



UNIVERSITE LILLE 2 DROIT ET SANTE  
**FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG**

Année : 2017

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT  
DE DOCTEUR EN MEDECINE

**Intérêt du test de génération simultanée de thrombine et de plasmine  
pour l'évaluation du traitement par acide tranexamique au cours des  
césariennes hémorragiques : étude pilote**

Présentée et soutenue publiquement le 13 mars 2017 à 18h00  
Au Pôle Recherche  
**Par Imen Saidi**

---

**JURY**

**Présidente :**

**Madame le Professeur Sophie Susen**

**Assesseurs :**

**Madame le Professeur Annabelle Dupont**

**Madame le Docteur Anne-Sophie Ducloy-Bouthors**

**Monsieur le Docteur Benjamin Hennart**

**Directrice de Thèse :**

**Madame le Docteur Emmanuelle Jeanpierre**

---

# **Avertissement**

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



## Liste des abréviations

ATX	Acide tranexamique
AUC	<i>Area Under the Curve</i>
CGR	Concentré de Globules Rouges
CIVD	Coagulation intravasculaire disséminée
CNGOF	Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français
CV	Coefficient de variation
EXADELI	EXAcyl® dans le traitement de l'hémorragie de la DELivrance
FC	Fréquence Cardiaque
Hb	Hémoglobine
HELLP	<i>Hemolysis Elevated Liver enzymes Low Platelet (Syndrome)</i>
HPP	Hémorragie du Post-partum
LBAH	Ligature Bilatérale des Artères Hypogastriques
LBAU	Ligature Bilatérale des Artères Utérines
NFS	Numération-Formule Sanguine
PAI	<i>Plasminogen Activator Inhibitor</i>
PAP	Plasmine-antiplasmine
PFC	Plasma Frais Congelé
RAI	Recherche d'Agglutinines Irrégulières
ROTEM	<i>Rotational Thromboelastometry</i>
RTE	Réception Tri Enregistrement
TA	Tension Artérielle
TAFI	<i>Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor</i>
TAL	Transport Automatisé Léger
TCA	Temps de Céphaline Activée
TEG	<i>Thromboelastography</i>
TGTP	Test de Génération simultanée de Thrombine et de Plasmine
t-PA	<i>Tissue Plasminogen Activator</i>
TQ	Temps de Quick
TRACES	acide TRAnexamique dans le traitement des CESariennes hémorragiques
VWF	Facteur de von Willebrand

# TABLE DES MATIERES

<b>Résumé</b> .....	<b>1</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>2</b>
I. Hémorragie du post-partum .....	2
A. Définition .....	2
B. Epidémiologie.....	2
C. Principales étiologies.....	3
D. Prise en charge .....	3
1. La prévention de l'HPP lors de la délivrance .....	3
2. La prise en charge clinique en cas d'HPP .....	4
II. Hémostase : particularités de la grossesse et du péri-partum et suivi biologique.....	5
A. Modifications physiologiques.....	5
B. Suivi biologique .....	6
III. Acide tranexamique .....	7
A. Intérêt d'un agent antifibrinolytique et indications.....	7
B. Mode d'action.....	7
C. Pharmacocinétique.....	8
D. Effets indésirables et contre-indications .....	9
E. Inconvénients .....	10
IV. Test de génération de Thrombine/Plasmine.....	10
A. Intérêt .....	10
B. Principe .....	10
C. Applications.....	11
D. Objectif de l'étude.....	13
<b>Matériels et méthodes</b> .....	<b>14</b>
I. Population et temps de l'étude.....	14
A. Critères d'inclusion .....	14
B. Critères de non-inclusion.....	14
C. Période d'inclusion .....	14
II. Description de l'étude .....	14
III. Information et recueil du consentement.....	17
IV. Recueil des données cliniques .....	17
V. Préparation des échantillons destinés au laboratoire d'Hémostase.....	18
VI. Test de génération simultanée de thrombine et de plasmine (TGTP) .....	19
A. Automate .....	19
B. Réactifs .....	19
C. Préparation des pools témoin.....	21
D. Groupe témoin de femmes non enceintes.....	22
E. Principe du test sur échantillons de plasma .....	22
F. Paramètres du test.....	22
G. Gamme d'acide tranexamique <i>in vitro</i> .....	24
VII. Complexes plasmine/antiplasme (PAP).....	25
VIII. Dosages d'acide tranexamique .....	26
IX. Analyse statistique.....	27
<b>Résultats</b> .....	<b>28</b>
I. Test de Génération simultanée de Thrombine et de Plasmine (TGTP) : Répétabilité et Reproductibilité.....	28

II.	Gamme d'acide tranexamique <i>in vitro</i> .....	29
III.	Protocole TRACES pilote.....	29
A.	Description générale de la population d'étude .....	29
B.	Comparaison des paramètres d'hémostase entre les différents groupes au cours du temps .....	31
C.	Exemples de profil de génération de thrombine et de plasmine selon le groupe.....	34
1.	Groupe NH .....	34
2.	Groupe TXA0 .....	34
3.	Groupe TXA0.5 .....	35
4.	Groupe TXA1 .....	36
5.	Groupe TXA2 .....	36
D.	Comparaison des paramètres TGTP groupe NE versus groupe NH .....	38
E.	Différences entre les groupes NH et H à T0.....	39
F.	Comparaison des paramètres du TGTP à différents temps entre les groupes NH, H non traité et H traité.....	41
G.	Corrélation entre paramètres du TGTP et D-dimères.....	44
a)	Tout groupe confondu.....	44
b)	Dans chaque groupe .....	45
H.	Corrélation entre paramètres de génération de plasmine et complexes PAP .....	47
I.	Corrélation entre complexes PAP et D-dimères .....	47
a)	Tout groupe confondu.....	47
b)	Dans chaque groupe .....	48
J.	Corrélation entre génération de plasmine et concentration d'ATX (groupe H traité).....	49
	<b>Discussion .....</b>	<b>51</b>
	<b>Conclusion.....</b>	<b>58</b>
	<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>59</b>
	<b>Annexes .....</b>	<b>62</b>

## RESUME

**Contexte** : L'hémorragie du post-partum (HPP) est la première cause de morbi-mortalité maternelle. L'administration à forte dose d'acide tranexamique (ATX) est efficace pour réduire le volume d'hémorragie dans l'HPP survenant après accouchement par voie basse. La dose minimale efficace d'ATX, nécessaire pour réduire les pertes sanguines au cours des césariennes hémorragiques, sera déterminée grâce à l'étude TRACES. L'objectif de notre travail (étude TRACES pilote) est de valider la faisabilité de cette étude et d'évaluer l'intérêt du test de génération simultanée de thrombine et de plasmine (TGTP) pour l'évaluation du statut hémostatique de ces patientes et le suivi du traitement par ATX.

**Méthode** : 25 patientes ayant subi une césarienne ont été incluses et réparties entre un groupe témoin non hémorragique NH (<800 mL) (n=10) et un groupe hémorragique H (>800 mL) (n=15). Celui-ci était divisé en H non traité (n=4) et H traité (0.5, 1 ou 2 g d'ATX IV) (n=11). L'ATX était administré juste après le T0 (temps de l'inclusion). Une surveillance cinétique de la biologie a été effectuée (D-dimères, TGTP, dosage d'ATX ...) chez ces patientes. Le TGTP a également été réalisé sur un groupe de femmes non enceintes (NE). Une gamme d'ATX *in vitro* a été testée sur un pool témoin.

**Résultats** : Les D-dimères sont plus élevés dans le groupe H traité par rapport au groupe NH à T0 (3600 vs 1500 ng/mL,  $p=0.02$ ). Concernant le TGTP, la capacité de génération de thrombine (reflétée par l'AUC thrombine) est plus élevée dans le groupe NH que dans le groupe NE ( $p=0.02$ ), la capacité de génération de plasmine (reflétée par l'AUC plasmine) est plus faible ( $p=0.002$ ). Dans le groupe H traité, la diminution de l'AUC plasmine reflète l'inhibition de la génération de plasmine par l'ATX. Cependant, l'effet-dose n'est pas aussi remarquable qu'*in vitro*.

**Conclusion** : Cette étude pilote a permis de valider la faisabilité de l'étude TRACES et de montrer l'intérêt du TGTP dans l'évaluation du statut hémostatique des différents groupes de patientes et du suivi du traitement par ATX dans les césariennes hémorragiques.

# INTRODUCTION

## I. Hémorragie du post-partum

### A. Définition

L'hémorragie du post-partum (HPP) est définie comme une perte sanguine provenant du tractus génital  $\geq 500$  mL après l'accouchement, et ce quelle que soit la voie d'accouchement. Elle est dite sévère lorsque le volume de saignement est  $\geq 1000$  mL (accord professionnel). Cette définition consensuelle est toutefois arbitraire car le seuil d'intervention clinique en cas d'hémorragie obstétricale dépend essentiellement du débit de saignement, de la tolérance clinique, du contexte clinique et de la voie d'accouchement. Ainsi, si le débit de saignement est élevé ou si la tolérance clinique est mauvaise, une prise en charge active peut être débutée même si le seuil de 500 mL n'est pas atteint. À l'inverse, dans un contexte d'accouchement par césarienne, compte tenu de la perte sanguine inhérente au geste chirurgical, le seuil d'action peut être plus élevé si la tolérance clinique le permet (accord professionnel) (1). L'HPP primaire ou immédiat survient dans les 24 premières heures après l'accouchement et représente la forme la plus fréquente et la plus à risque de complications. L'HPP secondaire se manifeste dans un délai de 42 jours après la naissance, mais est plus rare (2).

### B. Epidémiologie

L'HPP est la complication la plus fréquente de l'accouchement et représente la première cause de morbi-mortalité maternelle dans le monde (3). En France, le taux de mortalité maternelle a considérablement diminué depuis ces trente dernières années : environ 8 décès pour 100 000 naissances vivantes. L'HPP en est la première cause avec 18% des décès maternels, soit environ 1.4 décès pour 100 000 naissances vivantes (4). Elle constitue également la principale cause de morbidité maternelle sévère aiguë et d'admission en réanimation au cours du post-partum. Elle expose aux risques de complications liées à la réanimation, à la transfusion sanguine massive, à l'infertilité en cas d'hystérectomie d'hémostase et à la récurrence d'HPP en cas de grossesse ultérieure (5).



## C. Principales étiologies

Les trois grandes causes d'HPP sont par ordre de fréquence : l'atonie utérine, la rétention placentaire et les plaies du tractus génital.

L'atonie utérine est définie par un défaut de contractilité de l'utérus après l'accouchement. Elle est responsable d'au moins 50% des HPP (5). Après l'extraction du nouveau-né, l'utérus se contracte pour comprimer les artères restées béantes et tarir le saignement : c'est ce qu'on appelle l'hémostase mécanique. Elle a normalement lieu pendant et après la délivrance. L'importance du saignement dépend de la rapidité de la délivrance et de l'efficacité de la contraction du muscle utérin. En cas d'atonie utérine, l'hémostase mécanique est inefficace et expose au risque de choc hémorragique.

La rétention placentaire est la persistance de la totalité ou d'une partie du placenta dans l'utérus. Elle est en cause dans 10 à 30% des HPP, mais son association ou sa distinction avec l'atonie utérine est parfois difficile (5).

Les plaies de la filière génitale représentent 15 à 20% des HPP. En cas d'accouchement par voie basse, il peut s'agir de plaies périnéales, vaginales ou cervicales, notamment l'épisiotomie. En cas de césarienne, le saignement est lié à l'hystérotomie ou à un décollement vésico-utérin (5).

Plus rarement l'HPP peut être due à une coagulopathie constitutionnelle ou acquise, un hématome rétro-placentaire, une rupture utérine ou une anomalie d'insertion du placenta (5).

## D. Prise en charge

L'HPP peut survenir de manière brutale, imprévisible et massive. Elle nécessite donc une prise en charge optimale. Des recommandations pour la pratique clinique ont été rédigées en 2014 par le Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français (CNGOF) (1). En voici les principaux axes :

### 1. La prévention de l'HPP lors de la délivrance

L'administration préventive d'utérotoniques est recommandée pour stimuler les contractions utérines et donc l'hémostase mécanique. L'ocytocine est le traitement

de choix. La délivrance artificielle doit être réalisée en cas de non-délivrance entre 30 et 60 minutes après l'accouchement et en absence de saignement.

## 2. La prise en charge clinique en cas d'HPP

La conduite à tenir est codifiée et diffère quelque peu selon le mode d'accouchement. L'algorithme de prise en charge de l'HPP au cours de la césarienne, par exemple, est présenté en annexe 1.

Une réanimation adaptée est d'abord mise en place avec la surveillance non invasive des constantes (FC, TA, oxymétrie de pouls), la pose et la sécurisation d'une voie veineuse, la réalisation de prélèvements biologiques si non faits au préalable (RAI, NFS-plaquettes, bilan de coagulation), la correction d'une hypovolémie, l'oxygénothérapie si besoin, la lutte contre l'hypothermie et enfin une anesthésie pour permettre les gestes obstétricaux en toute sécurité.

En parallèle, la cause du saignement doit être recherchée sans délai. En cas d'HPP avant délivrance, une délivrance artificielle doit être effectuée. Dans le cas contraire, une révision utérine doit être faite pour s'assurer de la vacuité utérine et de l'intégrité des parois utérines. Le massage utérin doit systématiquement être associé et poursuivi assez longtemps pour stimuler la rétraction utérine. Celle-ci est également facilitée par l'administration d'ocytocine.

Si l'HPP persiste malgré une prise en charge initiale bien conduite, ou si elle est sévère d'emblée ou mal tolérée, des mesures complémentaires doivent être prises au plus vite. Un traitement utérotonique de seconde intention doit être entrepris en cas d'inefficacité de l'ocytocine après 30 minutes, ou plus tôt, selon la gravité du saignement. L'utilisation de la sulprostone (dérivé synthétique de la prostaglandine E2) est recommandée dans les HPP sévères ou persistantes. Si l'HPP persiste malgré les gestes endo-utérins, un examen sous valves doit être réalisé à la recherche de lésions de la filière génitale. Celles-ci doivent être suturées, le cas échéant. En cas d'échec de la prise en charge par sulprostone, le recours à la radiologie interventionnelle et/ou à la chirurgie s'impose. La radiologie interventionnelle dans l'HPP consiste en l'embolisation sélective des artères utérines ou des troncs antérieurs des artères iliaques internes. Quant à la chirurgie, elle repose sur différents types d'interventions : la ligature bilatérale des artères utérines (LBAU) ou des artères hypogastriques (LBAH), les techniques de compression ou de plicature utérine, et l'hystérectomie d'hémostase en dernier recours. L'état

hémodynamique doit être régulièrement surveillé (FC, TA, oxymétrie de pouls, coloration cutanéomuqueuse, diurèse, volume d'hémorragie), de même que la survenue d'une anémie, d'une thrombopénie et/ou de troubles de coagulation sévères.

