin, and their interaction with platelets may trigger a thrombotic phenotype but also platelets apoptosis and lost. Because Anti-Xa activity was similar in both groups, the involvement of circuit-

attached heparin in promoting anti-PF4 antibody formation remains plausible. Additionally, weaker performance of heparin coating for platelet aggregation and consumption has been reported as compared to other coating technologies.^{17,32}

The higher VWF content in PPC-coating circuit junction may suppose a higher involvement of VWF for thrombus formation in these VA-ECMO circuitry. The VWF/GPIb α interaction to promote platelets activation³⁷ and thrombosis can be emphasized by free hemoglobin³⁸ as previously reported. This interaction is made possible by the flow-dependent elongation of high molecular weight VWF multimers exposing its A1 domain which respond to GPIb α .^{37,39,40} Therefore, the differences observed between the two types of coatings could reflect in part the differences in shear generated within these circuits. Indeed, some PPC-coating circuits have a different pump head (Revolution®, Livanova®) than the Heparin-coating ones and had a smaller exchange surface of oxygenators. On the other hand, a difference in shear stress would have favored more bleeding in relation to the occurrence of a shear-dependent acquired VWF syndrome. This was not observed in our results. Interestingly, in a previous publication, we observed a heterogeneous composition of clots recovered from ECMO without a specific pattern in relation to the type of ECMO circuit or the location on it. This work investigated all thrombi recovered from either the oxygenator, pump head or circuit or circuit junctions. Focusing on a single location (circuit junction thrombi) with a well-established mechanism of thrombi formation,⁴¹ we observed differences in VWF content and a nonsignificant trend in NETs content when considering coating types. This observation highlights the complexity of thrombi formation in other VA-ECMO locations and the need for dedicated investigations in this regard.

Our results further underlined that the rate of thrombotic complications remains high despite the systematic use of surface coating and systemic anticoagulation. These complications occurred both on the inert surface where the effect of surface coating should be optimal, and

within the patient's endothelialized vascularization. This suggests that surface coating did not alleviate or avoid coagulation activation occurs through the factor XII pathway, or that other mechanisms may participate in promoting thrombosis in both endothelialized and inert surfaces. Several alternative pathways have been described, and includes the shear induced platelets activation,^{37,39} the generation of circulating microparticles⁴² and systemic inflammation depending on the initial disease severity.

This study suffers from several limits. The retrospective setting of the multicenter study is one of those. The confounding factors were, however, mitigated using a PSOW. Nevertheless, we cannot exclude remaining confounding, and causation cannot be made regarding these results. We cannot totally exclude the effect of pump head type on the observed results. Indeed, only The Maquet-Revolution circuit and the Euroset circuit offers similar pump head and similar oxygenator exchange surface. In general, pairwise comparison between the four different circuit types could help to rule out some of the confounding related to circuit particularities. Unfortunately, the rate of events was not high enough when considering each circuit separately to provide a sufficient power for statistical analysis. Our analysis is limited to two types of surface coating, although there are several on the market or in development, still the two technologies studied are the most used in the setting of ECMO in our country and probably in the worldwide.

Finally, these results suggest that anticoagulation strategies should be adapted by considering the thrombotic risk associated with the type of surface coating, beyond the sole risk of HIT that may be associated with heparin-based coating technologies. Randomized studies comparing different coating technologies using similar oxygenator and pump head are needed to confirm these results but need a close collaboration of manufacturers.

Conclusion

HA coated surfaces were associated with lower thrombotic complications as compared to PPC coated ones. Platelets drop during support was more sustained in Heparin-coated circuit while hemolysis seems lower. Thrombi compositions were according to surface coating. Therefore, anticoagulation strategies should be tailored considering the type of surface coating.

References

1. Gajkowski EF, Herrera G, Hatton L, Velia Antonini M, Vercaemst L, Cooley E. ELSO Guidelines for Adult and Pediatric Extracorporeal Membrane Oxygenation Circuits. *ASAIO Journal*. 2022; 68 (2):133–152. doi:10.1097/MAT.0000000000001630
2. Lorusso R, Whitman G, Milojevic M, et al. 2020 EACTS/ELSO/STS/AATS expert consensus on post-cardiotomy extracorporeal life support in adult patients. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2021;59(1):12-53. doi:10.1093/ejcts/ezaa283
3. ELSO International Summary of Statistics | ECMO | ECLS. Accessed June 28, 2022. <https://www.else.org/Registry/InternationalSummaryandReports/InternationalSummary.a.spx>
4. Moussa MD, Rouse N, Abou Arab O, et al. Subclavian versus femoral arterial cannulations during extracorporeal membrane oxygenation: A propensity-matched comparison. *J Heart Lung Transplant*. 2022; 41 (5):608–618. doi:10.1016/j.healun.2022.01.007
5. Moussa MD, Soquet J, Lamer A, et al. Evaluation of Anti-Activated Factor X Activity and Activated Partial Thromboplastin Time Relations and Their Association with Bleeding and Thrombosis during Venous-Arterial ECMO Support: A Retrospective Study. *J Clin Med*. 2021; 10 (10). doi:10.3390/jcm10102158
6. Vazquez ZGS, Sodha NR, Devers C, Ventetuolo CE, Abbasi A. Prevalence of Deep Vein Thrombosis in Patients Supported With Extracorporeal Membrane Oxygenation. *ASAIO Journal*. 2021; 67 (10): e169. doi:10.1097/MAT.0000000000001348
7. Bonicolini E, Martucci G, Simons J, et al. Limb ischemia in peripheral veno-arterial extracorporeal membrane oxygenation: a narrative review of incidence, prevention, monitoring, and treatment. *Crit Care*. 2019; 23 (1):266. doi:10.1186/s13054-019-2541-3
8. Ontaneda A, Annich GM. Novel Surfaces in Extracorporeal Membrane Oxygenation Circuits. *Front Med*. 2018; 5. doi:10.3389/fmed.2018.00321
9. Jacobs S, De Somer F, Vandenplas G, Van Belleghem Y, Taeymans Y, Van Nooten G. Active or passive bio-coating: does it matter in extracorporeal circulation? *Perfusion*. 2011; 26 (6):496–502. doi:10.1177/0267659111415146
10. Zhang M, Pauls JP, Bartnikowski N, et al. Anti-thrombogenic Surface Coatings for Extracorporeal Membrane Oxygenation: A Narrative Review. *ACS Biomater Sci Eng*. 2021; 7 (9):4402–4419. doi:10.1021/acsbiomaterials.1c00758
11. Mangoush O, Purkayastha S, Hajyahia S, et al. Heparin-bonded circuits versus nonheparin-bonded circuits: an evaluation of their effect on clinical outcomes. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2007; 31 (6):1058–1069. doi:10.1016/j.ejcts.2007.01.029
12. Ranucci M, Balduini A, Ditta A, Boncilli A, Brozzi S. A Systematic Review of Biocompatible Cardiopulmonary Bypass Circuits and Clinical Outcome. *The Annals of Thoracic Surgery*. 2009; 87 (4):1311–1319. doi:10.1016/j.athoracsur.2008.09.076

13. Pappalardo F, Valle PD, Crescenzi G, et al. Phosphorylcholine Coating May Limit Thrombin Formation During High-Risk Cardiac Surgery: A Randomized Controlled Trial. *The Annals of Thoracic Surgery*. 2006; 81 (3):886–891. doi:10.1016/j.athoracsur.2005.09.006
14. Mazzeffi M, Greenwood J, Tanaka K, et al. Bleeding, transfusion, and mortality on extracorporeal life support: ECLS working group on thrombosis and hemostasis. *Ann Thorac Surg*. 2016; 101 (2):682–689. doi:10.1016/j.athoracsur.2015.07.046
15. Guimbretière G, Anselmi A, Roisne A, et al. Prognostic impact of blood product transfusion in VA and VV ECMO. *Perfusion*. Published online November 16, 2018:267659118814690. doi:10.1177/0267659118814690
16. De Somer F, François K, van Oeveren W, et al. Phosphorylcholine coating of extracorporeal circuits provides natural protection against blood activation by the material surface. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2000; 18 (5):602–606. doi:10.1016/S1010-7940 (00)00508-X
17. Izuha H, Hattori M, Igari T, Wakamatsu D, Watanabe Mdt, Yokoyama H. Changes in platelet aggregation during cardiopulmonary bypass: comparison of poly-2-methoxyethylacrylate and heparin as a circuit coating material. *J Artif Organs*. 2005; 8 (1):41–46. doi:10.1007/s10047-004-0280-x
18. Itoh H, Ichiba S, Ujike Y, et al. A prospective randomized trial comparing the clinical effectiveness and biocompatibility of heparin-coated circuits and PMEA-coated circuits in pediatric cardiopulmonary bypass. *Perfusion*. 2016; 31 (3):247–254. doi:10.1177/0267659115598217
19. Lequier L, Annich G, Al-Ibrahim O. ELSO anticoagulation guideline. 2014. *The Extracorporeal Life Support Organization (ELSO)*. Published online 2016:1–17.
20. Austin PC. Balance diagnostics for comparing the distribution of baseline covariates between treatment groups in propensity-score matched samples. *Stat Med*. 2009; 28 (25):3083–3107. doi:10.1002/sim.3697
21. Austin PC, Lee DS, Fine JP. Introduction to the Analysis of Survival Data in the Presence of Competing Risks. *Circulation*. 2016; 133 (6):601–609. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.017719
22. Thomas LE, Li F, Pencina MJ. Overlap Weighting: A Propensity Score Method That Mimics Attributes of a Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2020; 323 (23):2417–2418. doi:10.1001/jama.2020.7819
23. Mattei A. Estimating and using propensity score in presence of missing background data: an application to assess the impact of childbearing on wellbeing. *Stat Methods Appl*. 2009; 18 (2):257–273. doi:10.1007/s10260-007-0086-0
24. Toutenburg H. Rubin, D.B.: Multiple imputation for nonresponse in surveys. *Statistical Papers*. 1990; 31 (1):180-180. doi:10.1007/BF02924688
25. Jansen PGM, Velthuis H te, Huybregts RAJM, et al. Reduced complement activation and improved postoperative performance after cardiopulmonary bypass with heparin-coated

- circuits. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 1995; 110 (3):829–834. doi:10.1016/S0022-5223 (95)70117-6
26. Sohn N, Marcoux J, Mycyk T, Krahn J, Meng Q. The impact of different biocompatible coated cardiopulmonary bypass circuits on inflammatory response and oxidative stress. *Perfusion*. 2009; 24 (4):231–237. doi:10.1177/0267659109351218
 27. Gu YJ, Boonstra PW, Rijnsburger AA, Haan J, Oeveren W van. Cardiopulmonary Bypass Circuit Treated With Surface-Modifying Additives: A Clinical Evaluation of Blood Compatibility. *The Annals of Thoracic Surgery*. 1998; 65 (5):1342–1347. doi:10.1016/S0003-4975 (98)00223-9
 28. Fosse E, Moen O, Johnson E, et al. Reduced complement and granulocyte activation with heparin-coated cardiopulmonary bypass. *The Annals of Thoracic Surgery*. 1994; 58 (2):472–477. doi:10.1016/0003-4975 (94)92231-4
 29. Ranucci M, Pazzaglia A, Isgrò G, et al. Closed, Phosphorylcholine-Coated Circuit and Reduction of Systemic Heparinization for Cardiopulmonary Bypass: The Intraoperative ECMO Concept. *Int J Artif Organs*. 2002; 25 (9):875–881. doi:10.1177/039139880202500910
 30. Ranucci M, Isgrò G, Soro G, Canziani A, Menicanti L, Frigiola A. Reduced Systemic Heparin Dose with Phosphorylcholine Coated Closed Circuit in Coronary Operations. *Int J Artif Organs*. 2004; 27 (4):311–319. doi:10.1177/039139880402700407
 31. Pappalardo F, Valle PD, Crescenzi G, et al. Phosphorylcholine Coating May Limit Thrombin Formation During High-Risk Cardiac Surgery: A Randomized Controlled Trial. *The Annals of Thoracic Surgery*. 2006; 81 (3):886–891. doi:10.1016/j.athoracsur.2005.09.006
 32. Hosoyama K, Ito K, Kawamoto S, et al. Poly-2-methoxyethylacrylate-coated cardiopulmonary bypass circuit can reduce transfusion of platelet products compared to heparin-coated circuit during aortic arch surgery. *J Artif Organs*. 2016; 19 (3):233–240. doi:10.1007/s10047-016-0887-8
 33. Ikuta T, Fujii H, Shibata T, et al. A new poly-2-methoxyethylacrylate-coated cardiopulmonary bypass circuit possesses superior platelet preservation and inflammatory suppression efficacy. *The Annals of Thoracic Surgery*. 2004; 77 (5):1678–1683. doi:10.1016/j.athoracsur.2003.10.060
 34. Thiara A, Andersen V, Videm V, et al. Comparable biocompatibility of Phisio- and Bioline-coated cardiopulmonary bypass circuits indicated by the inflammatory response. *Perfusion*. 2010; 25 (1):9–16. doi:10.1177/0267659110362822
 35. Gravlee GP. Heparin-coated cBypass circuits. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*. 1994; 8 (2):213–222. doi:10.1016/1053-0770 (94)90066-3
 36. Larm O, Larsson R, Olsson P. A New Non-Thrombogenic Surface Prepared by Selective Covalent Binding of Heparin Via a Modified Reducing Terminal Residue. *Biomaterials, Medical Devices, and Artificial Organs*. 1983; 11 (2–3):161–173. doi:10.3109/10731198309118804

37. Fuchs G, Berg N, Broman LM, PrahL Wittberg L. Flow-induced platelet activation in components of the extracorporeal membrane oxygenation circuit. *Sci Rep.* 2018;8(1):13985. doi:10.1038/s41598-018-32247-y
38. Da Q, Teruya M, Guchhait P, Teruya J, Olson JS, Cruz MA. Free hemoglobin increases Von Willebrand factor-mediated platelet adhesion in vitro: implications for circulatory devices. *Blood.* 2015; 126 (20):2338–2341. doi:10.1182/blood-2015-05-648030
39. Rana A, Westein E, Niego B, Hagemeyer CE. Shear-Dependent Platelet Aggregation: Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Front Cardiovasc Med.* 2019; 6:141. doi:10.3389/fcvm.2019.00141
40. Lancellotti S, Sacco M, Basso M, De Cristofaro R. Mechanochemistry of von Willebrand factor. *Biomol Concepts.* 2019;10(1):194-208. doi:10.1515/bmc-2019-0022
41. Hastings SM, Ku DN, Wagoner S, Maher KO, Deshpande S. Sources of Circuit Thrombosis in Pediatric Extracorporeal Membrane Oxygenation. *ASAIO J.* 2017; 63 (1):86–92. doi:10.1097/MAT.0000000000000444
42. Meyer AD, Gelfond JAL, Wiles AA, Freishtat RJ, Rais-Bahrami K. Platelet-derived microparticles generated by neonatal extracorporeal membrane oxygenation systems. *ASAIO J.* 2015; 61 (1):37–42. doi:10.1097/MAT.0000000000000164

Disclosure

All authors declare no conflicting interest.

Funding

French National Research Agency (Programme d'Investissement d'Avenir) with the Hospital-University Research in Health program (Recherche Hospitalo-Universitaire, WILL-ASSIST HEART ANR-17-RHUS-0011).

Availability of data and materials

The datasets analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request with restriction according to French and E.U regulations.

Acknowledgements

We are grateful to all the contributors of the Lille Refractory Cardiogenic Shock and Circulatory Assist Device (R-CaSCAD), Study Group (see supplemental material) and to all cardioperfusionists of the department of cardiovascular surgery.

Tables

Table 1. Patients' characteristics and description of ECMO support according to coating group before multiple imputation and propensity score weighting

	PPC-coating (N=155)	Heparin-coating (N=306)
Age ¹ , years	57.1 ± 13.7	54.6 ± 14.1
Body mass index ^{1,2} , kg/m ²	27.3 ± 5.9	28.1 ± 6.3
Male gender ¹	102/155 (65.8)	201/306 (65.7)
Comorbidities		
Stroke	7/154 (4.5)	21/303 (6.9)
Atrial fibrillation	56/155 (36.1)	66/304 (21.7)
Diabetes mellitus	40/155 (25.8)	77/304 (25.3)
Hypertension	86/154 (55.8)	140/303 (46.2)
Hypercholesterolemia	58/155 (37.4)	92/304 (30.3)
eGFR <80 ml/min/m ² before ECMO	41/153 (26.8)	158/295 (53.6)
Coronary artery disease	58/154 (37.7)	132/304 (43.4)
Valvular heart disease	37/155 (23.9)	52/304 (17.1)
Dilated cardiomyopathy ¹	21/154 (13.6)	26/304 (8.6)
SAPS II ^{1,3}	59.7 ± 21.9	56.9 ± 21.3
Lactate on admission ^{1,4} , mmol/L, median (IQR)	4.8 (2.6 to 8.9)	4.9 (2.7 to 10.1)
Prior to ECMO implant cardiac arrest ¹	56/155 (36.1)	70/306 (22.9)
Description of ECMO support		
Oxygenator brands		
Quadrox® (Maquet®)	6/155 (3.9)	306/306 (100.0)
Eos ECMO® (IivaNova®)	125/155 (80.6)	0/306 (0.0)
A.L. ONE® (Euroset®)	24/155 (15.5)	0/306 (0.0)
Oxygenator		
Low surface (<1.80 m ²)	125/155 (80.6)	0/306 (0.0)
Circular shape	149/155 (96.1)	0/306 (0.0)
Pump head		
Rotaflo®	30/155 (19.4)	209/306 (68.3)
Revolution®	125/155 (80.6)	0/306 (0.0)

HLS advance Set ®	0/155 (0.0)	97/306 (31.7)
Etiologies of refractory shocks		
Low cardiac output syndrome	53/155 (34.2)	69/306 (22.5)
Primary graft dysfunction	6/155 (3.9)	8/306 (2.6)
Myocardial infarction	38/155 (24.5)	91/306 (29.7)
Acute on chronic heart disease	33/155 (21.3)	23/306 (7.5)
Myocarditis	5/155 (3.2)	13/306 (4.2)
Pulmonary embolism	6/155 (3.9)	26/306 (8.5)
Poisoning	3/155 (1.9)	10/306 (3.3)
Right ventricle failure	2/155 (1.3)	10/306 (3.3)
Others	9/155 (5.8)	56/306 (18.3)
Postcardiotomy shock ¹	61/155 (39.4)	75/306 (24.5)
Arterial cannula > 15 French	112/150 (74.7)	217/294 (73.8)
Venous cannula > 21 French	78/150 (52.0)	185/287 (64.5)
Type of cannulation		
Femoro-femoral	134/150 (87.0)	276/299 (92.3)
Axillo-femoral	20/150 (13.0)	23/299 (7.7)
LV unloading ¹		
Left venting	9/155 (5.8)	9//155 (2.9)
IABP	4/155 (2.6)	43/155 (14.1)
Impella® CP/5.0	12/155 (7.7)	19/155 (6.2)
Duration of ECMO support, days, median (IQR)	7 (4 to 11)	8 (4 to 13)
Baseline biological variables		
Fibrinogen ^{1,5} , g/L	3.7 ± 1.7	3.3 ± 1.6
Anti-Factor Xa ^{1,6} , IU/mL, median (IQR)	0.1 (0.1 to 0.2)	0.1 (0.1 to 0.2)
Hemoglobin ⁷ , g/dL	8.9 ± 2.2	9.4 ± 2.1
Platelet count ^{1,8} , G/L	177 ± 97	190 ± 93

Values expressed as no./total no. (%) or median (interquartile range) unless otherwise indicated.¹ variables used to calculate the propensity score.

² 24 missing values (7 in PPC-coating); ³ 16 missing values (5 in PPC-coating); ⁴30 missing values (9 in PPC-coating); ⁵136 missing values (40 in PPC-coating); ⁶167 missing values (53

in PPC-coating); ⁷123 missing values (42 in PPC-coating), ⁸130 missing values (41 in PPC-coating)

Abbreviations: ECMO = Extracorporeal membrane oxygenation; eGFR=; Estimated glomerular filtration rate IABP = Intra-aortic balloon pump; IQR=interquartile range; LV= Left ventricle; PPC= Phosphorylcholine; SD= Standard deviation; SAPS II = Simplified acute physiology score II.

Table 2. Description of the histological cohort according to coating groups

	All	PPC-coating	Heparin-coating
Demographics			
Age, years	50 (46 to 66)	49 (38 to 73)	50 (47 to 66)
Male gender	10 (50)	4 (36)	6 (67)
Weight, kg	74 (60 to 85)	70 (58 to 76)	79 (60 to 95)
Height, cm	169 (164 to 175)	169 (153 to 175)	170 (165 to 176)
Comorbidities			
Stroke	3 (15)	3 (27)	0
Atrial fibrillation	6 (30)	4 (36)	2 (22)
Diabetes mellitus	5 (25)	2 (18)	3 (33)
Hypertension	7 (35)	3 (27)	4 (44)
Chronic heart failure	9 (45)	4 (36)	5 (26)
Chronic kidney disease	2 (10)	0	2 (22)
Coronary artery disease	8 (40)	5 (46)	3 (33)
VA-ECMO support			
Etiology			
Dilated cardiomyopathy	5 (25)	4 (36)	1 (11)
Myocardial infarction	3 (15)	3 (27)	0
Postcardiotomy	8 (40)	3 (27)	5 (56)
Pulmonary embolism	1 (5)	0	1 (11)
Cardiac arrest	1 (5)	0	1 (11)
Other	2 (10)	1 (9)	1 (11)
ECMO circuit duration	8 (4 to 10)	7 (6 to 9)	10 (3 to 13)
ECMO system			
Maquet ®	9 (45)	0	9 (100)
Livanova®	8 (40)	8 (73)	0
Euroset ®	3 (15)	3 (27)	0
Thrombi management			
Patients with thrombi per device location			
Pump head	16 (80)	11 (100)	5 (56)
Oxygenator	15 (75)	7 (64)	8 (89)

Circuit	20 (100)	11 (100)	9 (100)
Ablation type			
System change	6 (30)	5 (45.5)	1 (11.1)
Definite removal	14 (70)	6 (54.5)	8 (88.9)
Cause of system change			
Thrombosis	6 (30)	5 (46)	1 (11)
Severe hemolysis	14 (70)	6 (55)	8 (89)
Reason for definitive removal			
Death under support	6 (30)	5 (45.5)	1 (11)
Recovery	11 (55)	4 (36)	7 (78)
Heart transplant	1 (5)	1 (9)	0
Ventricle assist devices	2 (10)	1 (9)	1 (11)

ECMO=extracorporeal membrane oxygenation. Variables are proportion (percentages) or median (interquartile range). No comparison is provided because of limited number of patients per groups

Figure legends

Figure 1. Study flow charts. A described patient selection and study groups in the clinical cohorts. ECMO=extracorporeal membrane oxygenation, HIT=Heparin induced thrombopenia, RV=right ventricle.

Figure 2. Absolute standardized differences in pre-specified confounders (used to calculate propensity score) between main coating groups before propensity score weighting.

Absolute standardized differences were calculated after handling missing values by multiple imputation (m=10).

Figure 3. 28-day cumulative incidences of Thrombotic complications (A), Circuit Change (B), Serious Bleeding (C), mortality (D) according to coating groups in Propensity-score Weighted Cohort. All outcomes were censored at 28 days and calculated after handling missing values on covariates including propensity score by multiple imputation (combined estimates (mean value of the 10-imputed datasets) were obtained after applying complementary log-log of cumulative incidences derived from weighted Fine-and Gray or Cox's regression model).

Figure 4. Comparisons in outcomes between Heparin versus PPC coating in unadjusted, and propensity score-weighted analyses.

Values are number of events (28-day cumulative incidence, %) unless otherwise indicated. Effect sizes indicated relative risk for all-cause mortality and cause-specific hazard ratio for other outcomes calculated for Heparin- relative to PPC-coating group. Overlap-weighted effect sizes were calculated after handling missing values on covariates used to estimate the propensity score by multiple imputation. PPC= phosphorylcholine; PS=propensity

Figure 5. Changes in laboratory variables according to coating groups.

Changes of hemoglobin (A), platelets count (B), c-reactive protein (C) and leucocyte count (D) during the first 10 days of VA-ECMO support according to coating groups (Heparin-

coating versus Phosphorylcholin-coating) in overlap-weighted cohort. Evolutions were estimated using shared random-effect model weighted by overlaps weights for the joint analysis of longitudinal data (laboratory variable evolution) and time-to event data (ECMO removal); to account that the laboratory variable evolution was censored by ECMO removal. P-value are shown for mean difference between Heparin-coating (Red lines) and Phosphorylcholin-coating (Blue lines).

Figure 6. Comparison of components of thrombi retrieved from ECMO circuit junction in coating groups.

VWF=Facteur von Willebrand, NETose= présence de Neutrophil Extracellular Traps. PPC= Phosphorylcholin

Figure 1. Study flow charts.

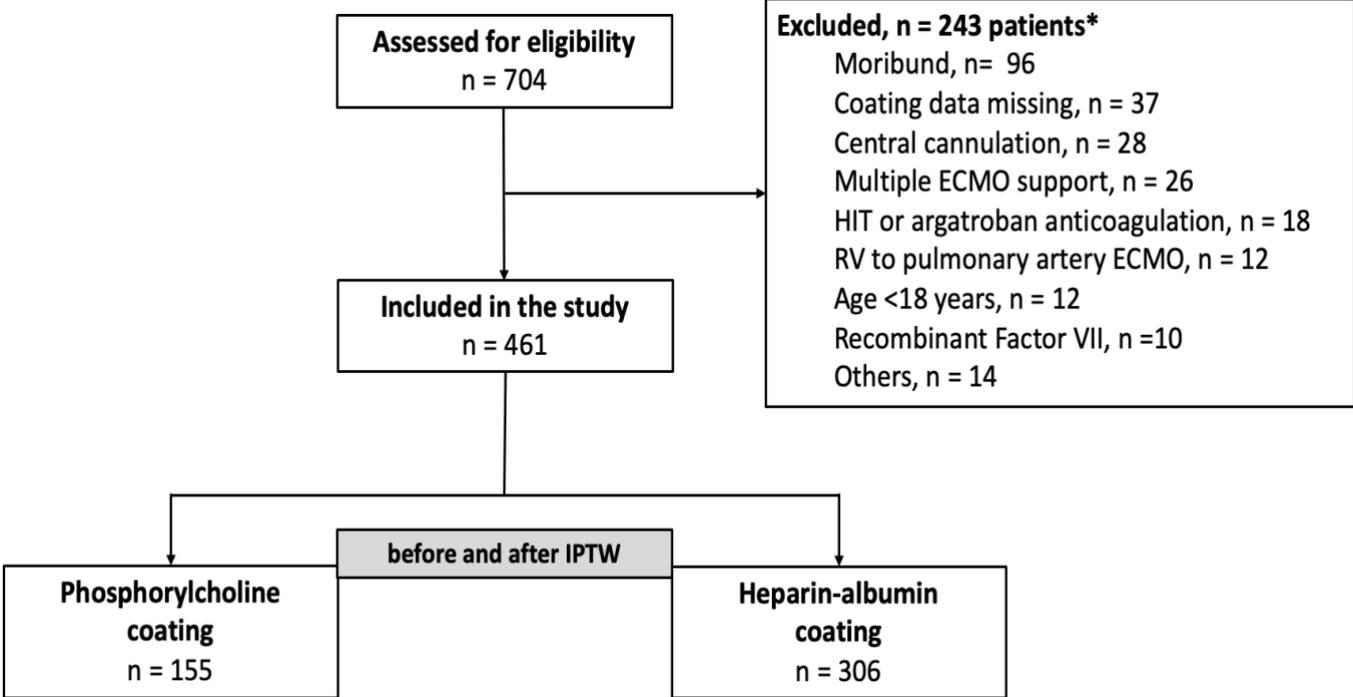


Figure 2. Absolute standardized differences in pre-specified confounders (used to calculate propensity score) between main coating groups before propensity score weighting.

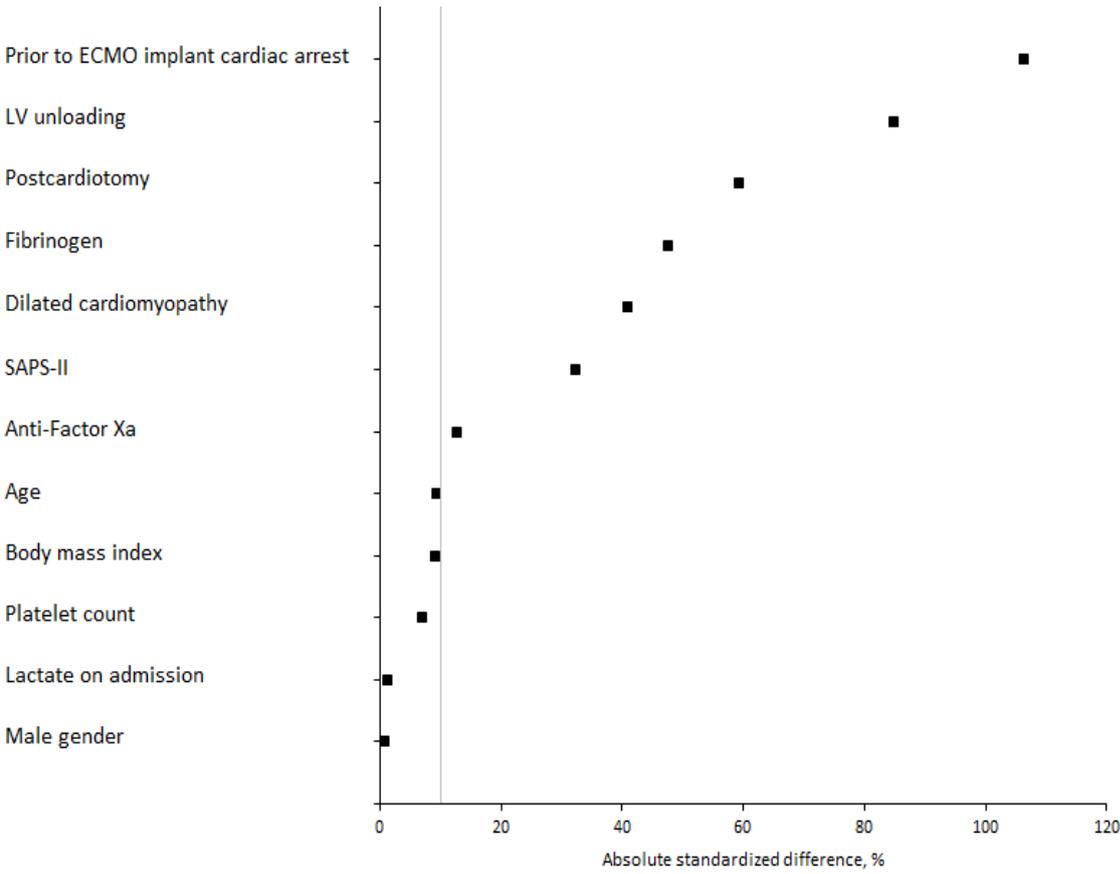


Figure 3. 28-day cumulative incidences of Thrombotic complications (A), Circuit Change (B), Serious Bleeding (C), mortality (D) according to coating groups in Propensity-score Weighted Cohort.

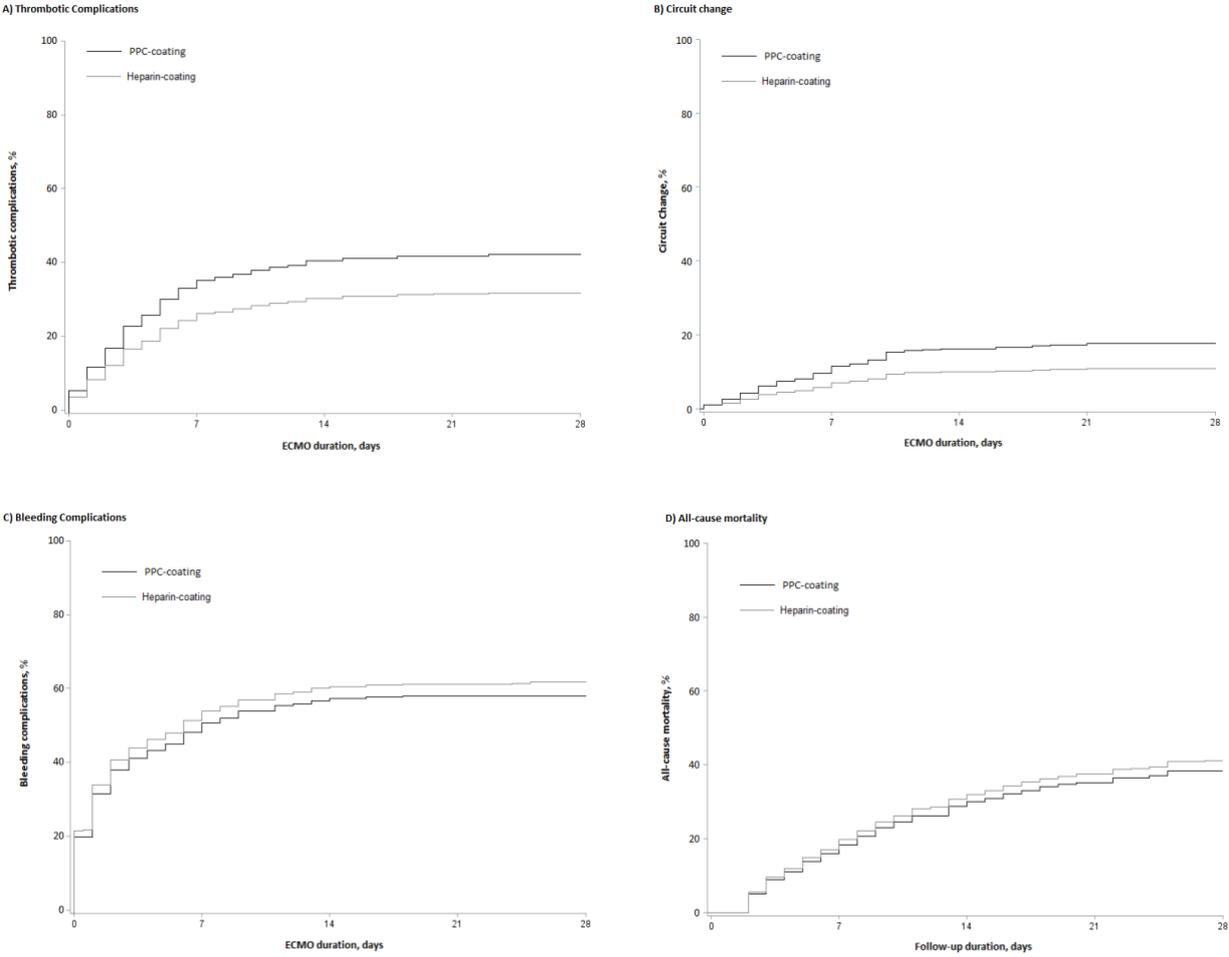


Figure 4. Comparisons in outcomes between Heparin versus PPC coating in unadjusted, and propensity score-weighted analyses.

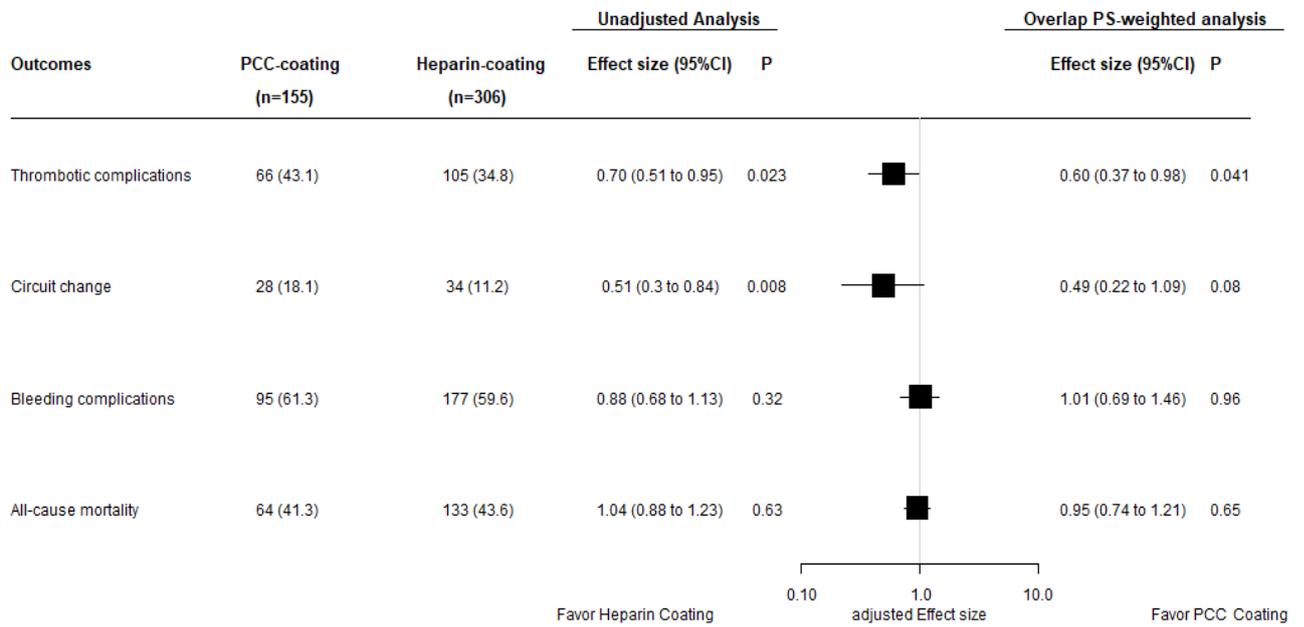


Figure 5. Changes in laboratory variables according to coating groups.

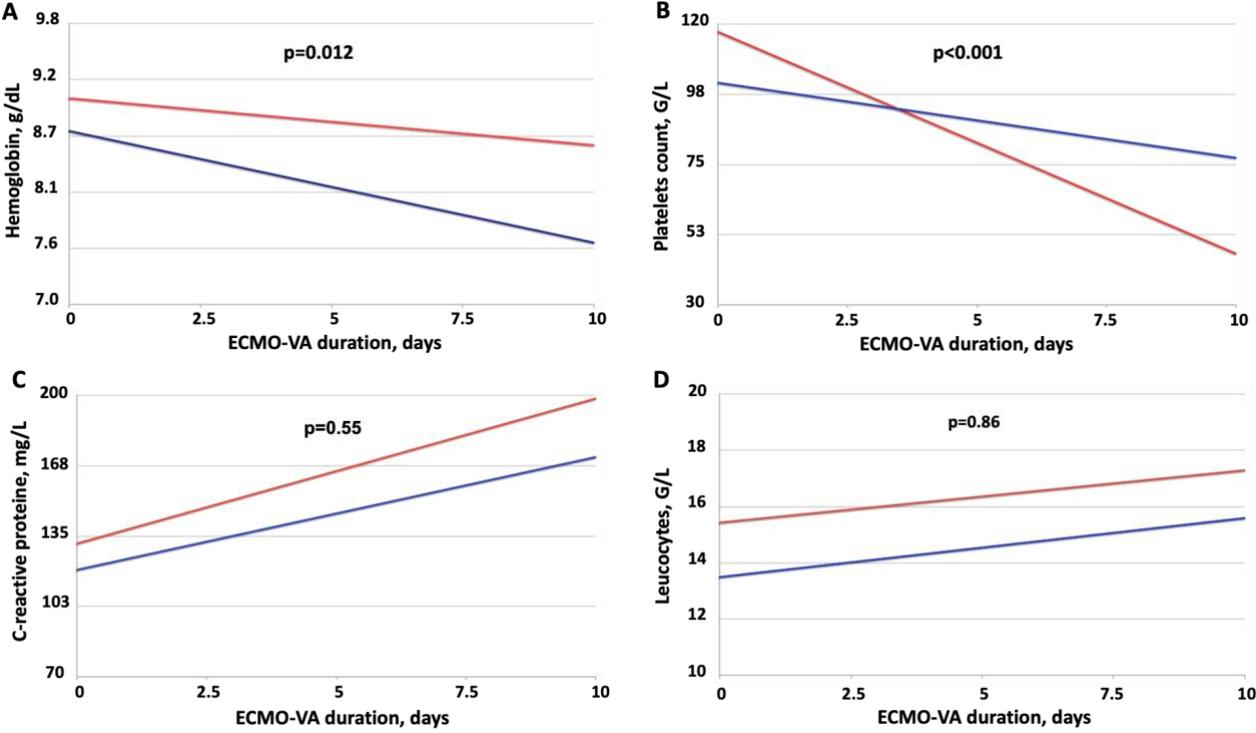
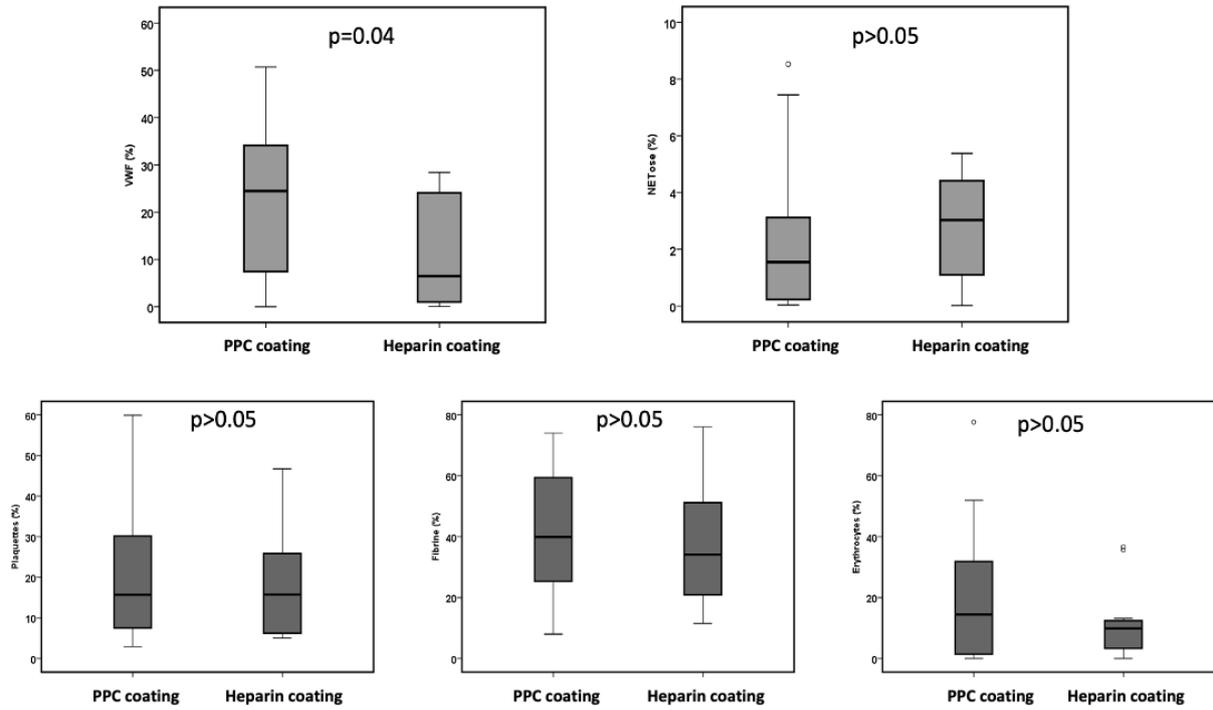


Figure 6. Comparison of components of thrombi retrieved from ECMO circuit junction in coating groups.