La transfusion de culots globulaires (CGR) doit être anticipée et adaptée à la tolérance clinique pour maintenir un taux d'Hb  $\geq 8$  g/dL. Le seuil recommandé de transfusion de concentrés plaquettaires est de 50 G/L. L'administration de concentrés de fibrinogène ou de plasma frais congelé (PFC) est recommandée afin de maintenir un taux de fibrinogène  $\geq 2$  g/L. L'acide tranexamique n'est pas formellement recommandée par le CNGOF, son utilisation est laissée au libre choix des équipes de soins.

## **II. Hémostase : particularités de la grossesse et du péri-partum et suivi biologique**

### **A. Modifications physiologiques**

Des changements physiologiques du système de coagulation surviennent au cours de la grossesse, plus particulièrement au troisième trimestre. Le volume plasmatique augmente, entraînant une anémie de dilution. La numération plaquettaire est diminuée, mais insuffisamment pour avoir un impact clinique. Les taux de la plupart des facteurs procoagulants (VII, VIII, IX, VWF, fibrinogène ...) sont fortement augmentés en fin de grossesse, alors que les inhibiteurs de la coagulation sont diminués (protéine S) ou stables (protéine C et antithrombine). Le système fibrinolytique est également inhibé avec une diminution du taux de t-PA (activateur tissulaire du plasminogène) et une augmentation du PAI-1 (inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 1) et du TAFI (inhibiteur de la fibrinolyse activé par la thrombine). Toutes ces modifications se traduisent par un état d'hypercoagulabilité physiologique qui contribue probablement à diminuer le risque hémorragique au cours du post-partum (6).

Au moment de la délivrance, l'activité fibrinolytique augmente du fait du relargage de t-PA d'origine placentaire et de la chute brutale du PAI-2 (inhibiteur de

l'activateur du plasminogène de type 2, d'origine placentaire). Il survient ainsi une CIVD biologique. Si l'hémorragie est abondante, cette CIVD peut s'aggraver et devenir clinique. Le système fibrinolytique étant fortement activé dans le post-partum immédiat, une fibrinolyse majeure peut survenir. L'hyperfibrinolyse ainsi que l'hémodilution (liée à la grossesse et à la correction de l'hypovolémie) ne font alors qu'aggraver l'hémorragie (7).

## **B. Suivi biologique**

On dispose de peu de tests biologiques permettant d'évaluer le risque d'HPP (8). Cependant, il a été démontré que le taux de fibrinogène est corrélé à l'incidence et à la sévérité de celle-ci : en effet, il a été montré dans une étude réalisée sur 128 patientes, que la diminution du taux de fibrinogène au cours de l'HPP immédiat était la seule variable indépendamment associée au risque d'évolution vers l'HPP sévère ; un taux de fibrinogène  $\leq 2$  g/L avait une valeur prédictive positive de 100% pour la sévérité de l'HPP, alors qu'un taux  $\geq 4$  g/L avait une valeur prédictive négative de 79% (9). C'est pour cette raison qu'il est recommandé d'administrer précocement du PFC ou du concentré de fibrinogène si le taux de fibrinogène est  $\leq 2$  g/L (1). Les D-dimères, produits issus de la dégradation de la fibrine, sont un bon marqueur de suivi de la fibrinolyse. Ils ne représentent toutefois qu'un marqueur indirect et ont une spécificité faible. En effet, ils sont le plus souvent déjà augmentés en fin de grossesse (8,10). En ce qui concerne les marqueurs directs de la fibrinolyse (plasminogène, t-PA, PAI,  $\alpha$ 2-antiplasmine, complexes PAP, TAFI), des dosages antigéniques et/ou fonctionnels sont possibles mais ne sont réalisés que dans certains laboratoires en raison de la difficulté technique, du coût et du manque d'efficacité en situation d'urgence (11).

En raison du contexte d'urgence, d'autres tests ont été développés : il s'agit de la thromboélastographie (TEG) et de la thromboélastométrie rotationnelle (ROTEM). Elles mesurent la viscosité du sang et explorent la coagulation dans sa globalité : de la formation du caillot jusqu'à sa lyse. Plusieurs paramètres sont calculés afin d'apprécier la qualité et la stabilité du caillot formé. Ce test a l'avantage d'être réalisable sur sang total, au lit du patient et avec un rendu de résultat rapide (6).

### III. Acide tranexamique

L'acide tranexamique (ATX) est un dérivé synthétique de la lysine utilisé comme agent antifibrinolytique.

#### A. Intérêt d'un agent antifibrinolytique et indications

Comme vu précédemment, l'utilisation d'un anti-fibrinolytique en contexte d'HPP permettrait de limiter le processus fibrinolytique et le saignement (12,13).

L'ATX peut être utilisé dans les hémorragies mineures chez les patients atteints de maladies hémorragiques (hémophilie, maladie de Willebrand). Cependant, en absence d'études robustes, son intérêt reste à prouver (14).

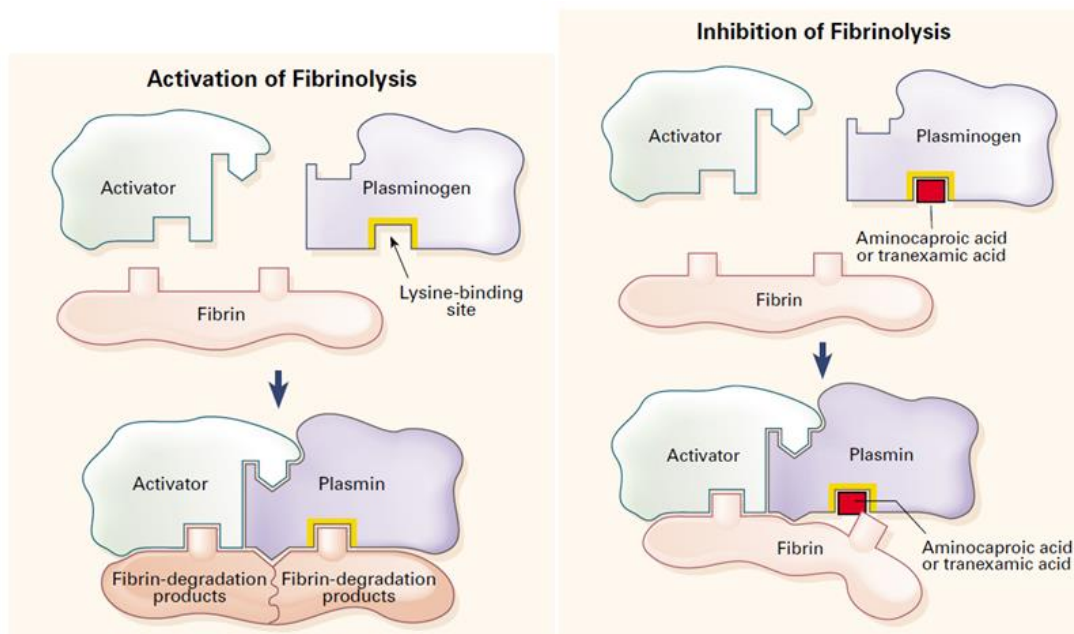
Son efficacité a par contre été démontrée dans d'autres situations pathologiques telles que le trauma sévère et la chirurgie. En effet, il a été montré dans l'étude CRASH-2 (*Clinical Randomisation of an Antifibrinolytic in Significant Haemorrhage*) que l'administration précoce d'ATX chez les traumatisés sévères, présentant une hémorragie avérée ou un risque élevé d'hémorragie, permettait de réduire la mortalité liée à celle-ci (15). Son effet sur la réduction du saignement post-opératoire dans la chirurgie cardiaque a également été prouvé (16,17). D'autres études ont mis en évidence que l'administration d'ATX au cours de la chirurgie prothétique de la hanche et du genou avait pour effet de diminuer le volume des pertes sanguines et le besoin transfusionnel en post-opératoire (18–20).

De plus, c'est une molécule très peu coûteuse : son prix de fabrication revient à moins d'un euro par gramme. Son utilisation est d'autant plus bénéfique qu'elle permet de diminuer le coût relatif à la transfusion homologue (prix des CGR, du transport des CGR, des examens biologiques) et à la transfusion autologue (utilisation et entretien du cell-saver) (21).

#### B. Mode d'action

Le plasminogène se lie aux résidus lysine présents sur la fibrine via son « *lysine binding site* ». Il est ensuite converti en plasmine en présence de t-PA. La plasmine peut alors dégrader la fibrine : c'est le processus de fibrinolyse.

L'ATX empêche la fibrinolyse en se liant de façon réversible au plasminogène, au niveau de son site de liaison à la fibrine. Par conséquent, ni le plasminogène ni la plasmine ne peuvent se fixer sur la fibrine. Le caillot de fibrine n'est donc pas dissout (22). Par conséquent, l'ATX diminue la génération de D-dimères induite par la fibrinolyse (23).



**Figure 1 : Mode d'action de l'acide tranexamique, d'après Mannucci (22)**

Cette molécule présente d'autres propriétés : Elle a une activité anti-inflammatoire en bloquant la liaison entre la plasmine et ses récepteurs présents à la surface des cellules médiatrices de l'inflammation (polynucléaires neutrophiles, monocytes, macrophages, cellules endothéliales et plaquettes) (24). Elle empêche également la liaison de l' $\alpha$ 2-antiplasmine à la plasmine et donc l'inactivation de celle-ci. Elle inhibe l'activation du trypsinogène, la trypsine et à moindre effet la thrombine (23).

## C. Pharmacocinétique

### Absorption

Les concentrations maximales d'ATX sont atteintes en moins de 30 minutes après une administration par voie parentérale et en deux à trois heures par voie entérale. En cas de prise orale, la prise alimentaire n'influe pas sur l'absorption et la biodisponibilité est de 33%.

### Distribution

Au niveau plasmatique, la molécule est quasi-exclusivement liée au plasminogène. L'ATX ne se lie pas à l'albumine. La distribution tissulaire est essentiellement hépatique, rénale et pulmonaire. L'ATX traverse également la barrière hémato-encéphalique, la barrière hémato-placentaire, ainsi que les liquides articulaires, oculaires et la salive.

### Elimination

Sa demi-vie d'élimination est d'environ trois heures. L'ATX est très peu métabolisé par le foie. Il est principalement excrété dans les urines par filtration glomérulaire, sous sa forme native. L'élimination de l'ATX après une administration IV de 10 mg/kg est de l'ordre de 30% après 1h et de 90% après 24h (23). Sa concentration plasmatique augmente en cas d'insuffisance rénale.

## **D. Effets indésirables et contre-indications**

L'ATX est globalement bien toléré. Les effets indésirables les plus fréquents sont mineurs à type de nausées, vomissements, diarrhées, vertiges, réaction allergique cutanée. Les contre-indications sont peu nombreuses : antécédent de convulsions, insuffisance rénale sévère, pathologie thromboembolique.

Des crises convulsives ont été observées, essentiellement chez des patients de chirurgie cardiaque ou à qui de fortes doses d'ATX ont été administrées. C'est pour cette raison que tout antécédent de crise convulsive constitue une contre-indication à l'ATX. Il est également contre-indiqué en cas d'insuffisance rénale sévère. Une diminution des posologies est recommandée en cas d'insuffisance rénale modérée. Il a été rapporté plusieurs cas d'insuffisance rénale aigue sous acide tranexamique, mais son imputabilité est incertaine en raison du contexte clinique exposant lui-même au risque de souffrance rénale (21). La contre-indication de l'ATX dans les pathologies thromboemboliques est controversée. En effet, de multiples études contredisent l'association de l'ATX à un risque prothrombotique et concluent même à un effet protecteur (15,18,20).

## E. Inconvénients

L'ATX semble être d'une grande efficacité dans les situations cliniques à risque d'hyperfibrinolyse. Toutefois, les schémas d'administration et les posologies utilisées sont très variables selon les études menées, pouvant osciller d'1 à 4g en dose de charge (13). Etant donné le risque d'effets indésirables rares mais non négligeables, il paraît nécessaire d'évaluer la dose minimale efficace d'acide tranexamique en fonction du contexte clinique.

## IV. Test de génération de Thrombine/Plasmine

### A. Intérêt

Comme vu précédemment, il existe peu de tests permettant d'explorer la fibrinolyse. Les tests basés sur la viscoélastométrie (TEG et ROTEM) sont d'une grande utilité, mais ils ne quantifient pas de façon précise la fibrinof ormation et la fibrinolyse, et ne montrent pas les interactions entre celles-ci (25).

Il existe un test permettant d'approcher le processus de coagulation tel qu'*in vivo* et d'étudier les interactions entre la fibrinof ormation et la fibrinolyse : c'est le test de génération simultanée de thrombine et de plasmine en un puits (TGTP).

### B. Principe

Les origines de ce test remontent aux années 1950 avec le développement de la thrombinographie. A l'époque, seule la génération de thrombine était mesurée pour étudier la coagulation chez les patients hémophiles (26). Cependant, ce test tombe rapidement en désuétude avec le développement des temps de coagulation tels que le TCA et le TQ. Ceux-ci ont l'avantage d'être rapides et automatisés, mais ils ne mesurent que le temps d'apparition des premières traces de fibrine dans le plasma, elles-mêmes apparaissant juste après les premières traces de thrombine générée (27). L'avantage du test de génération de thrombine est qu'il mesure la totalité de la thrombine générée et se rapproche donc plus du processus de fibrinof ormation tel qu'il a lieu *in vivo*. Toutefois, ce test ne prend pas en compte l'étape de fibrinolyse. En 2010 une équipe développe la technique pour évaluer à la fois le potentiel de génération de thrombine et de plasmine, mais dans deux puits différents (28). Là encore, le test n'étudie pas le phénomène de coagulation dans sa globalité car il ne



permet pas l'interaction entre les acteurs de la fibrinof formation et ceux de la fibrinolyse. Le test de génération simultanée de thrombine et de plasmine dans un même puits réactionnel a été mis au point par l'équipe de Van Geffen (29). Il permet d'étudier la génération de thrombine et de plasmine in vitro en prenant en compte les interactions des deux systèmes.

## C. Applications

Ce test de génération simultanée de thrombine et de plasmine en un puits a été mis en point au CHRU de Lille, dans les mêmes conditions que celles décrites par Van Geffen (29). Dans un premier temps, des essais ont été faits sur des sujets sains afin d'évaluer la répétabilité et la reproductibilité du test (30). Dans un second temps, des valeurs de référence ont été établies (cf. annexe 2) et des patients présentant un déficit constitutionnel en facteur XI ont été testés. Le but était d'étudier les interactions entre coagulation et fibrinolyse chez ces patients présentant des déficits en facteur XI plus ou moins sévères et d'évaluer l'effet du traitement par concentré de facteur XI sur leur capacité de génération de thrombine et de plasmine (31).

Le TGTP a également été évalué en Obstétrique. L'étude EXADELI (EXAcyl® dans le traitement de l'hémorragie de la DELivrance) est une étude prospective, randomisée et multicentrique qui a été menée sur des patientes ayant accouché par voix basse avec une HPP de volume > 800 mL dans les deux heures suivant la délivrance. Les patientes étaient divisées en deux groupes : l'un recevant de l'Exacyl® à la dose de 4 g IV sur une heure puis 1 g/h pendant 6h, et l'autre recevant un placebo. Le contrôle du volume de l'hémorragie, du taux d'hémoglobine et de l'hématocrite étaient évalués à plusieurs temps. Cette étude a démontré que de fortes doses d'Exacyl® permettaient de diminuer les pertes sanguines et donc la morbidité maternelle au cours de l'hémorragie du post-partum (12).

Le test de génération simultanée de thrombine et de plasmine en un puits a été réalisé en aveugle chez quelques patientes du protocole EXADELI. La distinction entre les deux groupes était évidente au vu des profils de génération de plasmine. En effet, une diminution importante de l'AUC de plasmine et du pic de plasmine était observée chez les patientes du groupe Exacyl® après injection. Parallèlement, il a été noté que le taux de D-dimères observé à T3 (2h après l'inclusion) était inférieur à celui à T1 (inclusion) et T2 (30min après l'inclusion). En revanche, pour les patientes

du groupe placebo, on observait une tendance à l'augmentation de la génération de plasmine parallèlement à l'augmentation des D-Dimères, ce qui témoigne d'une persistance de la fibrinolyse. Les profils de génération de thrombine n'étaient pas modifiés par l'Exacyl® (30).

Les accouchements par césarienne étant plus à risque d'hémorragie que les accouchements par voie basse (saignement inhérent au geste chirurgical), il serait intéressant de mener une étude similaire dans le cadre des césariennes. L'étude TRACES (acide **TR**Anexamique dans le traitement des **CES**ariennes hémorragiques) est une étude multicentrique randomisée en double-aveugle thérapeutique clinique et pharmaco-biologique comparant deux doses différentes d'ATX à un placebo au cours de césariennes hémorragiques. L'objectif principal est d'évaluer la dose minimale efficace d'ATX nécessaire pour réduire le volume des pertes sanguines. Le critère de jugement principal est le volume des pertes sanguines. Le premier critère de jugement secondaire est clinique et consiste en l'évaluation et la quantification de l'anémie post-opératoire, du recours à la transfusion de CGR et autres produits hémostatiques, et du recours à des techniques chirurgicales. Le deuxième critère de jugement secondaire est biologique et consiste en la mesure de la fibrinolyse, via le dosage des D-dimères et autres paramètres d'hémostase, notamment la mesure de la capacité de génération de plasmine, par rapport à l'ATX administré.

Pour mener une telle étude dans les meilleures conditions, une étude pilote doit préalablement être réalisée : l'étude TRACES pilote.

## **D. Objectif de l'étude**

Le but de cette étude pilote est d'évaluer la faisabilité du protocole TRACES, tant sur le plan logistique que sur le plan clinico-biologique. D'une part, il s'agit d'établir un circuit de soins, du pré-analytique au post-analytique, le plus pratique et cohérent possible, afin de faciliter l'inclusion des patientes et leur suivi par les équipes de soins et de laboratoire. D'autre part, cette étude permettra d'évaluer l'intérêt du TGTP pour l'évaluation du statut hémostatique des patientes dans le péri-partum et de faire une première analyse pharmaco-biologique sur l'impact et le suivi du traitement par ATX au cours des césariennes hémorragiques.

## MATERIELS ET METHODES

### I. Population et temps de l'étude

#### A. Critères d'inclusion

Les patientes incluses étaient des femmes majeures ayant accouché d'un ou plusieurs nouveau(x)-né(s) vivant(s) par césarienne, programmée ou en cours de travail, à la maternité Jeanne de Flandre du CHRU de Lille.

#### B. Critères de non-inclusion

Les patientes présentant des antécédents personnels de thrombose, de crises convulsives ou de glomérulopathie ne pouvaient pas intégrer l'étude. L'administration d'ATX avant l'inclusion ou la notion d'insuffisance rénale aiguë anurique ou de HELLP (*Hemolysis Elevated Liver enzymes Low Platelet*) syndrome étaient également des motifs de non-inclusion.

#### C. Période d'inclusion

Les patientes ont été incluses sur une période de huit mois, d'avril à décembre 2014. Une patiente incluse en mars 2016, initialement prévue pour intégrer l'étude TRACES, a par ailleurs été ajoutée à notre étude pilote.

### II. Description de l'étude

Les patientes incluses étaient réparties en deux groupes selon le volume de l'hémorragie :

- Un groupe témoin non hémorragique NH (hémorragie < 800 mL)
- Un groupe hémorragique H (hémorragie > 800 mL).

Le groupe H était divisé en trois sous-groupes en fonction de la dose d'ATX reçue :

- TXA0 : 0 g d'ATX (20 mL de SSI + 0 ampoule d'ATX)
- TXA1 : 1 g d'ATX (10 mL de SSI + 2 ampoules)
- TXA2 : 2 g d'ATX (0 mL de SSI + 4 ampoules).

L'ATX était administré en IV sous forme de perfusion rapide dans les minutes suivant l'inclusion (descriptif de l'étude présenté en annexe 3).

Au cours du protocole, la dose d'ATX administrée a été réévaluée. En effet, il a été jugé que les doses d'1 et 2 g étaient peut-être élevées. Certaines patientes, incluses par la suite, ont donc reçu une dose plus faible d'ATX (groupe TXA0.5).

Divers paramètres cliniques et biologiques étaient surveillés à différents temps :

- T0 : temps d'inclusion, avant le début de la perfusion d'ATX,
- T15 : 15 minutes après l'inclusion,
- T30 : 30 minutes après l'inclusion,
- T60 : 60 minutes après l'inclusion,
- T120 : 120 minutes après l'inclusion,
- T180 : 180 minutes après l'inclusion,
- T360 : 360 minutes après l'inclusion.

Sur le plan biologique, des bilans sanguins étaient prélevés sur une voie veineuse périphérique dédiée à chaque temps, ainsi que les urines des six heures de suivi à T360. Les analyses demandées variaient en fonction du temps (tableau 1).

**Tableau 1 : Bilans prélevés en fonction du temps d'étude**

	T0	T15	T30	T60	T120	T180	T360	
<b>Numération globulaire</b> (tube EDTA)	X		X		X		X	Bilans « soins courants »
<b>Bilan de coagulation :</b> TCA, TQ, Fib, FII, FV, D-di et MFIB (tube citaté)	X		X		X		X	
<b>Bilan biochimique :</b> K+, urée, créatinine, Ca2+, protidémie (tube hépariné)	X						X	
<b>Bilan biochimique urinaire :</b> urée et créatinine (monovette urinaire)							X	
<b>Dosage plasmatique d'ATX</b> (tube EDTA)	X*	X	X	X	X	X	X	Bilans spécifiques
<b>Dosage urinaire d'ATX</b> (monovette urinaire)							X	
<b>TGTP et Complexes PAP</b> (tube citaté)	X	X	X	X	X	X	X	

\* A noter que le dosage plasmatique d'ATX réalisé à T0 était prélevé quelques minutes après la perfusion d'ATX.  
D-di = D-dimères ; MFIB = Monomères de fibrine ; K+ = Kaliémie ; Ca2+ = Calcémie.

Des bilans type étaient enregistrés sur Cirus (logiciel de prescription et serveur de résultats) ce qui permettait d'identifier les analyses à faire et le temps d'analyse facilement. Les tubes étaient préparés par code couleur pour chaque temps. Ils étaient ensuite étiquetés et envoyés dans un sachet « protocole TRACES » via le TAL (Transport Automatisé Léger), associés à une fiche d'inclusion clinique pour chaque temps (annexe 4). Sur cette fiche figuraient l'identité de la patiente, la date et l'heure d'inclusion et le temps correspondant aux tubes prélevés. Le tout était directement transmis au laboratoire d'hémostase qui procédait de la façon suivante :

- les tubes déjà enregistrés par le service (bilan « soins courants ») étaient retransmis au RTE (Réception Tri Enregistrement) pour suivre le circuit classique,
- les tubes non enregistrés par le service (bilans d'hémostase spécialisée) étaient enregistrés sur Molis (système informatique du laboratoire) par un(e) technicien(ne) d'hémostase.

Les tubes réservés à l'hémostase étaient répertoriés à l'aide d'une fiche d'inclusion biologique (chaque temps correspondant à un N° Molis différent) (annexe 5).

Les tubes destinés au dosage d'ATX étaient directement envoyés au laboratoire de toxicologie.

### **III. Information et recueil du consentement**

Quelle que soit la situation, l'information et le recueil du consentement de la patiente étaient toujours obtenus :

- si césarienne hémorragique prévisible ou groupe non hémorragique : information orale et remise de la lettre d'information, signature du consentement éclairé avant anesthésie si possible (formulaires selon le groupe),
- si inclusion en cours de césarienne, patiente sous anesthésie locorégionale : information orale et consentement oral +/- écrit si possible,
- si inclusion en cours de césarienne, patiente sous anesthésie générale : information orale et remise de la lettre d'information, recueil du consentement (signature) de la personne de confiance ; en post-opératoire : information orale, remise de la lettre d'information et signature du consentement éclairé par la patiente.

### **IV. Recueil des données cliniques**

Un certain nombre de paramètres cliniques ont été collectés à partir des dossiers médicaux des patientes. Les principales données cliniques concernaient :

- Les patientes : âge, pathologie chronique
- La grossesse : gestité/parité, pathologie de grossesse (pré-éclampsie, diabète gestationnel, anomalie d'insertion placentaire), terme
- Les nouveaux-nés : nombre de fœtus, poids de naissance
- La césarienne : indication, programmée ou en cours de travail
- La prise en charge : volume du saignement, volume de remplissage (cristalloïdes et colloïdes), transfusion de CGR ou de PFC, administration de concentrés de fibrinogène ...

## V. Préparation des échantillons destinés au laboratoire d'Hémostase

Deux tubes citratés étaient réceptionnés en hémostase :

- Le 1er, qui avait suivi le circuit classique, servait à réaliser le bilan « soins courants »,
- Le 2ème, enregistré en hémostase, servait exclusivement au bilan spécifique (TGTP et complexes PAP).

### Bilan « soins courants » :

Le tube citraté avec lequel était réalisé le bilan « soins courants » était centrifugé une fois à 20 °C pendant 15 minutes à 4000 tours/min au RTE, puis transmis au laboratoire d'hémostase.

Le TCA, le TQ, le fibrinogène, les facteurs II et V étaient dosés par méthode chronométrique sur l'automate STA R (Stago) avec les réactifs suivants :

- TriniCLOT aPTT HS pour le TCA (Tcoag),
- STA®- Neoplastine pour le TQ (Stago),
- STA®- ImmunoDef II et STA®- Deficient V pour les facteurs (Stago),
- STA®- Liquid Fib pour le fibrinogène (Stago).

Les D-dimères et les monomères de fibrine étaient dosés sur le même automate mais par technique immuno-turbidimétrique, avec les réactifs STA®- Liatest® D-DI PLUS et STA®- Liatest® FM (Stago).

### Bilans spécifiques :

Le 1er tube ayant servi au bilan « soins courants » était récupéré puis centrifugé une seconde fois à 20 °C pendant 15 minutes à 4000 tours/min. Le 2ème tube subissait une double centrifugation à 20 °C pendant 15 minutes à 4000 tours/min. Le plasma des 2 tubes était récupéré, poolé puis aliquoté dans des cryotubes Nunc® de 500 µL. Ceux-ci étaient ensuite rangés dans une boîte « protocole TRACES » (une par patiente) et congelés à -80 °C.



## VI. Test de génération simultanée de thrombine et de plasmine (TGTP)

### A. Automate

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un fluorimètre Fluoroskan Ascent™ (Thermo Labsystems, Helsinki, Finlande) équipé de deux paires de filtres : la première avec des longueurs d'onde d'excitation et d'émission à 340 nm et 460 nm respectivement ; la seconde avec des longueurs d'onde d'excitation et d'émission respectives à 490 nm et 520 nm. La fluorescence émise était mesurée par le logiciel Ascent™ Software. Les tests ont été réalisés sur des microplaques noires de 96 puits (Nunc™ Thermo Scientific).

### B. Réactifs

#### TBS :

Le tampon utilisé est le Tris Buffer Saline (TBS). A 100 mL d'eau distillée, étaient ajoutés :

- 0.8766 g de Chlorure de Sodium Euromedex® 150 nM,
- 0.0727 g de Trizma Base® de Sigma 6 nM,
- 0.6934 g de Trizma hydrochloride® de Sigma 44 nM.

La solution obtenue était filtrée via un filtre MILLEX 0.8 µ et conservée 1 mois à 4 °C.

#### Solution déclenchante :

La réaction était initiée par l'ajout de la solution déclenchante contenant du CaCl<sub>2</sub> à 200 nM préparée avec 2.9404 g de CaCl<sub>2</sub> (Chlorure de calcium VWR Prolabo®) dilué dans 100 mL d'eau distillée. La solution obtenue était ensuite filtrée et conservée 1 mois à 4 °C.

#### Facteur Tissulaire :

Le facteur tissulaire est issu du réactif Innovin® (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Germany) sous forme de poudre. La poudre était reconstituée extemporanément avec 10 mL d'eau distillée et ensuite diluée au 1/500 dans du TBS.

### Substrat Thrombine :

Le substrat spécifique de la thrombine est le Bz-beta-Ala-Gly-Arg-7-amino-4-methylcoumarin (Chiralix, Nijmegen, The Netherlands). Il est conditionné sous forme de poudre stockée à -20 °C. Chaque flacon contient 100 mg de poudre à 609.63 g/mol. Le substrat devait être à une concentration finale de 833 µM pour 120 µL (volume final par puits). Pour ce faire, la poudre était dans un premier temps dissoute dans 1.64 mL de DMSO (diméthylsulfoxyde) et laissée au repos 15 minutes. Dans un second temps, 4.92 mL d'eau distillée y étaient ajoutés. La solution de travail obtenue avait un volume de 6.56 mL et contenait 5 nM de substrat. La solution était conservée sous forme d'aliqots de 250 µL congelés à -80 °C.