Supplemental Tables

Supplemental Table S1. Patients' characteristics and description of ECMO support in overall study population (N=461)

Characteristics	N	Values
Age, years	461	55.4 ± 14.0
Body mass index, kg/m ²	437	27.8 ± 6.2
Male gender	461	303 (65.7)
Comorbidities		
Stroke	459	28 (6.1)
Atrial fibrillation	459	122 (26.6)
Diabetes mellitus	459	117 (25.5)
hypertension	457	226 (49.5)
Hypercholesterolemia	459	150 (32.7)
eGFR <80 ml/min/m ² before ECMO	448	199 (44.4)
Coronary artery disease	458	190 (41.5)
Valvular heart disease	459	89 (19.4)
Dilated cardiomyopathy	458	47 (10.3)
Simplified acute physiology score II	445	57.8 ± 21.5
Lactate on admission, mmol/L, median (IQR)	431	4.9 (2.6 to 9.7)
Prior to ECMO implant cardiac arrest	461	126 (27.3)
Description of ECMO support		
Coating types		
Phosphorylcholin	461	155 (33.6)
Heparin based		306 (66.4)
ECMO circuit description		
Maquet® Rotaflow®	461	209 (45.3)
Maquet® HLS Advance®		97 (21.0)
LivaNova®		125 (27.1)
Euroset®		30 (6.5)
Oxygenator brands		
Quadrox (Maquet®)	461	312 (67.7)
Eos ECMO (LivaNova®)		125 (27.1)

A.L. ONE (Euroset®)		24 (5.2)
Oxygenator		
Low surface (<1.8 m ²)	461	125 (27.1)
Circular shape	461	149 (32.3)
Pump head		
Rotaflow®	461	239 (51.8)
Revolution®		125 (27.1)
HLS advance Set®		97 (21.0)
Etiologies of refractory shocks		
Low cardiac output syndrome	461	122 (27.5)
Primary graft dysfunction		14 (3.0)
Myocardial infarction		129 (28.0)
Acute on chronic heart disease		56 (12.1)
Myocarditis		18 (3.9)
Pulmonary embolism		32 (6.9)
Poisoning		13 (2.8)
Right ventricle failure		12 (2.6)
Others		65 (14.1)
Postcardiotomy shock	461	136 (29.5)
Type of cannulation		
Femoro-femoral	461	410 (90.5)
Axillo-femoral		43 (9.5)
Arterial cannula > 15 French	444	329 (74.1)
Venous cannula > 21 French	437	263 (60.2)
LV unloading		
Left venting	461	18 (3.9)
IABP		47 (10.2)
Impella CP/5.0®		31 (6.7)
Duration of ECMO support, days, median (IQR)	461	7 (4 to 12)

Values are number (%) or mean±SD unless otherwise as indicated.

Abbreviations: ECMO= Extracorporeal membrane oxygenation; eGFR=estimated glomerular filtration rate; IABP = Intra-aortic balloon pump; IQR=interquartile range; LV= Left ventricle, SD=standard deviation

Supplemental Table S2. Patients' characteristics and description of ECMO support according to coating and device types.

	PPC-coating		Heparin-coating	
	Livanova (n=125)	Euroset (n=30)	Maquet 1 (n=209)	Maquet 2 (n=97)
Age ¹ , years	56.4 ± 14.1	60.1 ± 11.3	54.4 ± 13.6	55.0 ± 15.1
Body mass index ^{1,2} , kg/m ²	27.2 ± 6.1	28.0 ± 4.9	28.2 ± 6.3	27.8 ± 6.4
Male gender ¹	82/125 (65.6)	20/30 (66.7)	137/209 (65.6)	64/97 (66.0)
Comorbidities				
Stroke	3/124 (2.4)	4/30 (13.3)	13/207 (6.3)	8/96 (8.3)
Atrial fibrillation	45/125 (36.0)	11/30 (36.7)	50/208 (24.0)	16/96 (16.7)
Diabetes mellitus	32/125 (25.6)	8/30 (26.7)	57/208 (27.4)	20/96 (20.8)
Hypertension	67/124 (54.0)	19/30 (63.3)	102/207 (49.3)	38/96 (39.6)
Hypercholesterolemia	44/125 (35.2)	14/30 (46.7)	66/208 (31.7)	26/96 (27.1)
eGFR <80 ml/min/m ² before ECMO	31/123 (25.2)	10/30 (33.3)	101/204 (49.5)	57/91 (62.6)
Coronary artery disease	48/125 (38.4)	10/29 (34.5)	95/208 (45.7)	37/96 (38.5)
Valvular heart disease	30/125 (24.0)	7/30 (23.3)	31/208 (14.9)	21/96 (21.9)
Dilated cardiomyopathy ¹	18/125 (14.4)	3/29 (10.3)	23/208 (11.1)	3/96 (3.1)
SAPS II ^{1,3}	58.8 ± 22.3	63.9 ± 19.6	59.1 ± 21.5	52.2 ± 20.0
Lactate on admission ^{1,4} , mmol/L, median (IQR)	4.7 (2.5 to 9.0)	5.5 (2.7 to 7.7)	5.0 (2.7 to 10.4)	4.8 (2.2 to 10.1)
Prior to ECMO implant cardiac arrest ¹	48/125 (38.4)	8/30 (26.7)	69/209 (33.0)	1/97 (1.0)

Description of ECMO support

Etiologies of refractory shocks

Low cardiac output syndrome	45/125 (36.0)	8/30 (26.7)	48/209 (23.0)	21/97 (21.6)
Primary graft dysfunction	6/125 (4.8)	0/30 (0.0)	8/209 (3.8)	0/97 (0.0)
Myocardial infarction	28/125 (22.4)	10/30 (33.3)	71/209 (34.0)	20/97 (20.6)
Acute on chronic heart disease	28/125 (22.4)	5/30 (16.7)	23/209 (11.0)	0/97 (0.0)
Myocarditis	3/125 (2.4)	2/30 (6.7)	10/209 (4.8)	3/97 (3.1)
Pulmonary embolism	4/125 (3.2)	2/30 (6.7)	17/209 (8.1)	9/97 (9.3)
Poisoning	3/125 (2.4)	0/30 (0.0)	8/209 (3.8)	2/97 (2.1)
Right ventricle failure	2/125 (1.6)	0/30 (0.0)	5/209 (2.4)	5/97 (5.2)
Others	6/125 (4.8)	3/30 (10.0)	19/209 (9.1)	37/97 (38.1)
Postcardiotomy shock ¹	53/125 (42.4)	8/30 (26.7)	59/209 (28.2)	16/97 (16.5)
Arterial cannula > 15 French	89/121 (73.6)	23/29 (79.3)	157/201 (78.1)	60/93 (64.5)
Venous cannula > 21 French	60/120 (50.0)	18/30 (60.0)	96/197 (48.7)	89/90 (98.9)
Type of cannulation				
Femoro-femoral	108/124 (87.1)	26/30 (86.7)	184/206 (89.3)	92/93 (98.9)
Axillo-femoral	16/124 (12.9)	4/30 (13.3)	22/206 (10.7)	1/93 (1.1)
LV unloading ¹				
Left venting	7/125 (5.6)	2/30 (6.7)	5/209 (2.4)	4/97 (4.1)
IABP	2/125 (1.6)	2/30 (6.7)	15/209 (7.2)	28/97 (28.9)
Impella	12/125 (9.6)	0/30 (0.0)	17/209 (8.1)	2/97 (2.1)

Duration of ECMO support, days, median (IQR)	7 (4 to 11)	7 (3 to 10)	8 (5 to 13)	7 (4 to 12)
--	-------------	-------------	-------------	-------------

Baseline biological variables

Fibrinogen ^{1,6} , g/L	3.7 ± 1.7	3.7 ± 1.7	3.3 ± 1.5	3.5 ± 1.9
Anti-Factor Xa ^{1,7} , IU/mL, median (IQR)	0.1 (0.1 to 0.2)	0.1 (0.1 to 0.3)	0.1 (0.1 to 0.2)	0.1 (0.1 to 0.2)
Haemoglobin ⁸ , g/dL	8.8 ± 2.1	9.5 ± 2.6	9.6 ± 2.2	9.1 ± 2.1
Platelet count ^{1,9} , G/L	180 ± 102	163 ± 73	189 ± 83	191 ± 115

Values expressed as no./total no. (%) or median (interquartile range) unless otherwise indicated. ¹ variables used to calculate the propensity score.

² 24 missing values (4 vs. 3 vs. 8 vs. 9 in each group); ³ 16 missing values (3 vs. 2 vs. 8 vs. 3 in each group); ⁴ 30 missing values (8 vs. 1 vs. 19 vs. 2 in each group); ⁵ 136 missing values (33 vs. 7 vs. 55 vs. 41 in each group); ⁶ 167 missing values (43 vs. 10 vs. 70 vs. 44 in each group); ⁷ 123 missing values (35 vs. 7 vs. 50 vs. 31 in each group), ⁸ 130 missing values (34 vs. 7 vs. 52 vs. 37 in each group).

Abbreviations: ECMO = Extracorporeal membrane oxygenation; eGFR= Estimated glomerular filtration rate; IABP = Intra-aortic balloon pump;

IQR=interquartile range; LV= Left ventricle; PPC=Phosphorylcholine; SD=standard deviation; SAPS II = Simplified acute physiology score II.

Supplemental Figures

Figure S1. Flowchart of the histologic cohort

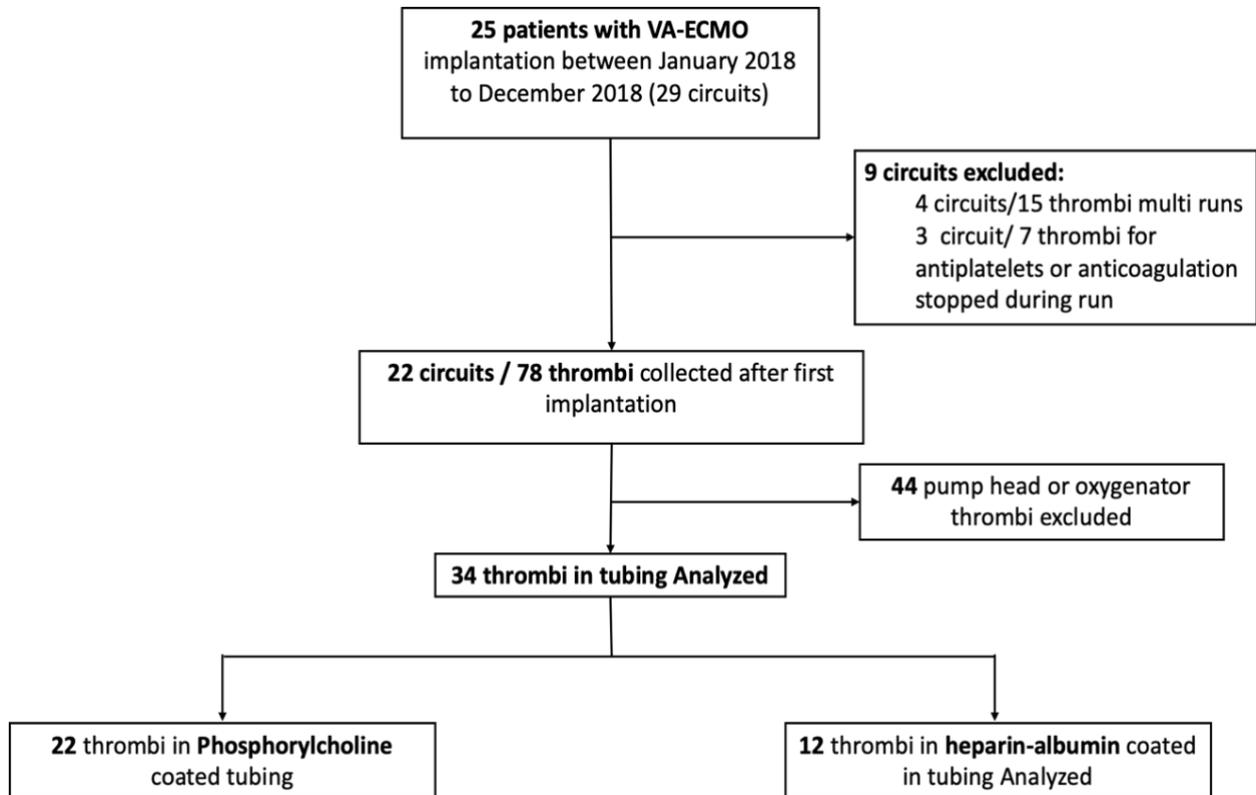


Figure S2. Propensity Score Distributions in each imputed dataset for comparison between main coating groups

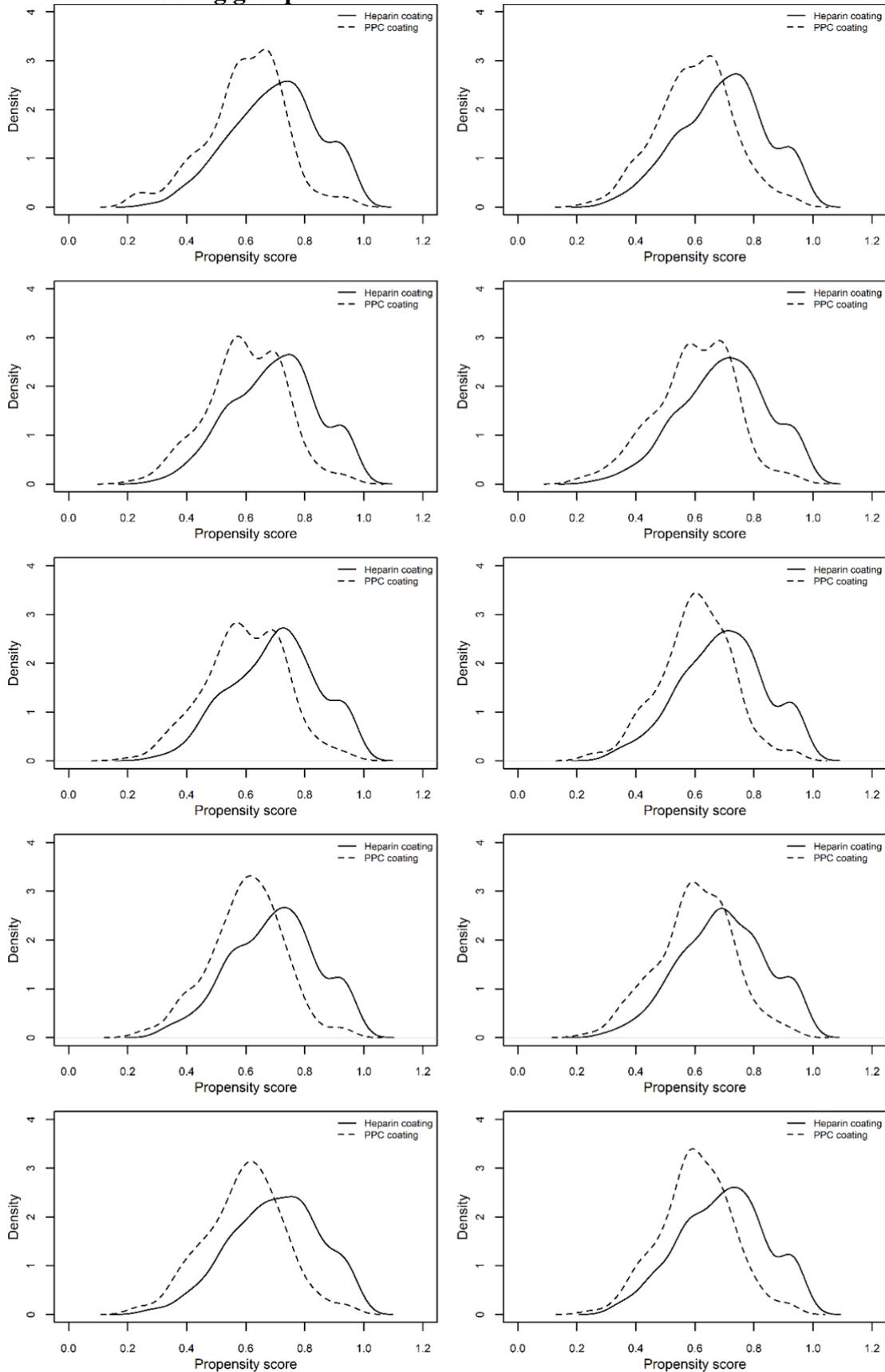
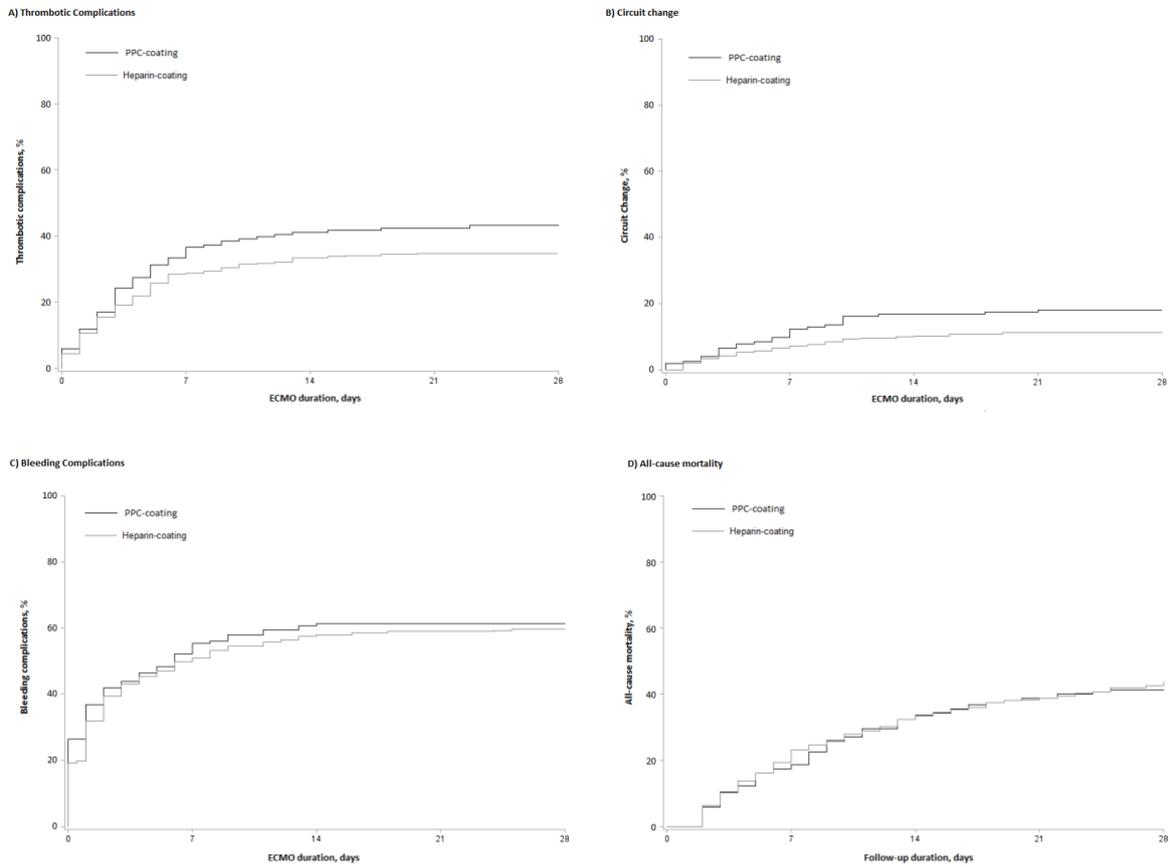


Figure S3. 28-day cumulative incidences of Thrombotic complications (A), Circuit Change (B), Serious Bleeding (C), mortality (D) according to coating groups in unadjusted Cohort. All outcomes were censored at 28 days.



III. Synthèse de l'axe thrombose

Nos résultats cliniques confirment l'incidence élevée des complications thrombotiques sous ECMO-VA, soulignant ainsi la limite des stratégies prophylactiques actuelles basées sur les revêtements de surfaces et l'héparinothérapie systémique.

Cette limite est possiblement liée à :

- une inhibition insuffisante de l'activation de la voie contact,
- l'absence de réponses prophylactiques aux autres voies d'activation de la coagulation et de l'inflammation
- et/ou à l'inadéquation de l'HNF comme anticoagulation ou de ses doses utilisés dans cette indication.

Le premier point est souligné par l'efficacité variable des techniques de revêtement de surface observé dans ce travail.

L'étude histologique confirme la très grande hétérogénéité des thrombi formés sur les circuits d'ECMO suggèrent des mécanismes locaux et systémiques variés. Cette composition semble cependant pouvoir être influencée par le type de revêtement de surface.

La réponse intuitive que constitue l'intensification de l'héparinothérapie systémique augmenterait le risque hémorragique sans pour autant inhibé la formation de thrombi en rapport avec des anomalies de flux locaux et d'autres mécanismes indépendants de la voie contact décrites plus haut. La grande richesse en VWF et en plaquettes observées par l'étude histologique mets en avant l'implication d'une activation plaquettaire flux dépendant. La mise évidence d'une NETose en l'absence de sepsis amène à envisager une inflammation systémique aseptique liée à la génération des DAMPS ou à l'insuffisance de l'inhibition de la voie du facteur XII. De façon similaire une anti-agrégation aspecificque exposerait au même

risque hémorragique accure sans certitude en termes d'efficacité aux vues des mécanismes multiples d'activation plaquettaire décrite sous ECMO-VA.

Dans ce contexte de nouvelles molécules ciblant spécifiquement la voie du facteur XII et/ou active sur la thrombine liée au caillot, et des stratégies de diminution des contraintes de flux devraient être privilégiées.

Travaux de l'axe hémorragie

I. Manuscrit 3 : Comparison of Major Bleeding Definitions for the prediction of 28-Mortality During Peripheral Venous-Arterial ECMO support

Authorship

Mouhamed Djahoum Moussa^a, Jérôme Soquet^a, Emmanuel Robin^a, Julien Labreuche^b, Natacha Rousse^a, Antoine Rauch^a, Valentin Loobuyck^a, Guillaume Leroy^c, Thibault Duburcq^d, Guillaume Gantois^c, Xavier Leroy^c, Slimane Ait-Ouarab^c, Antoine Lamer^c, Lise Thellier^c, Oliver Lukowiak^c, Guillaume Schurtz^a, Christophe Muller^a, Francis Juthier^a, Sophie Susen^a, André Vincentelli^a.

^a Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1011- EGID, F-59000 Lille, France

^b CHU Lille, Department of Biostatistics, F-59000 Lille, France

^c CHU Lille, Pôle d'Anesthésie-Réanimation, F-59000 Lille, France

^d CHU Lille, Medical Intensive Care Unit, Lille, France

Valorisation

- Présentation affichée au congrès annuel de la Société Française d'Anesthésie Réanimation
- En cours de révision dans Canadian Journal of Anesthesia, IF 6.713

A. Résumé du Manuscrit 3

Introduction

L'assistance circulatoire par ECMO veino-artérielle (VA) reste associée à un taux de complications hémorragiques particulièrement élevé pouvant atteindre 80 % des patients assistés en fonction des définitions retenues. Cette fréquence élevée du saignement cache une multiplicité de définitions et de niveau de gravité dont la pertinence clinique est peu étudiée.

La définition « serious bleeding » introduite par l'Extracorporeal Life Support Organisation (ELSO)²¹² qui tend à faire référence est empirique et sa capacité à prédire la mortalité reste inconstante dans la littérature. Les rares travaux retrouvant son association avec la mortalité sont issus de cohortes hétérogènes agrégeant des patients arborant différentes configurations d'ECMO (ECMO-VV et ECMO-VA, ECMO-VA périphérique et centrale) et ayant des étiologies hétérogènes (choc cardiogénique, SDRA et arrêt cardiaque réfractaire).^{56,88,45,48,213}

Par ailleurs d'autres définitions du saignement adaptable à l'ECMO-VA n'ont jamais été étudiés dans ce cadre. C'est le cas de la définition de Bleeding Academic Research Consortium (BARC) qui a fait l'objet d'une validation dans des cohorte de patients en choc cardiogénique²¹⁴⁻²¹⁷ et la définition « Universal Definition of Postoperative Bleeding » (UDPB) validée par plusieurs cohorte de patients de chirurgie cardiaque.^{218,219}

L'objectif principal de cette étude est d'identifier parmi ces trois définitions celles associées à la mortalité, critère retenu pour définir une hémorragie majeure dans ce travail. Les performances des définitions d'hémorragies majeures ainsi identifiées seront comparées et les facteurs prédictifs de la plus pertinente recherchés.

Matériel et méthodes

Cette étude rétrospective bicentrique porte sur des patients adultes assistés par ECMO-VA entre janvier 2013 et décembre 2019 pour un choc cardiogénique réfractaire. Les critères d'exclusion étaient : âge <18 ans, décès dans les 48 heures suivant l'assistance, l'absence de données permettant la classification du saignement ou des pronostics, l'utilisation d'arganova et/ou un diagnostic de TIH, syndrome des anti-phospholipides, utilisation d'anticoagulant oraux directe le jour de la canulation, présence d'une hémorragie avant la canulation, nouvel épisode de support par ECMO-VA en cas d'antériorité.

Les épisodes hémorragiques étaient définis d'après les classifications de l'ELSO, BARC ou l'UDPB. Le critère de jugement principal était la mortalité à 28 jours toutes causes confondues à partir du début de l'assistance par ECMO.

Analyse statistique

Les incidences cumulées des événements hémorragiques étaient estimées d'après la méthode de Kalbfleisch and Prentice en considérant le sevrage de l'ECMO comme événement compétitif. L'association indépendante entre les variables décrivant l'hémorragie et la mortalité à 28 jours était recherchée en analyse univariée et multivariée par sur un modèle de Cox en intégrant l'hémorragie comme variable temps dépendants. Les variables d'ajustements prédéfinis dans ce modèle étaient l'âge, l'indice de masse corporelle, le score IGSII, la fraction d'éjection du ventricule gauche, la lactatémie, l'hémoglobine et l'utilisation d'une décharge ventriculaire gauche. Les définitions d'hémorragie majeure étaient comparées par le C-index de Harrell et le critère d'information d'Akaike (AIC). La recherche de facteur prédictif d'hémorragie majeur reposait sur un modèle de Cox cause spécifique. Une valeur de $p < 0,05$ était significative.

Résultats

Parmi les 502 patients éligibles, 334 ont été inclus. Les incidences des épisodes hémorragiques étaient de 46,7 %, 67,1 % et 67,4 % respectivement pour la classification UDPB, les classifications BARC et ELSO.

La mortalité à 28 jours était de 40,4 % (135 patients). La définition de l'ELSO était associée à cette mortalité avant [HR 2,00 (IC 95 % 1,36 - 2,95), $p < 0.001$] et après ajustement aux facteurs confondants prédéfinis [HR 1,75 (IC 95 % 1,17 - 2,62), $p = 0,006$]. De façon similaire, la classification BARC était associée avec la mortalité à partir du stade 2 de cette classification. En retenant le critère $\text{BARC} \geq \text{type 2}$ comme une définition de l'hémorragie majeure, l'association de cette définition binaire avec la mortalité a été confirmée avant [HR 1,82 (IC 95 % 1,23 - 2,68), $p = 0,002$] et après ajustement [HR 1,60 (IC 95 % 1,07 - 2,39), $p = 0,021$] aux facteurs confondants. La classification UDPB n'était pas associée à la mortalité, quel que soit le stade considéré. La comparaison des deux définitions d'hémorragie majeure avait un C-index de Harrell de 0,681 (95% CI 0.634 to 0.727) pour la définition d'ELSO et de 0,681 (95% CI 0.634 to 0.729) pour la définition $\text{BARC} \geq \text{type 2}$. Les critères d'AIC respectifs pour la définition d'ELSO et de BARC étaient de 1486 et 1458.

Les principaux facteurs prédictifs de la survenue d'une hémorragie majeure selon la définition de l'ELSO étaient l'étiologie postcardiotomie, l'indice de masse corporel, et le taux de fibrinogène, le compte plaquettaire et l'hémoglobine à la canulation.

Conclusion

Les définitions du saignement de l'ELSO et la définition $\text{BARC} \geq \text{type 2}$ étaient significativement associées à la mortalité à 28 jours dans une population homogène de patients assistés par ECMO-VA avec des performances étant comparables. Les facteurs prédictifs d'hémorragie majeure d'après la définition de l'ELSO étaient l'indice de masse corporelle, l'étiologie postcardiotomie, la fibrinogénémie, le compte plaquettaire, et l'hémoglobine.

B. Manuscrit intégral (en révision)

Comparison of Major Bleeding Definitions for the prediction of 28-Mortality During Peripheral Venous-Arterial ECMO support

Mouhamed Djahoum Moussa^a, Jérôme Soquet^a, Emmanuel Robin^a, Julien Labreuche^b, Natacha Rousse^a, Antoine Rauch^a, Valentin Loobuyck^a, Guillaume Leroy^c, Thibault Duburcq^d, Guillaume Gantois^c, Xavier Leroy^c, Slimane Ait-Ouarab^c, Antoine Lamer^c, Lise Thellier^c, Oliver Lukowiak^c, Guillaume Schurtz^a, Christophe Muller^a, Francis Juthier^a, Sophie Susen^a, André Vincentelli^a.

^a Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1011- EGID, F-59000 Lille, France

^b CHU Lille, Department of Biostatistics, F-59000 Lille, France

^c CHU Lille, Pôle d'Anesthésie-Réanimation, F-59000 Lille, France

^d CHU Lille, Medical Intensive Care Unit, Lille, France

Running title: Major bleeding definitions, mortality and VA-ECMO

Corresponding author

Mouhamed D. MOUSSA

Service d'Anesthésie-Réanimation Cardiovasculaire et thoracique,

Institut Cœur - Poumon, CHU Lille, 2 avenue Oscar Lambret, 59 037 Lille France

Tel number: (+33) 320,445,962; Fax number: (+33) 320,444,810

E-mail: mouhamed.moussa@chru-lille.fr; Twitter handle: [@MoussaDMouhamed](https://twitter.com/MoussaDMouhamed)

Disclosures : All authors declare no conflicting interest

Funding : French National Research Agency (Programme d'Investissement d'Avenir) with the Hospital-University Research in Health program (Recherche Hospitalo-Universitaire, WILL-ASSIST HEART ANR-17-RHUS-0011)

Trial registration : CERAR (IRB 00010254-2022-050, Paris, France) on April 18, 2022

Word counts:

Abstract : 233/250

Manuscript main body : 2808

References : 30

Tables : 6

Figures : 3

Implication Statement:

A broad variety of definitions is used to report bleeding complications during ECMO support. Besides, studied populations are highly heterogenous resulting in hampered interpretation and relevance of findings. These complications have never been studied in a homogenous population of peripheral VA-ECMO patient supported for cardiogenic shock solely.

Among bleeding definitions studied, ELSO-serious bleeding and BARC \geq Type 2 were found independently associated with 28-day mortality with similar performances. ELSO-serious bleeding predictors were postcardiotomy, BMI, fibrinogen, platelets and hemoglobin.

Abstract

Purpose: Severity of bleeding events is heterogeneously defined during peripheral veno-arterial ECMO (pVA-ECMO). We define major bleeding events as those associated with mortality and compared 3 bleeding definitions performances for mortality prediction in pVA-ECMO for cardiogenic shock. Bleeding definitions studied were the Extracorporeal Life Support Organization (ELSO)-serious bleeding, the Bleeding Academic Research Consortium (BARC) and the Universal Definition of Postoperative Bleeding classifications (UDPB).

Methods: We included consecutive adult patients supported by pVA-ECMO for refractory cardiogenic shock admitted in the Lille academic hospitals between January 2013 to December 2019. Associations of bleeding definitions with 28-day all-cause mortality were analyzed using multivariate models accounting for time-dependent and competing variables. We compared models' performances using the Harrell's C-Index and the Akaike information criteria.

Results: 28-day mortality occurred in 135 (40.4%) patients over the 344 included. Following multivariate regressions, ELSO-serious bleeding [HR 1.75 (95% CI 1.17-2.62)] and BARC \geq type 2 [HR 1.60 (95% CI 1.07-2.39)] were associated with 28-day mortality. Their respective Harrell's C-indexes were 0.681 (95% CI 0.634 to 0.727) and 0.681 (95% CI 0.634 to 0.729). Predictors of ELSO-serious bleeding were postcardiotomy etiology, body mass index, baseline platelets, fibrinogen and hemoglobin levels.

Conclusion: ELSO-serious bleeding and BARC \geq type 2 are relevant definitions of major bleeding regarding their association with mortality in this homogenous population of pVA-ECMO supported for cardiogenic shock. The relevance of the modifiable risk factors for major bleeding identified remains to be confirm in future trials.

Key words: Extracorporeal Membrane Oxygenation; Major Bleeding; Extracorporeal Life Support Organization Definition serious bleeding; Bleeding Academic Research Consortium (BARC); Universal Definition of Postoperative Bleeding; 28-day mortality.

Introduction

Peripheral veno-arterial extracorporeal membrane oxygenation (pVA-ECMO) is positioned as reference over central VA-ECMO, because of its association with a better outcome in adult refractory cardiogenic shock (CS). [1–4] However, pVA-ECMO remains associated with high mortality and morbidity rates remain high. Among those possible outcome drivers are bleeding events which have a relatively high incidence, ranging from 30 to 80% of VA-ECMO supported patients according to disease patterns and definitions used. [5–7]

Despite the significant literature available and a better understanding of their underlying mechanisms, [8, 9] bleeding complications are poorly studied in a homogenous pVA-ECMO population supported for CS.

Besides, the Extracorporeal Life Support Organization (ELSO) serious bleeding is designed to describe bleeding severity [10] but has never been validated to predict mortality in this population. [11–15] In addition, the few available attempts to validate this score for mortality prediction have conflicting results and come from heterogeneous cohorts. The latter could have associated ECMO-VA and ECMO-VV, central and peripheral ECMO, etiologies characterized by very different mortality (ARDS, cardiogenic shock or refractory cardiac arrest). [16–19] As result, translation of these findings to pVA-ECMO patients may be inaccurate. Moreover, other relevant definitions of major bleeding available and validated in various disease settings have never been compared to the ELSO serious bleeding definition for mortality prediction in ECMO patients.

The Universal Definition of Postoperative Bleeding (UDPB) following cardiac surgery is one of those.[20] This multistage definition was prospectively validated in cardiac surgery cohorts. [20–22] The Bleeding Academy Research Consortium (BARC) definition of bleeding is another relevant multistage classification of bleeding events initially designed for cardiovascular clinical trial.[16]

The purpose of this study was first, to analyze the association between ELSO-serious bleeding and mortality in a homogenous pVA-ECMO patients supported for CS. Second, we sought to compare the discriminative ability of ELSO-serious bleeding against BARC and UDPB definitions of major bleeding for mortality prediction. Finally, we planned to identify predictors of ELSO major bleeding in a homogenous population of pVA-ECMO supported for CS.

Methods

This historical cohort study was performed in two academic intensive care units of Lille University Hospital, referral for ECMO support and heart transplantation (Réanimation Cardio-Vasculaire, Institut Cœur-Poumon; Pôle des Réanimations, Hôpital Salengro).

Approval was obtained from the ethical committee of the French Society of Anesthesia and Intensive Care Medicine, CERAR (IRB 00010254-2022-050, Paris, France) on April 18, 2022, which waived the need for informed consent given the retrospective setting.

We included consecutive adult patients (age ≥ 18 years-old) supported with pVA-ECMO for refractory CS from January 2013 to December 2019. Exclusion criteria were age < 18 -year-old, ECMO for refractory cardiac arrest, moribund patients (death within 24 hours of cannulation for failure to run the ECMO, cerebral death, withdrawal of intensive care, and refractory vasoplegia after heart transplantation), missing bleeding classification data, heparin induced thrombocytopenia or argatroban use during ECMO support, bleeding before ECMO cannulations, multiple ECMO runs (only the first run was kept in the analysis), antiphospholipid syndrome, vitamin K antagonist and direct oral anticoagulant use the day of cannulation.

Data Collection and Studied Variables

Anthropometric, medical history and clinical management variables were collected from our electronic health records. Those included the type of ECMO, the need for left ventricle venting and the duration of support, baseline hemoglobin, platelet count, fibrinogen, anti-Xa activity (Anti-Xa), lactate and total bilirubin. We also recorded daily transfused packed red blood cells (PRBC), fresh frozen plasma (FFP) and platelet concentrate (PC), the need for surgical reexploration for bleeding and the use of activated recombinant factor VII (rFVIIa).

Study Endpoint

The primary endpoint was 28-day mortality, defined as death from any cause between pVA-ECMO cannulation and the following day 28. Mortality status at 28 days was confirmed by analyzing national mortality database (Institut national des statistiques et des études économiques, France).

Definitions and Descriptions of Bleeding Events

Bleeding events during ECMO support were described using the 3 definitions that may qualify for major bleeding status: ELSO-serious bleeding definition, [10] UDPB [20] and BARC classifications.[16]

The criteria of each of these definitions were adapted from the originals when necessary to fit with ECMO patients and are detailed in **Table 1**. Differences between adapted and original definitions are provided in **Supplemental Table S1**.

Major bleeding was defined as bleeding events associated with 28-day mortality. To allow comparison with ELSO definition, we have first identified stage from which each multistage bleeding classification (UDPB and BARC) was associated with 28-day mortality following multivariate analyses. A binary definition of major bleeding was then considered from this threshold.

ECMO Managements

We use coated extracorporeal centrifugal pump system [Rotaflow (Maquet Gentige group, Rastatt, Germany), Revolution (LivaNova Group, Saluggia, Italy), Centrimag (Thoratec, Pleasanton, CA)] with coated polyvinyl chloride tubing, a hollow fiber membrane oxygenator [Quadrox (Maquet Gentige group, Rastatt, Germany), Eos ECMO (LivaNova Group, Saluggia, Italy)] ventilated with an oxygen-air blender (Sechrist Industries, Anaheim, CA).

Peripheral VA-ECMO cannulation was performed in the femoral vein and femoral or axillary arteries. LV unloading was performed using LV apical or transpulmonary vein venting, Impella CP or 5.0 (Abiomed, Inc, Danvers, MA) insertion, vented atrioseptostomy, intraaortic balloon pumping. Initial cardiac index was set at 2.2 L/min/m², then adjusted to target SvO₂ >65% or ScVO₂ >70%, mean arterial pressure >60 mmHg, aortic valve opening and optimal right ventricle unloading. Weaning was generally considered for recovery when cardiac output remained sufficient (Aortic Velocity Time Integral ≥12 cm/s) despite lowering ECMO flow to minimal for 30 minutes, with no or reduced inotropic support. ECMO bridging to heart transplantation or long-term ventricle assist devices were considered after five to seven days of support according to patients' conditions.

Anticoagulation, Transfusion and Bleeding Management

A 50 to 100 UI/kg of unfractionated heparin bolus was given before cannulations followed by a continuous infusion adjusted to an Anti-Xa of 0.2 to 0.4 IU/mL according to pump flow. The Anti-Xa could be increased at 0.4 to 0.7 IU/mL in case of specific curative anticoagulation indication, or lowered in case of high ECMO flow or increased bleeding risk or even stopped in case of scheduled invasive procedures or bleeding complications.

Bleeding complications resulted in an interruption of heparin infusion or protamine reversal according to the severity of bleeding and at the discretion of the attending physician. PRBC were transfused when hemoglobin <8 g/dL. FFP were given to maintain an INR less than 1.5 and aPTT ratio less than 2 x normal value, or for PRBC to FFP ratio of 2/1 to 1/1 in cases of massive transfusion. PC was administered to maintain a minimal count of >50,000/mm³ (increased to >70,000/mm³ in case of bleeding). We considered rFVIIa administration according to a predefined protocol (**Supplementary Methods**). Surgical exploration was

considered in case of overt bleeding after coagulation parameters improvement or clinical evidence of surgical source of bleeding.

Statistical Analysis

A more detailed description of the statistical analysis is provided in the **Supplementary Methods**.

Quantitative variables are expressed as means (standard deviation) in the case of normal distribution or medians (interquartile range) otherwise. Categorical variables are expressed as numbers (percentage). The 28-day cumulative incidences of bleeding events during pVA-ECMO for each bleeding classifications were estimated using Kalbfleisch and Prentice method, considering pVA-ECMO weaning within 28-day as a competing event.

We assessed the association of the bleeding events during pVA-ECMO according to the different bleeding categories with 28-day mortality using univariable and multivariable Cox's regression models by considering bleeding events as a time-dependent covariates. Multivariable Cox's regression models included the following pre-specified confounders, age, body mass index, simplified acute physiology score II, left ventricular ejection fraction, lactate and hemoglobin levels at baseline, and LV loading during pVA-ECMO treated as dependent covariates. To compare the performance of the different bleeding events classification, we calculated the Akaike information criteria (AIC) and the Harrell's C-index; lower is the AIC, better is the fit of the model and greater is the Harrell's C-index, better the model distinguishes survivors from non-survivors at 28-day.

Finally, we assessed the association of main patient's characteristics with ELSO-serious bleeding events using univariable and multivariable cause-specific Cox's regression models considering pVA-ECMO weaning as competing events. LV unloading during pVA-ECMO was treated as a time-dependent covariate into the Cox's regression model.[23] Variables with

a p-value <0.10 in bivariate analyses were implemented into a backward stepwise Cox's regression model using removal criteria of 0.10. To prevent collinearity, platelet count was considered in a first model separate from hemoglobin and fibrinogen which were included in another model. The performance of the final multivariable models were assessed by calculating the Harrell's C-index.[24]

Multivariable Cox's models were performed after handling missing data on covariates by using multiple imputation procedure.[25] Imputation procedure was performed using regression-switching approach under the missing at random assumption using all baseline characteristics, bleeding and death, with a predictive mean matching method for quantitative variables and logistic regression model for categorical variables. Estimates obtained in the different imputed data sets were combined using Rubin's rules.[26]

Statistical testing was conducted at the two-tailed α -level of 0.05. Data were analyzed using the SAS software version 9.4 (SAS Institute, Cary, NC).

Results

Of the 502 pVA-ECMO patients screened for inclusion, 334 patients met the inclusion criteria and were analyzed (**Figure 1**). Their baseline characteristics, pVA-ECMO support details and outcomes are summarized in **Table 2**.

Bleeding events occurred in 46.7%, 67.1% and 67.4% of patients, respectively for UDPB, ELSO and BARC bleeding classifications. Their cumulative incidence curves are shown in **Supplemental Figure S1 and S2**.

The most common sites of bleeding were the pericardium (30.2%) followed by cannulation sites (22.2%) (**Table 3**). Most patients received a PRBC transfusion (93.7%). PC, FFP and rFVIIa were given to 65.5%, 58.5% and 3% of patients, respectively. The median (IQR) number of blood products transfused were 1.5 (0.8 to 2.7) units/ECMO days for PRBC, 0.6

(0.3 to 1.0) units/ECMO days for PC and 1.0 (0.5 to 2.2) units/ECMO days for FFP. Further details about bleeding, transfusion and between group comparisons are shown in **Table 3**.