### Substrat Plasmine :

Le substrat de la plasmine est le bis-(CBZ-L-phénylalaninyl-L-arginine amide)-rhodamine (Chiralix, Nijmegen, The Netherlands). Il est conditionné sous forme de poudre stockée à -20 °C. Chaque flacon contient 10 mg de poudre à 1278.24 g/mol. Le substrat devait être à une concentration finale de 33 µM pour 120 µL (volume final par puits). Pour cela il fallait ajouter à la poudre :

- 980 µL de DMSO (puis agiter et attendre 15 minutes pour une bonne dissolution),
- 2.94 mL d'eau distillée.

La solution de travail avait un volume total de 3.92 mL et contenait 2 nM de substrat. La solution était conservée sous forme d'aliqots de 110 µL congelés à -80 °C.

### Céphaline :

Le réactif utilisé est le CK Prest® (Diagnostica Stago) stocké sous forme de poudre à reconstituer dans 2 mL d'eau distillée. La solution obtenue était conservée sous forme d'aliqots de 110 µL congelés à -80 °C.

### t-PA :

Le réactif utilisé est l'Alteplase® (Boehringer Ingelheim) et contient 20 mg de poudre à dissoudre dans 20 mL d'eau distillée. La solution obtenue était conservée à -80 °C en aliqots de 250 µL.

### C. Préparation des pools témoin

Un pool de plasmas normaux avait été réalisé lors de la mise au point du test, à partir de 100 patients sans traitement anticoagulant et présentant des tests de coagulation normaux :

- TP > 80%
- TCA compris entre 30 et 35 s
- Taux de fibrinogène entre 2 et 4 g/L.

L'ensemble des échantillons avait été collecté dans des tubes citratés à 0,109 M puis avait subi une double centrifugation à 20 °C pendant 15 min à 4000 tours/min. Les plasmas avaient ensuite été mélangés, aliquotés et congelés à -80 °C jusqu'à utilisation.

Nous avons repris ce même pool témoin afin d'évaluer la répétabilité et la reproductibilité de la technique.

#### La répétabilité :

Elle est évaluée par la dispersion de mesures indépendantes obtenues avec des échantillons identiques, par un même opérateur utilisant le même équipement et dans un court intervalle de temps (une même série). Elle est estimée par un coefficient de variation CV (en %) calculé de la façon suivante :

$$CV (\%) = \text{Ecart-type} / \text{Moyenne} \times 100$$

#### La reproductibilité ou fidélité intermédiaire :

Elle est déterminée en faisant varier un ou plusieurs facteurs (souvent le temps et/ou l'opérateur et/ou le lot de réactifs). Elle est également exprimée en CV (%).

## D. Groupe témoin de femmes non enceintes

Un groupe NE (femmes non enceintes) a été constitué afin de comparer leurs profils de génération de thrombine et de plasmine aux profils des parturientes du groupe NH. Neuf volontaires en âge de procréer mais non enceintes, sans anomalie de la coagulation ni traitement anticoagulant, ont été prélevées et testées.

## E. Principe du test sur échantillons de plasma

Les tests étaient réalisés sur des demi-plaques noires et chaque échantillon était testé dans trois puits consécutifs. Dans chaque puits étaient déposés successivement :

- 80  $\mu$ L de plasma à tester,
- 4  $\mu$ L du mélange d'activateur (préparé extemporanément en ajoutant 110  $\mu$ L de céphaline à 110  $\mu$ L d'Innovin® dilué au 1/500),
- 6  $\mu$ L du mélange de substrats (préparé extemporanément en ajoutant 200  $\mu$ L de substrat Thrombine à 100  $\mu$ L de substrat Plasmine),
- 10  $\mu$ L de TBS.

La plaque était soigneusement secouée et incubée dans le Fluoroskan 5 minutes à 37 °C. Pendant ce temps, la solution déclenchante était préparée en mélangeant 1000  $\mu$ L de tPA dilué au 1/1000 (4  $\mu$ L de tPA + 996  $\mu$ L de TBS) et 1000  $\mu$ L de CaCl<sub>2</sub>. L'automate distribuait ensuite 20  $\mu$ L de cette solution déclenchante dans chaque puits. La génération de thrombine et de plasmine était alors lancée pour une durée de 70 minutes. Les substrats spécifiques de la thrombine et de la plasmine ont des longueurs d'onde d'excitation respectives autour de 355 et 485 nm, et des longueurs d'onde d'émission respectives à 460 et 520 nm.

## F. Paramètres du test

La fluorescence cumulée au cours du temps était mesurée par le logiciel Ascent® Software. Pour chaque valeur brute de fluorescence mesurée, la dérivée première était ensuite calculée en utilisant la formule mathématique suivante :  $Y'_i = (Y_{i+1} - Y_{i-1}) / (X_{i+1} - X_{i-1})$  (Y correspondant à l'intensité de fluorescence et X au temps pour un même point i). Les courbes issues des dérivées premières

représentaient la vitesse de génération de thrombine et de plasmine. Les valeurs des dérivées premières étaient ensuite converties en concentrations de thrombine et de plasmine générées grâce à des droites de calibration. Celles-ci avaient été réalisées à partir d'une gamme de thrombine humaine et de plasmine humaine. Des courbes de concentration de thrombine et de plasmine en fonction du temps étaient ensuite tracées.

#### Paramètres étudiés :

Afin de décrire l'activité de la thrombine et de la plasmine, un certain nombre de paramètres ont été définis. Ils sont illustrés dans le profil de génération de thrombine et de plasmine réalisé sur pool témoin (figure 1).

Pour la thrombine, quatre paramètres ont été déterminés :

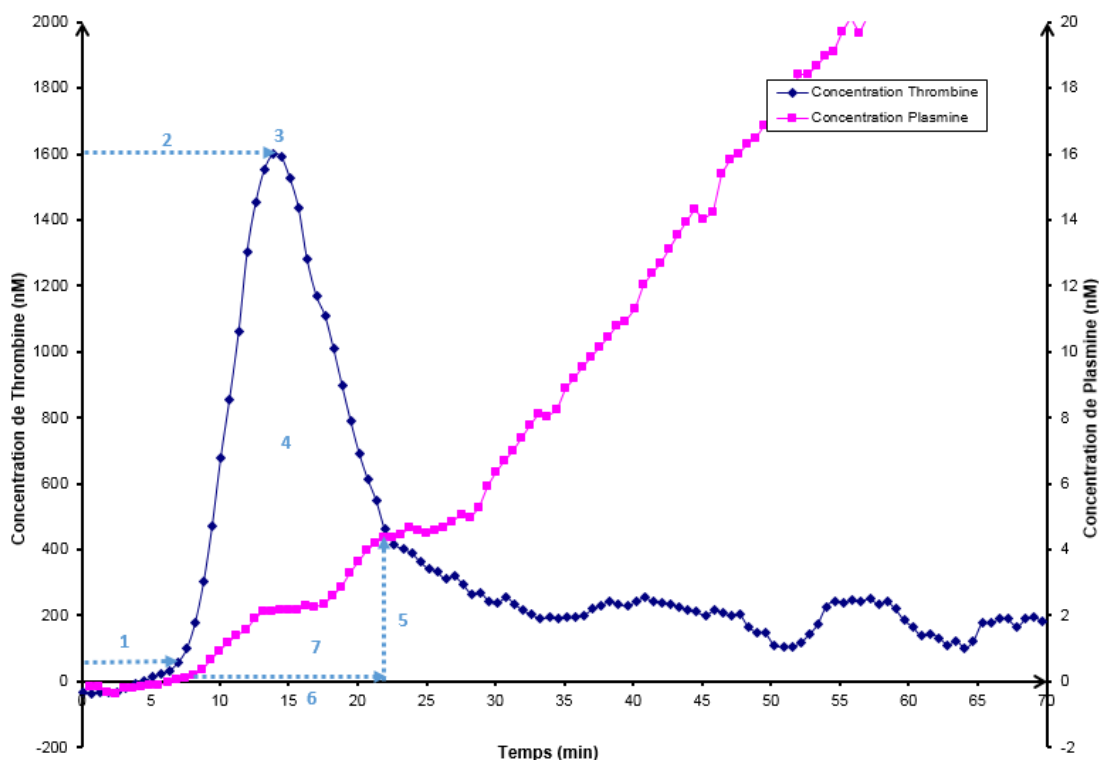
1. le lag time de génération de thrombine (ou temps de latence, en min) : il représente la phase d'initiation de la génération de thrombine,
2. le temps du pic de thrombine (en min) : c'est le temps mis pour atteindre le taux maximal de génération de thrombine,
3. le pic de thrombine (en nM) représentant le maximum de thrombine générée.
4. l'AUC thrombine (*Area Under the Curve*, aire sous la courbe, en nM\*min) correspondant à la quantité totale de thrombine générée.

Pour la plasmine, trois paramètres ont été définis :

5. le pic de plasmine (en nM) : il correspond au maximum de plasmine générée au moment où la courbe passe d'une forme convexe à une forme linéaire ; ce point représente le point de lyse du caillot par la plasmine,
6. le temps de lyse de la fibrine (ou FLT pour *Fibrin Lysis Time*, en min) : il s'agit de la différence entre le lag time de plasmine et le temps mis pour atteindre le pic de génération de plasmine.
7. l'AUC (en nM\*min) : c'est l'aire sous la courbe pendant le temps de lyse de la fibrine, reflétant la quantité de plasmine générée.

Un quatrième paramètre a été utilisé pour la plasmine : la vélocité du pic de plasmine (en nM.min<sup>-1</sup>), correspondant à la pente moyenne du pic. Elle a été

calculée manuellement selon la formule suivante : (pic de plasmine – concentration de plasmine au lag time) / temps de lyse.



**Figure 1 :** Paramètres étudiés avec le test de génération simultanée de thrombine et de plasmine : exemple d'un pool témoin

Chacun de ces sept paramètres a été déterminé à l'aide de formules intégrées par macros de calcul sur Excel.

### G. Gamme d'acide tranexamique *in vitro*

Une gamme d'acide tranexamique a été réalisée sur un même pool de plasmas de sujets normaux, afin d'évaluer la relation dose-effet *in vitro* de l'ATX sur la génération de thrombine et de plasmine.

L'acide tranexamique, commercialisé sous le nom d'Exacyl® (Sanofi Aventis), est conditionné sous forme d'ampoules injectables de 5 mL et à une concentration de 100 mg/mL.

A partir des ampoules d'Exacyl®, des dilutions successives ont été réalisées : au 1/6,25ème (100µL + 525µL de TBS), au 1/10ème (100µL + 900µL de TBS) et à nouveau au 1/10ème (100µL + 900µL de TBS), pour obtenir une solution S<sub>0</sub> à 160 mg/L. Cette solution a servi à préparer la concentration haute de notre gamme

(20mg/L) puisque qu'en prenant 15  $\mu\text{L}$  de  $S_0$ , une concentration de 20 mg/L d'Exacyl® était obtenue dans le puits de 120  $\mu\text{L}$ . Cette solution  $S_0$  servait ensuite à préparer les autres dilutions de la gamme comme décrit ci-dessous (tableau 2).

Au final, chaque puits avait un volume total de 120  $\mu\text{L}$  et contenait :

- 80  $\mu\text{L}$  de plasma (65  $\mu\text{L}$  d'un même pool témoin + 15  $\mu\text{L}$  de solution d'ATX de concentration décroissante),
- 4  $\mu\text{L}$  du mélange d'activateur,
- 6  $\mu\text{L}$  du mélange de substrats,
- 10  $\mu\text{L}$  de TBS,
- 20  $\mu\text{L}$  de solution déclenchante.

**Tableau 2 : Préparation de la gamme d'acide tranexamique**

<b>Concentration d'ATX dans le puits (mg/L)</b>	10 ( $S_1$ )	8	5 ( $S_2$ )	2	1 ( $S_3$ )	0.8
<b>Volume d'ATX (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	500 de $S_0$	40 de $S_0$	50 de $S_1$	20 de $S_1$	60 de $S_1$	80 de $S_3$
<b>Volume de TBS (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	500	60	50	80	540	20
<b>Concentration d'ATX dans le puits (mg/L)</b>	0.6	0.5	0.4	0.2	0.1	0
<b>Volume d'ATX (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	60 de $S_3$	10 de $S_2$	40 de $S_3$	20 de $S_2$	10 de $S_3$	0
<b>Volume de TBS (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	40	90	60	80	90	100

## VII. Complexes plasmine/antiplasmine (PAP)

Le dosage des complexes plasmine/antiplasmine (PAP) a été réalisé par technique immunoenzymatique avec le coffret TECHNOZYM® PAP complex ELISA (Technoclone, Vienna, Austria). Le test est basé sur l'utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé uniquement contre un épitope spécifique du complexe PAP, précoaté sur une plaque de microfiltration. L'anticorps ne reconnaît donc pas l' $\alpha_2$ -antiplasmine libre ni le plasminogène libre. S'il y a présence de PAP, celui-ci se fixe à

l'anticorps monoclonal anti-PAP. Un second anticorps monoclonal couplé à la peroxydase permet de révéler la réaction.

#### Réalisation du test :

Les calibrants, contrôles et échantillons patients étaient dilués au 1/10 dans du tampon. Ceux-ci étaient ensuite distribués dans les micropuits. La plaque était incubée toute une nuit à 4 °C. Elle était ensuite lavée quatre fois de suite avec une solution de lavage. Un volume de 100 µL de solution de conjugué, constitué d'anticorps anti-plasminogène humain de lapin conjugué à la peroxydase, était distribué dans chaque cupule. La plaque était incubée 2 heures à 37 °C puis lavée comme précédemment. Un volume de 100 µL d'une solution substrat était ensuite distribué dans chaque cupule. La plaque était incubée 20 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. La réaction était enfin arrêtée en ajoutant 100 µL d'une solution d'arrêt (acide sulfurique dilué) dans toutes les cupules. La lecture des réactions se faisait ensuite à l'aide d'un spectrophotomètre (longueur d'onde  $\lambda = 450$  nm). Les densités optiques étaient converties en concentrations via une droite de calibration.