Association of Major Bleeding Events and 28-day Mortality

The primary endpoint was met in 135 (40.4%) patients and the 90-day mortality rate was 52.1% (95% CI, 46.6 to 57.3) (**Supplemental Figure S3**).

Unadjusted comparison of bleeding definitions and 28-day mortality are available **Supplementary Table S2**. Following multivariate analysis, ELSO-serious bleeding was significantly associated with 28-day mortality [adjusted HR 1.75 (95% CI 1.17 to 2.62), p-value=0.006]. Similarly, BARC classification was association with 28-day mortality after adjustment to confounders (**Table 4**). BARC \geq Type 2 events were thus defined as major bleeding (BARC-major bleeding) as BARC type 2 was the first stage of this classification associated with 28-day mortality. Association of BARC-major bleeding was confirmed in another multivariate analysis [adjusted HR 1.60 (95% CI 1.07 to 2.39), p-value=0.021]. (**Table 4, Figure 3**).

The Harrell's C-indexes for ELSO-serious bleeding and for BARC classification were similar with overlapping 95% CI as were the lowest AIC observed for ELSO and BARC-major bleeding (**Table 4**).

The UDPB was not associated with 28-day mortality after adjustment to confounders (**Table 4**).

Prediction of ELSO Serious Bleeding Events

Characteristics of bleeders and non-bleeders according to ELSO-serious bleeding are detailed in **Supplemental Table S3**. Candidate covariables included in the multivariate analyses were,

body mass index (BMI), valvular heart disease, LV ejection fraction, SAPS II, baseline fibrinogen, platelets, hemoglobin and Anti-Xa and postcardiotomy etiology.

Among those BMI and postcardiotomy were associated with increased hazard of ELSO-serious bleeding in the two multivariate models performed to account for collinearity between laboratory variables. Platelets count in model 1, fibrinogen and hemoglobin in model 2, were also associated with ELSO-serious bleeding (**Table 5, Figure 3**) after multivariate analysis. Description of bleeding events according to postcardiotomy etiology is provided in **Supplemental Table S4**.

Discussion

This study is, to our knowledge, the first to compare predictive abilities of different major bleeding definitions in an ECMO population in general and more specifically in pVA-ECMO population. The main findings can be summarized as follows (**Figure 3**): First, unlike UDPB classification, ELSO-serious bleeding and BARC-major bleeding definitions were independently associated with 28-day mortality. Second, performance metrics of both ELSO-serious bleeding and BARC-major bleeding models were, however, moderate to good. Third, the main predictors of ELSO-serious bleeding were postcardiotomy etiology, BMI, baseline platelets count, fibrinogen and hemoglobin.

The lack of association between UDPB and 28-day mortality may be related to its reduced sensitivity compared with the ELSO and BARC major bleeding definitions, with incidences of 47.6%, 67.1%, and 67.4%, respectively. The UDPB criteria for defining major and severe bleeding are indeed more demanding in the number of transfusions, resulting in a lower incidence.

Association of ELSO-Serious Bleeding With Mortality

To the best of our knowledge, this study is the first to investigate the association between ELSO-serious bleeding occurring during the entire period of pVA-ECMO support and mortality in pVA-ECMO patient supported for CS. Ellouze *et al.* had examined the association of ELSO-serious bleeding and mortality in VA-ECMO patients considering, however, bleeding that occurred within the first 48 hours of support.[27] More importantly, this study included refractory cardiac arrest patients along with CS patients despite substantial differences in mortality rates and in disease characteristics. Nonetheless, our work and Ellouze *et al.* study [27] found a significant association between ELSO-serious bleeding and mortality in pVA-ECMO patients.

Of concern, two other groups have studied this association in both VA- and veno-venous ECMO patients and found opposite results. [13, 14] Aubron *et al.* reported that ELSO-serious bleeding was significantly associated with mortality after a multivariate Cox proportional model [13] whereas Mazzeffi *et al.* [14] did not observe a significant association between ELSO-serious bleeding and in-hospital mortality. This discrepancy may reflect differences in patients' characteristics, transfusion and bleeding management, sample size and statistical methods used.

Comparison of ELSO-Serious Bleeding and BARC

The BARC classification was extensively studied in large cohorts of CS to investigate bleeding association with mortality; however, very little data is available for VA-ECMO patient. In a pre-defined substudy of the Culprit-Shock II trial, authors report an association between VA-ECMO or Impella® and the occurrence of severe bleeding defined as BARC \geq type 3b.[19] Very recently, Levy *et al.* published a randomized control study where bleeding was defined according to BARC classification. [28, 29] However, these studies did not assess the association between bleeding and mortality. To the best of our knowledge, our results are

thus the first to use the BARC classification for major bleeding definition and mortality prediction in VA-ECMO setting.

BARC type 3b to type 5 was considered as severe bleeding in Culprit-Shock II trial patients based on a 2-fold increase in mortality associated with these stages.[19] Yet, this threshold could hardly be applied to pVA-ECMO patient. For this reason, defining a specific threshold for pVA-ECMO (Bleeding stage \geq BARC type 2) was relevant for clinical decision-making and research purpose. The performance of BARC-major bleeding using this threshold was similar to ELSO-serious bleeding definition with similar AIC and Harrell's C-index suggesting a possible use along with the ELSO-serious bleeding.

For both ELSO-serious bleeding and BARC classifications, we observed a Harrell's C-index between 68% and 70% indicating a rather moderate to good predictive performances. This observation calls for the development of a more accurate bleeding classification for pVA-ECMO patients.

Serious Bleeding Prediction

Regarding the bleeding risk factors identified in the present study, postcardiotomy shock has already been reported in VA-ECMO setting. [13, 27] Those patients receive high anticoagulation regimen during surgery, may suffer from cardiopulmonary bypass related coagulopathy and had more serious surgical wound what may favor bleeding. The association between BMI and ELSO-serious bleeding observed in this study may reflect peripheral cannulation difficulties in obese patients.

Interestingly, abnormalities in some laboratory tests of hemostasis, which can be easily corrected, were found to be associated with ELSO-serious bleeding. In line with our results, fibrinogen level was shown to be associated with major bleeding following cardiac surgery [30] with guidelines recommending correction generally when <1.5 g/dL, and in the VA-

ECMO setting.[27] In support of our findings, Ellouze et *al.* identified baseline hemoglobin as ELSO-serious bleeding predictors, suggesting a more active role of RBCs in coagulation beyond their involvement on blood rheology. Platelet count was associated with increased bleeding as previously reported in two studies of mixed veno-venous and VA-ECMO population with, however, a limited number of patients included [31] or a focus on intracranial hemorrhage alone.[32] Notably, as previously reported, Anti-Xa was not associated with serious bleeding in our study.[15]

Our results emphasizes the need for the implementation of hemostasis management protocol which could be based on the latest ELSO guideline.[33] Concerning postcardiotomy patients, the risk of bleeding could be reduced by strict antagonization of heparin before chest closure and rapid correction of coagulation anomalies such as hypofibrinogenemia or thrombocytopenia using point-of-care coagulation testing particularly viscoelastic coagulation tests.

Limitations

This study suffers from several limitations. The retrospective setting is a source of confounding biases, misclassification of bleeding events and loss of information. Indeed, information about the compliance to our anticoagulation and blood transfusion protocols were not recorded. Further exclusion of moribund patient has certainly reduced the mortality rate observed and may have reduced the rate of bleeding.

As no causality can be demonstrated regarded to our study design, prospective studies are needed to confirm the relationship of the ELSO, BARC and UDPB classifications and mortality.

In conclusion, ELSO-serious bleeding and BARC \geq type 2 are relevant definitions of major bleeding given their association with 28-day mortality in this homogeneous population of

pVA-ECMO population supported for cardiogenic shock. Using either definition, the incidence of major bleeding remained high (>60%). We have identified potentially modifiable risk factors for major bleeding (thrombocytopenia, hypofibrinogenemia and anemia), their clinical relevance remains to be demonstrated in future trials.

Abbreviations

Anti-Xa: anti factor X activity

BARC: Bleeding academic research consortium

CI: Confidence interval

CS: Cardiogenic shock

ECMO: Extracorporeal membrane oxygenation

ELSO: Extracorporeal life organization

UDPB: Universal definition of postoperative bleeding following cardiac surgery

VA: veno-arterial

Availability of data and materials

The datasets analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request with restriction according to French and E.U regulations.

Authors' contributions

Study design and conception: M.D.M., A.V., E.R.

Data collection and endpoints adjudication: A.L., L.T., M.D.M., O.L., N.R., A.R., V.L., G.L., T.D., G.G., X.L., G.S., S.A-O.

Statistical analyses and data management: J.L., A.L.

Results analysis and interpretation: M.D.M., O.L., N.R., A.R., G.S., V.L., G.L., S.A-O., T.D., G.G., F.J., C.M., S.S., E.R., A.V.

Manuscript drafting: M.D.M., J.S., E.R., O.L., L.T., A.V.

Manuscript reviewing: All authors

Acknowledgements

We are grateful to all the contributors of the Lille Refractory Cardiogenic Shock and Circulatory Assist Device (R-CaSCAD), Study Group (see supplemental material) and to all cardioperfusionists of the department of cardiovascular surgery.

References

1. Lorusso R, Shekar K, MacLaren G, et al (2021) ELSO Interim Guidelines for Venous Arterial Extracorporeal Membrane Oxygenation in Adult Cardiac Patients. *ASAIO Journal* 67:827. <https://doi.org/10.1097/MAT.0000000000001510>
2. Lorusso R, Whitman G, Milojevic M, et al (2021) 2020 EACTS/ELSO/STS/AATS expert consensus on post-cardiotomy extracorporeal life support in adult patients. *Eur J Cardiothorac Surg* 59:12–53. <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezaa283>
3. Mariscalco G, Salsano A, Fiore A, et al (2020) Peripheral versus central extracorporeal membrane oxygenation for postcardiotomy shock: Multicenter registry, systematic review, and meta-analysis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 160:1207-1216.e44. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2019.10.078>
4. Raffa GM, Kowalewski M, Brodie D, et al (2019) Meta-Analysis of Peripheral or Central Extracorporeal Membrane Oxygenation in Postcardiotomy and Non-Postcardiotomy Shock. *The Annals of Thoracic Surgery* 107:311–321. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2018.05.063>
5. Aubron C, Cheng AC, Pilcher D, et al (2013) Factors associated with outcomes of patients on extracorporeal membrane oxygenation support: a 5-year cohort study. *Crit Care* 17:R73. <https://doi.org/10.1186/cc12681>
6. Chen W-C, Huang K-Y, Yao C-W, et al (2016) The modified SAVE score: predicting survival using urgent veno-arterial extracorporeal membrane oxygenation within 24 hours of arrival at the emergency department. *Crit Care* 20:. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1520-1>
7. Schmidt M, Burrell A, Roberts L, et al (2015) Predicting survival after ECMO for refractory cardiogenic shock: the survival after veno-arterial-ECMO (SAVE)-score. *Eur Heart J* 36:2246–2256. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv194>
8. Baumann Kreuziger L, Massicotte MP (2015) Mechanical circulatory support: balancing bleeding and clotting in high-risk patients. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2015:61–68. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2015.1.61>
9. Tauber H, Ott H, Streif W, et al (2015) Extracorporeal membrane oxygenation induces short-term loss of high-molecular-weight von Willebrand factor multimers. *Anesth Analg* 120:730–736. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000000554>
10. [elsoanticoagulationguideline8-2014-table-contents.pdf](#)
11. Cheng R, Hachamovitch R, Kittleson M, et al (2014) Complications of extracorporeal membrane oxygenation for treatment of cardiogenic shock and cardiac arrest: a meta-analysis of 1,866 adult patients. *Ann Thorac Surg* 97:610–616. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2013.09.008>
12. Guimbretière G, Anselmi A, Roisne A, et al (2018) Prognostic impact of blood product transfusion in VA and VV ECMO. *Perfusion* 267659118814690. <https://doi.org/10.1177/0267659118814690>
13. Aubron C, DePuydt J, Belon F, et al (2016) Predictive factors of bleeding events in adults undergoing extracorporeal membrane oxygenation. *Ann Intensive Care* 6:97. <https://doi.org/10.1186/s13613-016-0196-7>
14. Mazzeffi M, Greenwood J, Tanaka K, et al (2016) Bleeding, transfusion, and mortality on extracorporeal life support: ECLS working group on thrombosis and hemostasis. *Ann Thorac Surg* 101:682–689. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2015.07.046>
15. Moussa MD, Soquet J, Lamer A, et al (2021) Evaluation of Anti-Activated Factor X Activity and Activated Partial Thromboplastin Time Relations and Their Association with

- Bleeding and Thrombosis during Venous-Arterial ECMO Support: A Retrospective Study. *J Clin Med* 10. <https://doi.org/10.3390/jcm10102158>
16. Mehran R, Rao SV, Bhatt DL, et al (2011) Standardized Bleeding Definitions for Cardiovascular Clinical Trials. *Circulation* 123:2736–2747. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.009449>
 17. Kikkert WJ, van Geloven N, van der Laan MH, et al (2014) The Prognostic Value of Bleeding Academic Research Consortium (BARC)-Defined Bleeding Complications in ST-Segment Elevation Myocardial Infarction: A Comparison With the TIMI (Thrombolysis In Myocardial Infarction), GUSTO (Global Utilization of Streptokinase and Tissue Plasminogen Activator for Occluded Coronary Arteries), and ISTH (International Society on Thrombosis and Haemostasis) Bleeding Classifications. *Journal of the American College of Cardiology* 63:1866–1875. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.01.069>
 18. Vranckx P, White HD, Huang Z, et al (2016) Validation of BARC Bleeding Criteria in Patients With Acute Coronary Syndromes: The TRACER Trial. *Journal of the American College of Cardiology* 67:2135–2144. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.02.056>
 19. Ratcovich H, Josiassen J, Helgestad OKL, et al (2021) Incidence, Predictors, and Outcome of In-Hospital Bleeding in Patients With Cardiogenic Shock Complicating Acute Myocardial Infarction. *Am J Cardiol* 144:13–19. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2020.12.045>
 20. Dyke C, Aronson S, Dietrich W, et al (2014) Universal definition of perioperative bleeding in adult cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 147:1458-1463.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2013.10.070>
 21. Kinnunen E-M, De Feo M, Reichart D, et al (2017) Incidence and prognostic impact of bleeding and transfusion after coronary surgery in low-risk patients. *Transfusion* 57:178–186. <https://doi.org/10.1111/trf.13885>
 22. Brascia D, Reichart D, Onorati F, et al (2017) Validation of Bleeding Classifications in Coronary Artery Bypass Grafting. *Am J Cardiol* 119:727–733. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2016.11.027>
 23. Schoenfeld D (1982) Partial residuals for the proportional hazards regression model. *Biometrika* 69:239–241. <https://doi.org/10.1093/biomet/69.1.239>
 24. Harrell FE, Lee KL, Mark DB (1996) Multivariable prognostic models: issues in developing models, evaluating assumptions and adequacy, and measuring and reducing errors. *Stat Med* 15:361–387. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0258\(19960229\)15:4<361::AID-SIM168>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0258(19960229)15:4<361::AID-SIM168>3.0.CO;2-4)
 25. Buuren S van, Groothuis-Oudshoorn K (2011) mice: Multivariate Imputation by Chained Equations in R. *Journal of Statistical Software* 45:1–67. <https://doi.org/10.18637/jss.v045.i03>
 26. Rubin DB (2010) Multiple imputation for nonresponse in surveys
 27. Ellouze O, Abbad X, Constandache T, et al (2021) Risk Factors of Bleeding in Patients Undergoing Venous-Arterial Extracorporeal Membrane Oxygenation. *Ann Thorac Surg* 111:623–628. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2020.02.012>
 28. Levy B, Girerd N, Amour J, et al (2022) Effect of Moderate Hypothermia vs Normothermia on 30-Day Mortality in Patients With Cardiogenic Shock Receiving Venous-Arterial Extracorporeal Membrane Oxygenation: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 327:442. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.24776>
 29. Jacquot A, Lepage X, Merckle L, et al (2019) Protocol for a multicentre randomised controlled trial evaluating the effects of moderate hypothermia versus normothermia on mortality in patients with refractory cardiogenic shock rescued by venous-Arterial extracorporeal membrane oxygenation (VA-ECMO) (HYPO-ECMO study). *BMJ Open* 9:e031697. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2019-031697>

30. Pillai RC, Fraser JF, Ziegenfuss M, Bhaskar B (2014) Influence of circulating levels of fibrinogen and perioperative coagulation parameters on predicting postoperative blood loss in cardiac surgery: a prospective observational study. *J Card Surg* 29:189–195. <https://doi.org/10.1111/jocs.12255>
31. Hu W, Zhang J, Wang M, et al (2021) Clinical Features and Risk Factors Analysis for Hemorrhage in Adults on ECMO. *Front Med* 8:731106. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.731106>
32. Kasirajan V, Smedira NG, McCarthy JF, et al (1999) Risk factors for intracranial hemorrhage in adults on extracorporeal membrane oxygenation. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 15:508–514. [https://doi.org/10.1016/S1010-7940\(99\)00061-5](https://doi.org/10.1016/S1010-7940(99)00061-5)
33. McMichael ABV, Ryerson LM, Ratano D, et al (2022) 2021 ELSO Adult and Pediatric Anticoagulation Guidelines. *ASAIO Journal* 68:303–310. <https://doi.org/10.1097/MAT.0000000000001652>

Tables

Table 1. Description of bleeding classifications investigated.

ELSO serious bleeding definition [10]
<p>A Bleeding that led to surgical exploration or characterized by its location (central nervous system, hemothorax, retro-peritoneal bleeding) or required immediate transfusion of ≥ 2 units of PRBC for:</p> <ul style="list-style-type: none"> - either a sudden fall in hemoglobin of 2 g/dL in less than 24 hours - or new onset of hemodynamic instability - or overt bleeding.
Universal definition of postoperative bleeding [20]
<p>Non-massive nor severe bleeding: None or bleeding that did not fit the criteria of severe or massive bleeding</p> <p>Severe bleeding: Bleeding that required immediate 5 to 10 PRBC or 5 to 10 FFP transfusion or surgical exploration</p> <p>Massive bleeding: Bleeding that required >10 PRBC, >10 FFP or rFVIIa administration</p>
Bleeding Academic Research Consortium (BARC) classification [16]
<p>Type 0 or Type 1: None or bleeding that does not fit type 2 criteria</p> <p>Type 2: Any overt, actionable sign of hemorrhage that does not fit the criteria for type 3 or more but does meet at least one of the following criteria:</p> <ul style="list-style-type: none"> - requiring nonsurgical - medical intervention by a healthcare professional - leading to hospitalization or increased levels of care - or prompting evaluation <p>Type 3:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Type 3a: overt bleeding plus hemoglobin drop of 3 to <5 g/dL or any transfusion

with overt bleeding

- **Type 3b:** overt bleeding plus hemoglobin drop ≥ 5 g/dL, cardiac tamponade, bleeding requiring surgical intervention for control or intravenous vasoactive agents
- **Type 3c:** intracranial hemorrhage (does not include microbleeds or hemorrhagic transformation, does include intraspinal)

Type 4: Postcardiotomy-related bleeding, perioperative intracranial bleeding within 48 hours, reoperation after closure of sternotomy for the purpose of controlling bleeding, transfusion of ≥ 5 units whole blood or packed red blood cells within a 48-hour period, chest tube output ≥ 2 L within a 24-hour period

Type 5: Fatal bleeding, was not considered in this historical cohort study (high risk of subjectivity and classification bias)

ELSO=Extracorporeal Life support Organization, FFP=Fresh frozen plasma, PRBC=Packed red blood cells, rFVIIa=recombinant activated factor VII (Novoseven®). ELSO bleeding is a binary definition, BARC and UDPB are multistage classification.

Table 2. Characteristics of the studied population

Characteristics	Values
	N=334
Age, years	57 (44 to 65)
Body mass index, kg/m ²	28.1 ±6.3
Male gender	217 (65.0)
Comorbidities	
Atrial fibrillation	97 (29.1)
Diabetes mellitus	87 (26.1)
Hypertension*	173 (52.0)
Hypercholesterolemia*	122 (36.5)
eGFR <80 mL/min/1.73 m ²	122 (37.2)
Ischemic heart disease*	141 (42.3)
Valvular heart disease*	67 (20.1)
Dilated cardiomyopathy*	41 (12.3)
P2Y12 inhibitors during ECMO†	34 (10.2)
SAPS II	60.4 ±22.0
Left ventricular ejection fraction, %	12 (10 to 25)
Biological variables	
Lactate, mmol/L	5 (3 to 10)
Fibrinogen, g/L	3.4 ±1.6
Bilirubin, mmol/L	19 (12 to 34)
Platelet count, 10 ⁹ /L	119 (77 to 177)
Hemoglobin, g/dL	9.1 ±2.2
Anti-Xa, IU/mL	0.5 (0.2 to 1.0)
Description of ECMO support	
Etiologies of refractory shocks	
Postoperative LCOS	102 (30.5)
Primary graft dysfunction	21 (6.3)
Myocardial infarction	94 (28.2)
Acute on chronic heart disease	55 (16.5)
Myocarditis	13 (3.9)
Pulmonary embolism	21 (6.3)
Poisoning	12 (3.6)
Others	16 (4.8)

Cardiopulmonary resuscitation	132 (39.5)
Type of cannulation	
Femoro-femoral ECMO	293 (87.7)
Axillo-femoral ECMO	41 (12.3)
Initial ECMO flow, L/min	3.9 ±0.9
Duration of ECMO support, days	7 (4 to 11)
LV unloading	46 (13.8)
Pulmonary vein LV venting	6 (1.8)
Apical LV venting	7 (2.1)
Atrioseptostomy	2 (0.6)
Impella on top of ECMO	28 (8.4)
Intraaortic balloon pump	3 (0.9)
Outcomes	
Weaning modalities	
Death under ECMO support*	115 (34.5)
Recovery	168 (50.5)
Heart transplantation	27 (8.1)
Ventricular assist device	23 (6.9)
ICU mortality	158 (47.3)
Hospital mortality	168 (50.3)
Hospital length of stay, days	21 (9 to 43)
28-day mortality	135 (40.4)
90-day mortality	160 (47.9)

Continuous variables were presented as mean ± standard deviation or median (interquartile range). Binary variables were presented as frequency (percentage). Abbreviations: ECMO=extracorporeal membrane oxygenation; eGFR, estimated glomerular filtration rate according to CKD-EPI 2009 definition; ICU=intensive care unit; IQR=interquartile range; LCOS=Low Cardiac Output syndrome; LV=left ventricular; SAPS II=simplified acute physiology score; SD=standard deviation. Proportions were calculated taking into account missing values which numbers were * 1, † 2.

Table 3. Description of bleeding events among the 28-day survivors and 28-day non-survivors

	All N=334	28-day survivors N = 199	28-day non-survivors N = 135
Bleeding definitions			
UDBP			
None or non-severe	178/334 (53.3)	115/199 (57.8)	63/135 (46.7)
Severe	116/334 (34.7)	62/199 (31.2)	54/135 (40.0)
Massive	40/334 (12.0)	22/199 (11.1)	18/135 (13.3)
ELSO			
None or non-serious	110/334 (32.9)	74/199 (37.2)	36/135 (26.7)
Serious	224/334 (67.1)	125/199 (62.8)	99/135 (73.3)
BARC			
Type 0 or 1	109/334 (32.6)	73/199 (36.7)	36/135 (26.7)
Type 2	15/334 (4.5)	6/199 (3.0)	9/135 (6.7)
Type 3 a	85/334 (25.4)	49/199 (24.6)	36/135 (26.7)
Type 3 b	33/334 (9.9)	25/199 (12.6)	8/135 (5.9)
Type 3 c	11/334 (3.3)	4/199 (2.0)	7/135 (5.2)
Type 4	81/334 (24.3)	42/199 (21.1)	39/135 (28.9)
Bleeding sites			
Pericardial	101/334 (30.2)	63/199 (31.7)	38/135 (28.1)
Cannula	74/334 (22.2)	34/199 (17.1)	40/135 (29.6)
Pleural	26/334 (7.8)	16/199 (8.0)	10/135 (7.4)
Otorhinolaryngeal area	28/334 (8.4)	16/199 (8.0)	12/135 (8.9)
Gastrointestinal tract	17/334 (5.1)	9/199 (4.5)	8/135 (5.9)
Hemoptysis	18/334 (5.4)	10/199 (5.0)	8/135 (5.9)
Intracranial	14/334 (4.2)	6/199 (3.0)	8/135 (5.9)
Retroperitoneal	3/334 (0.9)	3/199 (1.5)	0/135 (0.0)
Others	27/334 (8.1)	16/199 (8.0)	11/135 (8.1)
Blood products			
PRBC	311/332 (93.7)	187/199 (94.0)	124/133 (93.2)
<i>Number of PRBC, units</i>	<i>11 (6 to 20)</i>	<i>10 (5 to 19)</i>	<i>13 (6 to 20)</i>
<i>Number of PRBC, units/ECMO days</i>	<i>1.5 (0.8 to 2.7)</i>	<i>1.4 (0.7 to 2.3)</i>	<i>1.8 (1.0 to 3.0)</i>
FFP	190/325 (58.5)	109/196 (55.6)	81/129 (62.8)

<i>Number of FFP, units</i>	<i>8 (4 to 14)</i>	<i>6 (4 to 13)</i>	<i>10 (4 to 15)</i>
<i>Number of FFP, units/ECMO days</i>	<i>1.0 (0.5 to 2.2)</i>	<i>0.9 (0.4 to 2.0)</i>	<i>1.3 (0.5 to 2.3)</i>
PC	215/328 (65.5)	121/197 (61.4)	94/131 (71.8)
Number of PC, units	4 (2 to 7)	4 (2 to 7)	4 (2 to 7)
Number of PC, units/ECMO days	0.6 (0.3 to 1.0)	0.5 (0.2 to 1.0)	0.6 (0.3 to 1.3)
All blood product	311/333 (93.4)	187/199 (94.0)	124/134 (92.5)
<i>Number of All, units</i>	<i>16 (7 to 35)</i>	<i>14 (7 to 34)</i>	<i>18 (9 to 41)</i>
<i>Number of All, units/ECMO days</i>	<i>2.3 (1.1 to 4.6)</i>	<i>2.0 (1.0 to 4.0)</i>	<i>3.0 (1.3 to 5.5)</i>
rFVIIa	10 (3.0)	6 (3.0)	4 (3.0)
rFVIIa, mg	6.0 (3.0 to 6.0)	4.5 (3.0 to 6.0)	6.0 (4.5 to 6.5)
rFVIIa mg/ECMO days	0.4 (0.3 to 0.8)	0.4 (0.2 to 0.8)	0.6 (0.4 to 0.9)

Values are numbers/total numbers (%) or median (interquartile range).

Abbreviations: BARC=Bleeding academic research consortium; ECMO= Extracorporeal membrane oxygenation; ELSO=Extracorporeal life support organization; FFP=Fresh frozen plasma; PC=Platelet concentrates; PRBC= Packed red blood cells; rFVIIa=Recombinant activated factor VII; UDBP=Universal definition bleeding after cardiac surgery.

Table 4. Association between 28-day mortality with bleeding events during VA-ECMO support according to Different Bleeding Definitions.

Bleeding Definitions	Event/patients- day at risk	Adjusted ¹	
		HR (95% CI)	p-value
UDPB			0.27
None or non-severe	63/4092	1.00 (ref.)	-
Severe	54/1992	1.39 (0.93 to 2.08)	0.10
Massive	18/785	1.13 (0.64 to 1.98)	0.66
	<i>Harrell's C-index</i>	<i>0.674 (0.627 to 0.722)</i>	
	<i>AIC</i>	<i>1464</i>	
ELSO			
None or non-serious	36/2869	1.00 (ref.)	-
Serious	99/3893	1.75 (1.17 to 2.62)	0.006
	<i>Harrell's C-index</i>	<i>0.681 (0.634 to 0.727)</i>	
	<i>AIC</i>	<i>1454</i>	
BARC			<0.001
Type 0 or 1	36/2780	1.00 (ref.)	-
Type 2	9/212	3.69 (1.73 to 7.82)	<0.001
Type 3 a	36/1509	1.56 (0.96 to 2.51)	0.067
Type 3 b	8/757	0.74 (0.33 to 1.63)	0.46
Type 3 c	7/125	4.21 (1.76 to 10.06)	0.001
Type 4	38/1483	1.55 (0.92 to 2.59)	0.097
	<i>Harrell's C-index</i>	<i>0.700 (0.655 to 0.746)</i>	
	<i>AIC</i>	<i>1452</i>	
BARC major bleeding			<0.001
None or <Type 2	36/2780	1.00 (ref.)	-
Major (≥Type 2)	99/4088	1.60 (1.07 to 2.39)	0.021
	<i>Harrell's C-index</i>	<i>0.681 (0.634 to 0.729)</i>	
	<i>AIC</i>	<i>1458</i>	

¹adjusted for age, body mass index, simplified acute physiology score, left ventricular ejection fraction, lactate and hemoglobin levels at baseline, and LV unloading during ECMO calculated after handling missing data on covariates by multiple imputation (m=20).

Abbreviations: AIC=Akaike information criteria; BARC=Bleeding academic research consortium; C-

index= concordance index; ECMO=Extracorporeal membrane oxygenation; ELSO=Extracorporeal life support organization; UDPB=Universal definition bleeding after cardiac surgery.

Table 5. Multivariable analysis of patients' characteristics associated with ELSO-serious bleeding events during VA-ECMO support

	cHR (95% CI)	P-value
Model 1 (Platelet as candidate variable)		
BMI per one SD (= kg/m ²) increase	1.16 (1.01 to 1.32)	0.028
Platelet count per one SD (= 80,10 ⁹ /L)	0.68 (0.55 to 0.85)	<0.001
Postcardiotomy vs. medical etiology	1.49 (1.08 to 2.04)	0.013
<i>Harrell's c-Index</i>	<i>0.688 (0.643 to 0.733)</i>	
Model 2 (Hemoglobin and fibrinogen as candidate variables)		
BMI per one SD (= 6.3 kg/m ²) increase	1.16 (1.01 to 1.32)	0.027
Fibrinogen per one SD (=1.6 g/L)	0.83 (0.70 to 0.97)	0.019
Hemoglobin per one SD (=2.2 g/dL)	0.78 (0.65 to 0.93)	0.004
Postcardiotomy vs. medical etiology	1.73 (1.28 to 2.31)	<0.001
<i>Harrell's c-Index</i>	<i>0.679 (0.636 to 0.723)</i>	

cHRs (cause-specific hazard ratio) were calculated using backward-stepwise multivariable Cause-Specific Cox's regression models after handling missing values by multiple imputation procedures (m=20); candidate factors were factors associated with serious bleeding events in univariable Cause-Specific Cox's regression models (at p-value <0.10), except hemoglobin and fibrinogen for model 1 and except platelet count for model 2.

Abbreviations: BMI=body mass index; SD=standard deviation.

Figures

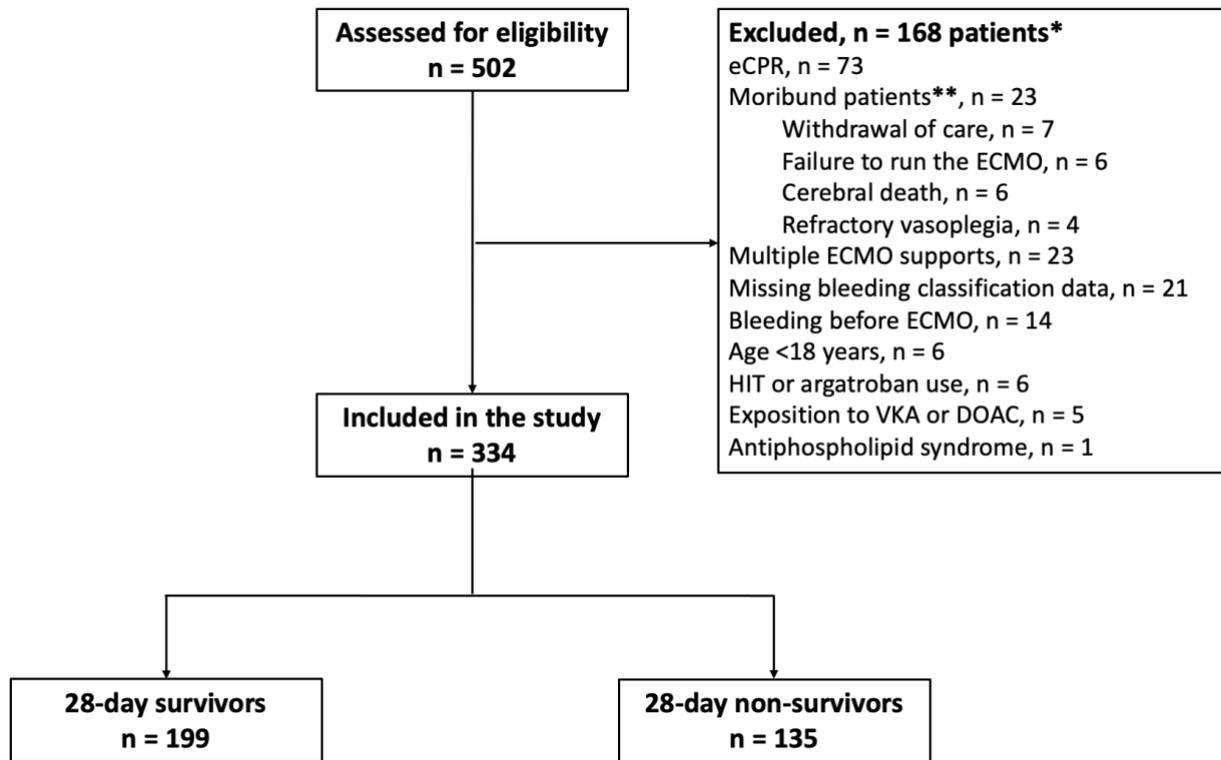


Figure 1. Study flow chart

Abbreviations: DOAC=Direct oral anticoagulants; ECMO=extracorporeal membrane oxygenation; eCPR= Extracorporeal Cardiopulmonary Resuscitation HIT=Heparin induced thrombocytopenia; n=number of patients; VKA=Vitamine K antagonist.

*The same patients may have several causes of exclusion

**Death within 24 first hours.

SUPPLEMENTAL MATERIALS

Additional methods

Recombinant Factor VII activated administration local protocol

Product used: Novoseven® (activated Eptacog alfa)

Administration criteria:

Life-threatening bleeding and the following criteria:

Achievement of the following laboratory parameter targets: hemoglobin ≥ 8 g/dL, Prothrombine ratio $> 50\%$, aPTT ratio < 2 , platelets count $\geq 70,000/\text{mm}^3$, fibrinogen ≥ 1.5 g/L, body temperature > 36 °C, pH ≥ 7.20 and calcemia > 2.2 mmol/L

Mandatory surgical reexploration to exclude surgical source of bleeding.

Detailed statistical analysis

Quantitative variables are expressed as means (standard deviation) in the case of normal distribution or medians (interquartile range) otherwise. Categorical variables are expressed as numbers (percentage). 90-day overall survival was estimated using the Kaplan-Meier method and the 28-day cumulative incidences of bleeding events ECMO according to the different bleeding categories with 28-day mortality by using univariable and multivariable Cox's regression models by considering bleeding events as a time-dependent covariates (2-level categorical variable for ELSO-serious definition (none or non-serious vs. serious), 3-levels categorical variable for UDPB definition (none or non-severe, severe vs. massive) and 5-levels categorical variable for BARC definition (type 0 or 1, type 2, type 3a, type 3b, type 3c, vs. type 4). Multivariable Cox's regression models included the following pre-specified confounders, age, body mass index, simplified acute physiology score, left ventricular

ejection fraction, lactate and hemoglobin levels at baseline, and LV loading during ECMO treated as dependent covariates. Unadjusted and adjusted HRs associated with each bleeding events classification were derived as effect sizes using the lowest category as reference. To compare the performance of the different bleeding events classification, we calculated the Akaike information criteria (AIC) and the Harrell's C-index; lower is the AIC, better is the fit of model and greater is the Harrell's C-index, better the model distinguishes living patients from those who have died at 28-day. To avoid case-deletion in multivariate analyses due to presence of missing data in covariates, multivariable Cox's models were performed after handling missing data on covariates by using multiple imputation procedure²²⁰. Imputation procedure was performed using regression-switching approach (chained equations with m=20 obtained) under the missing at random assumption using all baseline characteristics (see table 1), bleeding and death (event status and log of event time), with a predictive mean matching method for quantitative variables and logistic regression model (binary, ordinal or multinomial) for categorical variables. Estimates obtained in the different imputed data sets were combined using Rubin's rules²²¹.

Finally, we assessed the association of main patient's characteristics with the incidence of ELSO-serious bleeding events during ECMO using univariable and multivariable cause-specific Cox's regression models considering ECMO discharge (alive or dead) as competing events. LV unloading during ECMO was treated as a time-dependent covariate into the Cox's regression model. The proportional hazards assumption for each candidate factor was assessed by examining the Schoenfeld residuals plots and the log-linearity assumption for quantitative factors were assessed using Martingale residual plots.²²² Factors associated with a p-value <0.10 in bivariate analyses were implemented into a backward stepwise Cox's regression model using removal criteria of 0.10. To prevent collinearity of platelets count with fibrinogen and hemoglobin levels, two separate multivariate analyses were done; a first model

considering only platelet as candidate factor and a second model considering hemoglobin and fibrinogen as candidate factors. To avoid case deletion in the multivariable analyses due to missing data in covariates, missing values were handled by multiple imputation using regression switching approach (chained equations with $m=20$), similarly than previous multivariate analyses. The performance of the final multivariable models were assessed by calculating the Harrell' c-statistic²²³.

Statistical testing was conducted at the two-tailed α -level of 0.05. Data were analyzed using the SAS software version 9.4 (SAS Institute, Cary, NC).

Additional Tables

Supplementary Table A1. Bleeding defined by BARC, UDPB, and ELSO serious bleeding criteria

Definition	Criteria	Criteria modifications
BARC		
Type 0	No bleeding	Analysed in the same subtype: Type 0 or 1
Type 1	Bleeding that is not actionable and does not cause the patient to seek unscheduled performance of studies, hospitalization, or treatment by a healthcare professional; may include episodes leading to self-discontinuation of medical therapy by the patient without consulting a healthcare professional.	
Type 2	Any overt, actionable sign of hemorrhage (<i>e.g.</i> , more bleeding than would be expected for a clinical circumstance, including bleeding found by imaging alone) that does not fit the criteria for type 3, 4, or 5 but does meet at least one of the following criteria: (1) requiring nonsurgical, medical intervention by a healthcare professional, (2) leading to hospitalization or increased level of care, or (3) prompting evaluation.	No modification
Type 3 Type 3a	Overt bleeding plus hemoglobin drops of 3 to <5 g/dL (provided hemoglobin drop is related to bleed)	The exclusion of dental/nasal/skin/hemorrhoid criteria was not fully applied for type 3b. Cannulation bleedings and Epistaxis that justified anteroposterior packing and sphenoidal artery embolization were considered. No intraocular bleed compromising vision was observed and no autopsy or lumbar puncture confirmation were performed
Type 3b	Any transfusion with overt bleeding. Overt bleeding plus hemoglobin drop ≥ 5 g/dL (provided hemoglobin drop is related to bleed). Cardiac tamponade. Bleeding requiring surgical intervention for control (excluding dental/nasal/skin/hemorrhoid). Bleeding requiring intravenous vasoactive agents.	
Type 3c	Intracranial hemorrhage (does not include microbleeds or hemorrhagic transformation, does include intraspinal). Subcategories confirmed by autopsy or imaging or lumbar puncture. Intraocular bleed compromising vision.	
Type 4: CABG-related bleeding	Perioperative intracranial bleeding within 48 h Reoperation after closure of sternotomy for the purpose of controlling bleeding. Transfusion of ≥ 5 units whole blood or packed red blood cells within a 48-h period. Chest tube output ≥ 2 L within a 24-h period.	Extended to all postcardiotomy patients Rather than CABG -related bleeding, this was post-cardiotomy related bleeding Detailed criteria were unchanged
Type 5: fatal bleeding Type 5a Type 5b	Definite fatal bleeding; overt bleeding or autopsy or imaging confirmation. Probable fatal bleeding; no autopsy or imaging confirmation but clinically suspicious.	None classified. The imputability exclusively to a bleeding event was difficult in VA-ECMO setting
UDPB		
Class 0 (insignificant)	Universal definition of postoperative bleeding following cardiac surgery Postoperative chest tube blood loss with 12 hours <600 mL without tamponade or	Blood loss volume quantification criteria

	reexploration and no blood product transfusion	
Class 1 (Mild)	Postoperative chest tube blood loss with 12 hours of 600 to 800 mL or 1 PRBC transfusion without tamponade or reexploration	was not used as medical patient have no such drainage and the bleeding can occurs after their removal in surgical patients.
Class 2 (moderate)	Postoperative chest tube blood loss with 12 hours of 801 to 1000 mL with 2-4 PRBC, 2 or 4 FFP, any number of platelets, cryoprecipitate, prothrombin complex concentrates and without tamponade or reexploration	Analyzed in the same subcategory defined as none or non-severe. The main criteria used here were the number of PRBC and FFP criteria, surgical reexploration or tamponade
Class 3 (Severe)	Delayed sternal closure, 1001 to 2000 mL of postoperative chest tube bleed loss, immediate 5 to 10 PRBC or 5 to 10 FFP transfusion or surgical exploration	Blood loss volume quantification not applied for the raison aforementioned.
Class 4 (Massive)	Required > 10 PRBC, > 10 FFP or rFVIIa administration	All other criteria were applied
ELSO	Extracorporeal membrane oxygenation bleeding	
None		
Serious	bleeding requiring surgical exploration or characterized by its location (central nervous system, hemothorax, retro-peritoneal bleeding) or requiring immediate transfusion of at least 2 units of PRBC for either a sudden fall in hemoglobin of 2 g/dL in less than 24 hours or new onset of hemodynamic instability or overt bleeding.	No modification
ISTH	International society on thrombosis and heamostasis	
None		
Major bleeding definition in non-surgical patients	Fatal bleeding, and/or symptomatic bleeding in a critical area or organ, such as intracranial, intraspinal, intraocular, retroperitoneal, intraarticular or pericardial, or intramuscular with compartment syndrome, and/or bleeding causing a fall in hemoglobin level of 20 g/L (1.24 mmol/L) or more or leading to transfusion of two or more units of whole blood or red cells.	Not applied

Supplementary Table S2. Association between 28-day mortality with bleeding events during VA-ECMO support according to Different Bleeding Definitions.