Les normes de référence du fournisseur sont comprises entre 0 et 514 ng/mL. Un niveau de PAP supérieur à 120 µg/mL durant un traitement fibrinolytique traduit une consommation complète d' $\alpha$ 2-antiplasminine, voire une plasminémie généralisée.

## **VIII. Dosages d'acide tranexamique**

La technique de dosage de l'ATX dans le plasma et les urines a été développée au laboratoire de toxicologie selon les méthodes décrites dans la littérature (32). Son principe repose sur la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (UPLC-MS/MS). Dans un premier temps, la chromatographie en phase liquide sépare les différentes molécules présentes dans l'échantillon testé, en fonction de leur affinité pour différents solvants. Dans un second temps, la spectrométrie de masse permet d'isoler, détecter et quantifier l'ATX. Cette méthode de dosage est facile, rapide, sensible et très spécifique.



Les prélèvements étaient directement adressés au laboratoire de toxicologie qui les enregistrerait, les décantait et les congelait à -20 °C jusqu'à utilisation. Les dosages étaient réalisés sur l'automate ACQUITY® Xevo-TQ Detector (Waters®, Milford, MA).

## **IX. Analyse statistique**

Les données cliniques et biologiques ont été recueillies à l'aide du logiciel Excel® (Microsoft).

Les paramètres qualitatifs ont été décrits en termes de fréquence et de pourcentage. Les paramètres numériques ont été décrits en termes de médiane et d'écart interquartile ou en termes de moyenne et écart-type.

Pour les tests statistiques, nous avons regroupé toutes les patientes traitées en un seul groupe (groupe H traité), en raison du faible effectif. Les tests statistiques ont été réalisés dans chaque groupe (NE, NH, H traité), à l'exception du groupe H non traité en raison du faible effectif ( $n = 4$ ).

La comparaison des groupes a été faite à l'aide de tests non paramétriques (variables ne suivant pas la loi normale) et non-appariés pour petits effectifs : le test de Mann-Whitney pour la comparaison entre deux groupes, le test de Kruskal-Wallis pour la comparaison entre trois groupes ou plus.

La comparaison de moyennes pour les données cliniques, entre groupes NH et H, a été réalisée à l'aide du test t de Student pour échantillons indépendants.

Les corrélations ont été calculées en utilisant le test de corrélation de Spearman.

Le niveau de significativité a été fixé à 5%. Les analyses statistiques et les graphes ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism® (version 7).

## RESULTATS

### I. Test de Génération simultanée de Thrombine et de Plasmine (TGTP) : Répétabilité et Reproductibilité

Un pool de plasma a été testé au cours d'une même série afin d'évaluer la répétabilité de la technique. Pour chaque paramètre, le CV est inférieur à 10% (tableau 1).

**Tableau 1 : Coefficients de variation (CV %) intra-essai pour chaque paramètre du TGTP (n = 10)**

Paramètres étudiés	Thrombine				Plasmine		
	Lag time (min)	Temps du pic (min)	Pic (nM)	AUC (nM*min)	Pic (nM)	AUC (nM*min)	Temps de lyse (min)
CV (%)	8.42	8.59	6.18	1.90	8.70	5.08	5.46

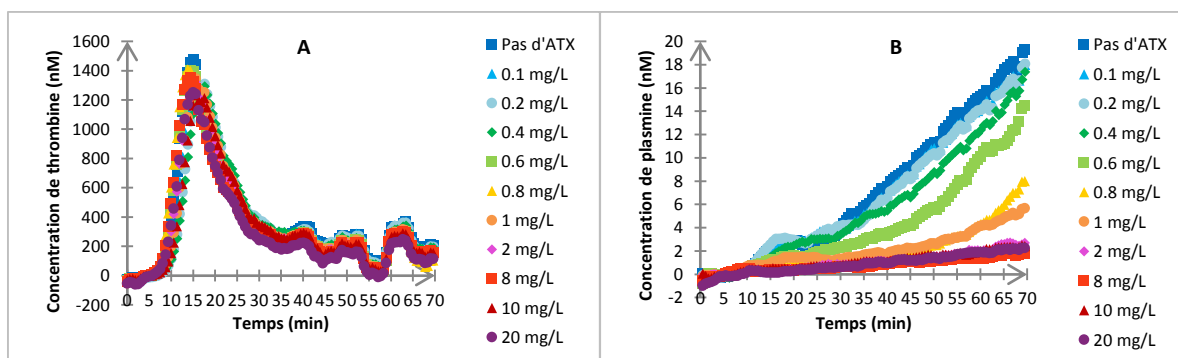
Le même pool témoin a été testé dans chaque série de test pour évaluer la reproductibilité. Les séries étaient réalisées à des dates différentes, parfois par des opérateurs différents, mais avec les mêmes lots de réactifs. Les CV sont compris entre 8 et 21% (tableau 2).

**Tableau 2 : Coefficients de variation (CV %) inter-essai pour chaque paramètre du TGTP (n = 10)**

Paramètres étudiés	Thrombine				Plasmine		
	Lag time (min)	Temps du pic (min)	Pic (nM)	AUC (nM*min)	Pic (nM)	AUC (nM*min)	Temps de lyse (min)
CV (%)	13.69	10.91	9.35	8.56	20.90	14.35	19.39

## II. Gamme d'acide tranexamique *in vitro*

Les profils de génération de thrombine et de plasmine, en fonction de la concentration plasmatique d'ATX *in vitro*, sont présentés séparément pour plus de clarté (figures 1A et 1B).



**Figure 1 :** Génération de thrombine et de plasmine en fonction de la concentration plasmatique d'ATX (pool témoin)

Les profils de génération de thrombine pour les différentes concentrations d'ATX sont superposables (figure 1A). Aucun des paramètres du profil de génération de thrombine n'est significativement perturbé par les variations de la concentration plasmatique d'ATX. La génération de plasmine est par contre influencée par la concentration plasmatique d'ATX : plus la concentration est élevée, plus la génération de plasmine est inhibée (figure 1B).

## III. Protocole TRACES pilote

### A. Description générale de la population d'étude

Le groupe témoin NH est composé de 10 patientes. Le groupe H en comporte 17 dont 2 patientes exclues (la patiente 18 en raison d'un accouchement par voie basse et la patiente 26 pour qui l'inclusion n'était pas claire). Pour ces deux groupes, quelques caractéristiques cliniques sont présentées dans le tableau 3.

**Tableau 3 : Comparaison des données cliniques générales entre les groupes NH et H** (données exprimées en moyenne [écart-type] sauf pour le taux de césarienne programmée (%) ; p calculés pour la comparaison des moyennes à l'aide du test t de Student pour échantillons indépendants)

	Groupe NH (n = 10)	Groupe H (n = 15)	
<b>Césarienne programmée</b>	100%	60%	
<b>Délai incision - inclusion (min)</b>	16 [3]	31 [16]	p = 0,008
<b>Durée de la césarienne (min)</b>	48 [10]	98 [45]	p = 0,002
<b>Age maternel</b>	30,8 [5,5]	31,8 [4,4]	p = 0,62
<b>Gestité</b>	2,8 [2,7]	2,7 [1,6]	p = 0,92
<b>Parité</b>	2,6 [2,1]	2,6 [1,2]	p = 0,95
<b>Age gestationnel (SA)</b>	37,5 [2,7]	36,7 [3,3]	p = 0,52
<b>Nombre de fœtus</b>	1,1 [0,3]	1,2 [0,4]	p = 0,52
<b>Poids fœtal (g)</b>	3155 [1054]	2673 [966]	p = 0,26
<b>Volume de l'hémorragie (mL)</b>	308 [138]	1501 [592]	p < 0,0001

Toutes les césariennes étaient programmées dans le groupe NH, alors que 60% seulement l'étaient dans le groupe H. Le délai entre l'incision et l'inclusion ainsi que la durée de la césarienne étaient significativement plus longs dans le groupe H. Les données relatives à la grossesse et aux nouveaux-nés sont comparables.

Parmi les 15 patientes du groupe hémorragique, nous avons 4 patientes non traitées (groupe TXA0), 5 patientes ayant reçu 1 g d'ATX (groupe TXA1), 4 patientes ayant reçu 2 g d'ATX (groupe TXA2) et 2 patientes pour lesquelles une dose de 0.5 g a été choisie au cours de l'étude (groupe TXA0.5).

Etant donné le faible effectif dont nous disposions par groupe, les patientes traitées ont été rassemblées dans un seul groupe (groupe H traité, n = 11) pour pouvoir exploiter les résultats statistiquement. Pour la même raison, les tests statistiques n'ont pas pu être effectués pour le groupe H non traité (= groupe TXA0, n = 4).

Un descriptif de l'ensemble des données relatives au TGTP est présenté pour chaque patiente (annexes 6 à 8) et pour chaque groupe (annexe 9).

Les données cliniques principales sont détaillées pour chaque patiente dans l'annexe 10.

## B. Comparaison des paramètres d'hémostase entre les différents groupes au cours du temps

**Tableau 4 : Comparaison des paramètres d'hémostase à différents temps dans chaque groupe** (valeurs exprimées en médiane [1<sup>er</sup> quartile-3<sup>ème</sup> quartile] ; calcul des p pour les mesures répétées dans le temps dans chaque groupe, à l'aide du test non paramétrique de Kruskal-Wallis ; certains paramètres étant manquants à certains temps et pour certaines patientes (non prélevés, coagulés ...), le nombre de valeurs pris en compte est variable : groupe NH n = 5 à 10, groupe H traité n = 2 à 4, groupe H traité n = 7 à 11))

Groupe NH n = 10					
	T0	T30	T120	T360	p
D-dimères (ng/mL)	1500 [1300-3000]	3300 [1400-4625]	4850 [2275-6350]	4800 [3300-5400]	<b>0.015</b>
PAP (ng/mL)	496 [327-531]	712 [378-855]	959 [838-1089]	798 [646-988]	<b>0.004</b>
Fibrinogène (g/L)	4.7 [4.6-4.8]	4.4 [3.8-4.5]	4.6 [4.1-4.9]	4.2 [4.1-4.7]	0.35
Facteur II (U/dL)	119 [111-128]	111 [103-124]	116 [110-131]	115 [106-134]	0.86
Facteur V (U/dL)	138 [115-146]	121 [110-139]	122 [118-136]	125 [118-130]	0.85
Monomères de fibrine (µg/mL)	28 [16-42]	56 [41-97]	60 [38-113]	62 [4-100]	0.22
Hémoglobine (g/dL)	12.7 [11.7-12.9]	12.1 [10.9-12.7]	12.3 [11.3-13.7]	12.4 [11.5-12.6]	0.75
Numération plaquettaire (G/L)	187 [162-251]	162 [147-176]	184 [143-185]	189 [181-211]	0.50
Groupe HNT n = 4					
	T0	T30	T120	T360	p
D-dimères (ng/mL)	3100 [2300-3900]	5300 [3950-10550]	4800 [4650-5050]	7400 [5800-132700]	.
PAP (ng/mL)	514 [340-602]	467 [364-570]	616 [484-756]	653 [548-758]	.
Fibrinogène (g/L)	3.8 [3.2-4.5]	3.5 [2.5-4.5]	3.8 [3.3-4.2]	3.4 [2.3-4.1]	.
Facteur II (U/dL)	98 [91-109]	82 [73-100]	85 [79-97]	91 [87-94]	.
Facteur V (U/dL)	113 [80-147]	115 [83-142]	109 [77-140]	90 [81-100]	.
Monomères de fibrine (µg/mL)	43 [28-57]	68 [42-112]	64 [60-85]	136 [134-146]	.
Hémoglobine (g/dL)	9.5 [9.2-10.8]	9.4 [9.1-9.6]	9.2 [8.9-10.3]	9.5 [8.7-10.4]	.
Numération plaquettaire (G/L)	178 [170-210]	181 [158-204]	163 [154-188]	164 [148-182]	.
Groupe HT n = 11					
	T0	T30	T120	T360	p
D-dimères (ng/mL)	3600 [3450-6050]	3850 [3375-12175]	3600 [3400-11100]	3000 [2500-6800]	0.61
PAP (ng/mL)	749 [502-787]	681 [544-795]	1234 [1003-1971]	1359 [920-1489]	0.07
Fibrinogène (g/L)	3.5 [2.9-4.5]	3.4 [3.2-4.0]	3.7 [2.7-4.4]	3.7 [2.8-4.1]	0.99
Facteur II (U/dL)	106 [77-115]	102 [92-104]	88 [78-106]	102 [79-105]	0.76
Facteur V (U/dL)	115 [84-136]	106 [90-125]	98 [80-123]	86 [81-135]	0.86
Monomères de fibrine (µg/mL)	89 [58-145]	116 [64-150]	123 [35-155]	81 [75-107]	0.97
Hémoglobine (g/dL)	10.7 [9.2-11.6]	10.1 [9.3-11.3]	10.1 [9.5-11.3]	9.9 [9.2-11.2]	0.92
Numération plaquettaire (G/L)	169 [153-191]	177 [151-193]	184 [171-216]	175 [157-194]	0.71

Pour le groupe NH, on observe au cours du temps une différence statistiquement significative uniquement pour les D-dimères (p = 0.015) et les

complexes PAP ( $p = 0.004$ ). En effet, les taux de D-dimères et de complexes PAP à T120 et T360 sont plus élevés qu'à T0.

Pour le groupe H non traité, on note une augmentation des D-dimères et des monomères de fibrine ainsi qu'une baisse du facteur V et du fibrinogène, mais la significativité statistique n'a pas été évaluée en raison du faible effectif pour ce groupe.

Pour le groupe H traité, le taux de D-dimères et de monomères de fibrine ainsi que le taux de facteur V semblent être plus faibles à T360 qu'à T0, mais ces résultats sont statistiquement non significatifs. Les complexes PAP semblent augmenter dans le temps, mais cette augmentation est également non statistiquement significative.

Les paramètres ont également été comparés à chaque temps entre le groupe NH et le groupe H traité (tableau 5).

**Tableau 5 : Comparaison des paramètres d'hémostase entre les groupes NH et H traité à chaque temps** (résultats exprimés en médiane [1<sup>er</sup> quartile-3<sup>ème</sup> quartile] ; p calculés à l'aide du test non paramétrique de Mann-Whitney ; certains paramètres étant manquants à certains temps et pour certaines patientes (non prélevés, coagulés ...), le nombre de valeurs pris en compte est variable (groupe NH n = 5 à 10, groupe H traité n = 7 à 11))

Paramètres biologiques	T0			T30			T120			T360		
	Groupe NH	Groupe H traité	p	Groupe NH	Groupe H traité	p	Groupe NH	Groupe H traité	p	Groupe NH	Groupe H traité	p
D-dimères (ng/mL)	1500 [1300-3000]	3600 [3450-6050]	<b>0.02</b>	3300 [1400-4625]	3850 [3375-12175]	0.19	4850 [2275-6350]	3600 [3400-11100]	0.47	4800 [3300-5400]	3000 [2500-6800]	0.71
PAP (ng/mL)	496 [327-531]	749 [502-787]	0.09	712 [378-855]	681 [544-795]	0.86	959 [838-1089]	1234 [1003-1971]	0.23	798 [646-988]	1359 [920-1489]	0.14
Fibrinogène (g/L)	4.7 [4.6-4.8]	3.5 [2.9-4.5]	<b>0.036</b>	4.4 [3.8-4.5]	3.4 [3.2-4.0]	<b>0.026</b>	4.6 [4.1-4.9]	3.7 [2.7-4.4]	<b>0.048</b>	4.2 [4.1-4.7]	3.7 [2.8-4.1]	<b>0.048</b>
Facteur II (U/dL)	119 [111-128]	106 [77-115]	<b>0.046</b>	111 [103-124]	102 [92-104]	0.09	116 [110-131]	88 [78-106]	<b>0.007</b>	115 [106-134]	102 [79-105]	<b>0.01</b>
Facteur V (U/dL)	138 [115-146]	115 [84-136]	0.18	121 [110-139]	106 [90-125]	0.19	122 [118-136]	98 [80-123]	0.10	125 [118-130]	86 [81-135]	0.18
Numération plaquettaire (G/L)	187 [162-251]	169 [153-191]	0.23	162 [147-176]	177 [151-193]	0.87	184 [143-185]	184 [171-216]	0.82	189 [181-211]	175 [157-194]	0.27
Monomères de fibrine (µg/mL)	28 [16-42]	89 [58-145]	<b>0.01</b>	56 [41-97]	116 [64-150]	0.19	60 [38-113]	123 [35-155]	0.73	62 [4-100]	81 [75-107]	0.21
Hémoglobine (g/dL)	12.7 [11.7-12.9]	10.7 [9.2-11.6]	0.05	12.1 [10.9-12.7]	10.1 [9.3-11.3]	0.19	12.3 [11.3-13.7]	10.1 [9.5-11.3]	0.16	12.4 [11.5-12.6]	9.9 [9.2-11.2]	<b>0.036</b>

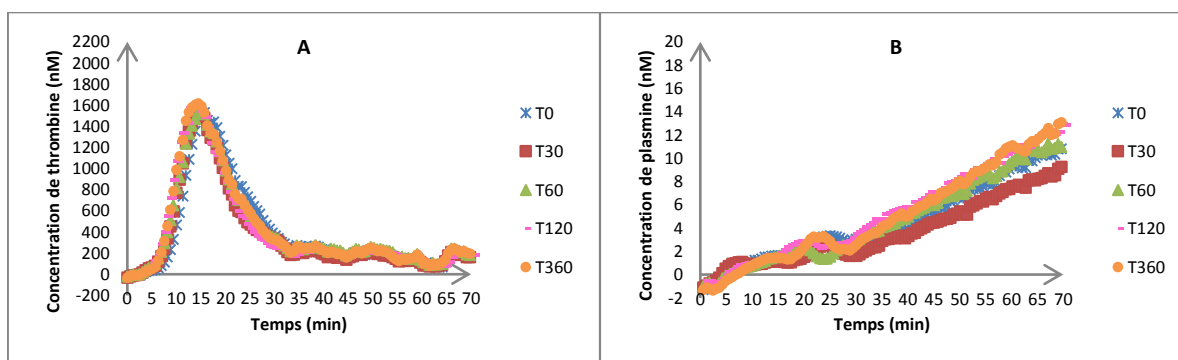
Les D-dimères sont significativement plus élevés à l'inclusion dans le groupe H traité (3600 ng/mL [3450-6050] vs 1500 ng/mL [1300-3000], p = 0.02). Il n'y a pas de différence statistiquement significative aux temps suivants, mais on note que le taux augmente progressivement dans le groupe NH alors que dans le groupe H traité le taux augmente discrètement et diminue dès T120. Concernant le taux de fibrinogène, celui-ci est plus bas dans le groupe H traité et cette différence est statistiquement significative à chaque temps (p = 0.036, 0.026, 0.048 et 0.048 à T0, T30, T120 et T360 respectivement). Le facteur II est significativement plus bas dans le groupe H traité, plus particulièrement à T120 (88 U/dL [78-106] vs 116 U/dL [110-131], p = 0.007). Le facteur V est plus bas dans le groupe H traité et à chaque temps, mais les résultats ne sont pas statistiquement significatifs.

Pour les monomères de fibrine, les taux sont plus élevés dans le groupe H traité, mais la différence est statistiquement significative à T0 seulement (89  $\mu\text{g}/\text{mL}$  [58-145] vs 28  $\mu\text{g}/\text{mL}$  [16-42],  $p = 0.01$ ). Les complexes PAP paraissent plus élevés dans le groupe H traité, notamment aux T120 et T360, mais les résultats ne sont pas statistiquement significatifs. Les numérations plaquettaires sont comparables, sans différence significative. Les chiffres d'hémoglobine sont quant à eux plus faibles dans le groupe H traité, mais on n'observe une différence statistiquement significative qu'à T360 (9.9 g/dL [9.2-11.2] vs 12.4 g/dL [11.5-12.6],  $p = 0.036$ ).

## C. Exemples de profil de génération de thrombine et de plasmine selon le groupe

### 1. Groupe NH

Les figures 2A et 2B représentent respectivement les profils de génération de thrombine et de plasmine au cours du temps, chez une patiente du groupe NH.



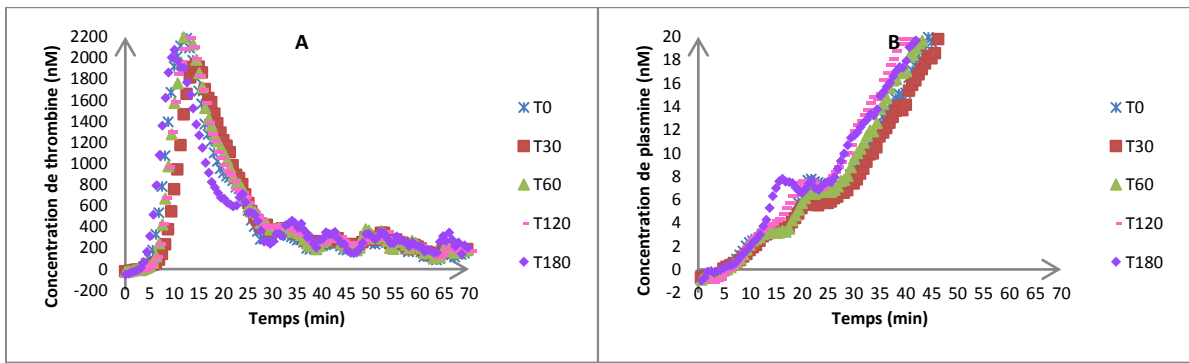
**Figure 2 :** Evolution des profils de génération de thrombine et de plasmine au cours du temps chez une patiente du groupe NH

Pour cette patiente du groupe NH, les profils de génération de thrombine et de plasmine sont superposables pour tous les temps (figures 3A et 3B). Le pic de thrombine est mesuré à 1600 nM environ pour un AUC à 32000 nM\*min. Le pic de plasmine varie discrètement entre 2.11 et 6.11 nM pour un AUC entre 650 et 860 nM\*min.

### 2. Groupe TXA0

Les figures 3A et 3B représentent respectivement les profils de génération de thrombine et de plasmine au cours du temps, chez une patiente du groupe TXA0.



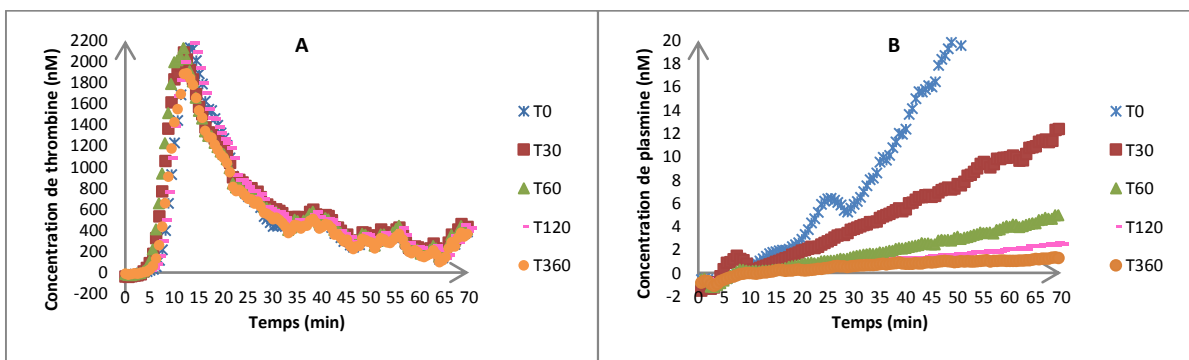


**Figure 3 :** Evolution des profils de génération de thrombine et de plasmine au cours du temps chez une patiente du groupe TXA0

Chez cette patiente du groupe H non traité par ATX, nous avons remplacé le T360 (non prélevé) par le T180. Les profils de génération de thrombine sont quasiment superposables, avec toutefois un pic de thrombine plus élevé que pour la patiente NH (pic mesuré entre 1900 et 2200 nM selon le temps) et un AUC plus élevé également (40000 nM\*min). Les profils de génération de plasmine sont également similaires quel que soit le temps, avec un pic mesuré entre 5.75 et 7.75 nM et un AUC plus élevé que pour la patiente NH (entre 2500 et 3200 nM\*min).

### 3. Groupe TXA0.5

Les figures 4A et 4B représentent respectivement les profils de génération de thrombine et de plasmine au cours du temps, chez une patiente du groupe TXA0.5.

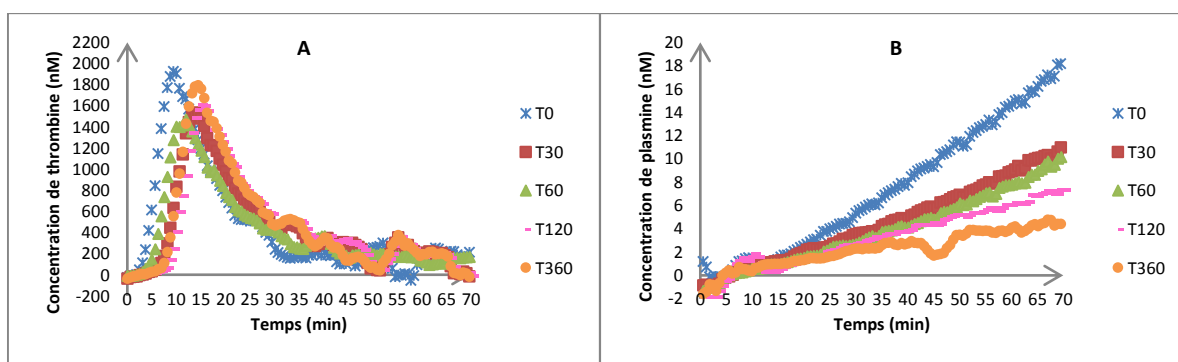


**Figure 4 :** Evolution des profils de génération de thrombine et de plasmine au cours du temps chez une patiente du groupe TXA0.5

Pour cette patiente, la génération de thrombine est similaire pour tous les temps de mesure, avec un pic de thrombine autour de 2000 nM et un AUC à 48000 nM\*min environ (figure 4A). On observe par contre une diminution progressive de la génération de plasmine au cours du temps, avec un pic de plasmine qui s'écrase dans le temps (6.40 nM à T0 contre 0.23 nM à T360) et un AUC mesuré à 2400 nM\*min environ à T0 et à 90 nM\*min à T360 (figure 4B).

#### 4. Groupe TXA1

Les figures 5A et 5B représentent respectivement les profils de génération de thrombine et de plasmine au cours du temps, chez une patiente du groupe TXA1.

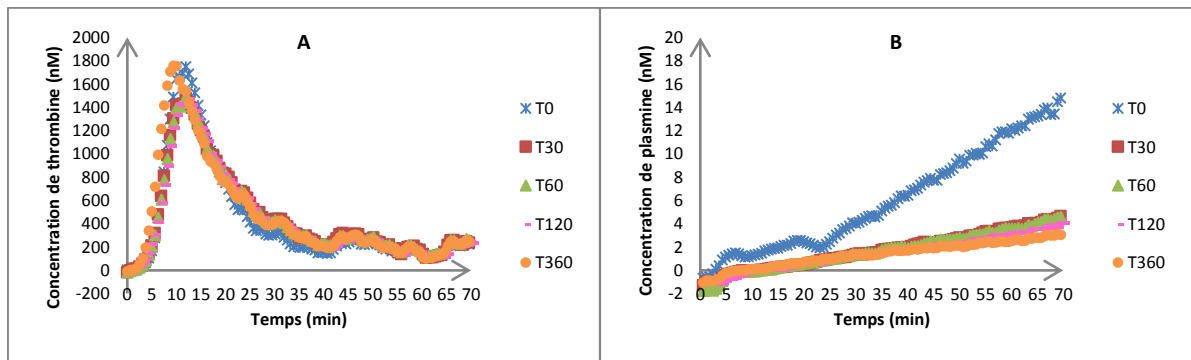


**Figure 5 :** Evolution des profils de génération de thrombine et de plasmine au cours du temps chez une patiente du groupe TXA1

Pour cette patiente du groupe TXA1, on observe quelques variations pour les paramètres de la thrombine mais l'AUC est stable à 34000 nM\*min environ (figure 5A). On note également une diminution progressive de la génération de plasmine au cours du temps (figure 5B).

#### 5. Groupe TXA2

Les figures 6A et 6B représentent respectivement les profils de génération de thrombine et de plasmine au cours du temps, chez une patiente du groupe TXA2.