Bleeding Definitions	Event/patients-day at risk	Unadjusted		Adjusted ¹	
		HR (95% CI)	p-value	HR (95% CI)	p-value
UDPB			0.008		0.27
None or non-severe	63/4092	1.00 (ref.)	-	1.00 (ref.)	-
Severe	54/1992	1.77 (1.23 to 2.56)	0.002	1.39 (0.93 to 2.08)	0.10
Massive	18/785	1.40 (0.82 to 2.40)	0.22	1.13 (0.64 to 1.98)	0.66
	<i>Harrell's C-index</i>	<i>0.566 (0.521 to 0.611)</i>		<i>0.674 (0.627 to 0.722)</i>	
	<i>AIC</i>	<i>1492</i>		<i>1464</i>	
ELSO					
None or non-serious	36/2869	1.00 (ref.)	-	1.00 (ref.)	-
Serious	99/3893	2.00 (1.36 to 2.95)	0.0004	1.75 (1.17 to 2.62)	0.006
	<i>Harrell's C-index</i>	<i>0.573 (0.530 to 0.615)</i>		<i>0.681 (0.634 to 0.727)</i>	
	<i>AIC</i>	<i>1473</i>		<i>1454</i>	
BARC			<0.001		<0.001
Type 0 or 1	36/2780	1.00 (ref.)	-	1.00 (ref.)	-
Type 2	9/212	3.22 (1.54 to 6.69)	0.002	3.69 (1.73 to 7.82)	<0.001
Type 3 a	36/1509	1.81 (1.13 to 2.88)	0.013	1.56 (0.96 to 2.51)	0.067
Type 3 b	8/757	0.85 (0.39 to 1.84)	0.68	0.74 (0.33 to 1.63)	0.46
Type 3 c	7/125	3.67 (1.63 to 8.26)	0.002	4.21 (1.76 to 10.06)	0.001
Type 4	38/1483	1.89 (1.20 to 2.99)	0.006	1.55 (0.92 to 2.59)	0.097
	<i>Harrell's C-index</i>	<i>0.607 (0.560 to 0.654)</i>		<i>0.700 (0.655 to 0.746)</i>	
	<i>AIC</i>	<i>1486</i>		<i>1452</i>	
BARC major bleeding			<0.001		<0.001
None or <Type 2	36/2780	1.00 (ref.)	-	1.00 (ref.)	-
Major (≥Type 2)	99/4088	1.82 (1.23 to 2.68)	0.002	1.60 (1.07 to 2.39)	0.021
	<i>Harrell's C-index</i>	<i>0.562 (0.519 to 0.604)</i>		<i>0.681 (0.634 to 0.729)</i>	
	<i>AIC</i>	<i>1486</i>		<i>1458</i>	

¹ adjusted for age, body mass index, simplified acute physiology score, left ventricular ejection fraction, lactate and hemoglobin levels at baseline, and LV unloading during ECMO calculated after handling missing data on covariates by multiple imputation (m=20).

Abbreviations: AIC=Akaike information criteria; BARC=Bleeding academic research consortium; C-index=concordance index; ECMO=Extracorporeal membrane oxygenation; ELSO=Extracorporeal life support organization; UDPB=Universal definition bleeding after cardiac surgery.

Supplementary Table S3. Univariate analysis of patient's characteristics associated with serious bleeding events during ECMO

Characteristics	None or non-serious event (n=110)	Serious bleeding (n=224)	cHR (95%CI)	p-value
Age, years	55 (44 to 64)	58 (44 to 66)	1.06 (0.96 to 1.18) ¹	0.23
BMI, kg/m ²	27.0 ±5.9	28.4 ±6.4	1.15 (1.01 to 1.32) ²	0.031
Male gender	75/110 (68.2)	142/224 (63.4)	0.80 (0.60 to 1.06)	0.11
Comorbidities				
Atrial fibrillation	26/110 (23.6)	71/224 (31.7)	0.99 (0.73 to 1.32)	0.93
Diabetes mellitus	31/110 (28.2)	56/224 (25.0)	0.91 (0.66 to 1.24)	0.52
Hypertension	53/109 (48.6)	120/224 (53.6)	1.22 (0.93 to 1.60)	0.15
Hypercholesterolemia	39/109 (35.8)	83/224 (37.1)	1.00 (0.76 to 1.32)	0.99
eGFR <80 mL/min/1.73 m ²	29/108 (26.9)	93/220 (42.3)	1.24 (0.94 to 1.63)	0.12
Ischemic heart disease	42/109 (38.5)	99/224 (44.2)	1.09 (0.83 to 1.43)	0.54
Valvular heart disease	12/109 (11.0)	55/224 (24.6)	1.46 (1.07 to 1.99)	0.015
Dilated cardiomyopathy	15/109 (13.8)	26/224 (11.6)	0.69 (0.44 to 1.07)	0.90
P2Y12 inhibitors during ECMO	13/109 (11.9)	21/224 (9.4)	0.89 (0.56 to 1.40)	0.62
SAPS II	58.0 ±20.4	61.5 ±22.7	1.19 (1.03 to 1.36) ²	0.015
LVEF, %	10 (10 to 20.0)	13 (9 to 25.0)	1.14 (1.01 to 1.28) ¹	0.026
Biological variables				
Lactate, mmol/L	5 (2 to 9)	5 (3 to 10)	1.14 (0.99 to 1.30) ²	0.059
Fibrinogen, g/L	3.8 ±1.8	3.3 ±1.5	0.84 (0.75 to 0.93) ²	<0.001
Bilirubin, mmol/L	15 (12 to 20)	22 (14 to 36)	1.06 (0.92 to 1.21) ²	0.40
Platelet count, 10 ⁹ /L	185 (131 to 226)	100 (68 to 146)	0.54 (0.44 to 0.66) ²	<0.001
Hemoglobin, g/dL	10.3 ±2.2	8.6 ±2.0	0.63 (0.53 to 0.75) ²	<0.001
Anti-Xa, IU/mL	0.6 (0.3 to 1.2)	0.4 (0.2 to 0.9)	0.79 (0.66 to 0.94) ²	0.007
Description of ECMO support				
Etiologies of refractory shocks				
Medical	92/110 (83.6)	119/224 (53.1)	1.00 (ref.)	-
Postcardiotomy	18/110 (16.4)	105/224 (46.9)	2.09 (1.59 to 2.74)	<0.001
Cardiopulmonary resuscitation	43/110 (39.1)	89/223 (39.9)	1.13 (0.85 to 1.48)	0.39
Type of cannulation				
Femoro-femoral ECMO	99/110 (90.0)	194/224 (86.6)	1.00 (ref.)	-
Axillo-femoral ECMO	11/110 (10.0)	30/224 (13.4)	1.05 (0.71 to 1.55)	0.12

Initial ECMO flow, L/min	3.8 ±0.9	4.0 ±0.9	1.01 (0.86 to 1.18) ²	0.92
LV unloading	14/110 (12.7)	32/224 (14.3)	0.92 (0.57 to 1.46) ³	0.71

¹ cHR calculated per 10-unit increase; ² cHR calculated per one standard deviation increase; ³ cHR calculated by treating LV unloading as time-varying variable. Continuous variables were presented as mean ± standard deviation or median (interquartile range). Binary variables were presented as frequency (percentage).

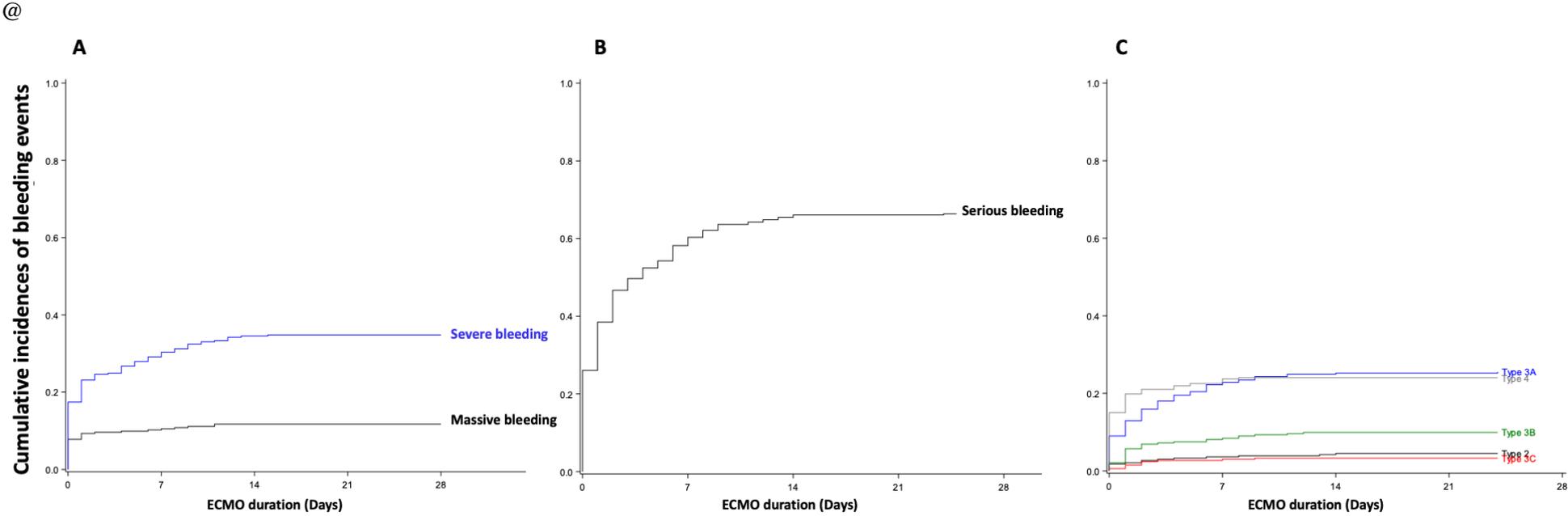
Abbreviations: cHR=cause-specific hazard ratio; CI=confidence interval; ECMO=extracorporeal membrane oxygenation; eGFR, estimated glomerular filtration rate according to CKD-EPI 2009 definition; ICU=intensive care unit; LV=left ventricle; LVEF=left ventricular ejection fraction; SAPS II, simplified acute physiology score.

Supplementary Table S4. Description of bleeding events in patients with Postcardiotomy versus medical etiology

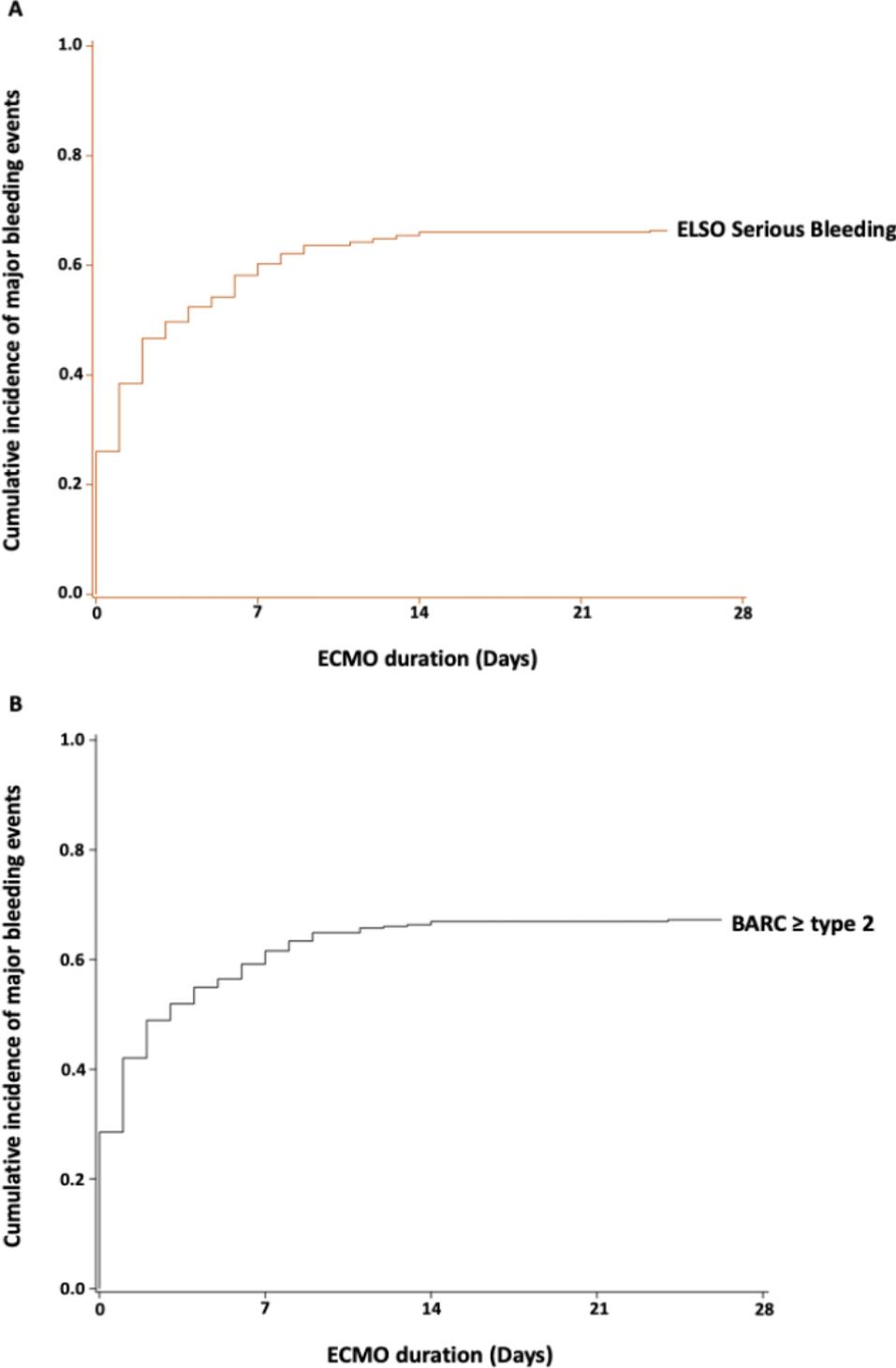
	Medical etiology (N=211)	Postcardiotomy (N=123)
Bleeding definitions		
UDBP		
None or non-severe	143/211 (67.8)	35/123 (28.5)
Severe	57/211 (27.0)	59/123 (48.0)
Massive	11/211 (5.2)	29/123 (23.6)
ELSO		
None or non-serious	92/211 (43.6)	18/123 (14.6)
Serious	119/211 (56.4)	105/123 (85.4)
BARC		
Type 0 or 1	91/211 (6.6)	18/123 (14.6)
Type 2	14/211 (6.6)	1/123 (0.8)
Type 3 a	76/211 (36.0)	9/123 (7.3)
Type 3 b	19/211 (9.0)	14/123 (11.4)
Type 3 C	8/211 (3.8)	3/123 (2.4)
Type 4	3/211 (1.4)	78/123 (63.4)
Bleeding sites		
Pericardial	23/211 (10.9)	78/123 (63.4)
Cannula	50/211 (23.7)	24/123 (19.5)
Pleural	9/211 (4.3)	17/123 (13.8)
Otorhinolaryngeal area	17/211 (8.1)	11/123 (8.9)
Gastrointestinal tract	13/211 (6.2)	4/123 (3.3)
Hemoptysis	13/211 (6.2)	5/123 (4.1)
Intracranial	8/211 (3.8)	6/123 (4.9)
Retroperitoneal	2/211 (0.9)	1/123 (0.8)
Unknown	20/211 (9.5)	7/123 (5.7)
Blood products		
PRBC	191/210 (91.0)	120/122 (98.4)
<i>Number of PRBC, units</i>	8.0 (4.0 to 14.0)	17.0 (11.0 to 27.0)
<i>Number of PRBC, units/ECMO days</i>	1.2 (0.6 to 2.0)	2.1 (1.4 to 3.5)
FFP	94/203 (46.1)	96/121 (79.3)
<i>Number of FFP, units</i>	5.0 (3.0 to 10.0)	11.0 (6.0 to 17.5)
<i>Number of FFP, units/ECMO days</i>	0.8 (0.4 to 1.3)	1.6 (0.6 to 2.5)
PC	107/206 (51.9)	108/122 (88.5)
Number of PC, units	3.0 (2.0 to 6.0)	5.0 (3.0 to 8.0)
Number of PC, units/ECMO days	0.4 (0.2 to 0.7)	0.7 (0.3 to 1.2)
All blood product	191/211 (90.5)	120/122 (98.4)
<i>Number of All, units</i>	11.0 (6.0 to 22.0)	32.0 (16.0 to 47.5)
<i>Number of All, units/ECMO days</i>	1.5 (0.8 to 3.3)	4.0 (2.1 to 7.1)
rFVII	2/211 (0.9)	8/122 (6.5)
rFVII, mg	6.0 (6.0 to 6.0)	4.5 (3.0 to 6.0)
rFVII mg/ECMO days	0.4 (0.4 to 0.5)	0.6 (0.2 to 0.8)

Additional Figures

Supplemental Figure 1. initiation Cumulative incidences of bleeding events according to the 3 bleeding definitions studied



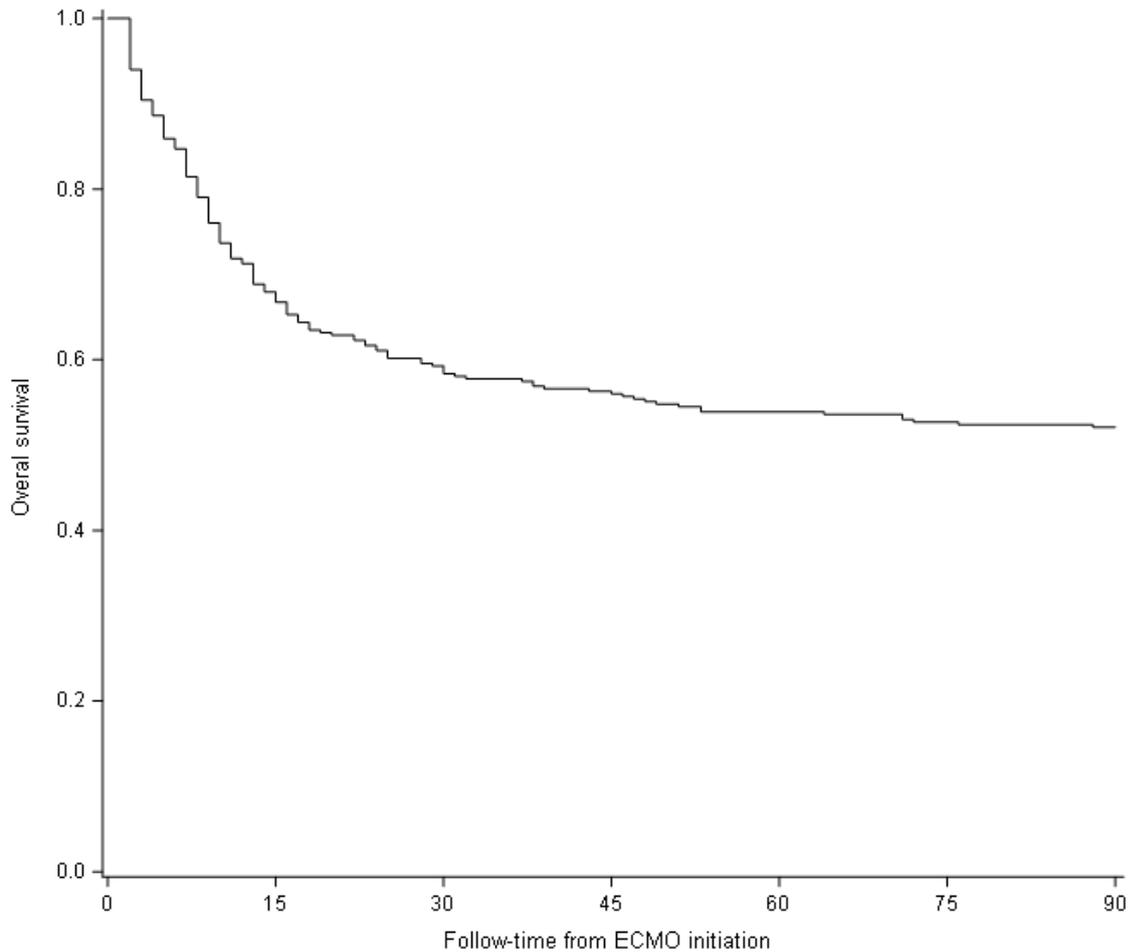
Supplementary Figure 2. Cumulative incidences of major bleeding events



(A) shows cumulative incidence of serious bleeding according to the extracorporeal life support organization (ELSO) and (B) shows cumulative incidence of major bleeding according to the bleeding academic research consortium (BARC).

Supplementary Figure 3. Overall survival within 90 days of ECMO initiation

Supplemental Figure 2. Overall survival within 90 days of ECMO initiation



Lille Refractory Cardiogenic Shock and Circulatory Assist Device (R-CASCAD) members and contributors on 30 April 2022

Slimane Aït-Ouarab, Camille Beaudeau, Corine Besson, Benoit Brassard, Delphine Deblauwe, Christophe Decoene, Jacques Desbordes, Martin Dubernet, Céline Dupré, Valentin Foulon, Guillaume Gantois, Antoine Ghemired, Céline Goémine, Olivier Joulin, Francis Juthier, Guillaume Leroy, Xavier Leroy, Valentin Loobuyck, Agnès Mugnier, Christophe Muller, Mouhamed Djahoum Moussa, Madalina E. Nodea, Vincent Petitgand, Emmanuel Robin, Natacha Rouse, Nouredine Saddouk, Guillaume Schurtz, Jérôme Soquet, André Vincentelli, Josephine Vogel, Marie-Paule Warembourg.

Discussion générale

L'assistance circulatoire par ECMO-VA périphérique représente le traitement de choix pour le choc cardiogénique réfractaire. Son utilisation dans cette indication est croissante^{14,224} et l'élargissement de ses indications à des patients moins graves est en cours d'investigation par 3 études multicentriques randomisées contrôlées (EURO-SHOCK, NCT03813134 ; ECLS-SHOCK, NCT03637205 ; ANCHOR, NCT04184635).

Quelles que soient les modalités d'assistance par ECMO considérées, il existe un surrisque de complications thrombotiques et hémorragiques dont les mécanismes sont complexes, nombreux et intriqués. Les désordres de l'hémostase définissant la coagulopathie associée à l'ECMO-VA en sont une. Elle comprend des altérations fonctionnelles multiples qui aboutissent à la fois à un phénotype hémorragique et prothrombotique.

La prévention de ce risque thrombotique majeur justifie l'utilisation d'une anticoagulation systémique dont le choix reste empirique. Cette anticoagulation ne suffit pas à éviter les complications thrombotiques alors même qu'elle pourrait aggraver le risque hémorragique dans ce contexte. Bien que la littérature concernant l'ECMO est riche de publications, une analyse extensive permet d'identifier plusieurs problèmes dont quelques-uns ont été agrégés pour définir la problématique globale de cette thèse.

L'ECMO-VA périphérique est la modalité de canulation donnant les meilleures chances de survie en comparaison à la configuration centrale. Elle est rarement étudiée de façon isolée. De façon similaire les patients assistés pour arrêt cardiaque réfractaire dont la mortalité avoisine 85 % sont étudiés avec ceux assistés pour choc cardiogénique réfractaire de mortalité plus réduite (50 %). Ces deux sources d'hétérogénéité sont aggravées par l'inclusion fréquente de patients assistés par une ECMO-VV dont l'indication est le SDRA. Le type de pathologie, d'anticoagulation et les stratégies d'anti-agrégation plaquettaire différente entre

les deux populations. L'étiologie la plus fréquente du SDRA étant septique, les mécanismes de thrombinofomation engagés sont probablement différents de ceux existant chez les patients assistés pour une cause aseptique comme l'est le choc cardiogénique. Ainsi les données cliniques publiées à ce jour sur les complications hémorragiques ou thrombotiques dans ce contexte sont peu transposables à une population homogène de patients sous ECMO-VA. En conséquence, nous avons focalisé notre recherche autour des patients assistés par ECMO-VA périphérique exclusivement pour un choc cardiogénique réfractaire. Nous avons organisé notre propos autour des deux axes reflétant les complications liées à l'hémostase : l'axe thrombose et l'axe hémorragie.

Concernant l'axe thrombose, notre travail de thèse a essayé d'apporter de nouveaux éléments de compréhension dans la survenue des complications thrombotiques malgré l'utilisation extensive d'une anticoagulation systémique par HNF. Dans une première étude clinique et histologique, nous avons décrit et analysé l'architecture des thrombus formés sur les circuits inertes d'ECMO-VA malgré cette anticoagulation systémique censée éviter leur survenue. Dans un deuxième travail de recherche qui agrège les données d'une étude clinique multicentrique et d'une étude histologique, nous avons comparé l'efficacité des revêtements de surface existants et étudié l'impact de ces revêtements de surface sur la composition des thrombus formés sur circuit d'ECMO-VA.

Concernant l'axe hémorragie, nos investigations ont été essentiellement cliniques. Une étude clinique sur un grand effectif de patients a en effet permis de décrire de façon précise les caractéristiques des complications hémorragiques dans une population homogène de patients sous ECMO-VA périphérique. Nous avons validé deux définitions alternatives d'hémorragie majeures en mesure d'impacter la mortalité afin de faciliter la prise de décision en pratiques courantes et d'harmoniser les critères de jugements en recherche clinique. Enfin, nous avons identifié les facteurs de risque d'hémorragie majeure spécifique à cette population de patients

assistés par ECMO-VA périphérique. Par ailleurs, dans un travail annexe dans la thématique de la thèse, nous avons investigué dans le contexte de l'ECMO-VA, la fiabilité des outils de monitoring de l'anticoagulation par HNF les plus robustes disponibles en routine que sont le TCA et l'Anti-Xa.

Axe thrombose

Nous avons montré que dans notre population d'intérêt l'incidence des complications thrombotiques était importante avoisinant les 32 à 39 % dans nos différentes cohortes.²²⁵ Ces complications thrombotiques, qui étaient étudiées sous forme de critère composite dans nos travaux regroupent cependant différentes réalités physiopathologiques. En effet les complications thrombotiques pouvaient avoir une cause embolique, thrombotique sur lésions endothéliales locales, ou ischémique sur obstruction iatrogène d'une lumière vasculaire par une canule. Plusieurs de ces mécanismes peuvent être associés sans que l'on ne puisse distinguer l'importance relative de l'une ou l'autre. L'exemple de l'AVC ischémique dans ce contexte est marquant. Cette complication peut résulter d'une cause cardio-embolique, d'une dissection artérielle en cas de canulation axillaire, d'une embolie gazeuse accidentelle ou encore d'une thrombose locale au niveau d'une artère cérébrale. De façon similaire l'ischémie de membre est le fait conjugué d'une obstruction vasculaire artérielle confinant à un débit de perfusion réduit du membre, d'une possible obstruction veineuse limitant le drainage du membre, d'une rupture de plaque ou d'une dissection au moment de la canulation, de cause cardio-embolique ou être secondaire à des doses excessives de vasoconstricteurs. L'une des explications de l'échec de l'anticoagulation à prévenir ces complications est la complexité de ces mécanismes qui associent à la fois des phénomènes ischémiques vasculaires et des phénomènes thrombotiques liés aux anomalies de l'hémostase.

Cette assertion n'est cependant pas valable lorsque l'on considère les complications thrombotiques intervenant sur le circuit d'ECMO. Le taux de complication amenant à un changement de circuit d'ECMO était de 14 % dans notre travail, en deçà des 31 % rapporté par Lubnov et *al.* dans une cohorte d'ECMO-VV et en cohérence avec le taux de défaillance d'oxygénateur seul d'environ 7 % issu du rapport de l'ELSO de 2016.

L'architecture des circuits considérés pourrait générer des zones de stagnation de flux à même de favoriser la survenue de ces thromboses. Par ailleurs, les pompes présentant une tige de rotation à l'exemple de la pompe Revolution (LivaNova Group, Saluggia, Italy) ont plus de thrombi en fréquence et en nombre dans notre travail. De plus ces zones de frottement élevé pourraient générer des températures excessives pouvant favoriser l'hémolyse et/ou la coagulation de certaines protéines. L'aspect macroscopique de certains thrombi issus de notre travail, de couleur sombre, majoritairement issus de ces localisations, associés à un aspect histologique compatible avec la dénaturation des protéines et de l'hémolyse tend à valider cette hypothèse.²⁰⁹

Le mécanisme précis de thrombinofomation sur le circuit d'ECMO n'est pas totalement élucidé, mais une part importante est attribuée à l'activation de la voie contact suite à l'interaction entre le sang circulant et les surfaces inertes négativement chargées. Ce mécanisme devrait pouvoir être inhibé par l'utilisation d'un bolus d'anticoagulation par HNF suivie par une infusion systémique continue, ce que contredisent les observations cliniques.

Dans notre travail décrivant de façon extensive la composition des thrombi extraits de ces circuits, nous avons observé une très grande hétérogénéité des thrombus isolés.²⁰⁹ Cela amène à considérer que plusieurs mécanismes pourraient être impliqués dans leurs survenues.

Les deux composants majoritaires de ces thrombus étaient la fibrine et le VWF. Nous avons également observé la présence de plaquettes, d'érythrocytes et dans une moindre mesure des

leucocytes en phase de NETose. Nos résultats font échos à la publication de Figueroa Villalba et *al.* Ces auteurs avaient analysé 53 circuits issus de patients pédiatriques avec des configurations d'ECMO hétérogènes.²²⁶ Ils font également échos aux résultats publiés par Hasting et *al.*, à propos des thrombi issus de tubes et d'oxygénateurs de circuit d'ECMO pédiatrique à l'exclusion de ceux issus des têtes de pompe.²²⁷ Les analyses des auteurs étaient qualitatives et focalisées sur le contenu en fibrine et en plaquettes.

Nos résultats et celles de ces deux travaux soutiennent l'implication de l'adsorption de la fibrine sur les surfaces inertes lors de l'activation de la phase contact (ou voie intrinsèque de la coagulation) comme un des phénomènes majeurs à l'origine de l'activation de la coagulation et de l'inflammation sous ECMO. L'adsorption des protéines plasmatiques avec en premier lieu le fibrinogène intervient dès les premières minutes de contact entre le sang avec les surfaces inertes.^{195,197} Cette phase d'activation de la voie contact est suivie par l'adsorption des protéines de la coagulation de la voie extrinsèque activant ainsi la thrombinformation mais également le recrutement de plaquettes et de leucocytes activés. Les monocytes recrutés et activés produisent du facteur tissulaire en capacité d'activer la voie extrinsèque et de majorer le dépôt de fibrine.²²⁸⁻²³⁰ De façon intéressante, nous avons observé un taux de leucocytes bien plus élevé dans les thrombi riche en fibrine en comparaison au thrombi plutôt riche en érythrocytes identifié après notre analyse en cluster hiérarchique.²⁰⁹

Dans les conditions de contraintes de flux supra maximales comme celles observées sous ECMO-VA, l'adhésion plaquettaire ne devrait être possible que par le freinage préalable permis par l'interaction GPIb et VWF. Cela pourrait expliquer la proportion importante de VWF retrouvé dans ces thrombi en même temps que la présence quasi ubiquitaire de plaquettes. Cette participation du VWF à la genèse de ces thrombus est également retrouvée par Figueroa Villalba et *al.* et Hasting et *al.*^{76,80}

En effet, il est démontré que l'activation plaquettaire flux dépendant préalable à leurs adhésions au fibrinogène ou à la fibrine liés aux surfaces inertes est médiée par le VWF. Cette activation plaquettaire flux dépendante liée au récepteur GPIIb est un phénomène bien décrit et pourrait expliquer la présence de façon quasi ubiquitaire de plaquettes dans les thrombi analysés.^{27,231,232} Par ailleurs, l'efficacité relative de l'héparinothérapie dans le contrôle de la thrombinoformation sous ECMO trouverait là une possible explication. La liaison VWF/GPIIb est indépendante de l'héparinothérapie et pourrait être amplifiée sous ECMO-VA du fait de la présence fréquente d'hémoglobine libre plasmatique qui facilite l'interaction VWF/GPIIb.¹³⁶ L'hémoglobine libre plasmatique résulte de l'hémolyse qui est complication fréquente sous ECMO-VA.

La mise en évidence de H3Cit qui confirme la présence de NETose met en lumière la participation des phénomènes inflammatoires aseptique dans cette thrombinoformation sous ECMO, même si cette contribution semble être modeste d'un point de vue quantitative.

Classiquement le phénomène de NETose est associé au sepsis et des travaux précédents de notre équipe avait démontré la présence d'une NETose intense dans les thrombi issus de circuits d'ECMO-VV de patients assistés pour SDRA liée à une pneumopathie à SARS-COV2.²³³ Les NETs sont capable d'activer le facteur XII en XIIa du fait de leur richesse en charge négative. Elles pourraient expliquer l'échec des revêtements de surface à prévenir de façon plus effective la survenue des complications thrombotiques sur les circuits d'ECMO prétraités. La présence des NETs dans les thrombus issus des circuits d'ECMO-VA dans notre travail alors que tous les patients recevaient une antibiothérapie prophylactique et n'avaient pas de sepsis avéré suppose une induction de NETose aseptique. Cette induction pourrait être en rapport avec l'activation de l'inflammation grâce à la liaison entre des DAMPS et leurs PRR en complément de celle induite par l'activation de la voie du facteur XII. De plus, des données récentes suggèrent que la NETose pourrait être induite de façon isolée par des

contraintes de flux anormalement élevées.²³⁴ L'interaction plaquettes-neutrophiles pourraient être une autres cause d'induction la NETose en condition de contraintes de flux supra maximale en l'absence de sepsis.^{234,235} Dans notre étude, la présence de leukocytes est très faible au sein des thrombi en opposition au résultats de Figueroa Villalba et *al.*²²⁶ probablement du fait des différences dans les étiologies à l'origine de l'assistance par ECMO.

Dans cette perspective, la NETose pourrait être une cible supplémentaire dans la prévention des complications thrombotiques. Le niveau de la réaction inflammatoire est aisément évaluable en routine par la mesure de biomarqueur comme la CRP ou la procalcitonine, ces biomarqueurs pourraient donc indiquer un risque accru de thrombose mais reste à valider.

Ces résultats confirment donc la suspicion d'un mécanisme multifactoriel dans la thrombinofomation sur circuit ECMO-VA. Les résultats de l'analyse en cluster hiérarchique réalisée dans notre étude vont dans le même sens. En identifiant au moins deux types de clusters dans cette approche non subjective, l'une fait de thrombi riche en érythrocytes et l'autre fait de thrombi érythrocytes pauvre/fibrine riche, ces résultats suggèrent la présence d'au moins deux mécanismes différents.

Dans le cadre de cet axe thrombose, nous avons également exploré les performances des revêtements de surface les plus utilisés en routine dans la prévention des complications thrombotiques et de l'inflammation. Nous avons observé que les revêtements à base d'héparine en comparaison à ceux à base de PPC, étaient les plus efficaces dans la réduction des complications thrombotiques mais plus délétères dans le maintien du compte plaquettaire. Les performances étaient similaires pour la survenue des complications hémorragiques, de la mortalité et sur la cinétique des marqueurs inflammatoires étudiés. Ces résultats sont novateurs puisqu'aucune étude à ce jour n'a comparé les revêtements de surfaces l'une à l'autre dans le contexte de l'ECMO. Les données disponibles concernent les circuits de CEC

utilisée en chirurgie cardiaque difficilement transposable dans le contexte de l'ECMO. Ces évidences se limitent à la supériorité des revêtements de surface en comparaison à l'absence de revêtement et peu ou pas des différences concernant les deux types de revêtement étudiés dans ce travail.²³⁶⁻²⁴¹ La comparaison en clinique humaine de deux types de revêtement sur la survenue complications thrombotiques est inexistante même dans le contexte l'ECMO. Nos résultats n'excluent cependant pas l'utilisation de revêtement par PPC, mais suggèrent un niveau d'anticoagulation plus agressif dans ce contexte. En effet ces circuits ont l'avantage d'éviter tout risque de génération de TIH contrairement au circuit revêtant de l'héparine. Ayant exclu les patients aux antécédents de TIH dans notre cohorte pour cette analyse, nous avons pu surestimer le bénéfice associé au HA dans notre étude, cependant le nombre d'exclusions avec une TIH était limité. Par ailleurs, l'identification d'une proportion plus importante VWF dans les thrombi issues des circuits traités par PPC pourrait suggérer une activation plaquettaire flux dépendante plus importante dans ces circuits. Se pose alors la question de l'origine de ces différences de contrainte de flux. Une piste est la différence de performance entre la tête de pompe puisque tous les patients du groupe PPC n'avaient pas la même tête de pompe que ceux du groupe héparine. Le nombre limité d'évènements de permettait pas de réalisée une analyse en sous-groupe doté d'une puissance suffisante pour pouvoir conclure. Si ces résultats se confirmaient dans une étude de plus grands effectifs, il pourrait faire moduler le type de traitement antithrombotique à envisager en fonction des revêtements de surface. Cependant, il est important de noter que la différence observée pour le critère de jugement principal et composite complications thrombotiques, ne l'est pas en pour les thromboses machine amenant à un changement de circuit après analyse multivariée. Le manque d'évènements et de puissance statistique pourrait expliquer cette discordance.

Axe hémorragie

Le profil des courbes d'incidences cumulées de complications hémorragiques observées dans nos travaux souligne l'importance de l'agression chirurgicale comme leur principale cause. En effet elles semblent plus fréquentes chez les patients assistés pour un choc postcardiotomie. La prééminence des saignements péricardiques et de ceux survenant aux sites de canulation appuie cette observation et semble être en cohérence avec les données de la littérature.^{21,45,56,202} Par ailleurs, les saignements chirurgicaux semblent avoir une temporalité différente de celle des saignements non chirurgicaux. Les premières surviennent en général dans les tout premiers jours de l'assistance alors que les seconds surviennent de façon plus étalée dans le temps. Les mécanismes impliqués sont différents dans une certaine mesure.

Les saignements chirurgicaux agrègent pour origine, l'effraction vasculaire en premiers lieux et possiblement les anomalies de la coagulation, alors que les saignements non chirurgicaux à l'exemple des saignements muqueux sont plutôt liés d'une part à la fragilisation des muqueuses liées à l'ischémie induite par le bas débit initial, d'autre part à un syndrome aVWS^{48,92} ou au développement d'angiodysplasies secondaires qui pourraient être induites indirectement par l'hydrolyse du VWF. Les données existant à propos de la maladie Heyde, et les saignements muqueux identifiés sous LVAD tous deux en lien avec l'aVWS amènent à considérer cette hypothèse.^{155,158,242}

En conséquence, les stratégies de prévention médicamenteuse et non médicamenteuse de ces deux types de saignement devraient être en partie distinctes. Concernant les saignements chirurgicaux, le développement de l'approche percutanée pour la canulation périphérique fémorale, la mise en place des techniques de préclosing et de post closing endovasculaire pourrait permettre de réduire les saignements des sites de canulation.²⁴³⁻²⁴⁵ L'objectif d'anticoagulation devrait être plus réduit dans les étiologies de choc post-chirurgicales comparativement aux étiologies médicales.

Concernant les saignements muqueux, il n'existe pas à ce jour de traitement validé pour leur prévention. Le ciblage de l'aVWS semble le plus pertinent, mais se heurte à plusieurs écueils. Les approches médicamenteuses dont le but est la prévention des angiodyplasies n'ont pas été étudiées chez le patient sous ECMO-VA et n'ont pas fait preuve de leurs efficacités chez les patients implantés de LVAD. L'octréotide, la molécule utilisée dans ce contexte, est un vasoconstricteur splanchnique puissant qui a montré un intérêt en dehors des assistances.^{246,247} Dans le cadre de l'ECMO-VA pour choc cardiogénique où existe une vasoconstriction adaptative à l'état de choc, l'aggravation de cette vasoconstriction pourrait favoriser la survenue de complications ischémiques digestives. La thalidomide dont l'action antiangiogénique a été appliquée dans ce contexte semble peu efficace au prix d'effets secondaires importants.²⁴⁸ Une autre approche est d'atténuer l'activité protéolytique de l'ADAMTS13 par la doxycycline. Contrairement aux résultats d'une première étude in vitro, des données in vivo ont montré l'inefficacité à la dose de 100 mg deux fois par jour pendant 7 jours.²⁴⁹ La supplémentation en MHPM de VWF a fait l'objet de plusieurs rapports de cas, mais non validés par une étude de qualité. Cette approche est cependant très discutable puisque plusieurs données suggèrent que l'hydrolyse de VWF survient dans les minutes suivant l'initiation de l'ECMO. Ces observations sont communes à la plupart des pompes génératrices de contraintes de flux élevées et furent démontrées par des travaux antérieurs de notre équipe.²⁴² Ainsi la supplémentation de MHPM de VWF serait vouée à l'hydrolyse rapide et s'avérerait probablement inefficace.

Dans un travail pionnier de notre équipe publié par Vincent et *al.* la préservation de la pulsatilité artérielle était associée à une réduction de la perte des MHPM et de leur relargage par les corps de Weibel Palade en cas de restauration d'un flux pulsative antérieurement reprimé.¹⁶⁷ La traduction clinique serait de limiter les contraintes de flux élevé sous ECMO en minimisant le débit machine et le RPM afin de préserver la pulsatilité résiduelle du cœur

natif. Cette validation expérimentale nécessite une confirmation clinique, c'est l'objectif principal de l'étude multicentrique WITECMO-H (NCT 03070912, CPP N° 2017-A00256-47) portée par notre équipe.

La principale étude de l'axe hémorragie soumise à publications nous a permis de proposer une définition pertinente de l'hémorragie majeure sous ECMO-VA. Nos résultats montrent que la définition « serious bleeding » proposée par l'ELSO et celle définie par une classification BARC \geq type 2 étaient significativement associée à la mortalité et pouvait donc être accepté comme définition d'hémorragie majeure. Ces résultats concernant la définition « serious bleeding » de l'ELSO sont en cohérence avec ceux des travaux publiés par Aubron et *al.*⁴⁸ et Ellouze et *al.*⁹¹, mais s'oppose à ceux de Mazzeffi et *al.*⁴⁵ Contrairement à de l'étude d'Ellouze et *al.*, les deux autres travaux cités agrègent des patients assistés par ECMO-VA et ECMO-VV dans leur analyse. Celle d'Ellouze et *al.* ont inclus à la fois des patients assistés par ECMO-VA périphérique pour choc cardiogénique et pour arrêt cardiaque réfractaire alors que la mortalité attendue dans ces deux groupes va du simple au double en considérant les données de l'ELSO. En conséquence à ce jour, seule notre étude apporte des résultats dans une population homogène de patient en choc cardiogénique réfractaire assisté par ECMO-VA périphérique. Concernant la classification BARC, aucune évaluation de sa capacité à prédire la mortalité n'est disponible dans la population de patients ciblés dans notre travail de thèse. Par ailleurs, la définition du seuil à retenir pour l'hémorragie majeure dans ce contexte d'ECMO est également inexistante. Cependant, la classification BARC a été utilisée comme pour définir l'hémorragie majeure par Levy et *al.*⁶³ dans l'étude HYPOECMO en retenant un seuil validé (BARC \geq type 3) dans une population éloignée des patients assistés par ECMO.^{217,216} Les performances des modèles prédictifs relatives aux deux définitions retenues révélaient un C-statistique de Harrell's d'environ 0,68, laissant penser que leurs utilisations restent possibles en routine, mais aussi que leurs améliorations sont souhaitables.