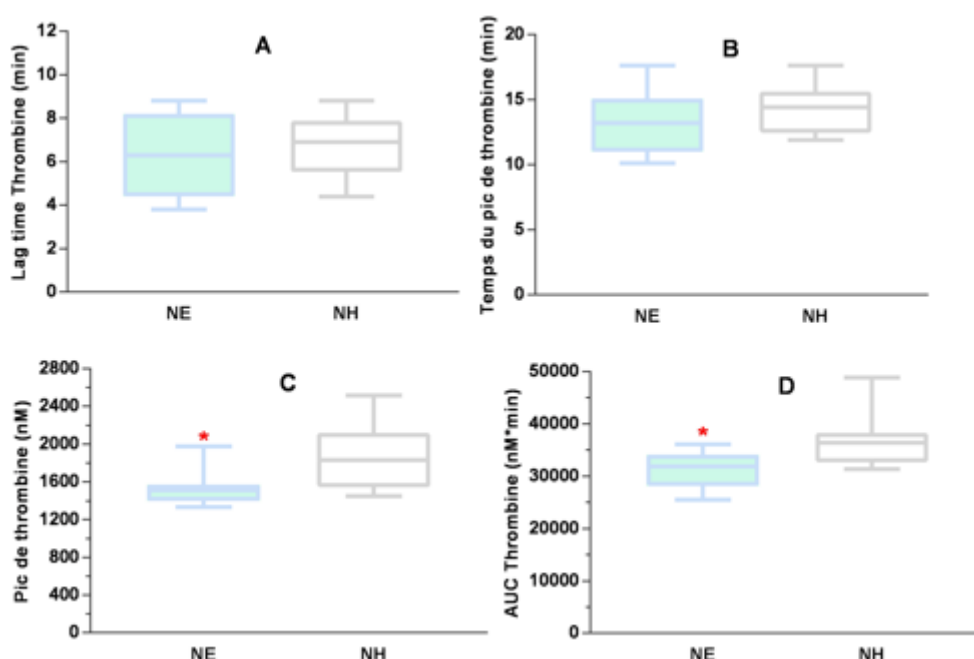


**Figure 6 : Evolution des profils de génération de thrombine et de plasmine au cours du temps chez une patiente du groupe TXA2**

Les profils de génération de thrombine sont superposables (figure 6A). La génération de plasmine est là aussi freinée dans le temps, mais avec des profils aux T30, T60, T120 et T360 quasi-superposables (figure 6B).

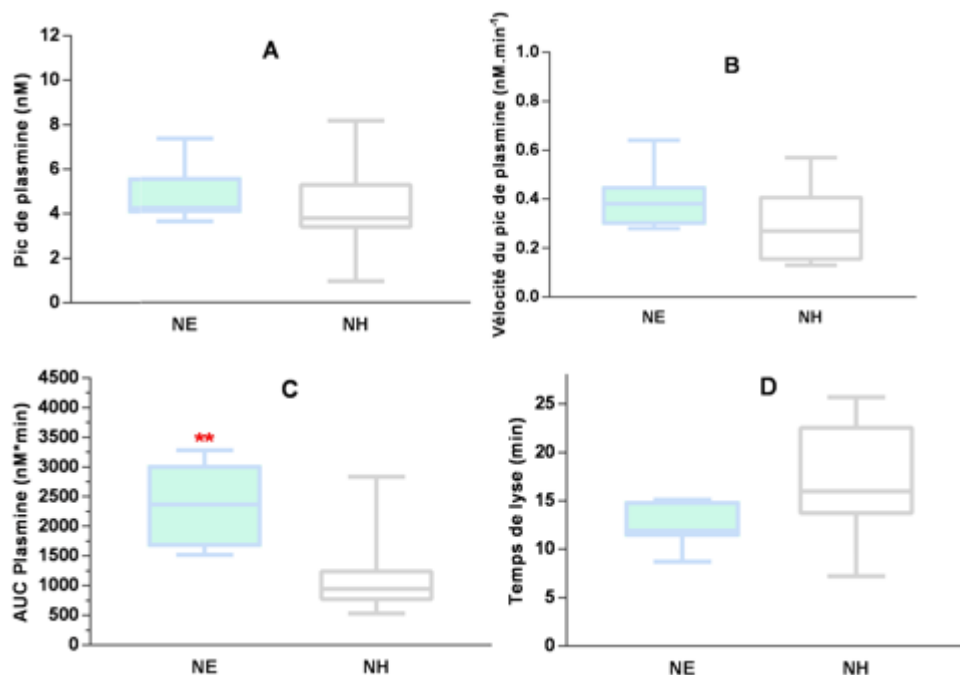
## D. Comparaison des paramètres TGTP groupe NE versus groupe NH

Les figures 7 et 8 représentent les comparaisons des différents paramètres du TGTP entre le groupe NE (femmes en âge de procréer mais non enceintes) et le groupe NH à T0.



**Figure 7 :** Comparaison des paramètres de thrombine entre le groupe NE et le groupe NH (groupe NE : n = 9, groupe NH : n = 10 ; \* p = 0.02)

Il n'y a pas de différence significative pour le lag time et le temps du pic de thrombine (figure 7A et 7B). Il y a par contre une différence statistiquement significative pour le pic de thrombine et l'AUC thrombine ( $p = 0.02$ ), qui sont plus faibles dans le groupe des femmes non enceintes (figure 7C et 7D).



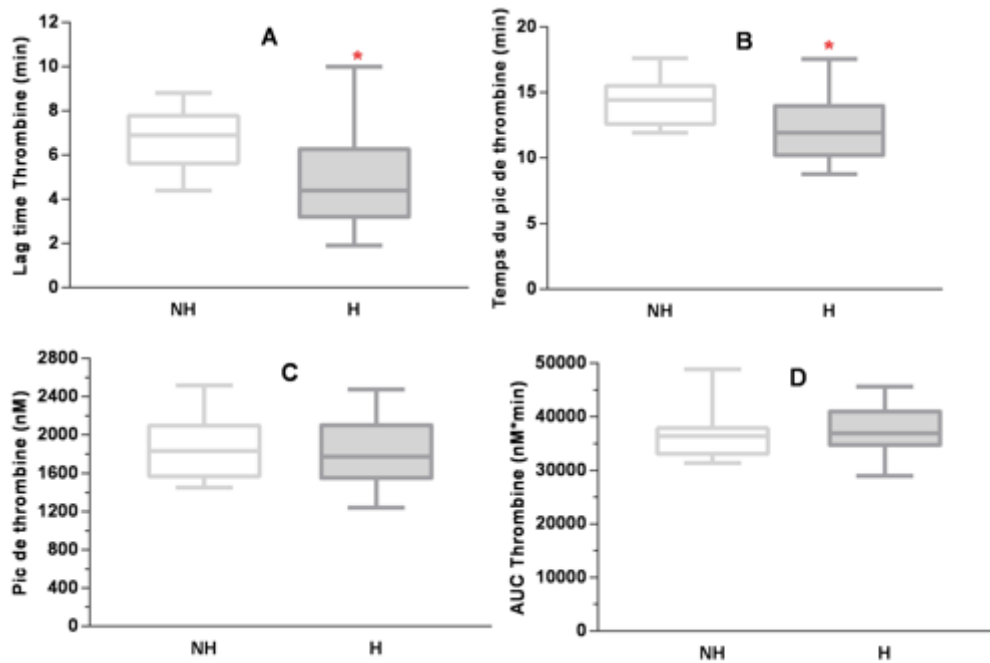
**Figure 8 :** Comparaison des paramètres de plasmine entre le groupe NE et le groupe NH (groupe NE : n = 9, groupe NH : n = 10 ; \*\* p = 0.002)

Concernant les paramètres de plasmine, on observe une différence statistiquement significative uniquement pour l'AUC plasmine ( $p = 0.002$ ) (figure 8C). En effet, l'AUC plasmine est plus faible dans le groupe NH. Il n'y a pas de différence significative pour le pic de plasmine, ni pour la vitesse du pic, ni pour le temps de lyse (figures 8A, 8B et 8D).

### E. Différences entre les groupes NH et H à T0

Pour le T0 (temps d'inclusion avant traitement), nous avons pu rassembler les patientes du groupe H non traité et celles du groupe H traité en un seul groupe H.

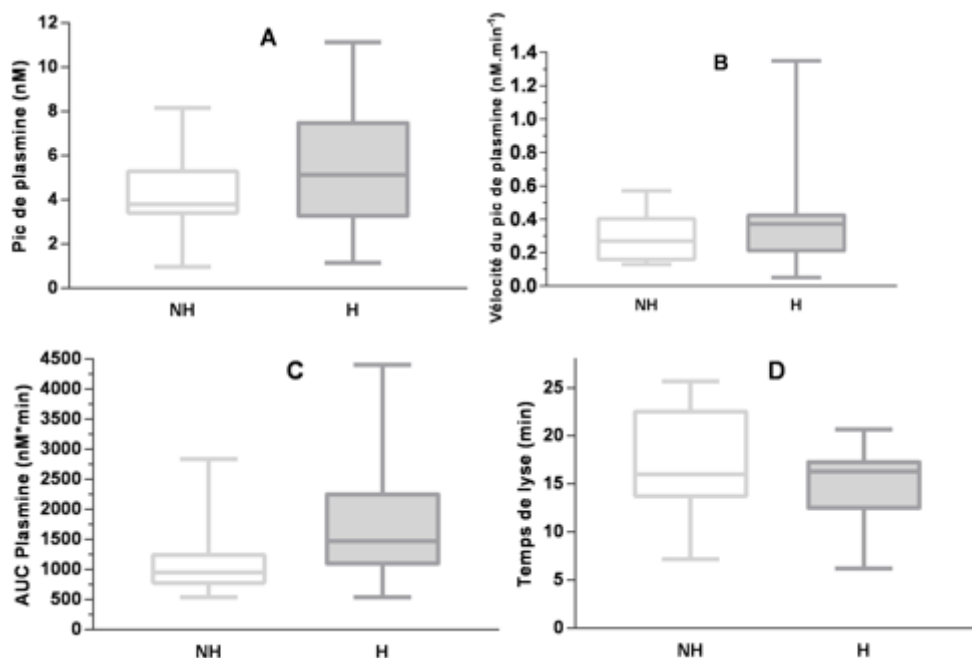
La comparaison des différents paramètres de la thrombine à T0 entre le groupe NH et le groupe H est illustrée dans la figure 9.



**Figure 9 :** Comparaison des paramètres de génération de thrombine à T0 entre les groupes NH et H (groupe NH : n = 10 ; groupe H : n = 13 ; \* p = 0.02)

On observe une différence significative ( $p = 0.02$ ) pour le lag time (figure 9A) et le temps du pic de thrombine (figure 9B). En effet, ces temps sont plus courts dans le groupe H. Par contre, il n'y a pas de différence significative pour le pic de thrombine et l'AUC thrombine (figures 9C et 9D).

La figure 10 présente la comparaison des paramètres de la plasmine entre les groupes NH et H à T0.

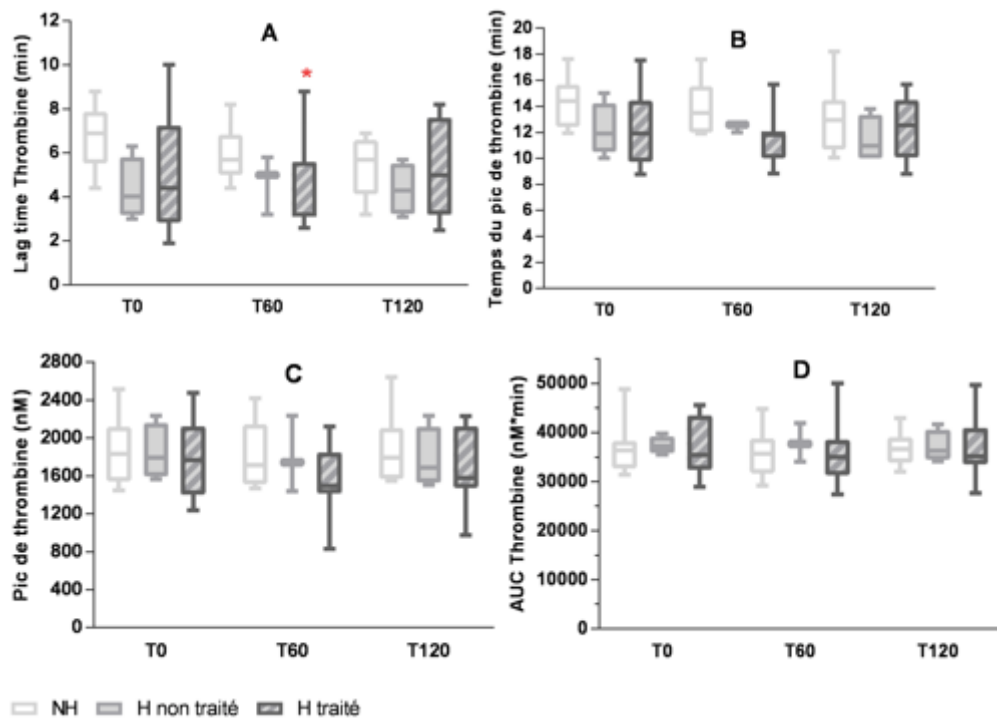


**Figure 10 :** Comparaison des paramètres de génération de plasmine à T0 entre les groupes NH et H (groupe NH : n = 10 ; groupe H : n = 13)

La dispersion est importante, notamment pour le groupe H. Aucune différence significative n'est mise en évidence pour les paramètres de la plasmine à T0 (figure 10).

#### F. Comparaison des paramètres du TGTP à différents temps entre les groupes NH, H non traité et H traité

La figure 11 présente la comparaison des paramètres de la thrombine entre les groupes NH, H non traité et H traité, à T0, T60 et T120. En raison de son très faible effectif, le groupe H non traité (n = 4) n'est présenté qu'à titre indicatif. Par conséquent, nous avons comparé le groupe H T au groupe NH.