Nous avons identifié deux groupes de prédicteurs de saignement majeur, celle non accessible à une modification durant la prise en charge indexe, l'étiologie postcardiotomie et l'indice de masse corporelle, et celle modifiable que sont la fibrinogénémie basale, le compte plaquettaire et l'anémie.

L'identification de la postcardiotomie, de l'indice de masse corporelle et du fibrinogène comme prédicteur déjà connu dans une population proche à la seule différence que les OR évoluent étonnamment en sens opposé pour l'indice de masse corporelle.⁹¹

En marge l'objectif initial de cette thèse, nous avons apporté dans un autre travail des informations utiles à une meilleure surveillance de l'efficacité de l'anticoagulation par HNF dans ce contexte.

Notre étude est la première à évaluer l'interaction entre l'Anti-Xa et le TCA dans la population des patients sous ECMO-VA périphérique, elle montre que si les valeurs de ces deux tests sont corrélées linéairement l'une à l'autre, leurs seuils thérapeutiques peuvent être discordants. Par ailleurs aucun des deux tests n'était prédictif de la survenue des complications hémorragiques ou thrombotiques.²²⁵

En se focalisant sur les seuils d'Anti-Xa et le TCA, parmi les tests les plus utilisés pour le monitoring de l'HNF, plus de 39 % des valeurs de TCA attendues étaient subthérapeutique. Ce qui impliquerait une majoration des doses d'anticoagulation si le TCA était utilisé comme outils de référence. Le taux de concordance rapporté ici semble faire écho aux publications antérieures en dehors du contexte ECMO-VA^{250,251} et à celle rapportée par les rares publications disponibles dans le cadre de l'assistance circulatoire de longue durée.^{252,253}

Par ailleurs, nous montrons que le lien entre TCA et Anti-Xa est très sensible aux concentrations de la bilirubine, du fibrinogène, du temps de prothrombine, du LDH, du facteur V et de la thrombocythémie. Ce qui questionne de la pertinence des seuils

habituellement retenus dans ce contexte. Pour mémoire, l'incidence de l'hyperbilirubinémie était de 12,2 % dans la cohorte de patients adultes du registre l'ELSO assisté par ECMO-VA.²²⁴ Si l'effet de certaines de ces covariables est connu ou attendu, nous avons rapporté dans ce travail l'influence du compte plaquettaire qui est surprenante dans ce contexte. Le TCA et l'Anti-Xa étant mesurés sur du plasma, seule la persistance de microparticules issues de l'activation plaquettaire ou des fragments plaquettaires résiduels pourrait expliquer cette observation.

L'absence de prédiction des complications hémorragiques et thrombotiques par ces deux tests est l'occasion de rappeler la complexité des anomalies liées à l'hémostase sous ECMO-VA et la multiplicité des facteurs qui déterminent la survenue de ces complications (activation plaquettaire, syndrome de von Willebrand acquis, hypofibrinogénémie, le type d'agression chirurgicale, les comorbidités propres aux patients).

Quelques informations d'usage cliniques issues de cette thèse et des travaux antérieurs de notre équipe sont synthétisées dans le tableau 4.

Limites

La limite principale de nos 2 études cliniques est leur caractère rétrospectif dont la conséquence la plus problématique est le risque de biais de classement. Ce biais existe par ailleurs même en cas d'étude prospective dans cette thématique, car les complications thrombotiques cérébrales, les embolies pulmonaires ou les thromboses veineuses profondes par exemple peuvent ne pas être identifiées chez les patients sédatisés et/ou qui décèdent. Le caractère monocentrique de deux de ces travaux en limite la validité externe des résultats. L'étude portant sur le revêtement de surface collige les données issues de 3 centres afin de minimiser ce biais. Dans le cadre du travail annexe au questionnement de la thèse, qui a étudié la concordance entre l'Anti-Xa et le TCA, le caractère monocentrique pourrait au

contraire être une force de l'étude, en effet la variabilité préanalytique, les particularités des kits utilisés dans chaque centre entraînent une comparabilité limitée des valeurs absolues obtenues.^{254,255}

L'exclusion des patients assistés par ECMO-VV est cohérente au vu des différences d'incidence et de profils des complications hémorragiques et thrombotiques étudiées, des différences de profils des patients vis-à-vis des étiologies des supports et des différences dans les thérapeutiques associées et pour finir du pronostic attendu.

Malgré les approches statistiques prenant en compte le risque compétitif associé au décès ou au sevrage de l'ECMO, la nature temps dépendant des principales variables descriptives des complications liées à l'hémostase, ou encore la pondération par un score de propension, nous ne pouvons affirmer de lien causalité à l'issue de nos analyses multivariées. Des études prospectives et idéalement randomisées contrôlées sont nécessaires pour confirmer nos résultats quand celles-ci sont possibles.

Concernant l'analyse histologique des thrombi issus des circuits d'ECMO-VA, plusieurs limites doivent également être considérées.

Les premières sont en rapport avec la localisation des thrombi. En dehors des thrombi localisés autour des zones de jonctions des tubes et des axes de rotation des têtes de pompes qui sont assez caractéristiques, nous n'avons pas de certitudes que cette localisation observée au moment de l'extraction de ces thrombi correspond effectivement à leur site de formation initiale. Les oxygénateurs peuvent agir comme des filtres et emprisonnés des thrombi formés en amont soit au niveau de la tête de pompe soit au niveau du circuit. Cette objection s'applique également aux thrombi retrouvés sur les pales (aubes) des têtes de pompes ou déposés sur les tubes (en dehors des zones de jonction). Nous n'avons pas pu extraire les thrombi spécifiquement formés sur les canules, car ceux-ci sont clampés de façon prolongée au moment de l'ablation de l'ECMO dans notre centre, ce qui entraîne une stagnation

prolongée du sang dans leurs lumières rendant inexploitable leur contenu thrombotique recueilli. L'évolution vers l'utilisation de l'abord percutané et des systèmes de fermeture vasculaire percutanée permettront de répondre à ces écueils dans le futur. Concernant l'oxygénateur, la distinction entre les thrombi formés en secteur veineux de ceux formés en secteur artériel pourrait apporter des informations supplémentaires. En effet, le régime de flux et les niveaux de résistance à l'écoulement étant différents dans ces différents secteurs, les mécanismes de formations et la nature de thrombi pouvaient également l'être. De plus, seul le secteur veineux serait concerné par la possibilité de filtrage de thrombi d'amont.

À propos de la conservation des circuits et des thrombi avant analyses, le délai de 24 heures entre l'extraction et la fixation peut exposer à une lyse de ces thrombi, à la dénaturation de certaines protéines et à la croissance de microorganismes pouvant biaiser notre évaluation. L'utilisation d'antibioprophylaxie systématique dans notre cohorte était à même de réduire ce risque et des données antérieures semblent rassurantes pour des conservations de thrombi analysé jusqu'à 48 heures après leurs extractions. Concernant la quantification histologique, notre analyse était limitée à une sélection de lames pour chaque thrombi.²⁵⁶ La morphologie étant variables et n'ayant pas de données objectives sur l'homogénéité de répartition des composants étudiés au sein d'un même thrombus, nous nous exposons possiblement à un biais de mesure. Cependant cette approche a été utilisée par plusieurs auteurs avant nous et la sélection aléatoire des lames exclut un biais de sélection.^{227,257,258} Enfin, il est possible que certain thrombi aient subi une contraction ce qui modifierai la part respective des différents composant étudié. Notre approche analytique n'incluant pas encore d'étude en microscopie électronique, nous sommes en incapacité d'observer les polyhedrocytes caractéristiques de la contraction des érythrocytes. Notre cohorte actuelle de thrombi étant fixée exclusivement dans de la paraffine, une cohorte de thrombi dédiée est nécessaire pour répondre à cette interrogation.

Tableau 4 Apports du travail de thèse pour la pratique clinique

Facteurs de risques des complications hémorragiques et thrombotiques		
Facteur de risque d'hémorragie	Risque hémorragique	Positionnement et actions envisageables
Postcardiotomie	↑↑↑	Facteur de risque identifié d'hémorragie majeure. Réduction de l'HNF, en particulier durant les premiers jours d'assistance
Obésité	↑	Facteur de risque d'hémorragie majeure. Saignement au site de canulation à anticiper (privilégier l'abord percutané et les solutions de préclosing)
Thrombopénie	↑↑	Facteur de risque d'hémorragie majeure. Envisager la transfusion plaquettaire en cas de thrombopénie. Le seuil d'intervention reste à définir en prophylaxie (<30 000 ou 50 000 mm ³ en prophylaxie >70 000 ou 100 000 mm ³ en cas de saignement ?).
Hypofibrinogénémi	↑↑	Facteur de risque d'hémorragie majeure. Envisager la supplémentation si <1,5 g/dL
Anémie	↑↑	Facteur de risque d'hémorragie majeure. Envisager une transfusion si anémie sévère (le seuil reste à déterminer). Discuté un seuil d'intervention plus élevée en cas de risque cumulé de saignement.
Facteurs de risque de thrombose	Risque thrombotique	Positionnement et actions envisageables
Hyperleucocytose	–	Associée à la présence de thrombi contenant des NETs. Pourrait justifier la majoration du niveau d'anticoagulation. Reste à confirmer
Revêtement de surface par PPC/HA	↑si PPC/HA	PPC moins performant que l'Héparine-Albumine pour la prévention des complications thrombotiques. Circuit traité par HA : diminution dose anticoagulation et inversement si circuit traité par PPC Le choix du type de circuit doit aussi tenir compte du risque de TIH.

Quelques caractéristiques des complications hémorragiques et thrombotiques		
Saignement chirurgical	↑↑	<p>Précoce et d'origine mécanique en premiers lieux. Nécessite une reprise chirurgicale précoce.</p> <p>Pourrais être prévenu par l'utilisation de l'abord percutané et de techniques de preclosing en ce qui concerne les saignements aux sites de canulation.</p> <p>Envisager une fenêtre d'anticoagulation en cas de survenue de ce type de saignement</p>
Saignement médical	↑	<p>Souvent d'origine muqueuse, survienne de façon plus retardée en l'absence d'agression chirurgicale ou procédurale.</p> <p>Forte présomption de l'implication de l'aVWS.</p> <p>Prévention par la préservation de la pulsatilité artérielle, Place des traitements médicamenteux, concentrés de VWF inclus discutables, Hémostase locale si possible.</p>
Histologie des thrombi d'ECMO	–	<p>Composé de fibrine, de VWF, plaquettes, d'érythrocyte et de NETs</p> <p>Prédominance de la fibrine confirme la part de l'activation de la phase contact : majorer anticoagulation en cas d'hyperfibrinogénémie ? Reste à déterminer et à valider</p> <p>Prédominance de VWF associée à une activation plaquettaire flux dépendant, amplifier par l'hémolyse et l'hémoglobine libre plasmatique</p> <p>NETose aseptique, suppose l'activation de la coagulation par la voie du facteur XII.</p>
<p>aVWS=acquired von Willebrand Syndrome ou maladie de Willebrand acquise, BARC=Bleeding Academic Research Consortium, ECMO=Extracorporeal Membrane Oxygenation, HA=Héparine-albumine, NETs=Neutrophile extracellular traps, PPC=Phosphorylcholine, TIH=Thrombopénie induite à l'héparine, VWF= Facteur de von Willebrand.</p>		

Conclusions

La problématique de la thèse était d'améliorer la compréhension des complications duales liée à l'hémostase, la thrombose et l'hémorragie, d'apporter des évidences cliniques et physiologiques nouvelles à même permettre d'améliorer leur prévention et leur prise en charge dans le cadre exclusif de l'ECMO-VA périphérique.

Concernant l'axe thrombose, les résultats de notre étude histologique des thrombi issus d'ECMO-VA montrent une composition hétérogène, faite majoritairement de fibrine et de VWF et dans une moindre mesure d'érythrocytes, de plaquettes et l'implication de la NETose. Par une approche non subjective, nous avons identifié deux types de thrombi, ceux riches en érythrocytes et ceux pauvres en érythrocytes, mais riches en fibrine. Ces observations soulèvent plusieurs questionnements sur la pertinence de nos stratégies actuelles d'anticoagulation et celle de la place de l'anti-agrégation dans ce contexte.

Dans une seconde étude, nous avons comparé les deux revêtements de surface couramment utilisés en clinique et avons observé un surrisque de complications thrombotiques associé à l'utilisation des revêtements à base de phosphorylcholine comparativement à ceux associés à l'Héparine-Albumine. Nos résultats suggèrent une différence de proportion en VWF au niveau des thrombi issus des jonctions de circuit en fonction du type de revêtement. Ces résultats soulignent la nécessité d'un ajustement du niveau d'anticoagulation et d'anti-agrégation prenant en compte le type de revêtement de surface sur le circuit d'ECMO-VA.

Concernant l'axe hémorragie, nous avons montré que la définition proposée par l'ELSO et celle définie par une classe BARC \geq type 2 comme étaient associée à la mortalité à 28-jour avec des performances prédictives similaires. En conséquence, ces deux définitions sont pertinentes pour définir l'hémorragie majeure. Les facteurs de risque d'hémorragie majeure

ainsi définie étaient la fibrinogénémie, le compte plaquettaire, l'hémoglobine, l'étiologie postcardiotomie et l'indice de masse corporelle.

La majorité des complications hémorragiques intervenant précocement dans la prise en charge particulièrement en cas d'ECMO-VA postcardiotomie, alors que celles thrombotiques survenant de façon plus retardée, l'ajustement du niveau d'anticoagulation devrait être orienté par cette observation. De façon générale, la stratégie de gestion des risques thrombotiques et hémorragiques devrait être individualisée, prenant en compte les particularités du patient, la pathologie causale et sa phase, les caractéristiques techniques et opérationnelles de l'ECMO-VA incluant le type de revêtement de surface, de tête de pompe, d'oxygénateur et le niveau d'assistance délivré.

Perspectives

Ce travail ouvre plusieurs perspectives de recherche. Concernant l'axe thrombose, en écho à la mise en évidence d'une NETose dans les thrombi étudiés en l'absence de tout sepsis évolutif, l'association entre la sévérité du syndrome inflammatoire biologique et la survenue des complications thrombotiques devrait être analysée. L'apport respectif de la leucocytose, la CRP et la procalcitonine chez le patient non septique sous ECMO-VA fait l'objet d'un travail de collecte de données additionnelles à la base déjà disponible.

Par ailleurs les variations du fibrinogène, l'un des deux constituants majoritaires des thrombi, pourraient être un marqueur intéressant de la charge thrombotique en routine clinique. Une modélisation de sa cinétique est à l'étude chez les patients sous ECMO-VA et dans des populations contrôles.

Une autre question importante est le lien existant entre les complications thrombotiques systémiques et les complications survenant sur les circuits d'ECMO-VA.

Concernant l'axe hémorragie, notre travail souligne la nécessité d'établir une définition du saignement majeur plus performante dans un travail prospectif. Un tel travail est envisageable grâce à la cohorte de patients inclus dans l'étude WITECMO-H en cours et porté par notre équipe.

Dans l'une de nos publications, nous décrivons la cinétique des plaquettes sous ECMO-VA, et avons confirmé le lien entre le compte plaquettaire et les complications hémorragiques. Cependant, nous n'avons pas abordé la question fondamentale du/des mécanisme(s) en lien avec la thrombopénie. Il s'agit d'une des thématiques majeures de recherche de notre équipe et explorée par plusieurs investigations.

Par ailleurs, nous finalisons une demande de financement au titre des appels à projets PHRC-interrégional portant sur des stratégies antithrombotiques sous ECMO-VA. Un premier travail comparera l'effet de l'anticoagulation par Argatroban et l'HNF sur la survenue des complications liées à l'hémostase. Un second travail s'intéressant au délai d'initiation de l'anticoagulation est également à l'étude.

Références bibliographiques

1. Thiele H, Zeymer U, Neumann F-J, Ferenc M, Olbrich H-G, Hausleiter J, Richardt G, Hennersdorf M, Empen K, Fuernau G, Desch S, Eitel I, Hambrecht R, Fuhrmann J, Böhm M, Ebelt H, Schneider S, Schuler G, Werdan K, IABP-SHOCK II Trial Investigators. Intraaortic balloon support for myocardial infarction with cardiogenic shock. *N Engl J Med*. 2012;367:1287–1296.
2. Thiele H, Zeymer U, Neumann F-J, Ferenc M, Olbrich H-G, Hausleiter J, de Waha A, Richardt G, Hennersdorf M, Empen K, Fuernau G, Desch S, Eitel I, Hambrecht R, Lauer B, Böhm M, Ebelt H, Schneider S, Werdan K, Schuler G, Intraaortic Balloon Pump in cardiogenic shock II (IABP-SHOCK II) trial investigators. Intra-aortic balloon counterpulsation in acute myocardial infarction complicated by cardiogenic shock (IABP-SHOCK II): final 12 month results of a randomised, open-label trial. *Lancet Lond Engl*. 2013;382:1638–1645.
3. H T, U Z, N T, Fj N, J H, M A-W, R M-S, G F, I E, R H, M B, K W, Sb F, M H, S S, T O, S D, S de W-T. Intraaortic Balloon Pump in Cardiogenic Shock Complicating Acute Myocardial Infarction: Long-Term 6-Year Outcome of the Randomized IABP-SHOCK II Trial. *Circulation* [Internet]. 2018 [cited 2021 Oct 21]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30586721/>
4. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, Falk V, González-Juanatey JR, Harjola V-P, Jankowska EA, Jessup M, Linde C, Nihoyannopoulos P, Parissis JT, Pieske B, Riley JP, Rosano GMC, Ruilope LM, Ruschitzka F, Rutten FH, van der Meer P, ESC Scientific Document Group. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J*. 2016;37:2129–2200.
5. Paden ML, Conrad SA, Rycus PT, Thiagarajan RR, ELSO Registry. Extracorporeal Life Support Organization Registry Report 2012. *ASAIO J Am Soc Artif Intern Organs* 1992. 2013;59:202–210.
6. Maxwell BG, Powers AJ, Sheikh AY, Lee PHU, Lobato RL, Wong JK. Resource use trends in extracorporeal membrane oxygenation in adults: an analysis of the Nationwide Inpatient Sample 1998-2009. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2014;148:416-421.e1.
7. Stretch R, Sauer CM, Yuh DD, Bonde P. National trends in the utilization of short-term mechanical circulatory support: incidence, outcomes, and cost analysis. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64:1407–1415.
8. Goldberg RJ, Spencer FA, Gore JM, Lessard D, Yarzebski J. Thirty-year trends (1975 to 2005) in the magnitude of, management of, and hospital death rates associated with cardiogenic shock in patients with acute myocardial infarction: a population-based perspective. *Circulation*. 2009;119:1211–1219.

9. Chioncel O, Parissis J, Mebazaa A, Thiele H, Desch S, Bauersachs J, Harjola V-P, Antohi E-L, Arrigo M, Gal TB, Celutkiene J, Collins SP, DeBacker D, Ilescu VA, Jankowska E, Jaarsma T, Keramida K, Lainscak M, Lund LH, Lyon AR, Masip J, Metra M, Miro O, Mortara A, Mueller C, Mullens W, Nikolaou M, Piepoli M, Price S, Rosano G, Vieillard-Baron A, Weinstein JM, Anker SD, Filippatos G, Ruschitzka F, Coats AJS, Seferovic P. Epidemiology, pathophysiology and contemporary management of cardiogenic shock - a position statement from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *Eur J Heart Fail.* 2020;22:1315–1341.
10. Aissaoui N, Puymirat E, Delmas C, Ortuno S, Durand E, Bataille V, Drouet E, Bonello L, Bonnefoy-Cudraz E, Lesmeles G, Guerot E, Schiele F, Simon T, Danchin N. Trends in cardiogenic shock complicating acute myocardial infarction. *Eur J Heart Fail.* 2020;22:664–672.
11. Extracorporeal Life Support Organization - ECMO and ECLS > Registry > Statistics > International Summary [Internet]. [cited 2021 Oct 22]; Available from: <https://www.elseo.org/Registry/Statistics/InternationalSummary.aspx>
12. Whitman GJR. Extracorporeal membrane oxygenation for the treatment of postcardiotomy shock. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2017;153:95–101.
13. Extracorporeal Life Support Organization - ECMO and ECLS > Registry > ELSO Live Registry Dashboard [Internet]. [cited 2021 Oct 22]; Available from: <https://www.elseo.org/Registry/ELSOLiveRegistryDashboard.aspx>
14. ELSO International Summary of Statistics | ECMO | ECLS [Internet]. [cited 2022 Jun 28]; Available from: <https://www.elseo.org/Registry/InternationalSummaryandReports/InternationalSummary.aspx>
15. Lorusso R, Gelsomino S, Parise O, Mendiratta P, Prodhan P, Rycus P, MacLaren G, Brogan TV, Chen Y-S, Maessen J, Hou X, Thiagarajan RR. Venoarterial Extracorporeal Membrane Oxygenation for Refractory Cardiogenic Shock in Elderly Patients: Trends in Application and Outcome From the Extracorporeal Life Support Organization (ELSO) Registry. *Ann Thorac Surg.* 2017;104:62–69.
16. Mazzeffi MA, Rao VK, Dodd-O J, Del Rio JM, Hernandez A, Chung M, Bardia A, Bauer RM, Meltzer JS, Satyapriya S, Rector R, Ramsay JG, Gutsche J. Intraoperative Management of Adult Patients on Extracorporeal Membrane Oxygenation: An Expert Consensus Statement From the Society of Cardiovascular Anesthesiologists-Part I, Technical Aspects of Extracorporeal Membrane Oxygenation. *Anesth Analg.* 2021;
17. McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, Böhm M, Burri H, Butler J, Čelutkienė J, Chioncel O, Cleland JGF, Coats AJS, Crespo-Leiro MG, Farmakis D, Gilard M, Heymans S, Hoes AW, Jaarsma T, Jankowska EA, Lainscak M, Lam CSP, Lyon AR, McMurray JJV, Mebazaa A, Mindham R, Muneretto C, Francesco Piepoli M, Price S, Rosano GMC, Ruschitzka F, Kathrine Skibelund A, ESC Scientific Document Group, de Boer RA, Christian Schulze P, Abdelhamid M, Aboyans V, Adamopoulos S, Anker SD, Arbelo E, Asteggiano R, Bauersachs J, Bayes-Genis A, Borger MA, Budts W, Cikes M, Damman K, Delgado V, Dendale P, Dilaveris P, Drexel H, Ezekowitz J, Falk V, Fauchier L, Filippatos G, Fraser A, Frey N, Gale CP, Gustafsson F, Harris J, Jung B,

- Janssens S, Jessup M, Konradi A, Kotecha D, Lambrinou E, Lancellotti P, Landmesser U, Leclercq C, Lewis BS, Leyva F, Linhart A, Løchen M-L, Lund LH, Mancini D, Masip J, Milicic D, Mueller C, Nef H, Nielsen J-C, Neubeck L, Noutsias M, Petersen SE, Sonia Petronio A, Ponikowski P, Prescott E, Rakisheva A, Richter DJ, Schlyakhto E, Seferovic P, Senni M, Sitges M, Sousa-Uva M, Tocchetti CG, Touyz RM, Tschoepe C, Waltenberger J, Adamo M, Baumbach A, et al. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J*. 2021;42:3599–3726.
18. Ahmad Y, Sen S, Shun-Shin MJ, Ouyang J, Finegold JA, Al-Lamee RK, Davies JER, Cole GD, Francis DP. Intra-aortic Balloon Pump Therapy for Acute Myocardial Infarction: A Meta-analysis. *JAMA Intern Med*. 2015;175:931–939.
 19. den Uil CA, Akin S, Jewbali LS, Dos Reis Miranda D, Brugts JJ, Constantinescu AA, Kappetein AP, Caliskan K. Short-term mechanical circulatory support as a bridge to durable left ventricular assist device implantation in refractory cardiogenic shock: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg*. 2017;52:14–25.
 20. Shishehbor MH, Moazami N, Tong MZ-Y, Unai S, Tang WHW, Soltesz EG. Cardiogenic shock: From ECMO to Impella and beyond. *Cleve Clin J Med*. 2017;84:287–295.
 21. Lorusso R, Whitman G, Milojevic M, Raffa G, McMullan DM, Boeken U, Haft J, Bermudez CA, Shah AS, D'Alessandro DA. 2020 EACTS/ELSO/STS/AATS expert consensus on post-cardiotomy extracorporeal life support in adult patients. *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg*. 2021;59:12–53.
 22. Kazui T, Tran PL, Echeverria A, Jerman CF, Iwanski J, Kim SS, Smith RG, Khalpey ZI. Minimally invasive approach for percutaneous CentriMag right ventricular assist device support using a single PROTEKDuo Cannula. *J Cardiothorac Surg*. 2016;11:123.
 23. Yulong Guan null, Xiaowei Su null, McCoach R, Kunselman A, El-Banayosy A, Undar A. Mechanical performance comparison between RotaFlow and CentriMag centrifugal blood pumps in an adult ECLS model. *Perfusion*. 2010;25:71–76.
 24. Palanzo DA, El-Banayosy A, Stephenson E, Brehm C, Kunselman A, Pae WE. Comparison of hemolysis between CentriMag and RotaFlow rotary blood pumps during extracorporeal membrane oxygenation. *Artif Organs*. 2013;37:E162-166.
 25. Ganushchak Y, van Marken Lichtenbelt W, van der Nagel T, de Jong DS. Hydrodynamic performance and heat generation by centrifugal pumps. *Perfusion*. 2006;21:373–379.
 26. Yurimoto T, Hara S, Isoyama T, Saito I, Ono T, Abe Y. Viscosity-adjusted estimation of pressure head and pump flow with quasi-pulsatile modulation of rotary blood pump for a total artificial heart. *J Artif Organs*. 2016;19:219–225.
 27. Wu Y, Zhang M, Hauch KD, Horbett TA. Effect of adsorbed von Willebrand factor and fibrinogen on platelet interactions with synthetic materials under flow conditions. *J Biomed Mater Res A*. 2008;85:829–839.
 28. Wong W-T, Lai VK, Chee YE, Lee A. Fast-track cardiac care for adult cardiac surgical patients. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2016 [cited 2020 Nov 2]; Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD003587.pub3>

29. Boes S, Thamsen B, Haas M, Daners MS, Meboldt M, Granegger M. Hydraulic Characterization of Implantable Rotary Blood Pumps. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2019;66:1618–1627.
30. Telyshev D, Petukhov D, Selishchev S. Numerical modeling of continuous-flow left ventricular assist device performance. *Int J Artif Organs.* 2019;42:611–620.
31. Fraser KH, Zhang T, Taskin ME, Griffith BP, Wu ZJ. A quantitative comparison of mechanical blood damage parameters in rotary ventricular assist devices: shear stress, exposure time and hemolysis index. *J Biomech Eng.* 2012;134:081002.
32. Wickramasinghe SR, Han B. Designing Microporous Hollow Fibre Blood Oxygenators. *Chem Eng Res Des.* 2005;83:256–267.
33. Di Paola L, Terrinoni AR, Vitale F. Extracorporeal membrane blood oxygenators: effect of membrane wetting on gas transfer and device performance. *Asia-Pac J Chem Eng.* 2012;7:S348–S355.
34. Hendrix RHJ, Ganushchak YM, Weerwind PW. Contemporary Oxygenator Design: Shear Stress-Related Oxygen and Carbon Dioxide Transfer. *Artif Organs.* 2018;42:611–619.
35. Segers PA, Heida JF, de Vries I, Maas C, Boogaart AJ, Eilander S. Clinical evaluation of nine hollow-fibre membrane oxygenators. *Perfusion.* 2001;16:95–106.
36. Zhang M, Pauls JP, Bartnikowski N, Haymet AB, Chan CHH, Suen JY, Schneider B, Ki KK, Whittaker AK, Dargusch MS, Fraser JF. Anti-thrombogenic Surface Coatings for Extracorporeal Membrane Oxygenation: A Narrative Review. *ACS Biomater Sci Eng.* 2021;7:4402–4419.
37. Ishihara K. Blood-Compatible Surfaces with Phosphorylcholine-Based Polymers for Cardiovascular Medical Devices. *Langmuir.* 2019;35:1778–1787.
38. Li N, Li T, Qiao X-Y, Li R, Yao Y, Gong Y-K. Universal Strategy for Efficient Fabrication of Blood Compatible Surfaces via Polydopamine-Assisted Surface-Initiated Activators Regenerated by Electron Transfer Atom-Transfer Radical Polymerization of Zwitterions. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2020;12:12337–12344.
39. Schlenoff JB. Zwitteration: Coating Surfaces with Zwitterionic Functionality to Reduce Nonspecific Adsorption. *Langmuir.* 2014;30:9625–9636.
40. Gajkowski EF, Herrera G, Hatton L, Velia Antonini M, Vercaemst L, Cooley E. ELSO Guidelines for Adult and Pediatric Extracorporeal Membrane Oxygenation Circuits. *ASAIO J.* 2022;68:133–152.
41. Broman LM, Taccone FS, Lorusso R, Malfertheiner MV, Pappalardo F, Di Nardo M, Belliato M, Bembea MM, Barbaro RP, Diaz R, Grazioli L, Pellegrino V, Mendonca MH, Brodie D, Fan E, Bartlett RH, McMullan MM, Conrad SA. The ELSO Maastricht treaty for ECLS nomenclature: abbreviations for cannulation configuration in extracorporeal life support - a position paper of the Extracorporeal Life Support Organization. *Crit Care.* 2019;23:36.

42. Mazzeffi MA, Rao VK, Dodd-O J, Del Rio JM, Hernandez A, Chung M, Bardia A, Bauer RM, Meltzer JS, Satyapriya S, Rector R, Ramsay JG, Gutsche J. Intraoperative Management of Adult Patients on Extracorporeal Membrane Oxygenation: An Expert Consensus Statement From the Society of Cardiovascular Anesthesiologists-Part I, Technical Aspects of Extracorporeal Membrane Oxygenation. *Anesth Analg*. 2021;
43. Aubron C, McQuilten Z, Bailey M, Board J, Buhr H, Cartwright B, Dennis M, Hodgson C, Forrest P, McIlroy D, Murphy D, Murray L, Pellegrino V, Pilcher D, Sheldrake J, Tran H, Vallance S, Cooper DJ, endorsed by the International ECMO Network (ECMONet). Low-Dose versus therapeutic anticoagulation in patients on extracorporeal membrane oxygenation: a pilot randomized trial. *Crit Care Med*. 2019;47:e563–e571.
44. Descamps R, Moussa MD, Besnier E, Fischer M-O, Preau S, Tamion F, Daubin C, Cousin N, Vincentelli A, Goutay J, Du Cheyron D. Anti-Xa activity and hemorrhagic events under extracorporeal membrane oxygenation (ECMO): a multicenter cohort study. *Crit Care Lond Engl*. 2021;25:127.
45. Mazzeffi M, Greenwood J, Tanaka K, Menaker J, Rector R, Herr D, Kon Z, Lee J, Griffith B, Rajagopal K, Pham S. Bleeding, transfusion, and mortality on extracorporeal life support: ECLS working group on thrombosis and hemostasis. *Ann Thorac Surg*. 2016;101:682–689.
46. Panigada M, E Iapichino G, Brioni M, Panarello G, Protti A, Grasselli G, Occhipinti G, Novembrino C, Consonni D, Arcadipane A, Gattinoni L, Pesenti A. Thromboelastography-based anticoagulation management during extracorporeal membrane oxygenation: a safety and feasibility pilot study. *Ann Intensive Care*. 2018;8:7.
47. Aubron C, Cheng AC, Pilcher D, Leong T, Magrin G, Cooper DJ, Scheinkestel C, Pellegrino V. Factors associated with outcomes of patients on extracorporeal membrane oxygenation support: a 5-year cohort study. *Crit Care Lond Engl*. 2013;17:R73.
48. Aubron C, DePuydt J, Belon F, Bailey M, Schmidt M, Sheldrake J, Murphy D, Scheinkestel C, Cooper DJ, Capellier G, Pellegrino V, Pilcher D, McQuilten Z. Predictive factors of bleeding events in adults undergoing extracorporeal membrane oxygenation. *Ann Intensive Care*. 2016;6:97.
49. Zangrillo A, Landoni G, Biondi-Zoccai G, Greco M, Greco T, Frati G, Patroniti N, Antonelli M, Pesenti A, Pappalardo F. A meta-analysis of complications and mortality of extracorporeal membrane oxygenation. *Crit Care Resusc J Australas Acad Crit Care Med*. 2013;15:172–178.
50. Smith A, Hardison D, Bridges B, Pietsch J. Red blood cell transfusion volume and mortality among patients receiving extracorporeal membrane oxygenation. *Perfusion*. 2013;28:54–60.
51. Combes A, Hajage D, Capellier G, Demoule A, Lavoué S, Guervilly C, Da Silva D, Zafrani L, Tirot P, Veber B, Maury E, Levy B, Cohen Y, Richard C, Kalfon P, Bouadma L, Mehdaoui H, Beduneau G, Lebreton G, Brochard L, Ferguson ND, Fan E, Slutsky AS, Brodie D, Mercat A, EOLIA Trial Group, REVA, and ECMONet. Extracorporeal membrane oxygenation for severe acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2018;378:1965–1975.

52. Cousin N, Bourel C, Carpentier D, Goutay J, Mugnier A, Labreuche J, Godeau E, Clavier T, Grange S, Tamion F, Durand A, Moussa MD, Duburcq T, Lille Intensive Care COVID-19 group. SARS-CoV-2 versus influenza associated acute respiratory distress syndrome requiring veno-venous extracorporeal membrane oxygenation support. *ASAIO J Am Soc Artif Intern Organs* 1992. 2020;
53. Chen W-C, Huang K-Y, Yao C-W, Wu C-F, Liang S-J, Li C-H, Tu C-Y, Chen H-J. The modified SAVE score: predicting survival using urgent veno-arterial extracorporeal membrane oxygenation within 24 hours of arrival at the emergency department. *Crit Care* [Internet]. 2016 [cited 2018 Jan 2];20. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5075192/>
54. Moussa MD, Soquet J, Lamer A, Labreuche J, Gantois G, Dupont A, Abou-Arab O, Rousse N, Liu V, Brandt C, Foulon V, Leroy G, Schurtz G, Jeanpierre E, Duhamel A, Susen S, Vincentelli A, Robin E. Evaluation of Anti-Activated Factor X Activity and Activated Partial Thromboplastin Time Relations and Their Association with Bleeding and Thrombosis during Veno-Arterial ECMO Support: A Retrospective Study. *J Clin Med*. 2021;10.
55. Wang SS, Chen YS, Ko WJ, Chu SH. Extracorporeal membrane oxygenation support for postcardiotomy cardiogenic shock. *Artif Organs*. 1996;20:1287–1291.
56. Ellouze O, Abbad X, Constandache T, Missaoui A, Berthoud V, Daily T, Aho S, Bouchot O, Bouhemad B, Guinot P-G. Risk Factors of Bleeding in Patients Undergoing Venoarterial Extracorporeal Membrane Oxygenation. *Ann Thorac Surg*. 2021;111:623–628.
57. 2020 EACTS/ELSO/STS/AATS expert consensus on post-cardiotomy extracorporeal life support in adult patients | European Journal of Cardio-Thoracic Surgery | Oxford Academic [Internet]. [cited 2021 Oct 18]; Available from: <https://academic.oup.com/ejcts/article/59/1/12/5918808>
58. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE, Colvin MM, Drazner MH, Filippatos GS, Fonarow GC, Givertz MM, Hollenberg SM, Lindenfeld J, Masoudi FA, McBride PE, Peterson PN, Stevenson LW, Westlake C. 2017 ACC/AHA/HFSA Focused Update of the 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of Heart Failure. *J Am Coll Cardiol*. 2017;70:776–803.
59. Stevenson LW, Pagani FD, Young JB, Jessup M, Miller L, Kormos RL, Naftel DC, Ulsney K, Desvigne-Nickens P, Kirklin JK. INTERMACS profiles of advanced heart failure: the current picture. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. 2009;28:535–541.
60. Molina EJ, Shah P, Kiernan MS, Cornwell WK, Copeland H, Takeda K, Fernandez FG, Badhwar V, Habib RH, Jacobs JP, Koehl D, Kirklin JK, Pagani FD, Cowger JA. The Society of Thoracic Surgeons Intermacs 2020 Annual Report. *Ann Thorac Surg*. 2021;111:778–792.
61. Baran DA, Grines CL, Bailey S, Burkhoff D, Hall SA, Henry TD, Hollenberg SM, Kapur NK, O'Neill W, Ornato JP, Stelling K, Thiele H, Diepen S van, Naidu SS. SCAI clinical

- expert consensus statement on the classification of cardiogenic shock. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2019;94:29–37.
62. Registry Dashboard | ECMO | Extracorporeal Membrane Oxygenation [Internet]. [cited 2022 Jun 26]; Available from: <https://www.else.org/Registry/ELSOLiveRegistryDashboard.aspx>
63. Levy B, Girerd N, Amour J, Besnier E, Nessler N, Helms J, Delmas C, Sonnevile R, Guidon C, Rozec B, David H, Bougon D, Chaouch O, Walid O, Hervé D, Belin N, Gaide-Chevronnay L, Rossignol P, Kimmoun A, Duarte K, Slutsky AS, Brodie D, Fellahi J-L, Ouattara A, Combes A, HYPO-ECMO Trial Group and the International ECMO Network (ECMONet), Mattei M, Thivillier C, Auchet T, Perez P, Fritz C, Maureira P, Hubert M, Liu Y, Meziani F, Merdji H, Monnier A, Clere-Jehl R, Nieszkowska A, Pineton M, Chommeloux J, Hékimian G, Lebreton G, Quessard A, Imbault J, Rémy A, Pernot M, Joseph P, Scollo G, Pozzi M, Escudier É, Muller M, Dorez D, Sirodot M, Doguet F, Scherrer V, Aludaat C, Bernasinski M, Zogheib E, Caus T, Bizouarn P, Vourec'h M, Roussel J-C, Senage T, Flecher E, Verhoye J-P, Roisne A, Biedermann S, Vardon-Bouines F, Crognier L, Porterie J, Colson P, Gaudard P, Rouviere P, Bouadma L, Sinnah F, Nataf P, Para M, Dureau P, Djavidi N, Bouglé A, Leprince P, Dessertaine G, Durand M, Albaladejo P, Martin C, Belon F, Piton G, Winiszewski H, Perroti A, Tonon D, Cholley B, Zlotnik D, Achouh P, Nougue H, Collange O, Mertes PM, Kindo M. Effect of Moderate Hypothermia vs Normothermia on 30-Day Mortality in Patients With Cardiogenic Shock Receiving Venous Arterial Extracorporeal Membrane Oxygenation: A Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2022;327:442.
64. Roll MA, Kuys S, Walsh JR, Tronstad O, Ziegenfuss MD, Mullany DV. Long-Term Survival and Health-Related Quality of Life in Adults After Extra Corporeal Membrane Oxygenation. *Heart Lung Circ.* 2018;
65. Khorsandi M, Dougherty S, Bouamra O, Pai V, Curry P, Tsui S, Clark S, Westaby S, Al-Attar N, Zamvar V. Extra-corporeal membrane oxygenation for refractory cardiogenic shock after adult cardiac surgery: a systematic review and meta-analysis. *J Cardiothorac Surg.* 2017;12:55.
66. Kowalewski M, Zieliński K, Brodie D, MacLaren G, Whitman G, Raffa GM, Boeken U, Shekar K, Chen Y-S, Bermudez C, D'Alessandro D, Hou X, Haft J, Belohlavek J, Dziembowska I, Suwalski P, Alexander P, Barbaro RP, Gaudino M, Di Mauro M, Maessen J, Lorusso R. Venous Arterial Extracorporeal Membrane Oxygenation for Postcardiotomy Shock-Analysis of the Extracorporeal Life Support Organization Registry. *Crit Care Med.* 2021;49:1107–1117.
67. Schmidt M, Burrell A, Roberts L, Bailey M, Sheldrake J, Rycus PT, Hodgson C, Scheinkestel C, Cooper DJ, Thiagarajan RR, Brodie D, Pellegrino V, Pilcher D. Predicting survival after ECMO for refractory cardiogenic shock: the survival after venous arterial-ECMO (SAVE)-score. *Eur Heart J.* 2015;36:2246–2256.
68. Muller G, Flecher E, Lebreton G, Luyt C-E, Trouillet J-L, Bréchet N, Schmidt M, Mastroianni C, Chastre J, Leprince P, Anselmi A, Combes A. The ENCOURAGE mortality risk score and analysis of long-term outcomes after VA-ECMO for acute myocardial infarction with cardiogenic shock. *Intensive Care Med.* 2016;42:370–378.

69. Wang L, Yang F, Wang X, Xie H, Fan E, Ogino M, Brodie D, Wang H, Hou X. Predicting mortality in patients undergoing VA-ECMO after coronary artery bypass grafting: the REMEMBER score. *Crit Care Lond Engl*. 2019;23:11.
70. Sánchez-Salado JC, Lorente V, Alegre O, Llaó I, Blázquez L, Ariza-Solé A. Rendimiento de la escala CardShock en pacientes con shock cardiogénico profundo tratados con membrana de oxigenación extracorpórea venoarterial. *Med Intensiva*. 2020;44:312–315.
71. Fux T, Holm M, Corbascio M, Lund LH, van der Linden J. VA-ECMO Support in Nonsurgical Patients With Refractory Cardiogenic Shock: Pre-Implant Outcome Predictors. *Artif Organs*. 2019;43:132–141.
72. Delmas C, Conil J-M, Sztajnic S, Georges B, Biendel C, Dambrin C, Galinier M, Minville V, Fourcade O, Silva S, Marcheix B. Early Prediction of 3-month Survival of Patients in Refractory Cardiogenic Shock and Cardiac Arrest on Extracorporeal Life Support. *Indian J Crit Care Med Peer-Rev Off Publ Indian Soc Crit Care Med*. 2017;21:138–145.
73. Sohail S, Fan E, Foroutan F, Ross HJ, Billia F, Alba AC. Predictors of Mortality in Patients Treated with Venous-Arterial ECMO for Cardiogenic Shock Complicating Acute Myocardial Infarction: a Systematic Review and Meta-Analysis. *J Cardiovasc Transl Res*. 2022;15:227–238.
74. Biancari F, Perrotti A, Dalén M, Guerrieri M, Fiore A, Reichart D, Dell'Aquila AM, Gatti G, Ala-Kokko T, Kinnunen E-M, Tauriainen T, Chocron S, Airaksinen JKE, Ruggieri VG, Brascia D. Meta-Analysis of the Outcome After Postcardiotomy Venous-Arterial Extracorporeal Membrane Oxygenation in Adult Patients. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2018;32:1175–1182.
75. Mehta S, Nemeth S, Kurlansky P, Fried J, Melehy A, Masoumi A, Sayer G, Uriel N, Naka Y, Char S, O'Connell G, Takeda K. SCAI Shock Classification to Predict Outcomes of Venous-Arterial Extracorporeal Membrane Oxygenation. *J Heart Lung Transplant*. 2021;40:S184.
76. Hastings SM, Deshpande SR, Wagoner S, Maher K, Ku DN. Thrombosis in centrifugal pumps: location and composition in clinical and in vitro circuits. *Int J Artif Organs*. 2016;39:200–204.
77. Lubnow M, Philipp A, Foltan M, Bull Enger T, Lunz D, Bein T, Haneya A, Schmid C, Riegger G, Müller T, Lehle K. Technical complications during venous-venous extracorporeal membrane oxygenation and their relevance predicting a system-exchange--retrospective analysis of 265 cases. *PloS One*. 2014;9:e112316.
78. Larsson M, Rayzman V, Nolte MW, Nickel KF, Björkqvist J, Jämsä A, Hardy MP, Fries M, Schmidbauer S, Hedenqvist P, Broomé M, Pragst I, Dickneite G, Wilson MJ, Nash AD, Panousis C, Renné T. A factor XIIIa inhibitory antibody provides thromboprotection in extracorporeal circulation without increasing bleeding risk. *Sci Transl Med*. 2014;6:222ra17-222ra17.
79. Moussa MD, Rousse N, Abou Arab O, Lamer A, Gantois G, Soquet J, Liu V, Mugnier A, Duburcq T, Petitgand V, Foulon V, Dumontet J, Deblauwe D, Juthier F, Desbordes J, Loobuyck V, Labreuche J, Robin E, Vincentelli A. Subclavian versus femoral arterial cannulations during extracorporeal membrane oxygenation: A propensity-matched

- comparison. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. 2022;S1053-2498 (22)00009-2.
80. Figueroa Villalba CA, McMullan DM, Reed RC, Chandler WL. Thrombosis in Extracorporeal Membrane Oxygenation (ECMO) Circuits. *ASAIO J Am Soc Artif Intern Organs 1992*. 2021;
 81. Moussa MD, Rouse N, Abou Arab O, Lamer A, Gantois G, Soquet J, Liu V, Mugnier A, Duburcq T, Petitgand V, Foulon V, Dumontet J, Deblauwe D, Juthier F, Desbordes J, Loobuyck V, Labreuche J, Robin E, Vincentelli A. Subclavian versus femoral arterial cannulations during extracorporeal membrane oxygenation: A propensity-matched comparison. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. 2022;41:608–618.
 82. Reed RC, Rutledge JC. Laboratory and clinical predictors of thrombosis and hemorrhage in 29 pediatric extracorporeal membrane oxygenation nonsurvivors. *Pediatr Dev Pathol Off J Soc Pediatr Pathol Paediatr Pathol Soc*. 2010;13:385–392.
 83. Rastan AJ, Lachmann N, Walther T, Doll N, Gradistanac T, Gommert JF, Lehmann S, Wittekind C, Mohr FW. Autopsy findings in patients on postcardiotomy extracorporeal membrane oxygenation (ECMO). *Int J Artif Organs*. 2006;29:1121–1131.
 84. Chung M, Cabezas FR, Nunez JI, Kennedy KF, Rick K, Rycus P, Mehra MR, Garan AR, Kociol RD, Grandin EW. Hemocompatibility-Related Adverse Events and Survival on Venoaerterial Extracorporeal Life Support: An ELSO Registry Analysis. *JACC Heart Fail*. 2020;8:892–902.
 85. Mansour A, Flecher E, Schmidt M, Rozec B, Gouin-Thibault I, Esvan M, Fougerou C, Levy B, Porto A, Ross JT, Para M, Manganiello S, Lebreton G, Vincentelli A, Nessler N, Pierrot M, Chocron S, Flicoteaux G, Mauriat P, Ouattara A, Roze H, Huet O, Fischer M-O, Alessandri C, Bellaïche R, Constant O, de Roux Q, Ly A, Meffert A, Merle J-C, Mongardon N, Picard L, Skripkina E, Folliguet T, Fiore A, D’ostrevy N, Morgan M-C, Guinot P-G, Nguyen M, Gaide-Chevronnay L, Terzi N, Colin G, Fabre O, Astaneh A, Issard J, Fadel E, Fabre D, Girault A, Guihaire J, Ion I, Menager JB, Mitilian D, Mercier O, Stephan F, Thes J, Jouan J, Duburcq T, Loobuyck V, Moussa M, Mugnier A, Rouse N, Desebbe O, Fellahi J-L, Henaine R, Pozzi M, Richard J-C, Riad Z, Guervilly C, Hraiech S, Papazian L, Castanier M, Chanavaz C, Cadoz C, Gette S, Louis G, Portocarrero E, Gaudard P, Brini K, Bischoff N, Kimmoun A, Mattei M, Perez P, Bourdiol A, Hourmant Y, Mahé P-J, Jaquet P, Lortat-Jacob B, Mordant P, Nataf P, Patrier J, Provençère S, Roué M, Sonnevile R, Tran-Dinh A, Wicky P-H, Al Zreibi C, Cholley B, Guyonvarch Y, et al. Bleeding and thrombotic events in patients with severe COVID-19 supported with extracorporeal membrane oxygenation: a nationwide cohort study. *Intensive Care Med* [Internet]. 2022 [cited 2022 Jul 19]; Available from: <https://doi.org/10.1007/s00134-022-06794-y>
 86. Nunez JI, Gosling AF, O’Gara B, Kennedy KF, Rycus P, Abrams D, Brodie D, Shaefi S, Garan AR, Grandin EW. Bleeding and thrombotic events in adults supported with venovenous extracorporeal membrane oxygenation: an ELSO registry analysis. *Intensive Care Med*. 2022;48:213–224.

87. Extracorporeal Life Support Organization - ECMO and ECLS > Registry > Statistics [Internet]. [cited 2018 Mar 22]; Available from: <https://www.else.org/Registry/Statistics.aspx>
88. Sy E, Sklar MC, Lequier L, Fan E, Kanji HD. Anticoagulation practices and the prevalence of major bleeding, thromboembolic events, and mortality in venoarterial extracorporeal membrane oxygenation: A systematic review and meta-analysis. *J Crit Care*. 2017;39:87–96.
89. Heilmann C, Geisen U, Beyersdorf F, Nakamura L, Benk C, Trummer G, Berchtold-Herz M, Schlensak C, Zieger B. Acquired von Willebrand syndrome in patients with extracorporeal life support (ECLS). *Intensive Care Med*. 2012;38:62–68.
90. Heilmann C, Geisen U, Beyersdorf F, Nakamura L, Benk C, Trummer G, Berchtold-Herz M, Schlensak C, Zieger B. Acquired von Willebrand syndrome in patients with extracorporeal life support (ECLS). *Intensive Care Med*. 2012;38:62–68.
91. Ellouze O, Abbad X, Constandache T, Missaoui A, Berthoud V, Daily T, Aho S, Bouchot O, Bouhemad B, Guinot P-G. Risk Factors of Bleeding in Patients Undergoing Venarterial Extracorporeal Membrane Oxygenation. *Ann Thorac Surg*. 2021;111:623–628.
92. Mazzeffi M, Kiefer J, Greenwood J, Tanaka K, Menaker J, Kon Z, Sanchez P, Pham S, Herr D. Epidemiology of gastrointestinal bleeding in adult patients on extracorporeal life support. *Intensive Care Med*. 2015;41:2015.
93. Willers A, Swol J, Buscher H, McQuilten Z, van Kuijk SMJ, ten Cate H, Rycus PT, McKellar S, Lorusso R, Tonna JE. Longitudinal Trends in Bleeding Complications on Extracorporeal Life Support Over the Past Two Decades—Extracorporeal Life Support Organization Registry Analysis. *Crit Care Med* [Internet]. 2022 [cited 2022 May 5]; Available from: https://journals.lww.com/ccmjournal/Abstract/9000/Longitudinal_Trends_in_Bleeding_Complications_on.95009.aspx
94. Sang Y, Roest M, de Laat B, de Groot PG, Huskens D. Interplay between platelets and coagulation. *Blood Rev*. 2021;46:100733.
95. Ulrichs H, Udvardy M, Lenting PJ, Pareyn I, Vandeputte N, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H. Shielding of the A1 Domain by the D'D3 Domains of von Willebrand Factor Modulates Its Interaction with Platelet Glycoprotein Ib-IX-V*. *J Biol Chem*. 2006;281:4699–4707.
96. Arthur J, Gardiner E, Matzaris M, Taylor S, Wijeyewickrema L, Ozaki Y, Kahn M, Andrews R, Berndt M. Glycoprotein VI is associated with GPIb-IX-V on the membrane of resting and activated platelets. *Thromb Haemost*. 2005;93:716–723.
97. Estevez B, Du X. New Concepts and Mechanisms of Platelet Activation Signaling. *Physiology*. 2017;32:162–177.
98. Thomas SG. 3 - The Structure of Resting and Activated Platelets [Internet]. In: Michelson AD, editor. *Platelets (Fourth Edition)*. Academic Press; 2019 [cited 2022 Jun 8]. p. 47–

99. Harrison P, Martin Cramer E. Platelet α -granules. *Blood Rev.* 1993;7:52–62.
100. Smith CW. Release of α -granule contents during platelet activation. *Platelets.* 2022;33:491–502.
101. McNicol A, Israels SJ. Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. *Thromb Res.* 1999;95:1–18.
102. Payrastra B, Missy K, Trumel C, Bodin S, Plantavid M, Chap H. The integrin alpha IIb/beta 3 in human platelet signal transduction. *Biochem Pharmacol.* 2000;60:1069–1074.
103. Lecut C, Schoolmeester A, Kuijpers MJE, Broers JLV, van Zandvoort MAMJ, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H, Jandrot-Perrus M, Heemskerk JWM. Principal role of glycoprotein VI in alpha2beta1 and alphaIIbbeta3 activation during collagen-induced thrombus formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1727–1733.
104. Nesbitt WS, Kulkarni S, Giuliano S, Goncalves I, Dopheide SM, Yap CL, Harper IS, Salem HH, Jackson SP. Distinct Glycoprotein Ib/V/IX and Integrin α IIb β 3-dependent Calcium Signals Cooperatively Regulate Platelet Adhesion under Flow*. *J Biol Chem.* 2002;277:2965–2972.
105. Cho MJ, Liu J, Pestina TI, Steward SA, Thomas DW, Coffman TM, Wang D, Jackson CW, Gartner TK. The roles of alpha IIb beta 3-mediated outside-in signal transduction, thromboxane A2, and adenosine diphosphate in collagen-induced platelet aggregation. *Blood.* 2003;101:2646–2651.
106. Beaulieu LM, Freedman JE. Chapter 17 - Inhibition of Platelet Function by the Endothelium [Internet]. In: Michelson AD, editor. Platelets (Third Edition). Academic Press; 2013 [cited 2022 Jun 8]. p. 313–342. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123878373000171>
107. Tsai HM, Sussman II, Nagel RL. Shear stress enhances the proteolysis of von Willebrand factor in normal plasma. *Blood.* 1994;83:2171–2179.
108. Cognasse F, Hamzeh H, Chavarin P, Acquart S, Genin C, Garraud O. Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets. *Immunol Cell Biol.* 2005;83:196–198.
109. Blair P, Rex S, Vitseva O, Beaulieu L, Tanriverdi K, Chakrabarti S, Hayashi C, Genco CA, Iafrati M, Freedman JE. Stimulation of Toll-like receptor 2 in human platelets induces a thromboinflammatory response through activation of phosphoinositide 3-kinase. *Circ Res.* 2009;104:346–354.
110. Zhang S, Zhang S, Hu L, Zhai L, Xue R, Ye J, Chen L, Cheng G, Mruk J, Kunapuli SP, Ding Z. Nucleotide-binding oligomerization domain 2 receptor is expressed in platelets and enhances platelet activation and thrombosis. *Circulation.* 2015;131:1160–1170.

111. Rothmeier AS, Marchese P, Petrich BG, Furlan-Freguia C, Ginsberg MH, Ruggeri ZM, Ruf W. Caspase-1-mediated pathway promotes generation of thromboinflammatory microparticles. *J Clin Invest*. 2015;125:1471–1484.
112. Lindemann S, Tolley ND, Dixon DA, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA, Weyrich AS. Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *J Cell Biol*. 2001;154:485–490.
113. Jenne CN, Urrutia R, Kubes P. Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity. *Int J Lab Hematol*. 2013;35:254–261.
114. Bortolotti P, Faure E, Kipnis E. Inflammasomes in Tissue Damages and Immune Disorders After Trauma. *Front Immunol* [Internet]. 2018 [cited 2022 Jun 28];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.01900>
115. McDonald B, Pittman K, Menezes GB, Hirota SA, Slaba I, Waterhouse CCM, Beck PL, Muruve DA, Kubes P. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science*. 2010;330:362–366.
116. Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*. 2010;10:826–837.
117. Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5:577–582.
118. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303:1532–1535.
119. Gould TJ, Vu TT, Swystun LL, Dwivedi DJ, Mai SHC, Weitz JI, Liaw PC. Neutrophil extracellular traps promote thrombin generation through platelet-dependent and platelet-independent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34:1977–1984.
120. von Brühl M-L, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, Khandoga A, Tirniceriu A, Coletti R, Köllnberger M, Byrne RA, Laitinen I, Walch A, Brill A, Pfeiler S, Manukyan D, Braun S, Lange P, Riegger J, Ware J, Eckart A, Haidari S, Rudelius M, Schulz C, Echtler K, Brinkmann V, Schwaiger M, Preissner KT, Wagner DD, Mackman N, Engelmann B, Massberg S. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med*. 2012;209:819–835.
121. Massberg S, Grahl L, von Bruehl M-L, Manukyan D, Pfeiler S, Goosmann C, Brinkmann V, Lorenz M, Bidzhekov K, Khandagale AB, Konrad I, Kennerknecht E, Reges K, Holdenrieder S, Braun S, Reinhardt C, Spannagl M, Preissner KT, Engelmann B. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med*. 2010;16:887–896.
122. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, Wroblewski SK, Wakefield TW, Hartwig JH, Wagner DD. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:15880–15885.
123. Ito T. PAMPs and DAMPs as triggers for DIC. *J Intensive Care*. 2014;2:67.

124. Naudin C, Burillo E, Blankenberg S, Butler L, Renné T. Factor XII Contact Activation. *Semin Thromb Hemost.* 2017;43:814–826.
125. Maas C, Renné T. Coagulation factor XII in thrombosis and inflammation. *Blood.* 2018;131:1903–1909.
126. Didiasova M, Wujak L, Schaefer L, Wygrecka M. Factor XII in coagulation, inflammation and beyond. *Cell Signal.* 2018;51:257–265.
127. Toomasian JM, Bartlett RH. Hemolysis and ECMO pumps in the 21st Century. *Perfusion.* 2011;26:5–6.
128. Lou S, MacLaren G, Best D, Delzoppo C, Butt W. Hemolysis in pediatric patients receiving centrifugal-pump extracorporeal membrane oxygenation: prevalence, risk factors, and outcomes. *Crit Care Med.* 2014;42:1213–1220.
129. L'Acqua C, Hod E. New perspectives on the thrombotic complications of haemolysis. *Br J Haematol.* 2015;168:175–185.
130. Omar HR, Mirsaeidi M, Socias S, Sprenger C, Caldeira C, Camporesi EM, Mangar D. Plasma Free Hemoglobin Is an Independent Predictor of Mortality among Patients on Extracorporeal Membrane Oxygenation Support. *PLoS One.* 2015;10:e0124034.
131. Kato GJ, Taylor JG. Pleiotropic effects of intravascular haemolysis on vascular homeostasis. *Br J Haematol.* 2010;148:690–701.
132. Zhou Z, Han H, Cruz MA, López JA, Dong J-F, Guchhait P. Haemoglobin blocks von Willebrand factor proteolysis by ADAMTS-13: a mechanism associated with sickle cell disease. *Thromb Haemost.* 2009;101:1070–1077.
133. Aponte-Santamaría C, Huck V, Posch S, Bronowska AK, Grässle S, Brehm MA, Obser T, Schneppenheim R, Hinterdorfer P, Schneider SW, Baldauf C, Gräter F. Force-sensitive autoinhibition of the von Willebrand factor is mediated by interdomain interactions. *Biophys J.* 2015;108:2312–2321.
134. Auton M, Sowa KE, Smith SM, Sedlák E, Vijayan KV, Cruz MA. Destabilization of the A1 domain in von Willebrand factor dissociates the A1A2A3 tri-domain and provokes spontaneous binding to glycoprotein Ibalpha and platelet activation under shear stress. *J Biol Chem.* 2010;285:22831–22839.
135. Martin C, Morales LD, Cruz MA. Purified A2 domain of von Willebrand factor binds to the active conformation of von Willebrand factor and blocks the interaction with platelet glycoprotein Ibalpha. *J Thromb Haemost JTH.* 2007;5:1363–1370.
136. Da Q, Teruya M, Guchhait P, Teruya J, Olson JS, Cruz MA. Free hemoglobin increases von Willebrand factor-mediated platelet adhesion in vitro: implications for circulatory devices. *Blood.* 2015;126:2338–2341.
137. Cai Z, Greene MI, Zhu Z, Zhang H. Structural Features and PF4 Functions that Occur in Heparin-Induced Thrombocytopenia (HIT) Complicated by COVID-19. *Antibodies.* 2020;9:52.

138. Selleng S, Malowsky B, Strobel U, Wessel A, Ittermann T, Wollert H-G, Warkentin TE, Greinacher A. Early-onset and persisting thrombocytopenia in post-cardiac surgery patients is rarely due to heparin-induced thrombocytopenia, even when antibody tests are positive. *J Thromb Haemost JTH*. 2010;8:30–36.
139. Kimmoun A, Oulehri W, Sonnevile R, Grisot P-H, Zogheib E, Amour J, Aissaoui N, Megarbane B, Mongardon N, Renou A, Schmidt M, Besnier E, Delmas C, Dessertaine G, Guidon C, Nesseler N, Labro G, Rozec B, Pierrot M, Helms J, Bougon D, Chardonnal L, Medard A, Ouattara A, Girerd N, Lamiral Z, Borie M, Ajzenberg N, Levy B. Prevalence and outcome of heparin-induced thrombocytopenia diagnosed under veno-arterial extracorporeal membrane oxygenation: a retrospective nationwide study. *Intensive Care Med*. 2018;44:1460–1469.
140. Mazzeffi M, Clark M, Grazioli A, Dugan C, Rector R, Dalton H, Madathil R, Menaker J, Herr D, Tanaka K. Platelet factor-4 concentration in adult veno-arterial ECMO patients. *Perfusion*. 2020;267659120965104.
141. Meyer AD, Gelfond JAL, Wiles AA, Freishtat RJ, Rais-Bahrami K. Platelet-derived microparticles generated by neonatal extracorporeal membrane oxygenation systems. *ASAIO J Am Soc Artif Intern Organs 1992*. 2015;61:37–42.
142. Dignat-George F, Bonifay A, Lacroix R. Les microvésicules cellulaires : biomarqueurs émergents en pathologie cardiovasculaire : intérêt dans le risque thrombotique de la COVID 19. *Bull Académie Natl Médecine*. 2021;205:166–179.
143. Vítková V, Pánek M, Janec P, Šibíková M, Vobruba V, Haluzík M, Živný J, Janota J. Endothelial Microvesicles and Soluble Markers of Endothelial Injury in Critically Ill Newborns. *Mediators Inflamm*. 2018;2018:e1975056.
144. Siegel PM, Hentschel D, Bojti I, Wengenmayer T, Helbing T, Moser M, Duerschmied D, Trummer G, Bode C, Diehl P. Annexin V positive microvesicles are elevated and correlate with flow rate in patients receiving veno-arterial extracorporeal membrane oxygenation. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2020;31:884–891.
145. Siegel PM, Bender I, Chalupsky J, Heger LA, Rieder M, Trummer G, Wengenmayer T, Duerschmied D, Bode C, Diehl P. Extracellular Vesicles Are Associated With Outcome in Veno-Arterial Extracorporeal Membrane Oxygenation and Myocardial Infarction. *Front Cardiovasc Med*. 2021;8:747453.
146. Zhou Y-F, Eng ET, Zhu J, Lu C, Walz T, Springer TA. Sequence and structure relationships within von Willebrand factor. *Blood*. 2012;120:449–458.
147. Gastrointestinal Bleeding in Aortic Stenosis. *N Engl J Med*. 1958;259:196–196.
148. Ruggeri ZM, Zimmerman TS. The Complex Multimeric Composition of Factor VIII/von Willebrand Factor. *Blood*. 1981;57:1140–1143.
149. Gill JC, Wilson AD, Endres-Brooks J, Montgomery RR. Loss of the largest von Willebrand factor multimers from the plasma of patients with congenital cardiac defects. *Blood*. 1986;67:758–761.

150. Tsai HM, Nagel RL, Hatcher VB, Sussman II. Multimeric composition of endothelial cell-derived von Willebrand factor. *Blood*. 1989;73:2074–2076.
151. Dent JA, Berkowitz SD, Ware J, Kasper CK, Ruggeri ZM. Identification of a cleavage site directing the immunochemical detection of molecular abnormalities in type IIA von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:6306–6310.
152. Federici AB, Rand JH, Bucciarelli P, Budde U, van Genderen PJ, Mohri H, Meyer D, Rodeghiero F, Sadler JE, Subcommittee on von Willebrand Factor. Acquired von Willebrand syndrome: data from an international registry. *Thromb Haemost*. 2000;84:345–349.
153. Warkentin TE, Morgan DG, Moore JC. Aortic stenosis and bleeding gastrointestinal angiodysplasia: is acquired von Willebrand's disease the link? *The Lancet*. 1992;340:35–37.
154. Veyradier A, Balian A, Wolf M, Giraud V, Montembault S, Obert B, Dagher I, Chaput JC, Meyer D, Naveau S. Abnormal von Willebrand factor in bleeding angiodysplasias of the digestive tract. *Gastroenterology*. 2001;120:346–353.
155. Vincentelli A, Susen S, Le Tourneau T, Six I, Fabre O, Juthier F, Bauters A, Decoene C, Goudemand J, Prat A, Jude B. Acquired von Willebrand syndrome in aortic stenosis. *N Engl J Med*. 2003;349:343–349.
156. Geisen U, Heilmann C, Beyersdorf F, Benk C, Berchtold-Herz M, Schlensak C, Budde U, Zieger B. Non-surgical bleeding in patients with ventricular assist devices could be explained by acquired von Willebrand disease. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2008;33:679–684.
157. Heilmann C, Geisen U, Beyersdorf F, Nakamura L, Benk C, Berchtold-Herz M, Trummer G, Schlensak C, Zieger B. Acquired von Willebrand syndrome in patients with ventricular assist device or total artificial heart. *Thromb Haemost*. 2010;103:962–967.
158. Nascimbene A, Hilton T, Konkle BA, Moake JL, Frazier OH, Dong J. von Willebrand factor proteolysis by ADAMTS-13 in patients on left ventricular assist device support. *J Heart Lung Transplant*. 2017;36:477–479.
159. Brophy TM, Ward SE, McGimsey TR, Schneppenheim S, Drakeford C, O'Sullivan JM, Chion A, Budde U, O'Donnell JS. Plasmin Cleaves Von Willebrand Factor at K1491-R1492 in the A1–A2 Linker Region in a Shear- and Glycan-Dependent Manner In Vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37:845–855.
160. Wohner N, Kovács A, Machovich R, Kolev K. Modulation of the von Willebrand factor-dependent platelet adhesion through alternative proteolytic pathways. *Thromb Res*. 2012;129:e41–e46.
161. Heilmann C, Geisen U, Beyersdorf F, Nakamura L, Benk C, Berchtold-Herz M, Trummer G, Schlensak C, Zieger B. Acquired von Willebrand syndrome in patients with ventricular assist device or total artificial heart. *Thromb Haemost*. 2010;103:962–967.

162. Kalbhenn J, Schmidt R, Nakamura L, Schelling J, Rosenfelder S, Zieger B. Early diagnosis of acquired von Willebrand syndrome (AVWS) is elementary for clinical practice in patients treated with ECMO therapy. *J Atheroscler Thromb*. 2015;22:265–271.
163. Griffith GW, Toomasian JM, Schreiner RJ, Dusset CM, Cook KE, Osterholzer KR, Merz SI, Bartlett RH. Hematological changes during short-term tidal flow extracorporeal life support. *Perfusion*. 2004;19:359–363.
164. Tauber H, Ott H, Streif W, Weigel G, Loacker L, Fritz J, Heinz A, Velik-Salchner C. Extracorporeal membrane oxygenation induces short-term loss of high-molecular-weight von Willebrand factor multimers. *Anesth Analg*. 2015;120:730–736.
165. Tamura T, Horiuchi H, Obayashi Y, Fuki M, Imanaka M, Kuroda M, Nishimura S, Amano M, Sakamoto J, Tamaki Y, Enomoto S, Miyake M, Kondo H, Izumi C, Nakagawa Y. Acquired von Willebrand syndrome in patients treated with veno-arterial extracorporeal membrane oxygenation. *Cardiovasc Interv Ther*. 2019;34:358–363.
166. Mazzeffi M, Bathula A, Tabatabai A, Menaker J, Kaczorowski D, Madathil R, Galvagno S, Pasrija C, Rector R, Tanaka K, Herr D. Von Willebrand Factor Concentrate Administration for Acquired Von Willebrand Syndrome- Related Bleeding During Adult Extracorporeal Membrane Oxygenation. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2021;35:882–887.
167. Vincent F, Rauch A, Loobuyck V, Robin E, Nix C, Vincentelli A, Smadja DM, Leprince P, Amour J, Lemesle G, Spillemaeker H, Debry N, Latremouille C, Jansen P, Capel A, Moussa M, Rousse N, Schurtz G, Delhay C, Paris C, Jeanpierre E, Dupont A, Corseaux D, Rosa M, Sottejeau Y, Barth S, Mourran C, Gomane V, Coisne A, Richardson M, Caron C, Preda C, Ung A, Carpentier A, Hubert T, Denis C, Staels B, Lenting PJ, Van Belle E, Susen S. Arterial Pulsatility and Circulating von Willebrand Factor in Patients on Mechanical Circulatory Support. *J Am Coll Cardiol*. 2018;71:2106–2118.
168. Kohs TCL, Liu P, Raghunathan V, Amirsoltani R, Oakes M, McCarty OJT, Olson SR, Masha L, Zonies D, Shatzel JJ. Severe thrombocytopenia in adults undergoing extracorporeal membrane oxygenation is predictive of thrombosis. *Platelets*. 2022;33:570–576.
169. Cuker A, Arepally GM, Chong BH, Cines DB, Greinacher A, Gruel Y, Linkins LA, Rodner SB, Selleng S, Warkentin TE, Wex A, Mustafa RA, Morgan RL, Santesso N. American Society of Hematology 2018 guidelines for management of venous thromboembolism: heparin-induced thrombocytopenia. *Blood Adv*. 2018;2:3360–3392.
170. Jiritano F, Serraino GF, Ten Cate H, Fina D, Matteucci M, Mastroberto P, Lorusso R. Platelets and extra-corporeal membrane oxygenation in adult patients: a systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med*. 2020;46:1154–1169.
171. Mutlak H, Reyher C, Meybohm P, Papadopoulos N, Hanke AA, Zacharowski K, Weber CF. Multiple electrode aggregometry for the assessment of acquired platelet dysfunctions during extracorporeal circulation. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2015;63:21–27.
172. Nair P, Hoechter DJ, Buscher H, Venkatesh K, Whittam S, Joseph J, Jansz P. Prospective observational study of hemostatic alterations during adult extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) using point-of-care thromboelastometry and platelet aggregometry. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2015;29:288–296.

173. Laine A, Niemi T, Suojaranta-Ylinen R, Raivio P, Soininen L, Lemström K, Hämmäinen P, Schramko A. Decreased maximum clot firmness in rotational thromboelastometry (ROTEM®) is associated with bleeding during extracorporeal mechanical circulatory support. *Perfusion*. 2016;31:625–633.
174. Tauber H, Streif W, Fritz J, Ott H, Weigel G, Loacker L, Heinz A, Velik-Salchner C. Predicting Transfusion Requirements During Extracorporeal Membrane Oxygenation. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2016;30:692–701.
175. Lukito P, Wong A, Jing J, Arthur JF, Marasco SF, Murphy DA, Bergin PJ, Shaw JA, Collecutt M, Andrews RK, Gardiner EE, Davis AK. Mechanical circulatory support is associated with loss of platelet receptors glycoprotein Iba and glycoprotein VI. *J Thromb Haemost JTH*. 2016;14:2253–2260.
176. Kalbhenn J, Schlagenhaut A, Rosenfelder S, Schmutz A, Zieger B. Acquired von Willebrand syndrome and impaired platelet function during venovenous extracorporeal membrane oxygenation: Rapid onset and fast recovery. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. 2018;37:985–991.
177. Hu J, Mondal NK, Sorensen EN, Cai L, Fang H-B, Griffith BP, Wu ZJ. Platelet glycoprotein Iba ectodomain shedding and non-surgical bleeding in heart failure patients supported by continuous-flow left ventricular assist devices. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. 2014;33:71–79.
178. Lukito P, Wong A, Jing J, Arthur JF, Marasco SF, Murphy DA, Bergin PJ, Shaw JA, Collecutt M, Andrews RK, Gardiner EE, Davis AK. Mechanical circulatory support is associated with loss of platelet receptors glycoprotein Iba and glycoprotein VI. *J Thromb Haemost JTH*. 2016;14:2253–2260.
179. Montague SJ, Andrews RK, Gardiner EE. Mechanisms of receptor shedding in platelets. *Blood*. 2018;132:2535–2545.
180. Bortot M, Ashworth K, Sharifi A, Walker F, Crawford NC, Neeves KB, Bark D, Di Paola J. Turbulent Flow Promotes Cleavage of VWF (von Willebrand Factor) by ADAMTS13 (A Disintegrin and Metalloproteinase With a Thrombospondin Type-1 Motif, Member 13). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019;39:1831–1842.
181. Barshtein G, Ben-Ami R, Yedgar S. Role of red blood cell flow behavior in hemodynamics and hemostasis. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2007;5:743–752.
182. Duke WW. the relation of blood platelets to hemorrhagic disease: description of a method for determining the bleeding time and coagulation time and report of three cases of hemorrhagic disease relieved by transfusion. *J Am Med Assoc*. 1910;55:1185–1192.
183. Baskurt OK, Yalcin O, Ozdem S, Armstrong JK, Meiselman HJ. Modulation of endothelial nitric oxide synthase expression by red blood cell aggregation. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 2004;286:H222–H229.
184. Goel MS, Diamond SL. Adhesion of normal erythrocytes at depressed venous shear rates to activated neutrophils, activated platelets, and fibrin polymerized from plasma. *Blood*. 2002;100:3797–3803.

185. Valles J, Santos M, Aznar J, Marcus A, Martinez-Sales V, Portoles M, Broekman M, Safier L. Erythrocytes metabolically enhance collagen-induced platelet responsiveness via increased thromboxane production, adenosine diphosphate release, and recruitment. *Blood*. 1991;78:154–162.
186. Byrnes JR, Duval C, Wang Y, Hansen CE, Ahn B, Mooberry MJ, Clark MA, Johnsen JM, Lord ST, Lam WA, Meijers JCM, Ni H, Ariëns RAS, Wolberg AS. Factor XIIIa-dependent retention of red blood cells in clots is mediated by fibrin α -chain crosslinking. *Blood*. 2015;126:1940–1948.
187. Tutwiler V, Litvinov RI, Lozhkin AP, Peshkova AD, Lebedeva T, Ataullakhanov FI, Spiller KL, Cines DB, Weisel JW. Kinetics and mechanics of clot contraction are governed by the molecular and cellular composition of the blood. *Blood*. 2016;127:149–159.
188. van der Spuy WJ, Pretorius E. Interaction of red blood cells adjacent to and within a thrombus in experimental cerebral ischaemia. *Thromb Res*. 2013;132:718–723.
189. Whelihan MF, Mann KG. The role of the red cell membrane in thrombin generation. *Thromb Res*. 2013;131:377–382.
190. Leal JKF, Adjobo-Hermans MJW, Bosman GJCGM. Red Blood Cell Homeostasis: Mechanisms and Effects of Microvesicle Generation in Health and Disease. *Front Physiol* [Internet]. 2018 [cited 2022 Jul 24];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2018.00703>
191. Morel O, Toti F, Hugel B, Bakouboula B, Camoin-Jau L, Dignat-George F, Freyssinet J-M. Procoagulant Microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:2594–2604.
192. Levin G, Sukhareva E, Lavrentieva A. Impact of microparticles derived from erythrocytes on fibrinolysis. *J Thromb Thrombolysis*. 2016;41:452–458.
193. Assayag EB, Bornstein N, Shapira I, Mardi T, Goldin Y, Tolshinski T, Vered Y, Zakuth V, Burke M, Berliner S, Bonet DS. Inflammation-sensitive proteins and erythrocyte aggregation in atherothrombosis. *Int J Cardiol*. 2005;98:271–276.
194. Lominadze D, Dean WL. Involvement of fibrinogen specific binding in erythrocyte aggregation. *FEBS Lett*. 2002;517:41–44.
195. Vroman L, Adams AL, Fischer GC, Munoz PC. Interaction of High Molecular Weight Kininogen, Factor XII, and Fibrinogen in Plasma at Interfaces. *Blood*. 1980;55:156–159.
196. Sperling C, Fischer M, Maitz MF, Werner C. Blood coagulation on biomaterials requires the combination of distinct activation processes. *Biomaterials*. 2009;30:4447–4456.
197. Fischer M, Sperling C, Tengvall P, Werner C. The ability of surface characteristics of materials to trigger leukocyte tissue factor expression. *Biomaterials*. 2010;31:2498–2507.
198. Maroney SA, Mast AE. New insights into the biology of tissue factor pathway inhibitor. *J Thromb Haemost JTH*. 2015;13 Suppl 1:S200-207.

199. Mazzeffi M, Judd M, Rabin J, Tabatabai A, Menaker J, Menne A, Chow J, Shah A, Henderson R, Herr D, Tanaka K. Tissue Factor Pathway Inhibitor Levels During Venous-Arterial Extracorporeal Membrane Oxygenation in Adults. *ASAIO J.* 2021;67:878–883.
200. Kim HS, Cheon DY, Ha SO, Han SJ, Kim H-S, Lee SH, Kim SG, Park S. Early changes in coagulation profiles and lactate levels in patients with septic shock undergoing extracorporeal membrane oxygenation. *J Thorac Dis.* 2018;10:1418–1430.
201. Tincrès F, Conil JM, Crognier L, Rouget A, Georges B, Ruiz S. Venous-arterial extracorporeal membrane oxygenation in a case of amniotic fluid embolism with coexisting hemorrhagic shock: lessons learned. *Int J Obstet Anesth.* 2018;33:99–100.
202. Guimbretière G, Anselmi A, Roisne A, Lelong B, Corbineau H, Langanay T, Flécher E, Verhoye J-P. Prognostic impact of blood product transfusion in VA and VV ECMO. *Perfusion.* 2018;267659118814690.
203. Warkentin TE, Greinacher A, Koster A. Bivalirudin. *Thromb Haemost.* 2008;99:830–839.
204. Ma M, Liang S, Zhu J, Dai M, Jia Z, Huang H, He Y. The Efficacy and Safety of Bivalirudin Versus Heparin in the Anticoagulation Therapy of Extracorporeal Membrane Oxygenation: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Pharmacol* [Internet]. 2022 [cited 2022 Jul 4];13. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2022.771563>
205. Zhong H, Zhu M-L, Yu Y-T, Li W, Xing S-P, Zhao X-Y, Wang W-J, Gu Z-C, Gao Y. Management of Bivalirudin Anticoagulation Therapy for Extracorporeal Membrane Oxygenation in Heparin-Induced Thrombocytopenia: A Case Report and a Systematic Review. *Front Pharmacol* [Internet]. 2020 [cited 2022 Jul 4];11. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2020.565013>
206. Hamzah M, Jarden AM, Ezetendu C, Stewart R. Evaluation of Bivalirudin As an Alternative to Heparin for Systemic Anticoagulation in Pediatric Extracorporeal Membrane Oxygenation. *Pediatr Crit Care Med J Soc Crit Care Med World Fed Pediatr Intensive Crit Care Soc.* 2020;21:827–834.
207. Ma M, Liang S, Zhu J, Dai M, Jia Z, Huang H, He Y. The Efficacy and Safety of Bivalirudin Versus Heparin in the Anticoagulation Therapy of Extracorporeal Membrane Oxygenation: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Pharmacol.* 2022;13:771563.
208. Murphy DA, Hockings LE, Andrews RK, Aubron C, Gardiner EE, Pellegrino VA, Davis AK. Extracorporeal membrane oxygenation-hemostatic complications. *Transfus Med Rev.* 2015;29:90–101.
209. Staessens S, Moussa MD, Pierache A, Rauch A, Rouse N, Bouleaux E, Ung A, Desender L, Pradines B, Vincentelli A, Mercier O, Labreuche J, Duhamel A, Van Belle E, Vincent F, Dupont A, Vanhoorelbeke K, Corseaux D, De Meyer SF, Susen S. Thrombus formation during ECMO: insights from a detailed histological analysis of thrombus composition. *J Thromb Haemost* [Internet]. [cited 2022 Jul 3];n/a. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jth.15784>

210. Doyle AJ, Hunt BJ. Current Understanding of How Extracorporeal Membrane Oxygenators Activate Haemostasis and Other Blood Components. *Front Med* [Internet]. 2018 [cited 2022 Jul 2];5. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmed.2018.00352>
211. Millar JE, Fanning JP, McDonald CI, McAuley DF, Fraser JF. The inflammatory response to extracorporeal membrane oxygenation (ECMO): a review of the pathophysiology. *Crit Care*. 2016;20:387.
212. [elsoanticoagulationguideline8-2014-table-contents.pdf](https://www.elsevier.com/locate/S0929664617300000) [Internet]. [cited 2017 Dec 24]; Available from: <https://www.else.org/portals/0/files/elsoanticoagulationguideline8-2014-table-contents.pdf>
213. Valente S, Lazzeri C, Bernardo P, Sori A, Chiostrri M, Innocenti L, Stefano P, Peris A, Gensini GF. Bleeding events in refractory cardiac arrest treated with extracorporeal membrane oxygenation--a single centre experience. *Resuscitation*. 2013;84:e119.
214. Kikkert WJ, van Geloven N, van der Laan MH, Vis MM, Baan J, Koch KT, Peters RJ, de Winter RJ, Piek JJ, Tijssen JGP, Henriques JPS. The Prognostic Value of Bleeding Academic Research Consortium (BARC)-Defined Bleeding Complications in ST-Segment Elevation Myocardial Infarction: A Comparison With the TIMI (Thrombolysis In Myocardial Infarction), GUSTO (Global Utilization of Streptokinase and Tissue Plasminogen Activator for Occluded Coronary Arteries), and ISTH (International Society on Thrombosis and Haemostasis) Bleeding Classifications. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63:1866–1875.
215. Mehran R, Rao SV, Bhatt DL, Gibson CM, Caixeta A, Eikelboom J, Kaul S, Wiviott SD, Menon V, Nikolsky E, Serebruany V, Valgimigli M, Vranckx P, Taggart D, Sabik JF, Cutlip DE, Krucoff MW, Ohman EM, Steg PG, White H. Standardized Bleeding Definitions for Cardiovascular Clinical Trials. *Circulation*. 2011;123:2736–2747.
216. Ratcovich H, Josiassen J, Helgestad OKL, Linde L, Sadjadieh G, Engstrøm T, Jensen LO, Ravn HB, Schmidt H, Hassager C, Møller JE, Holmvang L. Incidence, Predictors, and Outcome of In-Hospital Bleeding in Patients With Cardiogenic Shock Complicating Acute Myocardial Infarction. *Am J Cardiol*. 2021;144:13–19.
217. Vranckx P, White HD, Huang Z, Mahaffey KW, Armstrong PW, Van de Werf F, Moliterno DJ, Wallentin L, Held C, Aylward PE, Cornel JH, Bode C, Huber K, Nicolau JC, Ruzylo W, Harrington RA, Tricoci P. Validation of BARC Bleeding Criteria in Patients With Acute Coronary Syndromes: The TRACER Trial. *J Am Coll Cardiol*. 2016;67:2135–2144.
218. Dyke C, Aronson S, Dietrich W, Hofmann A, Karkouti K, Levi M, Murphy GJ, Sellke FW, Shore-Lesserson L, von Heymann C, Ranucci M. Universal definition of perioperative bleeding in adult cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2014;147:1458-1463.e1.
219. Brascia D, Reichart D, Onorati F, Perrotti A, Ruggieri VG, Bounader K, Verhoye JP, Santarpino G, Fischlein T, Maselli D, Dominici C, Mariscalco G, Gherli R, Rubino AS, De Feo M, Bancone C, Gatti G, Santini F, Dalén M, Saccocci M, Faggian G, Tauriainen

- T, Kinnunen E-M, Nicolini F, Gherli T, Rosato S, Biancari F. Validation of Bleeding Classifications in Coronary Artery Bypass Grafting. *Am J Cardiol.* 2017;119:727–733.
220. Buuren S van, Groothuis-Oudshoorn K. mice: Multivariate Imputation by Chained Equations in R. *J Stat Softw.* 2011;45:1–67.
221. Rubin DB. Multiple imputation for nonresponse in surveys. 2010.
222. Schoenfeld D. Partial residuals for the proportional hazards regression model. *Biometrika.* 1982;69:239–241.
223. Harrell FE, Lee KL, Mark DB. Multivariable prognostic models: issues in developing models, evaluating assumptions and adequacy, and measuring and reducing errors. *Stat Med.* 1996;15:361–387.
224. Thiagarajan RR, Barbaro RP, Rycus PT, McMullan DM, Conrad SA, Fortenberry JD, Paden ML, Centers on behalf of the E member. Extracorporeal Life Support Organization Registry International Report 2016. *ASAIO J.* 2017;63:60–67.
225. Moussa MD, Soquet J, Lamer A, Labreuche J, Gantois G, Dupont A, Abou-Arab O, Rousse N, Liu V, Brandt C, Foulon V, Leroy G, Schurtz G, Jeanpierre E, Duhamel A, Susen S, Vincentelli A, Robin E. Evaluation of Anti-Activated Factor X Activity and Activated Partial Thromboplastin Time Relations and Their Association with Bleeding and Thrombosis during Venous-Arterial ECMO Support: A Retrospective Study. *J Clin Med.* 2021;10:2158.
226. Figueroa Villalba CA, McMullan DM, Reed RC, Chandler WL. Thrombosis in Extracorporeal Membrane Oxygenation (ECMO) Circuits. *ASAIO J Am Soc Artif Intern Organs 1992.* 2021;
227. Hastings SM, Ku DN, Wagoner S, Maher KO, Deshpande S. Sources of Circuit Thrombosis in Pediatric Extracorporeal Membrane Oxygenation. *ASAIO J Am Soc Artif Intern Organs 1992.* 2017;63:86–92.
228. Kappelmayer J, Bernabei A, Edmunds LH, Edgington TS, Colman RW. Tissue factor is expressed on monocytes during simulated extracorporeal circulation. *Circ Res.* 1993;72:1075–1081.
229. Fischer M, Sperling C, Tengvall P, Werner C. The ability of surface characteristics of materials to trigger leukocyte tissue factor expression. *Biomaterials.* 2010;31:2498–2507.
230. Barstad RM, ØVrum E, Ringdal M-AL, Øystese R, Hamers MJAG, Veiby OP, Rolfsen T, Stephens RW, Sakariassen KS. Induction of monocyte tissue factor procoagulant activity during coronary artery bypass surgery is reduced with heparin-coated extracorporeal circuit. *Br J Haematol.* 1996;94:517–525.
231. Keuren JFW, Baruch D, Legendre P, Denis CV, Lenting PJ, Girma J-P, Lindhout T. von Willebrand factor C1C2 domain is involved in platelet adhesion to polymerized fibrin at high shear rate. *Blood.* 2004;103:1741–1746.

232. Kwak D, Wu Y, Horbett TA. Fibrinogen and von Willebrand's factor adsorption are both required for platelet adhesion from sheared suspensions to polyethylene preadsorbed with blood plasma. *J Biomed Mater Res A*. 2005;74:69–83.
233. Dupont A, Rauch A, Staessens S, Moussa M, Rosa M, Corseaux D, Jeanpierre E, Goutay J, Caplan M, Varlet P, Lefevre G, Lassalle F, Bauters A, Faure K, Lambert M, Duhamel A, Labreuche J, Garrigue D, De Meyer SF, Staels B, Vincent F, Rousse N, Kipnis E, Lenting P, Poissy J, Susen S, Lille Covid Research Network (LICORNE). Vascular Endothelial Damage in the Pathogenesis of Organ Injury in Severe COVID-19. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2021;41:1760–1773.
234. Winnersbach P, Rossaint J, Buhl EM, Singh S, Lölsberg J, Wessling M, Rossaint R, Bleilevens C. Platelet count reduction during in vitro membrane oxygenation affects platelet activation, neutrophil extracellular trap formation and clot stability, but does not prevent clotting. *Perfusion*. 2022;37:134–143.
235. Ki KK, Millar JE, Langguth D, Passmore MR, McDonald CI, Shekar K, Shankar-Hari M, Cho HJ, Suen JY, Fraser JF. Current Understanding of Leukocyte Phenotypic and Functional Modulation During Extracorporeal Membrane Oxygenation: A Narrative Review. *Front Immunol*. 2020;11:600684.
236. Hanedan MO, Yürük MA, Arslan AK, Kılıç A, Sayar U, Mataracı İ. Heparin-coated vs. Non-coated Cardiopulmonary Bypass Circuits: Comparing Immediate Results with Different Target Activated Clotting Time. *Braz J Cardiovasc Surg*. 2020;35:913–917.
237. Ranucci M, Balduini A, Ditta A, Boncilli A, Brozzi S. A Systematic Review of Biocompatible Cardiopulmonary Bypass Circuits and Clinical Outcome. *Ann Thorac Surg*. 2009;87:1311–1319.
238. Itoh H, Ichiba S, Ujike Y, Douguchi T, Kasahara S, Arai S, Sano S. A prospective randomized trial comparing the clinical effectiveness and biocompatibility of heparin-coated circuits and PMEA-coated circuits in pediatric cardiopulmonary bypass. *Perfusion*. 2016;31:247–254.
239. Pappalardo F, Valle PD, Crescenzi G, Corno C, Franco A, Torracca L, Alfieri O, Galli L, Zangrillo A, D'Angelo A. Phosphorylcholine Coating May Limit Thrombin Formation During High-Risk Cardiac Surgery: A Randomized Controlled Trial. *Ann Thorac Surg*. 2006;81:886–891.
240. Ranucci M, Isgrò G, Soro G, Canziani A, Menicanti L, Frigiola A. Reduced Systemic Heparin Dose with Phosphorylcholine Coated Closed Circuit in Coronary Operations. *Int J Artif Organs*. 2004;27:311–319.
241. Thiara A, Andersen V, Videm V, Mollnes T, Svennevig K, Hoel T, Fiane A. Comparable biocompatibility of Phisio- and Bioline-coated cardiopulmonary bypass circuits indicated by the inflammatory response. *Perfusion*. 2010;25:9–16.
242. Rauch A, Susen S, Zieger B. Acquired von Willebrand Syndrome in Patients With Ventricular Assist Device. *Front Med*. 2019;6:7.
243. Bemtgen X, Heidt T, Zotzmann V, Rilinger J, Wengenmayer T, Biever PM, von Zur Mühlen C, Benk C, Bode C, Staudacher DL. Venoarterial extracorporeal membrane

oxygenation decannulation using the novel Manta vascular closure device. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*. 2020;9:342–347.

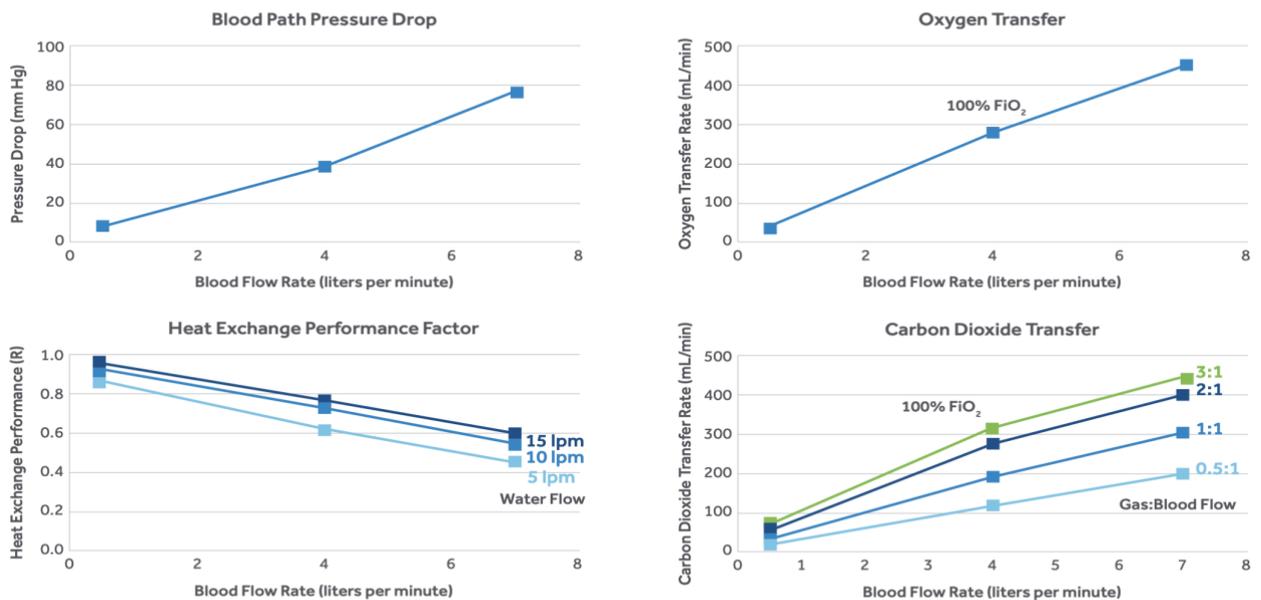
244. Saiydoun G, Gall E, Boukantar M, Fiore A, Mongardon N, Masi P, Bagate F, Radu C, Bergoend E, Mangiameli A, de Roux Q, Mekontso Dessap A, Langeron O, Folliguet T, Teiger E, Gallet R. Percutaneous angio-guided versus surgical veno-arterial ECLS implantation in patients with cardiogenic shock or cardiac arrest. *Resuscitation*. 2022;170:92–99.
245. Martin-Tuffreau A-S, Bagate F, Boukantar M, Saiydoun G, Mangiameli A, Rostain L, Mouillet G, Fiore A, Langeron O, Mekontso-Dessap A, Mongardon N, Folliguet T, Teiger E, Gallet R. Complete percutaneous angio-guided approach using preclosing for venoarterial extracorporeal membrane oxygenation implantation and explantation in patients with refractory cardiogenic shock or cardiac arrest. *Crit Care Lond Engl*. 2021;25:93.
246. Molina TL, Krisl JC, Donahue KR, Varnado S. Gastrointestinal Bleeding in Left Ventricular Assist Device: Octreotide and Other Treatment Modalities. *ASAIO J Am Soc Artif Intern Organs 1992*. 2018;64:433–439.
247. Nakajima-Doi S, Seguchi O, Shintani Y, Fujita T, Fukushima S, Matsumoto Y, Eura Y, Kokame K, Miyata S, Matsuda S, Mochizuki H, Iwasaki K, Kimura Y, Toda K, Kumai Y, Kuroda K, Watanabe T, Yanase M, Kobayashi J, Fukushima N. Experience of the use of octreotide for refractory gastrointestinal bleeding in a patient with Jarvik2000® left ventricular assist device. *J Artif Organs Off J Jpn Soc Artif Organs*. 2019;22:334–337.
248. Ray R, Kale PP, Ha R, Banerjee D. Treatment of Left Ventricular Assist Device–Associated Arteriovenous Malformations with Thalidomide. *ASAIO J*. 2014;60:482–483.
249. Keebler ME, Haglund N, Zalawadiya S, Djunaidi M, Baxter G, Shah A, Gailani D, Lindenfeld J. Standard Dose Doxycycline Does Not Alter von Willebrand Factor Degradation in Patients with CF LVAD. *J Heart Lung Transplant*. 2017;36:S11.
250. McLaughlin K, Rimsans J, Sylvester KW, Fanikos J, Dorfman DM, Senna P, Connors JM, Goldhaber SZ. Evaluation of antifactor-Xa heparin assay and activated partial thromboplastin time values in patients on therapeutic continuous infusion unfractionated heparin therapy. *Clin Appl Thromb*. 2019;25:1076029619876030.
251. Vandiver JW, Vondracek TG. Antifactor Xa levels versus activated partial thromboplastin time for monitoring unfractionated heparin. *Pharmacotherapy*. 2012;32:546–558.
252. Adatya S, Sunny R, Fitzpatrick MJ, Colvin M, Thennapan T, John R, Dodge Zantek N, Pritzker M, Eckman P, Uriel N. Coagulation factor abnormalities related to discordance between anti-factor Xa and activated partial thromboplastin time in patients supported with continuous-flow left ventricular assist devices. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. 2016;35:1311–1320.
253. Adatya S, Uriel N, Yarmohammadi H, Holley CT, Feng A, Roy SS, Reding MT, John R, Eckman P, Zantek ND. Anti-factor Xa and activated partial thromboplastin time measurements for heparin monitoring in mechanical circulatory support. *JACC Heart Fail*. 2015;3:314–322.

254. Cuker A, Ptashkin B, Konkle BA, Pipe SW, Whinna HC, Zheng XL, Cines DB, Pollak ES. Interlaboratory agreement in the monitoring of unfractionated heparin using the anti-factor Xa-correlated activated partial thromboplastin time. *J Thromb Haemost JTH*. 2009;7:80–86.
255. McGlasson DL, Kaczor DA, Krasuski RA, Campbell CL, Kostur MR, Adinero JT. Effects of pre-analytical variables on the anti-activated factor X chromogenic assay when monitoring unfractionated heparin and low molecular weight heparin anticoagulation. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2005;16:173–176.
256. Douglas A, Fitzgerald S, Pandit A, Doyle KM. Storage of blood clots for histological analysis: How long is too long in saline and paraformaldehyde? *Histol Histopathol*. 2020;35:313–320.
257. Staessens S, Fitzgerald S, Andersson T, Clarençon F, Denorme F, Gounis MJ, Hacke W, Liebeskind DS, Szikora I, van Es A, Brinjikji W, Doyle KM, De Meyer SF. Histological stroke clot analysis after thrombectomy: Technical aspects and recommendations. *Int J Stroke Off J Int Stroke Soc*. 2020;15:467–476.
258. Hastings SM, Griffin MT, Ku DN. Hemodynamic studies of platelet thrombosis using microfluidics. *Platelets*. 2017;28:427–433.
259. Protti A, Iapichino GE, Di Nardo M, Panigada M, Gattinoni L. Anticoagulation management and antithrombin supplementation practice during veno-venous extracorporeal membrane oxygenation: a worldwide survey. *Anesthesiology*. 2020;132:562–570.

Annexes

I. Illustration des performances d'échange et de résistance à l'écoulement d'un oxygénateur : Exemple de l'oxygénateur Nautilus (Medtronic).

PRODUCT PERFORMANCE



Bench data; may not be indicative of clinical performance.

Les images sont extraites du guide utilisateur « Nautilus™ ECMO oxygenator quick reference guide disponible en ligne à l'URL suivant : <https://www.medtronic.com/us-en/healthcare-professionals/products/cardiovascular/extracorporeal-life-support/nautilus-ecmo.html>

II. Publication en rapport avec la thématique de la thèse : Evaluation of Anti-Activated Factor X Activity and Activated Partial Thromboplastin Time Relations and Their Association with Bleeding and Thrombosis during Venous-Arterial ECMO Support: A Retrospective Study.

Authorship :

Mouhamed Djahoum Moussa¹, Jérôme Soquet², Antoine Lamer^{1, 2, 3}, Julien Labreuche^{4, 5}, Guillaume Gantois¹, Annabelle Dupont⁶, Osama Abou Arab⁷, Antoine Rauch⁶, Natacha Rousse², Vincent Liu¹, Caroline Brandt¹, Valentin Foulon¹, Guillaume Leroy¹, Valentin Loobuyck², Raphaël Marie¹, Céline Dupré¹, Olivier Joulin¹, Céline Goémine¹, Xavier Leroy¹, Flavien Vincent⁷, Guillaume Schurtz⁷, Emmanuel Jeanpierre⁸, Alain Duhamel^{4, 5}, Sophie Susen⁸, André Vincentelli², Emmanuel Robin¹

¹ CHU Lille, Pôle d'Anesthésie-Réanimation, F-59000 Lille, France

² CHU Lille, Service de Chirurgie Cardiaque, F-59000 Lille, France

³ Univ. Lille, INSERM, CHU Lille, CIC-IT 1403, F-59000 Lille, France

⁴ Univ. Lille, CHU Lille, ULR 2694-METRICS: évaluation des technologies de santé et des pratiques médicales, F59000-Lille, France

⁵ CHU Lille, Department of Biostatistics, F-59000 Lille, France

⁶ CHU Lille, Pôle d'Hématologie-Transfusion, Centre de Biologie Pathologie Génétique

⁷ Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine, Amiens University Hospital, France; MP3CV, EA7517, CURS, Jules Verne University of Picardie, Amiens, France

⁸ CHU Lille, Pôle de Cardiologie, F-59000 Lille, France

Valorisation :

Publication dans Journal of Clinical Medicine²²⁵

A. Résumé

Étude de la relation entre les tests usuels de monitoring de l'héparinothérapie, activité Anti-Xa et TCA, et leurs associations avec les complications hémorragiques et thrombotiques

Introduction

Parmi les outils de monitoring de l'héparinothérapie sous ECMO, l'Activated Cloting Time (ACT) a déjà montré son infériorité par rapport au TCA et l'Anti-Xa dans ce contexte. Cependant la pertinence de leur utilisation sous ECMO peut être discutée, car ces deux tests de monitoring sont sensibles à différentes modifications biologiques parmi lesquelles l'hyperbilirubinémie, l'hémodilution, et les modifications des concentrations des facteurs de la coagulation, anomalies fréquentes sous ECMO-VA. Pour autant, aucune donnée sur l'interchangeabilité de ces deux tests dans le monitoring de l'anticoagulation par HNF sous ECMO-VA n'est disponible à ce jour. La supériorité du TCA et l'Anti-Xa en termes de prédictions des complications hémorragiques et thrombotiques n'ont jamais été explorées non plus dans le contexte de l'ECMO-VA.²⁵⁹ Les objectifs de cette étude sont l'analyse de la relation entre ces deux tests d'une part, l'étude de l'effet des variables biologiques liées à l'hémostase sur cette relation et enfin l'analyse de leurs performances prédictives des complications thrombotiques et hémorragiques sous ECMO.

Matériel et méthodes

Nous avons conduit une étude rétrospective monocentrique portant sur des patients adultes assistés par ECMO-VA entre janvier 2015 et juin 2019 pour un choc cardiogénique réfractaire. Les critères d'exclusion étaient une survie de moins de 24 heures sous ECMO-VA, l'assistance par ECMO veino-veineuse, l'absence de données de mesures concomitantes d'Anti-Xa et de TCA, l'utilisation d'une anticoagulation par HBPM dans les 12 heures qui

précèdent l'ECMO, l'existence d'une TIH, l'utilisation de l'Argatroban et l'absence de données portants sur les complications hémorragiques et thrombotiques.

Variables étudiées

Nous avons colligé les valeurs d'Anti-Xa, de TCA, de fibrinogène, de facteur V, de plaquettes, de bilirubine et de LDH mesurée pluriquotidiennement.

Les valeurs mesurées entre 4 et 6 heures du matin étaient utilisées pour l'analyse de concordance. Les valeurs maximales et minimales de l'Anti-Xa et du TCA (max-Anti-Xa, max-TCA, min-Anti-Xa, min-TCA) ainsi que celles des covariables d'ajustement étudiées pour l'analyse de prédiction des complications.

Critères de jugements pronostiques

L'hémorragie majeure étant définie selon les critères de l'ELSO. Les complications thrombotiques étaient un critère composite : les AVC ischémiques, les ischémies aiguës de membres inférieurs, les changements de circuit d'ECMO et toute autre complication thrombotique entraînant une intervention thérapeutique invasive.

Analyses statistiques

Une concordance des valeurs de TCA était retenue si elle correspondait à l'intervalle attendu d'Anti-Xa. Cette concordance était recherchée pour les valeurs d'Anti-Xa entre 0,3 et 0,7 UI/mL avec une valeur théorique attendue de TCA de 49 s et 64 s (référence 31s) dans notre centre. Une seconde analyse de la corrélation entre ces variables était réalisée en utilisant un modèle de régression linéaire mixte. Afin d'analyser l'effet des covariables biologiques, ces dernières ont été introduites dans le modèle multivarié. Pour l'analyse de prédiction des complications thrombotiques et hémorragiques, nous avons construit un modèle de Cox cause

spécifique. Les covariables d'ajustement prédéfinies étaient : l'âge, indice de masse corporelle, score IGS II, étiologies de l'ECMO, décharge ventriculaire gauche, fibrinogène, plaquettes. Une valeur de $p < 0,05$ était significative.

Résultats

265 patients étaient inclus dans l'étude de prédiction et 245 étaient retenus pour l'étude de la relation entre Anti-Xa et TCA (absence de valeur entre 4 et 6 heures pour 20 patients).

Le taux de concordance entre les valeurs de TCA et d'Anti-Xa était de 50,7 % pour l'intervalle d'Anti-Xa 0,3 à 0,7 UI/mL. En considérant les mesures discordantes (49,3 %), le taux de valeur de TCA subthérapeutique était de 39,3 % pour ce même intervalle.

Les résultats de la régression linéaire mixte retrouvaient une association statistique significative entre les valeurs de TCA et d'Anti-Xa [$\beta=0,43$ (IC 95 % 0,41 — 0,45) 10^{-3} UI/mL ; $P<0,001$]. Cette association était significativement modulée par l'ensemble des covariables biologiques, le compte plaquettaire inclus.

Après l'analyse multivariée par un modèle de Cox cause-spécifique, ni l'Anti-Xa ni le TCA ne prédisaient la survenue de complications hémorragiques ou thrombotiques majeures, cela avant ou après ajustement par les facteurs prédéfinis.

En conclusion, cette étude montre que seuls un peu plus de 50 % des valeurs de TCA et d'Anti-Xa étaient concordantes avec un taux de discordance très élevée. Une proportion importante de valeur subthérapeutique de TCA était observée avec pour conséquence une majoration des doses d'héparine utilisée si le TCA était utilisé isolément. L'incapacité de ces tests à prédire les complications hémorragiques et thrombotiques souligne la complexité de la coagulopathie liée à l'ECMO et ses conséquences.

Article

Evaluation of Anti-Activated Factor X Activity and Activated Partial Thromboplastin Time Relations and Their Association with Bleeding and Thrombosis during Venous-Arterial ECMO Support: A Retrospective Study

Mouhamed Djahoum Moussa^{1,*}, Jérôme Soquet², Antoine Lamer^{1,3,4} , Julien Labreuche^{4,5}, Guillaume Gantois¹, Annabelle Dupont⁶, Osama Abou-Arab^{7,8} , Natacha Rousse² , Vincent Liu¹, Caroline Brandt¹, Valentin Foulon¹, Guillaume Leroy¹, Guillaume Schurtz⁹, Emmanuel Jeanpierre⁶, Alain Duhamel^{4,5}, Sophie Susen⁶ , André Vincentelli² and Emmanuel Robin¹



Citation: Moussa, M.D.; Soquet, J.; Lamer, A.; Labreuche, J.; Gantois, G.; Dupont, A.; Abou-Arab, O.; Rousse, N.; Liu, V.; Brandt, C.; et al.

Evaluation of Anti-Activated Factor X Activity and Activated Partial Thromboplastin Time Relations and Their Association with Bleeding and Thrombosis during Venous-Arterial ECMO Support: A Retrospective Study. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 2158. <https://doi.org/10.3390/jcm10102158>

Academic Editors: Arijit Biswas and Hideo Wada

Received: 7 April 2021
Accepted: 10 May 2021
Published: 17 May 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ CHU Lille, Pôle d'Anesthésie-Réanimation, 59000 Lille, France; antoine.lamer@chru-lille.fr (A.L.); guillaume.gantois@chru-lille.fr (G.G.); vincent.liu@chru-lille.fr (V.L.); caroline.brandt@chru-lille.fr (C.B.); valentin.foulon@chru-lille.fr (V.F.); guillaume.leroy@chru-lille.fr (G.L.); emmanuel.robin@chru-lille.fr (E.R.)
- ² CHU Lille, Service de Chirurgie Cardiaque, 59000 Lille, France; jerome.soquet@chru-lille.fr (J.S.); natacha.rousse@chru-lille.fr (N.R.); andre.vincentelli@chru-lille.fr (A.V.)
- ³ Univ. Lille, INSERM, CHU Lille, CIC-IT 1403, 59000 Lille, France
- ⁴ Univ. Lille, CHU Lille, ULR 2694-METRICS: Évaluation des Technologies de Santé et des Pratiques Médicales, 59000 Lille, France; julien.labreuche@chru-lille.fr (J.L.); alain.duhamel@chru-lille.fr (A.D.)
- ⁵ CHU Lille, Department of Biostatistics, 59000 Lille, France
- ⁶ CHU Lille, Pôle d'Hématologie-Transfusion, Centre de Biologie Pathologie Génétique, 59000 Lille, France; annabelle.dupont@chru-lille.fr (A.D.); emmanuel.jeanpierre@chru-lille.fr (E.J.); sophie.susen@chru-lille.fr (S.S.)
- ⁷ Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine, Amiens University Hospital, 80054 Amiens, France; osama.abouarab@gmail.com
- ⁸ MP3CV, EA7517, CURS, Jules Verne University of Picardie, 80054 Amiens, France
- ⁹ CHU Lille, Pôle de Cardiologie, 59000 Lille, France; guillaume.schurtz@chru-lille.fr
- * Correspondence: mouhamed.moussa@chru-lille.fr; Tel.: +33-320-445-962

Abstract: Background: We aimed to investigate the relationship between anti-activated Factor X (anti-FXa) and activated Partial Thromboplastin Time (aPTT), and its modulation by other haemostasis co-variables during venous-arterial extracorporeal membrane oxygenation (VA-ECMO) support. We further investigated their association with serious bleeding and thrombotic complications. Methods: This retrospective single-center study included 265 adults supported by VA-ECMO for refractory cardiogenic shock from January 2015 to June 2019. The concordance of anti-FXa and aPTT and their correlations were assessed in 1699 paired samples. Their independent associations with serious bleeding or thrombotic complications were also analysed in multivariate analysis. Results: The concordance rate of aPTT with anti-FXa values was 50.7%, with 39.3% subtherapeutic aPTT values. However, anti-FXa and aPTT remained associated ($\beta = 0.43$ (95% CI 0.4–0.45) 10^{-2} IU/mL, $p < 0.001$), with a significant modulation by several biological co-variables. There was no association between anti-FXa nor aPTT values with serious bleeding or with thrombotic complications. Conclusion: During VA-ECMO, although anti-FXa and aPTT were significantly associated, their values were highly discordant with marked sub-therapeutic aPTT values. These results should favour the use of anti-FXa. The effect of biological co-variables and the failure of anti-FXa and aPTT to predict bleeding and thrombotic complications underline the complexity of VA-ECMO-related coagulopathy.

Keywords: extracorporeal membrane oxygenation; activated partial thromboplastin time; anti-factor Xa; intravenous unfractionated heparin monitoring; thrombotic complications; bleeding

1. Introduction

Veno-arterial extracorporeal membrane oxygenation (VA-ECMO) is a lifesaving therapy in refractory cardiogenic shock with an exponential increase in use over the last few decades. Despite the improvement in head-pump technologies, surface coating of tubing and the use of contemporary compact polymethylpenten membrane oxygenators, VA-ECMO remains associated with a high incidence of thrombotic and bleeding complications [1–4].

These complications increase morbidity and cost, and may also impact mortality in supported patients [4]. To prevent thrombotic events and the activation of inflammatory pathways [5,6], intravenous anticoagulation is mandatory with unfractionated heparin (UFH) as a reference treatment [7].

Despite this systematic intravenous anticoagulation, thrombotic complications occur in 20% to 30% of supported patients and, even worse, bleeding events concern up to 70% of VA-ECMO patients [2–4,8], questioning the assessment of the efficacy and safety of UFH treatment.

The most commonly used assays to monitor UFH under VA-ECMO are activated clotting time (ACT), activated partial thromboplastin time (aPTT) and anti-factor X activity (anti-FXa). The currently available guidelines do not recommend an assay over the other [9,10]. If ACT was shown to be irrelevant for anticoagulation monitoring in VA-ECMO as compared to anti-FXa and aPTT after the cannulation procedure [11,12], there is no clear evidence of the superiority of the anti-FXa assay over aPTT when excluding pre-analytical characteristics. Their ability to reflect the sole heparin intrinsic activity can be questioned knowing that both anti-FXa (to a lesser extent) and aPTT may be susceptible to several biological factors unrelated to UFH therapy and to analytical limits. The impact of these biological variables that included hyperbilirubinemia, hyperfibrinogenemia or reduced clotting factors, on anti-FXa and aPTT association during VA-ECMO support [13] are poorly characterised.

Furthermore, the comparative analysis of the association of anti-FXa and aPTT with bleeding events or thrombotic complications in a VA-ECMO setting is lacking. This lack of evidence may explain the concerning high discrepancy that exists among centres for anticoagulation treatment and monitoring [14,15].

Our main objectives were to study the association between anti-FXa and aPTT during VA-ECMO support, to evaluate the modulation of this association according to prothrombin time (PT), factor V, fibrinogen, bilirubin, lactate dehydrogenase (LDH) and platelets count. Besides, we sought to investigate the association of anti-FXa and aPTT with the occurrence of bleeding events and thrombotic complications.

2. Materials and Methods

This retrospective single-centre study was conducted at the Lille University Hospital Cardiac and Thoracic Intensive Care Unit. Approval was obtained from the Ethical Committee of French Society of Anaesthesia and Intensive Care Medicine (CERAR, IRB 00010254-2020-195), Paris, France (Chairperson Prof J.E. Bazin) on 11 April 2020 which waived the need for informed consent because of the retrospective setting. All datasets were declared to the French authorities in compliance with national laws (CNIL N° DEC2015-14).

2.1. Participants

Consecutive adult patients aged 18 years and older, supported by VA-ECMO for refractory cardiogenic shock between January 2015 and June 2019 were included. Exclusion criteria were moribund patients (duration of support <24 h), missing or inadequate biological factors (exposure to direct oral anticoagulants, to low molecular heparin or to thrombolysis agent at cannulation), missing outcome status, known haematological diseases (heparin induced thrombocytopenia, ADAMTS13 deficiency, antiphospholipid syndrome), and the use of argatroban as primary anticoagulation therapy. In cases of multiple VA-ECMO support, only the first run was considered.

2.2. Data Collection and Sources

Anthropometric, anamnestic and outcomes variables were extracted from our electronic health records (Sillage (SIB, Rennes, France) and IntelliSpace Critical Care and Anaesthesia (Philips Healthcare, Koninklijke Philips N.V. Eindhoven, The Netherlands)). Biological data were recovered from the laboratory results management software (Molis[®], CompuGroup Medical, Koblenz, Germany).

2.3. Clinical Management of VA-ECMO

Extracorporeal centrifugal pump system (Rotaflow (Maquet Gentige group, Rastatt, Germany), Revolution (LivaNova Group, Saluggia, Italy), Centrimag (Thoratec, Pleasanton, CA, USA)) associated with following membrane oxygenator (Quadrox (Maquet Gentige group, Rastatt, Germany) or Eos ECMO (LivaNova Group, Saluggia, Italy) or A.LONE ECMO oxygenator (Euroset, Medolla, Italy)) were used. All VA-ECMO circuits were primed with crystalloids at the initiation of support and in cases of circuit change.

Senior cardiac surgeons performed all cannulation either for peripheral (femoral vein and femoral or subclavian arteries) or central VA-ECMO (right atrium and ascending aorta or pulmonary artery). Left ventricle (LV) unloading was considered in case of LV dilatation with spontaneous contrast in cardiac ultrasound or pulmonary oedema, using Impella CP or 5.0 (Abiomed, Inc, Danvers, MA, USA), additional LV venting cannulation, cannulation change for antegrade flow or intra-aortic balloon pump. The pump flow was adjusted to target a mean arterial pressure >60 mmHg, SvO₂ > 65% or ScVO₂ > 70%, aortic valve opening and optimal right ventricle unloading. Weaning was considered for recovery when cardiac output was acceptable (aortic or pulmonary velocity time integral >12 cm/s or 10 cm/s respectively) after lowering the ECMO flow with no or reduced inotropic support.

2.4. Anticoagulation and Bleeding Management

We use anti-FXa as the primary assay to guide UFH treatment in our ICU. UFH bolus of 100 IU/kg was initiated just before cannulations. Intravenous UFH was administered in ICU and adjusted to obtain an anti-FXa of 0.2 to 0.4 IU/mL. This target was increased to 0.4 to 0.7 IU/mL if pump flow <1.8 L/min or in case of thrombotic complications. Of note UFH could be postponed after cannulations (VA-ECMO following cardiopulmonary bypass) or stopped until bleeding was managed at the physician's discretion. Before ICU admission, patient haemostasis was managed during surgery (postcardiotomy patients) using ACT (targeting 200 s to 250 s before cannulation), and/or aPTT, PT and fibrinogen and more recently thromboelastography (2019). For non-postcardiotomy patients, ACT was used at the ECMO cannulations only.

During ICU stay, packed red blood cells (PRBC) and platelet concentrates were transfused to maintain a haemoglobin level >8 g/dL and platelet count >50,000 mm⁻³ (increased to 70,000 mm⁻³ in case of bleeding). Fresh frozen plasma (FFP) was given in case of major overt bleeding that required massive transfusion with a high FFP: RBC ratio or according to multi-parametric analyses of coagulation tests (PT, aPTT, factor V, factor II, fibrinogen and thromboelastographic test). Antithrombin was measured when heparin resistance was suspected (UFH dosage >10 IU/kg/h for 0.2 IU/mL to 0.4 IU/mL target) and supplementation (Aclotine, LFB Biomedicaments, Les Ulis, France) was performed when the level was <50%.

2.5. Sampling and Laboratory Assays

Samples were drawn from the patient through indwelling arterial line, or central venous catheter, and sent to the haemostasis and biology department using an automatized pneumatic tube transport system which shortens the laboratory delivery time to a few minutes. All haemostasis variables (aPTT, anti-FXa, PT, fibrinogen, factor V) were measured on the same sample at each time point. Sampling for platelet count, total bilirubin and LDH were drawn at the time of haemostatic sampling.

Blood samples for haemostasis tests were drawn in a 2.7 mL volume and 3.2% citrated tubes (BD Vacutainer[®], Plymouth, PL6BP; United Kingdom) and analysed on STA-R Max analyser (Diagnostica Stago, Asnières, France). aPTT and anti-FXa measurements were performed using the same reagents during the study period. Collected samples were processed within 10 min and results given within an hour. Both measurements were performed on platelet-poor plasma (platelet count $<10,000 \text{ mm}^{-3}$) obtained after a double centrifugation at $2500 \times g$ for 15 min at room temperature using a chromogenic method without correction for antithrombin for anti-FXa (Biophen Heparin LRT, HYPHEN BioMed, Neuville-sur-Oise, France), and a chromometric method for aPTT (TriniCLOT aPTT HS, Tcoag, Wicklow, Ireland).

Full description of the analysers, reagent, normal value ranges or reference values of laboratory tests studied are provided in Table S1.

2.6. Description of aPTT and Anti-FXa Variables

aPTT and anti-FXa were measured 3 times a day with additional measurements 4 to 6 h after any change in UFH dose or in the 2 h following plasma products transfusion. To account for diurnal variation of anti-FXa and aPTT, we selected the measurement performed between 4 and 6 am, [16] which was concomitant to the measurement of the other haemostatic covariates (factor V, fibrinogen, PT, platelets) and biochemical co-variables (bilirubin and LDH). These variables are defined as reference with an “r” attached as a prefix (i.e., r_aPTT and r_anti-FXa) and were exclusively used to analyse the relationship between anti-FXa and aPTT.

Besides, we calculated daily maximum (max_aPTT, max_anti-FXa, max_fibrinogen, max_platelet), minimum (min_aPTT, min_anti-FXa, min_fibrinogen, min_platelet) and mean (mean_aPTT, mean_anti-FXa, mean_fibrinogen, mean_platelet) values for anti-FXa, aPTT fibrinogen and platelets. We used these variables in the outcome prediction analyses. All variables were recorded for 10 days following cannulation or less in case of ECMO weaning or death.

2.7. Study Endpoints

The efficacy endpoint of this study was thrombotic complications and the safety endpoint was serious bleeding. The thrombotic complications endpoint was a composite of stroke, limb ischaemia and ECMO circuit changes for thrombosis or cannulation thrombosis or any thrombosis that led to medical or surgical intervention or death. Major bleeding was defined according to the ELSO bleeding management guidelines [9] as a bleeding that led to surgical exploration or characterised by its location (central nervous system, hemothorax, retro-peritoneal bleeding) or requiring immediate transfusion of at least 2 units of PRBC for either a sudden fall of haemoglobin of 2 g/dL in less than 24 h or new hemodynamic instability or overt bleeding.

2.8. Statistical Analysis

The statistical analysis plan was approved by the authors before analyses began. Quantitative variables were expressed as means (standard deviation) for normally distributed variables or as medians (interquartile range) if otherwise. The normality of distributions was assessed using histograms and the Shapiro–Wilk test. Categorical variables were expressed as numbers (percentage). We estimated the cumulative incidence of serious bleeding and thrombotic complications during ECMO duration using the Kalbfleisch and Prentice method [17] by taking into account death under ECMO and ECMO weaning as competing events.

The first part of the analysis consisted in assessing the relationship between r_anti-FXa and r_aPTT. Following the clinical laboratory standards institute and other guidelines, we determined ex vivo the aPTT range corresponding to the anti-FXa range of 0.30 to 0.70 IU/mL [18,19]. This expected range was 62 to 109 s in our centre. When the observed

r_aPTT values fell into this expected range, they were considered concordant with the r_anti-FXa range of 0.30 to 0.70 IU/mL.

We also estimated the slope between r_anti-FXa and r_aPTT values by using mixed linear regression model (unstructured covariance pattern model) to account correlation for samples drawn within the same patients considering r_anti-FXa as dependent variable, and r_aPTT as fixed independent variables. We assessed the relationship between r_anti-FXa and r_aPTT values according to other biological levels (prothrombin time, fibrinogen, factor V, platelets count, bilirubin and LDH) categorised according to quartiles using linear mixed regression models including the corresponding interaction term as fixed effects.

The second part of analysis consisted in the assessment of the relationship between the daily measures (maximum, minimum and mean daily values) of anti-FXa and aPTT and the incidence of serious bleeding and thrombotic complications under ECMO. We used a cause-specific Cox's regression models by considering death under ECMO and ECMO weaning as competing risk, and by treating biological data (as continuous or as categorical variables according to quartiles) before outcome occurrence as time dependent co-variables to account for changes in biological values over time [20]. Since we could not ascertain that day 0 biological data were measured before the bleeding and thrombotic events that occurred that same day, we carried out a landmark analysis from day 1. Multivariable cause-specific Cox's regression models were performed to adjust for predefined confounders (age, body mass index, SAPS II, postcardiotomy aetiology, left ventricle unloading, and daily measures of fibrinogen and platelets). All statistical tests were performed at the two-tailed α level of 0.05. Data were analysed using the SAS software package, release 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

3. Results

3.1. Study Population

Of the 379 patients screened during the study period, 265 patients met the inclusion criteria. The study flowchart is shown in Figure S1. Patient demographics, clinical characteristics and VA-ECMO course are summarised in Table 1.

Table 1. Characteristics of the study population ($n = 265$).

Characteristics	N	Values
Age, years	265	55 ± 14
Body mass index, kg/m ²	258	27.5 ± 5.7
Male gender	265	183 (69.1)
Comorbidities		
Strokes	264	8 (3.0)
Atrial fibrillation	263	95 (36.1)
Diabetes mellitus	264	61 (23.1)
Hypertension	264	144 (54.5)
Hypercholesterolaemia	252	93 (36.9)
Chronic kidney disease	256	97 (37.9)
P2Y12 inhibitors during ECMO	257	21 (8.2)
Simplified acute physiology score II	264	58.3 ± 22.0
Lactate on admission, mmol/L	176	4.5 (2.4 to 9.5)
Description of ECMO support		
Aetiologies of refractory shocks	265	
Postoperative low cardiac output syndrome		90 (34.0)
Primary graft dysfunction		15 (5.7)
Myocardial infarction		76 (28.7)

Table 1. Cont.

Characteristics	N	Values
Acute on chronic heart disease		40 (15.1)
Pulmonary embolism		9 (3.4)
Myocarditis		16 (6.0)
Poisoning		7 (2.6)
Others		12 (4.5)
Postcardiotomy shock	265	103 (38.9)
Duration of ECMO support, days	265	7 (3 to 11)
Peripheral ECMO	265	263 (99.2)
Left ventricle unloading strategies	265	51 (19.2)
Left ventricle venting		10 (3.8)
Cannulation upgrade		10 (3.8)
Intra-aortic balloon pumping		4 (1.5)
Impella CP/5.0		27 (10.2)
Thrombotic complications	265	87 (32.8)
Description of thrombosis sites **		102
Ischemic stroke		46 (45.1)
Limb ischaemia		15 (14.7)
Cannula/circuit thrombosis		26 (25.5)
Others		15 (14.7)
Serious bleeders	265	150 (56.6)
Description of bleeding sites *		206
Pericardial		79 (38.4)
Cannula		46 (22.3)
Pleural		19 (9.2)
Otorhinolaryngological area		16 (7.8)
Gastrointestinal tract		10 (4.9)
Haemoptysis		9 (4.4)
Intracerebral haemorrhage		6 (2.9)
Others *		21 (10.2)
Number of blood products	265	
Packed red blood cells, units	250	10 (5 to 18)
Fresh frozen plasma, units	169	7 (3 to 11)
Platelet concentrate, units	176	3 (2 to 6)
Weaning categories	265	
Successful weaning		120 (45.5)
Heart transplantation		22 (8.3)
Left or bi-ventricular assist devices		20 (7.6)
Death under VA-ECMO support		103 (38.9)
Outcomes	265	
Intensive care unit length of stay (days)		12 (6 to 25)
Hospital length of stay (days)		18 (8 to 41)
28-day mortality		114 (43.0)
Intensive care unit mortality		126 (47.5)
Hospital Mortality		136 (51.3)

Values are numbers (percentage), mean \pm standard deviation or median (interquartile range). ECMO, extracorporeal membrane oxygenation; * The other aetiologies were: Acute pulmonary hypertension (2) and cardiac arrest (2) related to ARDS, Takotsubo cardiomyopathy (2), cardiogenic shock related to pheochromocytoma (1) or following liver transplantation (1), cardiac arrest following anaphylactic shock (1), septic cardiomyopathy (1), cardiogenic shock following transcatheter aortic (1) or mitral (1) valve replacement. ** multiple sites in some patients.

3.2. Relationship between Anti-FXa and aPTT Using Reference Samples

A total of 1699 reference samples from 245 patients were used to analyse the relationship between r_{anti-FXa} and r_{aPTT}. r_{anti-FXa} met the clinical target of 0.2 to 0.4 IU/mL on all days except day 1 to day 3. The time courses of both variables are shown in Figure 1.

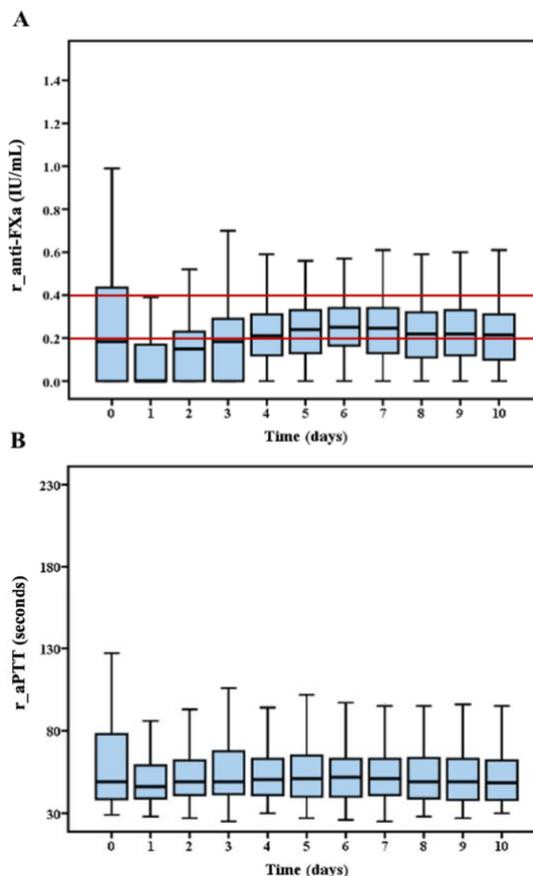


Figure 1. Time courses of reference anti-FXa and aPTT. Tuckey diagrams showing the daily values of reference anti-FXa (A) and reference aPTT (B) used for the association analysis. Anti-FXa was the reference test for anticoagulation monitoring and the red lines (A) describe the targeted anti-FXa interval.

The concordance of actual r_aPTT values with expected aPTT range that corresponds to r_anti-FXa range of [0.30 to 0.70 IU/mL] was 50.7%. Expected r_aPTT values were markedly sub-therapeutic (39.3%) (Figure 2).

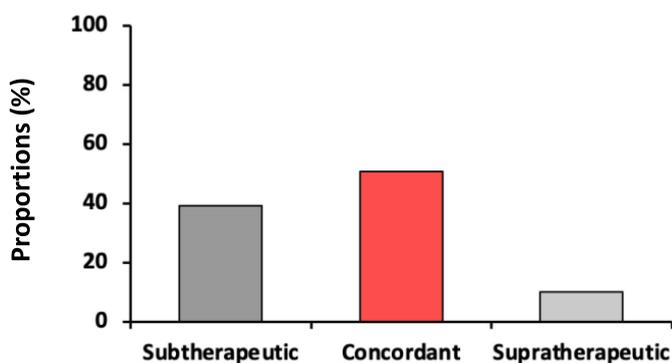


Figure 2. Description of concordance and discordance of anti-FXa and aPTT. Both variables were measured on the same sample. Observed aPTT values were considered concordant if they fell into the expected aPTT range that corresponds to the anti-FXa range of 0.3 to 0.7 IU/mL.

In a mixed linear regression model, anti-FXa was associated with aPTT, with an estimated regression coefficient of $0.43 \cdot 10^{-2}$ IU/mL (95% CI, 0.41 to 0.45) per 1 s increase in aPTT, $p < 0.001$. As shown in Figure 3, this relationship was significantly modulated by all co-variables (the time courses are shown in Figure S2). Increase in fibrinogen, factor V, and platelet levels strengthened this association whereas increase in PT and bilirubin weakened the association.

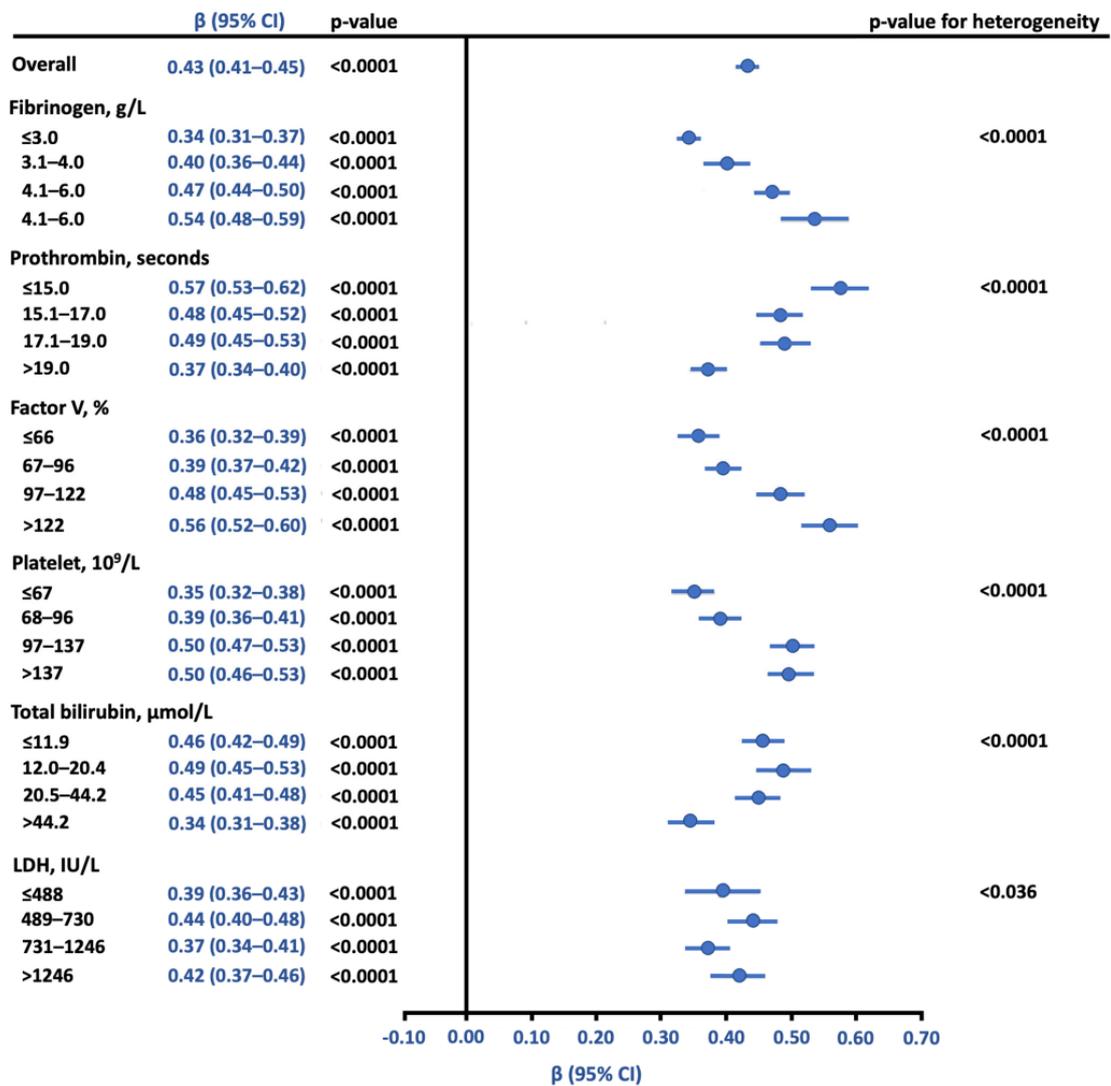


Figure 3. Association of anti-FXa and aPTT, overall and after modulation by biological covariates. β indicates regression coefficient of aPTT on anti-FXa (expressed as 10^{-2} IU/mL) calculated using all available biological measures at the same time points by using linear mixed model (unstructured covariance pattern model to account repeated measurements). Subgroups analyses on other biological data (categorised according to quartiles of all available measures) were made by including the corresponding interaction term into linear mixed models. Prothrombin time (PT), factor V and fibrinogen were analysed on the same citrated samples as aPTT and Anti-FXa. Platelets, bilirubin and lactate dehydrogenase samples were drawn at the same time point as aPTT and Anti-FXa.

3.3. Association of Anti-FXa and aPTT with Serious Bleeding

Overall, 150 (56.6%) patients had one or more episodes of serious bleeding (Table 1), most events occurring within the first 7 days of ECMO support. The cumulative incidence of bleeding at 7 and 14 days were 53.6% and 56.2%, respectively (Figure S3). The time courses of daily anti-FXa and aPTT variables are shown in Figure 4.

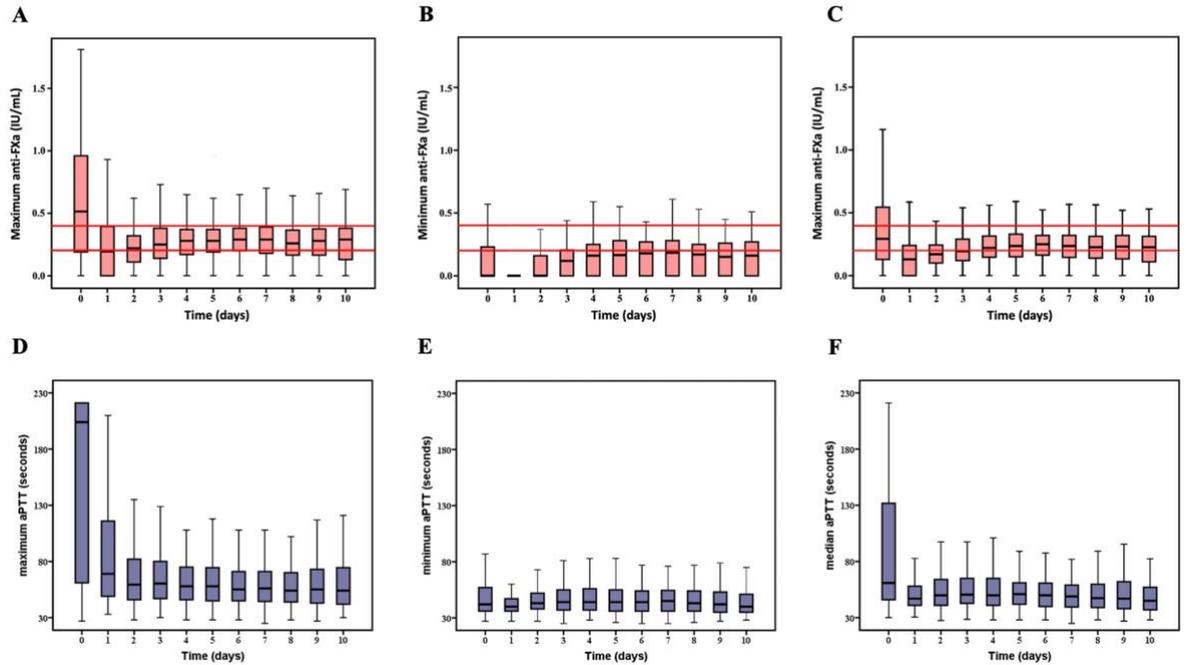


Figure 4. Time courses of daily maximum, minimum and mean values of anti-FXa and aPTT. The pink Tuckey diagrams showing the time course of the daily maximum (A) minimum (B) and mean (C) values of anti-FXa. The reference line for the lower and the upper limit of the anti-FXa used in our centre are coloured red. The bleu Tuckey diagrams showing maximum (D), minimum (E) and mean (F) values of aPTT.

In a time-dependent cause-specific Cox’s proportional hazard model, daily maximum, minimum and mean anti-FXa and aPTT values were not associated with serious bleeding before or after pre-specified adjustment on age, BML, post-cardiotomy shock, SAPS-II score, LV unloading and daily measure of fibrinogen and platelets (Figure S4).

3.4. Association of Anti-FXa and aPTT with Thrombotic Complications

The cumulative incidence of thrombotic complications during ECMO support at 7 and 14 days were 25.7% and 29.8%, respectively (Additional Figure 3). Overall, 87 (32.8%) patients had one or more thrombotic complication during ECMO support (Table 1). As shown in Figure S4, thrombotic complications were not significantly associated with daily maximum, minimum or mean anti-FXa and aPTT values.

4. Discussion

This study is, to our knowledge, the first to examine the clinical uncertainty regarding the use of anti-FXa instead of aPTT in adult patients supported by VA-ECMO. We found a low concordance rate between $r_{\text{anti-FXa}}$ and r_{aPTT} for the reference anti-FXa targets of 0.30 to 0.70 IU/mL. Discordant values were mainly sub-therapeutic r_{aPTT} values (39.3%). Although a significant association of $r_{\text{anti-FXa}}$ with r_{aPTT} values was observed, this association was modulated by several biological variables for which abnormal values are

frequently reached in VA-ECMO setting. Finally, the maximum, minimum and mean values of both anti-FXa and aPTT failed to predict serious bleeding or thrombotic complications.

The poor concordance rate (50.7%) between anti-FXa and aPTT observed in the anti-FXa target of 0.30–0.70 IU/mL in our study is in line with prior observations, where these rates varied from 35% to 60% [21,22]. However, the single study that investigated this issue in 24 patients under mechanical circulatory support (HeartMate II, Thoratec Corporation, Pleasanton, CA, USA) observed a worse concordance rate (32.1%) in comparison to our results for the anti-FXa therapeutic target of 0.30 to 0.70 IU/mL.

Differences in aPTT reagent/analyser performances could partially explain this result [23], as could the effects of laboratory co-variables on the association between anti-FXa and aPTT shown by our results.

The observed modulation of this association by bilirubin levels was previously reported *in vitro* and in paediatric patients supported by ECMO [14]. We suspected and confirmed the interaction of factor V—which may directly alter aPTT—with the association between anti-FXa and aPTT. The ability of fibrinogen to modulate aPTT [13,23] can explain why this variable could also alter the association between anti-FXa and aPTT. Intriguingly, platelet count also affects the anti-FXa and aPTT relationship while their measurement is performed on centrifuged plasma without taking platelet contribution to clot formation into account. This observation suggests that platelet components with a link to the total platelet count (beyond the usual residual platelet in platelet-poor plasma) may be involved in modulating the anti-FXa and aPTT interaction. In this hypothesis, platelet microparticles (MPs) and platelet fragments can be evoked. Indeed, these platelet MPs have a pro-thrombotic ability and could, therefore, alter the reliability of the measurement of aPTT values. The presence of these MPs has already been established in a paediatric ECMO model [24]. They could be generated following the shear-induced platelet activation mediated by the glycoprotein (GP) Ib α -Von Willebrand factor (VWF) interaction [25,26] or by a direct traumatic effect of high shear stress under VA-ECMO [27,28]. Although the association between platelet count—which was actually found to modulate the anti-FXa/aPTT interaction in our multivariate model—and the effect of MPs is difficult to establish, some data support this hypothesis. The thrombocytopenia observed under ECMO is in part the result of apoptosis induced by high shear stress, yet this same trigger is at the origin of platelet MPs generation [25,29,30].

Of concern is the fact that these biological co-variables varied over time in different directions, adding more complexity in the way anti-FXa and aPTT association is modulated.

As aPTT encompasses the loss of coagulation factors of intrinsic pathway from Factor XII and its activators (prekallikrein and high-molecular-weight kininogen) to fibrinogen, it might be assumed that this variable is more reliable than anti-FXa in predicting bleeding events. We have analysed this hypothesis by studying the association between maximum, minimum and mean values of aPTT and anti-FXa with haemostatic complications but no significant association was observed.

Similar results were observed by Mazzeffi et al. in a retrospective analysis of 132 patients extracted from their institutional records and ELSO database [31]. Conversely, these results contradicted those of Aubron et al. for bleeding outcomes. These authors studied a mixed population of veno-venous and VA-ECMO patients and found a significant association of aPTT value >70 s with bleeding [4]. Concerning thrombotic complications and ECMO, all these studies and our findings clearly converged to confirm the lack of statistical interaction between aPTT and thrombotic complications [4,31]. Only one study in a paediatric ECMO setting reported an association between anti-FXa and ECMO circuit change [11]. In a recent multicentric retrospective study, a mean anti-FXa >0.46 IU/mL was found to be associated with serious bleeding in a mixed population of medical VA-ECMO and VV-ECMO patients. This result triggered our investigation in the specific population of VA-ECMO patients including both post-cardiotomy and medical ECMO [32]. Differences in study population, in statistical approaches, variables and outcome definitions may have played a role in these opposite results.

Our results, therefore, suggest that bleeding complications are the result of a multifactorial process that goes beyond the administration of UFH or anti-FXa or aPTT values. Indeed, surgical insult, anaemia, thrombocytopenia, fibrinogen concentration, or acquired von Willebrand syndrome (almost ubiquitous under ECMO), certainly influence the risk of bleeding [33]. Regarding thrombotic complications, ECMO devices and cannula characteristics, the levels of pro-thrombotic biological variables and haemolysis (which may trigger inflammation and thrombosis) are to be accounted for [34]. To a lesser extent, flow induced platelets activation and aggregation should also be considered [6,35]. Furthermore, pre-analytical and biological confounders described above may result in falsely increased or reduced values and may blur the hypothetical contribution of anti-FXa and aPTT to this prediction.

Based on our results and considering the evidence available in the literature, we propose the use of anti-FXa rather than aPTT, bearing in mind that anti-FXa remains the least used test for monitoring UFH under ECMO worldwide [15]. First, we observed the highest rate of sub-therapeutic aPTT levels (39.3%) in the corresponding anti-FXa therapeutic range most used worldwide [15] during ECMO support, suggesting that the use of aPTT for UFH monitoring may result in increased UFH infusion in almost 40% of patients. Second, compared to anti-FXa, aPTT is more sensitive to pre-analytical considerations such as under-filled blood sample tubes, diurnal fluctuations, acute phase reactants, intrinsic or common pathway factors levels and antiphospholipid antibodies [13,23,36]. Additionally, variations in reagents and laboratory specificities are more pronounced with aPTT [22]. Indeed, unlike PT which is normalised between centres using the International Normalised Ratio, each laboratory must set up a specific heparin therapeutic range, resulting in serious discordance between centres [23,37].

Our study has several strengths and suffers from several limitations. In this large number of paired samples analysed, we used a comprehensive statistical approach that took into account repeated measurements and multiple comparisons, the time effect and the time-dependent nature of the studied variables. Similarly, the outcome prediction models included competing events that may increase studied outcomes regardless of the effect of the studied variables.

The retrospective setting of our study is likely to favour several biases among which misclassifications of bleeding and thrombotic events are the more prominent, particularly in sedated patients. The single-centre design, which may represent a limit for external validity for outcome prediction, can be considered as a strength for the analyses of anti-FXa and aPTT relationship. Assays' and reagents' sensitivity to heparin use for aPTT and to a lesser extent for anti-FXa may be different among centres. In addition, even with a similar assay/regent, inter-laboratory agreement in the monitoring of UFH using aPTT was proven to be a serious source of concern [23,38]. Moreover, pre-analytical processes may vary widely between centres. It should be noted that our anti-FXa test was sensitive to antithrombin deficiency. In the presence of this deficiency and depending on its severity, the anti-FXa measured in our study could misrepresent the actual circulating heparin concentration. In this situation of antithrombin deficiency, our anti-FXa test, nevertheless, reflects a value that really corresponds to the patient's UFH effect on factor X. Therefore, a discrepancy between the anti-FXa value and the dose of UFH administered will indicate the need for possible antithrombin supplementation, as opposed to a test corrected for antithrombin which would be falsely reassuring.

Plasma products transfused mainly due to serious bleeding could alter the interpretation of aPTT and anti-FXa. However, this risk is rather low in our study. Indeed, for the analysis of concordance and association between anti-FXa and aPTT, we only used the first measurements, performed in the morning, at a distance from any transfusion. For serious bleeding and thrombotic complications prediction analyses, the variables studied were the daily maximum, minimum and means, which may reduce the potential confounding effect of such transfusions. In addition, a control of the coagulation parameters is systemat-

ically carried out in our protocol in the hour following the end of such transfusion when they occurred.

We did not include veno-venous (VV)-ECMO patient in this study on purpose. VV-ECMO patients differ from VA-ECMO primarily by the type of insult (acute respiratory distress syndrome vs. refractory cardiogenic shock) and by various support characteristics that modulate thrombotic and bleeding complication profiles. Thrombotic complications and bleeding events occur less often in the VV-ECMO patients. Indeed, the pressure regimen in the arterial cannulas may increase the risk of bleeding. Acute limb ischaemia mainly burdens VA-ECMO patients cannulated through peripheral arteries but rarely VV-ECMO patients. Similarly, acute exposure to P2Y12 inhibitors is observed exclusively in ischemic cardiogenic shock patients. Furthermore, acute liver failure observed in cardiogenic shock that impact factor V concentration is more limited in ARDS patients under VV-ECMO support [39].

We herein provide important information regarding the limitations, reliability and relevance of anti-FXa and aPTT assays during ECMO support, both for UFH monitoring and haemostatic complications prediction. This information should be considered in the design of future prospective control trials evaluating these assays in VA-ECMO patients. Furthermore, it is crucial to evaluate alternative haemostasis tests that better consider the current knowledge about ECMO-related coagulopathy, either alone or in association.

To this end, associating platelet function tests that explored primary haemostasis with aPTT and PT may help to refine the description of a patient's coagulation state [40]. Platelets play a pivotal role in haemostasis and are key contributors to VA-ECMO related coagulopathy. Two VA-ECMO main characteristics influence platelets homeostasis during VA-ECMO support: the VA-ECMO artificial surface which promotes platelet adhesion to their surface and of most importance, the VA-ECMO induced high shear stress. This high shear stress leads to conformational changes in the VWF, allowing its proteolytic cleavage by the metalloprotease ADAMTS-13 into smaller but less efficient fragments, and promote GPIb α -mediated interaction between this protein and platelets. High shear stress has also been shown to cause loss of platelet surface receptors, particularly GPIb α and GPIV shedding and can trigger platelets apoptosis through GPIb α -VWF interaction [25–30]. The resulting platelet functional changes along with the platelets count loss are critical in haemostatic complications observed during VA-ECMO.

The latest generation of viscoelastic tests that explore the entire coagulation cascade, while making it possible to dissociate the effect of UFH from that of the other coagulation determinants, should be further explored in regard to the promising preliminary results available [41]. Finally, thrombin generation tests (unlike aPTT, anti-FXa or PT that only explore the coagulation initiation phase) which study the amplification phase (95% of thrombin generation), giving a more accurate reflection of the real coagulability of patients, could be an alternative [42].

5. Conclusions

Anti-FXa and aPTT were discordant and are thus not interchangeable for UFH monitoring in VA-ECMO setting. The association between both assays was strongly modulated by several biological cofactors which pathological values frequently observed under ECMO. Therefore, these variables should be taken into account in the interpretation of both tests.

Since immediate alternatives to anti-FXa and aPTT are not routinely available, and we would suggest the use of anti-FXa as the primary UFH monitoring assay rather than aPTT, the use of the latter may lead to administration of inappropriate doses of UFH. Furthermore, anti-FXa and aPTT failed to predict serious bleeding or thrombotic complications. These results imply that these haemostatic complications have multiple causes beyond anticoagulation alone, thus highlighting the complexity of VA-ECMO coagulopathy.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/jcm10102158/s1>, Figure S1: Study flowchart. Figure S2: Time courses of reference variables that modulate anti-FXa and aPTT association. Figure S3: Cumulative incidence of serious bleeding and thrombotic complications during ECMO support. Figure S4: Association of anti-FXa and aPTT with serious bleeding during VA-ECMO support. Table S1: Description of technical characteristics of the studied biological variables.

Author Contributions: Conceptualisation, M.D.M., A.V., E.R.; methodology, M.D.M., A.D. (Alain Duhamel), J.L.; software, A.L., V.F.; validation, A.L., M.D.M., G.G.; formal analysis, J.L.; writing—original draft preparation, M.D.M., J.S., A.D. (Annabelle Dupont); writing—review and editing, O.A.-A., A.L., N.R., V.L., C.B., V.F., G.L., G.S., E.J., S.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Institutional and departmental sources.

Institutional Review Board Statement: Approval was obtained from the Ethical Committee of French Society of Anaesthesia and Intensive Care Medicine (CERAR, IRB 00010254-2020-195), Paris, France (Chairperson Prof J.E. Bazin) on 11 April 2020. All datasets were declared to French authorities in compliance with national laws (CNIL N° DEC2015-14).

Informed Consent Statement: Patient consent was waived due to the retrospective setting.

Data Availability Statement: The anonymised datasets analysed during the current study are available from the corresponding author on a reasonable request and in compliance with French laws.

Acknowledgments: We are grateful to all the contributors to the Lille Refractory Cardiogenic Shock and Circulatory Assist Device Study Group, cardioperfusionists and nurses of the department of cardiovascular surgery intensive care department for their involvement in data collections.

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

References

1. Cavayas, Y.A.; Del Sorbo, L.; Fan, E. Intracranial Hemorrhage in Adults on ECMO. *Perfusion* **2018**, *33*, 42–50. [CrossRef] [PubMed]
2. Guimbretière, G.; Anselmi, A.; Roisne, A.; Lelong, B.; Corbineau, H.; Langanay, T.; Flécher, E.; Verhoye, J.-P. Prognostic Impact of Blood Product Transfusion in VA and VV ECMO. *Perfusion* **2019**, *34*, 246–253. [CrossRef] [PubMed]
3. Mazzeffi, M.A.; Tanaka, K.; Roberts, A.; Rector, R.; Menaker, J.; Kon, Z.; Deatrick, K.B.; Kaczorowski, D.; Griffith, B.; Herr, D. Bleeding, Thrombosis, and Transfusion with Two Heparin Anticoagulation Protocols in Venous Arterial ECMO Patients. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* **2019**, *33*, 1216–1220. [CrossRef]
4. Aubron, C.; DePuydt, J.; Belon, F.; Bailey, M.; Schmidt, M.; Sheldrake, J.; Murphy, D.; Scheinkestel, C.; Cooper, D.J.; Capellier, G.; et al. Predictive Factors of Bleeding Events in Adults Undergoing Extracorporeal Membrane Oxygenation. *Ann. Intensive Care* **2016**, *6*, 1–10. [CrossRef]
5. Larsson, M.; Rayzman, V.; Nolte, M.W.; Nickel, K.F.; Björkqvist, J.; Jämsä, A.; Hardy, M.P.; Fries, M.; Schmidbauer, S.; Hedenqvist, P.; et al. A Factor XIIa Inhibitory Antibody Provides Thromboprotection in Extracorporeal Circulation without Increasing Bleeding Risk. *Sci. Transl. Med.* **2014**, *6*, 222ra17. [CrossRef]
6. Fuchs, G.; Berg, N.; Broman, L.M.; Prah Wittberg, L. Flow-Induced Platelet Activation in Components of the Extracorporeal Membrane Oxygenation. *Circuit. Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–9. [CrossRef]
7. ELSO Guidelines General All ECLS Version 1.4 Pdf. Available online: <https://www.else.org/Resources/Guidelines.aspx> (accessed on 20 February 2021).
8. Thomas, J.; Kostousov, V.; Teruya, J. Bleeding and Thrombotic Complications in the Use of Extracorporeal Membrane Oxygenation. *Semin. Thromb. Hemost.* **2018**, *44*, 20–29. [CrossRef] [PubMed]
9. Lequier, L.; Annich, G.; Al-Ibrahim, O. ELSO Anticoagulation Guideline. 2014. Extracorporeal Life Support Organ. ELSO 2016, 1–17. Available online: <https://www.else.org/Resources/Guidelines.aspx> (accessed on 20 February 2021).
10. Lorusso, R.; Whitman, G.; Milojevic, M.; Raffa, G.; McMullan, D.M.; Boeken, U.; Haft, J.; Bermudez, C.A.; Shah, A.S.; D'Alessandro, D.A. 2020 EACTS/ELSO/STS/AATS Expert Consensus on Post-Cardiotomy Extracorporeal Life Support in Adult Patients. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* **2021**, *59*, 12–53. [CrossRef]
11. Irby, K.; Swearingen, C.; Byrnes, J.; Bryant, J.; Prodhan, P.; Fiser, R. Unfractionated Heparin Activity Measured by Anti-Factor Xa Levels Is Associated with the Need for Extracorporeal Membrane Oxygenation Circuit/Membrane Oxygenator Change: A Retrospective Pediatric Study. *Pediatr. Crit. Care Med.* **2014**, *15*, e175–e182. [CrossRef]
12. Delmas, C.; Jacquemin, A.; Vardon-Bouines, F.; Georges, B.; Guerrero, F.; Hernandez, N.; Marcheix, B.; Seguin, T.; Minville, V.; Conil, J.-M.; et al. Anticoagulation Monitoring under ECMO Support: A Comparative Study between the Activated Coagulation Time and the Anti-Xa Activity Assay. *J. Intensive Care Med.* **2020**, *35*, 679–686. [CrossRef]

13. Vandiver, J.W.; Vondracek, T.G. Antifactor Xa Levels versus Activated Partial Thromboplastin Time for Monitoring Unfractionated Heparin. *Pharmacotherapy* **2012**, *32*, 546–558. [[CrossRef](#)]
14. Kostousov, V.; Nguyen, K.; Hundalani, S.G.; Teruya, J. The Influence of Free Hemoglobin and Bilirubin on Heparin Monitoring by Activated Partial Thromboplastin Time and Anti-Xa Assay. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2014**, *138*, 1503–1506. [[CrossRef](#)]
15. Protti, A.; Iapichino, G.E.; Di Nardo, M.; Panigada, M.; Gattinoni, L. Anticoagulation Management and Antithrombin Supplementation Practice during Venovenous Extracorporeal Membrane Oxygenation: A Worldwide Survey. *Anesthesiology* **2020**, *132*, 562–570. [[CrossRef](#)]
16. Krulder, J.W.; de Boer, A.; van den Besselaar, A.M.; Cohen, A.F.; Schoemaker, H.C.; Briët, E.; Meinders, A.E. Diurnal Rhythm in Anticoagulant Effect of Heparin during a Low Dose Constant Rate Infusion. A Study in Healthy Volunteers. *Thromb. Haemost.* **1992**, *68*, 30–32. [[PubMed](#)]
17. Prentice, R.L.; Kalbfleisch, J.D.; Peterson, A.V.; Flournoy, N.; Farewell, V.T.; Breslow, N.E. The Analysis of Failure Times in the Presence of Competing Risks. *Biometrics* **1978**, *34*, 541–554. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Garcia, D.A.; Baglin, T.P.; Weitz, J.I.; Samama, M.M. Parenteral Anticoagulants. *Chest* **2012**, *141*, e24S–e43S. [[CrossRef](#)]
19. Marlar, R.A. *Clinical and Laboratory Standards Institute One-Stage Prothrombin Time (PT) Test and Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) Test: Approved Guideline*; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2008; ISBN 9781562386726.
20. Therneau, T.M.; Grambsch, P.M. Multiple Events per Subject. In *Modeling Survival Data: Extending the Cox Model*; Therneau, T.M., Grambsch, P.M., Eds.; Statistics for Biology and Health; Springer: New York, NY, USA, 2000; pp. 169–229. ISBN 9781475732948.
21. McLaughlin, K.; Rimsans, J.; Sylvester, K.W.; Fanikos, J.; Dorfman, D.M.; Senna, P.; Connors, J.M.; Goldhaber, S.Z. Evaluation of Antifactor-Xa Heparin Assay and Activated Partial Thromboplastin Time Values in Patients on Therapeutic Continuous Infusion Unfractionated Heparin Therapy. *Clin. Appl. Thromb.* **2019**, *25*, 1076029619876030. [[CrossRef](#)]
22. Adaya, S.; Uriel, N.; Yarmohammadi, H.; Holley, C.T.; Feng, A.; Roy, S.S.; Reding, M.T.; John, R.; Eckman, P.; Zantek, N.D. Anti-Factor Xa and Activated Partial Thromboplastin Time Measurements for Heparin Monitoring in Mechanical Circulatory Support. *JACC Heart Fail.* **2015**, *3*, 314–322. [[CrossRef](#)]
23. Marlar, R.A.; Clement, B.; Gausman, J. Activated Partial Thromboplastin Time Monitoring of Unfractionated Heparin Therapy: Issues and Recommendations. *Semin. Thromb. Hemost.* **2017**, *43*, 253–260. [[CrossRef](#)]
24. Meyer, A.D.; Gelfond, J.A.L.; Wiles, A.A.; Freishtat, R.J.; Rais-Bahrami, K. Platelet-Derived Microparticles Generated by Neonatal Extracorporeal Membrane Oxygenation Systems. *ASAIO J. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* **1992**, *61*, 37–42. [[CrossRef](#)]
25. Mazzeffi, M.; Hasan, S.; Abuelkasem, E.; Meyer, M.; Deatrick, K.; Taylor, B.; Kon, Z.; Herr, D.; Tanaka, K. Von Willebrand Factor-GP1b α Interactions in Venovenous Extracorporeal Membrane Oxygenation Patients. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* **2019**, *33*, 2125–2132. [[CrossRef](#)]
26. Wang, S.; Griffith, B.P.; Wu, Z.J. Device-Induced Hemostatic Disorders in Mechanically Assisted Circulation. *Clin. Appl. Thromb. Off. J. Int. Acad. Clin. Appl. Thromb.* **2021**, *27*, 1076029620982374. [[CrossRef](#)]
27. Leytin, V.; Allen, D.J.; Mykhaylov, S.; Mis, L.; Lyubimov, E.V.; Garvey, B.; Freedman, J. Pathologic High Shear Stress Induces Apoptosis Events in Human Platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *320*, 303–310. [[CrossRef](#)]
28. Ilkan, Z.; Wright, J.R.; Goodall, A.H.; Gibbins, J.M.; Jones, C.I.; Mahaut-Smith, M.P. Evidence for Shear-Mediated Ca²⁺ Entry through Mechanosensitive Cation Channels in Human Platelets and a Megakaryocytic Cell Line. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 9204–9217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Li, S.; Wang, Z.; Liao, Y.; Zhang, W.; Shi, Q.; Yan, R.; Ruan, C.; Dai, K. The Glycoprotein Ibalpha-von Willebrand Factor Interaction Induces Platelet Apoptosis. *J. Thromb. Haemost. JTH* **2010**, *8*, 341–350. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Balle, C.M.; Jeppesen, A.N.; Christensen, S.; Hvas, A.-M. Platelet Function During Extracorporeal Membrane Oxygenation in Adult Patients. *Front. Cardiovasc. Med.* **2019**, *6*, 114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Mazzeffi, M.; Greenwood, J.; Tanaka, K.; Menaker, J.; Rector, R.; Herr, D.; Kon, Z.; Lee, J.; Griffith, B.; Rajagopal, K.; et al. Bleeding, Transfusion, and Mortality on Extracorporeal Life Support: ECLS Working Group on Thrombosis and Hemostasis. *Ann. Thorac. Surg.* **2016**, *101*, 682–689. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Descamps, R.; Moussa, M.D.; Besnier, E.; Fischer, M.-O.; Preau, S.; Tamion, F.; Daubin, C.; Cousin, N.; Vincentelli, A.; Goutay, J.; et al. Anti-Xa Activity and Hemorrhagic Events under Extracorporeal Membrane Oxygenation (ECMO): A Multicenter Cohort Study. *Crit. Care Lond. Engl.* **2021**, *25*, 127. [[CrossRef](#)]
33. Tauber, H.; Ott, H.; Streif, W.; Weigel, G.; Loacker, L.; Fritz, J.; Heinz, A.; Velik-Salchner, C. Extracorporeal Membrane Oxygenation Induces Short-Term Loss of High-Molecular-Weight von Willebrand Factor Multimers. *Anesth. Analg.* **2015**, *120*, 730–736. [[CrossRef](#)]
34. Frimat, M.; Boudhabhay, I.; Roumenina, L.T. Hemolysis Derived Products Toxicity and Endothelium: Model of the Second Hit. *Toxins* **2019**, *11*, 660. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Shankaran, H.; Alexandridis, P.; Neelamegham, S. Aspects of Hydrodynamic Shear Regulating Shear-Induced Platelet Activation and Self-Association of von Willebrand Factor in Suspension. *Blood* **2003**, *101*, 2637–2645. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. McGlasson, D.L.; Kaczor, D.A.; Krasuski, R.A.; Campbell, C.L.; Kostur, M.R.; Adinaro, J.T. Effects of Pre-Analytical Variables on the Anti-Activated Factor X Chromogenic Assay When Monitoring Unfractionated Heparin and Low Molecular Weight Heparin Anticoagulation. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **2005**, *16*, 173–176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

37. Favaloro, E.J.; Kershaw, G.; Mohammed, S.; Lippi, G. How to Optimize Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) Testing: Solutions to Establishing and Verifying Normal Reference Intervals and Assessing APTT Reagents for Sensitivity to Heparin, Lupus Anticoagulant, and Clotting Factors. *Semin. Thromb. Hemost.* **2019**, *45*, 22–35. [[CrossRef](#)]
38. Cuker, A.; Ptashkin, B.; Konkle, B.A.; Pipe, S.W.; Whinna, H.C.; Zheng, X.L.; Cines, D.B.; Pollak, E.S. Interlaboratory Agreement in the Monitoring of Unfractionated Heparin Using the Anti-Factor Xa-Correlated Activated Partial Thromboplastin Time. *J. Thromb. Haemost.* **2009**, *7*, 80–86. [[CrossRef](#)]
39. Combes, A.; Hajage, D.; Capellier, G.; Demoule, A.; Lavoué, S.; Guervilly, C.; Da Silva, D.; Zafrani, L.; Tirot, P.; Veber, B.; et al. Extracorporeal Membrane Oxygenation for Severe Acute Respiratory Distress Syndrome. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *378*, 1965–1975. [[CrossRef](#)]
40. Dovlatova, N.; Heptinstall, S. Platelet Aggregation Measured by Single-Platelet Counting and Using PFA-100 Devices. *Platelets* **2018**, *29*, 656–661. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Panigada, M.; Iapichino, G.E.; Brioni, M.; Panarello, G.; Protti, A.; Grasselli, G.; Occhipinti, G.; Novembrino, C.; Consonni, D.; Arcadipane, A.; et al. Thromboelastography-Based Anticoagulation Management during Extracorporeal Membrane Oxygenation: A Safety and Feasibility Pilot Study. *Ann. Intensive Care* **2018**, *8*, 1–9. [[CrossRef](#)]
42. Mazzeffi, M.; Strauss, E.; Meyer, M.; Hasan, S.; Judd, M.; Abuelkasem, E.; Chow, J.; Nandwani, V.; McCarthy, P.; Tanaka, K. Coagulation Factor Levels and Underlying Thrombin Generation Patterns in Adult Extracorporeal Membrane Oxygenation Patients. *Anesth. Analg.* **2019**, *129*, 659–666. [[CrossRef](#)]

Résumé général

I. Résumé en Français

Déterminants cliniques, physiopathologiques et pronostics associés aux complications liées à l'hémostase au cours des assistances circulatoires de courte durée à pompe centrifuge

La problématique de cette thèse est la caractérisation des complications liées à l'hémostase chez le patient assisté par ECMO-VA périphérique afin d'en améliorer la prévention et de rationaliser les approches antithrombotiques en usage.

Dans une première étude, nous avons décrit qualitativement et quantitativement la composition des thrombi formés sur les circuits d'ECMO-VA. Nous avons observé que ces thrombi sont majoritairement composés de VWF, de fibrine et dans une moindre proportion de plaquettes et d'érythrocytes. Notre approche quantitative a également permis de mettre en évidence la présence de NETs en l'absence de toute pathologie septique active, confirmant la possibilité d'une NETose aseptique sous ECMO-VA. Par une analyse en cluster hiérarchique, nous avons identifié 2 types de thrombi pouvant relever chacun d'un mécanisme de formation différent. Dans cette étude, la localisation des thrombi sur le circuit d'ECMO-VA n'impactait pas leurs compositions, ce qui souligne l'hétérogénéité des thrombi formés sous ECMO-VA et la multiplicité des mécanismes à l'origine de la thrombinofomation dans ce contexte.

Dans un second travail, nous avons comparé la performance des revêtements de surfaces des circuits d'ECMO-VA à réduire la thrombinofomation et ses conséquences cliniques. Deux des revêtements les plus utilisés en routine étaient comparés : celle à base de phosphorylcholine et à base d'héparine. Nous avons observé un taux de complications thrombotiques plus

conséquent dans le groupe phosphorylcholine sans surrisque hémorragique ou de mortalité dans les deux groupes. Par ailleurs, comparativement aux thrombi issus des jonctions de circuits traités par revêtement de phosphorylcholine, ceux provenant de circuits traités par polysaccharide-albumine étaient plus pauvres en VWF. Notre travail suggère que l'intensité de l'anticoagulation devrait être modulée en fonction du type de revêtement de surface du circuit d'ECMO.

Notre troisième étude avait pour but d'identifier les saignements les plus graves justifiant d'une prise en charge clinique agressive et d'un investissement plus conséquent en recherche. À cette fin, nous avons comparé l'association entre 3 classifications de saignement avec la mortalité à 28 jours. La définition ELSO déjà en usage et les classes de la classification BARC \geq type 2 étaient associées à la mortalité et retenues donc comme définitions de l'hémorragie majeure. Les facteurs biologiques prédictifs de l'hémorragie grave d'après la définition de l'ELSO étaient la baisse du fibrinogène, du compte plaquettaire et de l'hémoglobine à la canulation. L'indice de masse corporelle et l'étiologie postcardiotomie étaient également prédictifs de la survenue de cette complication.

Dans un travail additionnel portant sur la thématique de la thèse, nous avons étudié deux des tests les plus utilisés pour la surveillance de l'héparinothérapie systémique sous ECMO, le TCA et l'activité Anti-Xa afin d'identifier le plus pertinent. Pour ce faire, dans un premier objectif nous avons étudié la relation entre ces deux tests puis avons analysé dans un second objectif l'impact de facteurs biologiques d'influences sur cette relation. Ensuite, nous avons déterminé leurs associations avec les complications thrombotiques et hémorragiques. Bien qu'étant linéairement associé, le taux de discordance entre leurs mesures était de 39 % pour une fenêtre référence d'Anti-Xa de 0,3 — 0,7 UI/mL. Ni le TCA et ni l'Anti-Xa n'étaient associées aux complications thrombotiques ou hémorragiques.

Dans leurs ensembles, nos résultats soulignent l'hétérogénéité des thrombi issues des ECMO-VA périphériques, l'implication de facteurs multiples dans la survenue des complications thrombotiques et hémorragiques non prédictible par les simples tests de routine. Ils soulignent également la nécessité d'une stratification du risque thrombotique ou hémorragique et le choix des stratégies thérapeutiques à l'échelle individuelle en intégrant les caractéristiques du patient et celles de l'ECMO.

Mots clés : ECMO veino-artérielle périphérique, hémorragie majeure, complication thrombotique, histologie, revêtement de surface, monitoring anticoagulation, mortalité.

II. Abstract

Clinical, pathophysiological, and prognostic factors associated with hemostasis-related complications during centrifugal pump-based short-term circulatory support

The purpose of this dissertation is to characterize hemostasis-related complications in patients supported by peripheral VA-ECMO to improve their prevention and to optimize the antithrombotic therapeutic approaches in use.

In a first study, we qualitatively and quantitatively described the composition of thrombi collected from the VA-ECMO circuits. We observed that these thrombi are mainly made of VWF, fibrin and in a lesser proportion of platelets and RBCs. Our quantitative approach also allowed us to demonstrate the presence of NETs while there was no active septic, confirming the possibility of aseptic NETosis under VA-ECMO. By hierarchical cluster analysis, we identified 2 types of thrombi, each of which may be related to a different mechanism of formation. In this study, the location of thrombi on the VA-ECMO circuit did not impact their compositions, highlighting the heterogeneity of thrombi formed within VA-ECMO and the multifactorial mechanisms that support thrombosis in this setting.

In a second study, we compared the performance of surface coatings on VA-ECMO circuits to reduce thrombinofomation and its clinical consequences. Two of the most used coatings in daily practice were compared: the phosphorylcholin-based coating and the polysaccharide-albumin-based coating. We observed a higher rate of thrombotic complications in the phosphorylcholin group without any excess bleeding events or mortality in either group. In addition, compared with thrombi from phosphorylcholin-coated circuit junctions, those from polysaccharide-albumin-coated circuits were poorer in VWF. Our work suggests that the level of anticoagulation should be modulated according to the type of coating of the ECMO circuit.

The aim of our third study was to identify the most relevant bleeding events that may guide clinical decision-making for more aggressive clinical management and a greater investment in research. To this end, we compared the association between 3 bleeding classifications with 28-day mortality. The ELSO definition already in use and the BARC classification classes \geq type 2 were associated with 28-day mortality and thus retained as definitions of major bleeding. Laboratory parameters that are predictors major bleeding according to the ELSO definition were decreased fibrinogen, platelet count, and hemoglobin at cannulations. Body mass index and postcardiotomy etiology were also predictive of ELSO major bleeding.

In an additional work related to the topic of the thesis, we studied two of the most used laboratory tests for the monitoring of systemic heparin during VA-ECMO, the APTT and the Anti-Xa activity, to identify the most relevant. First, we studied the relationship between these two tests and then analyzed in a second objective the impact of biological influencing factors on this relationship. Next, we determined their associations with thrombotic and hemorrhagic complications. Although linearly associated, the rate of discordance between their measurements was 39 % for an Anti-Xa reference range of 0.3 - 0.7 IU/mL. Neither APTT nor Anti-Xa was associated with thrombotic or bleeding complications.

Taken together, our results highlight the heterogeneity of thrombi from peripheral VA-ECMO, the involvement of numerous causal factors that underline thrombotic and hemorrhagic complications, both not predictable by routine tests. Finally, our work underscored the need for new approaches in thrombotic or hemorrhagic complications management with targets set at an individual level considering both patient and ECMO circuit characteristics.

Key words: Peripheral veno-arterial ECMO, major bleeding, thrombotic complications, histology, surface coating, anticoagulation monitoring, mortality