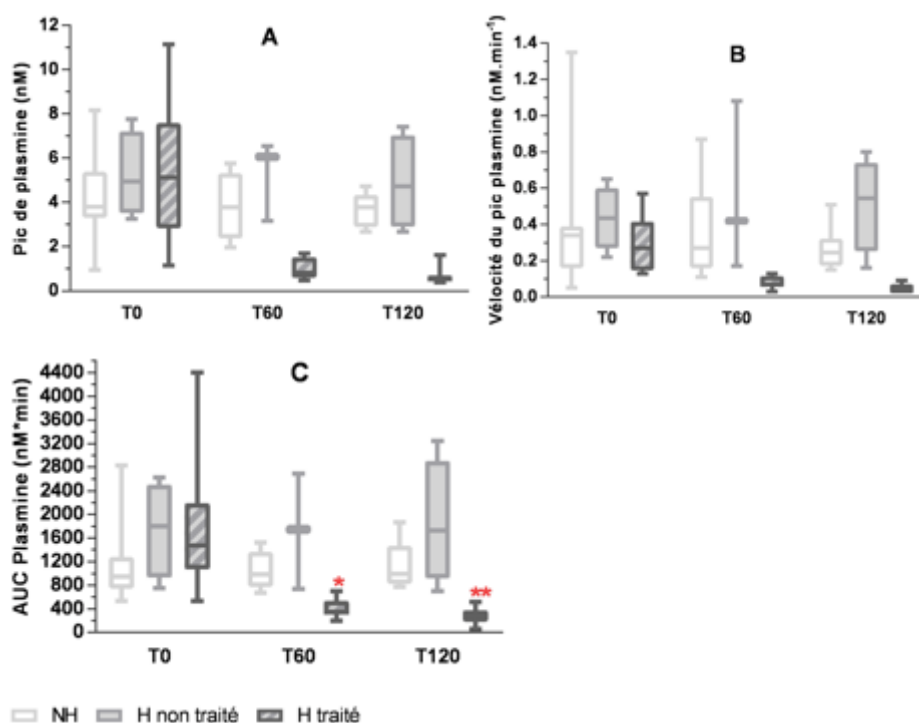


**Figure 11 :** Comparaison intergroupe des paramètres de thrombine au cours du temps (\* p = 0.02)

On n'observe aucune différence statistiquement significative entre les groupes NH et H traité, hormis pour le lag time à T60 (p = 0.03). Celui-ci est plus court dans le groupe H traité (figure 11A).

La comparaison des paramètres de la plasmine est présentée dans la figure 12.





**Figure 12 :** Comparaison intergroupe des paramètres de plasmine au cours du temps (\*AUC plasmine à T60 groupe H traité versus groupe NH :  $p = 0.0002$ , \*\*AUC plasmine à T120 groupe H traité versus groupe NH :  $p < 0.0001$ )

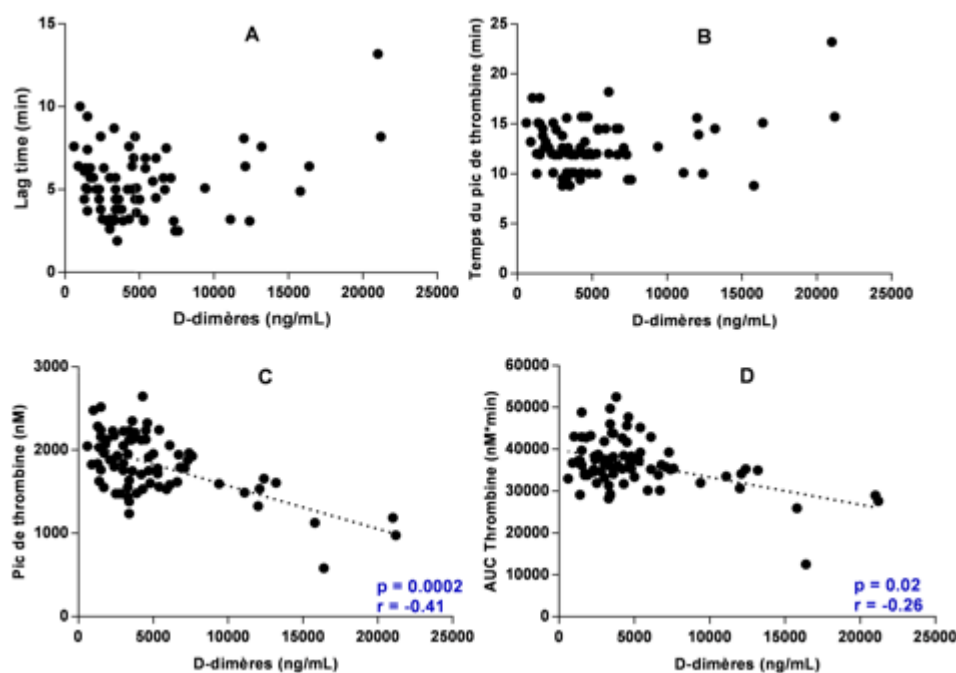
Pour les patientes traitées, il n'y a pas de pic de plasmine mesurable à T60 et T120 en raison de l'inhibition de la génération de plasmine. Nous avons toutefois mesuré arbitrairement le pic de plasmine (et sa vélocité) et le temps de lyse pour ces temps afin d'estimer l'AUC plasmine. Les valeurs du pic de plasmine (et de sa vélocité) et du temps de lyse ne sont donc pas à prendre en compte pour les T60 et T120.

A T0, on n'observe aucune différence significative entre les groupes H traité et NH et pour aucun des paramètres de la plasmine (figures 12A à 12C). Pour les temps T60 et T120, seule l'AUC plasmine est comparée entre les groupes H traité et NH : on note une différence statistiquement significative à T60 ( $p = 0.0002$ ) et à T120 ( $p < 0.0001$ ), traduisant un AUC plasmine plus faible dans le groupe H traité (figure 12C).

## G. Corrélation entre paramètres du TGTP et D-dimères

### a) Tout groupe confondu

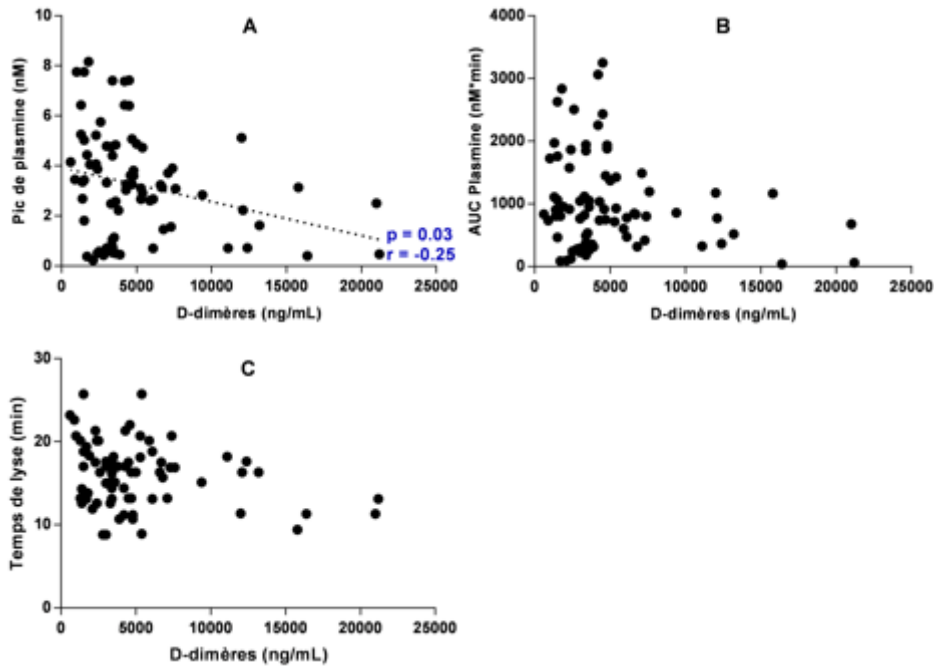
La figure 13 illustre les corrélations entre les paramètres de thrombine et les D-dimères, tout groupe et tout temps confondus.



**Figure 13 :** Corrélation entre les paramètres de génération de thrombine et les D-dimères tout groupe confondu (nombre de paires de données  $n = 77$ )

Il existe une corrélation négative et statistiquement significative entre les D-dimères et le pic de thrombine ( $p = 0.0002$ ,  $r = -0.41$ ) et l'AUC thrombine ( $p = 0.02$ ,  $r = -0.26$ ) : plus le pic et l'AUC thrombine diminuent, plus les D-dimères augmentent (figures 13C et 13D). Il n'y a pas de relation statistiquement significative avec le lag time et le temps du pic de thrombine (figure 13A et 13B).

La figure 14 montre les corrélations retrouvées entre les paramètres de la plasmine et les D-dimères (tout groupe confondu et tout temps confondu).



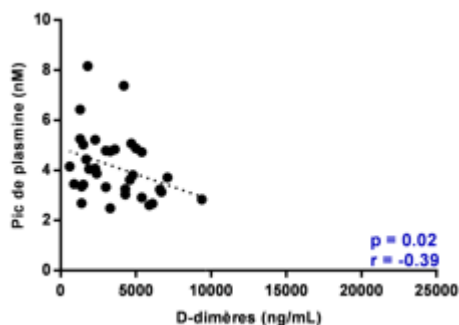
**Figure 14 :** Corrélation entre les paramètres de génération de plasmine et les D-dimères tout groupe confondu ( $n = 77$ )

En ce qui concerne les paramètres de plasmine, seul le pic de plasmine est statistiquement corrélé avec les D-dimères ( $p = 0.03$ ,  $r = -0.25$ ) : plus le pic de plasmine diminue, plus les D-dimères augmentent (figure 14A).

### b) Dans chaque groupe

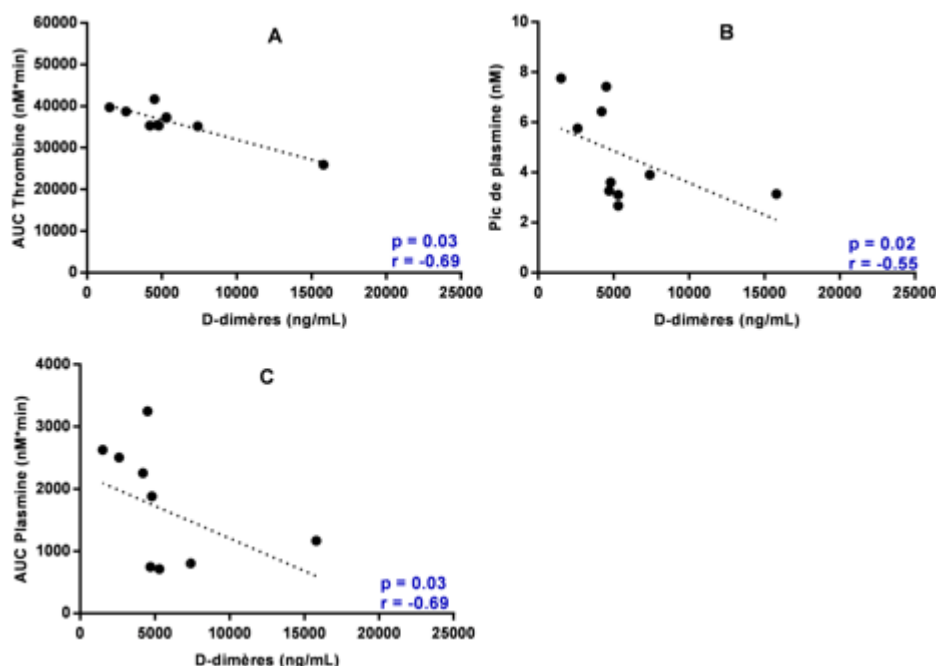
Des tests de corrélation entre les paramètres de plasmine et les D-dimères ont également été faits dans chaque groupe. Seuls les résultats statistiquement significatifs sont présentés.

Pour le groupe NH, il n'y a pas de corrélation entre les paramètres du TGTP et les D-dimères, excepté pour le pic de plasmine ( $p = 0.02$  et  $r = -0.39$ ) (figure 15).



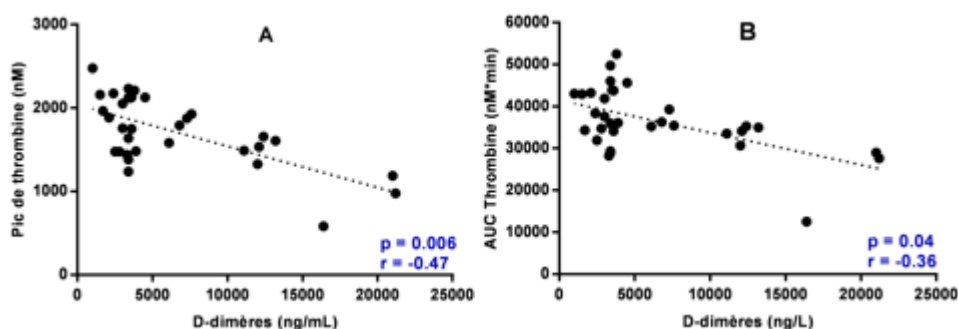
**Figure 15 :** Paramètres du TGTP corrélés avec les D-dimères dans le groupe NH ( $n = 34$ )

Pour le groupe H non traité, on note une corrélation inverse et statistiquement significative entre les D-dimères et l'AUC thrombine ( $p = 0.03$ ,  $r = -0.69$ ) (figure 16A). Il existe également une corrélation négative statistiquement significative avec le pic de plasmine ( $p = 0.02$  et  $r = -0.55$ ) et l'AUC plasmine ( $p = 0.03$ ,  $r = -0.69$ ) (figures 16B et 16C).



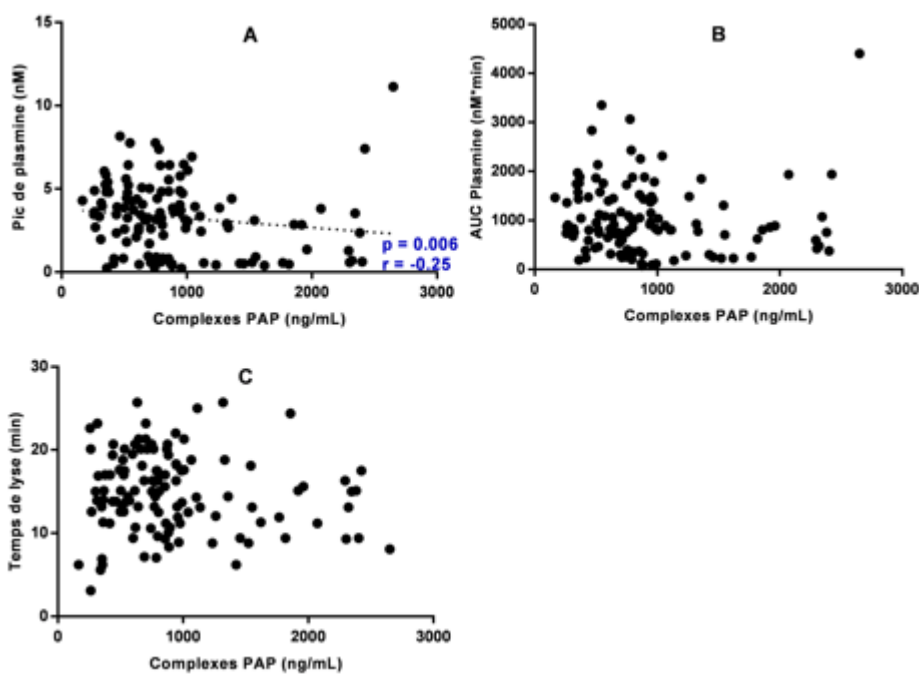
**Figure 16 :** Paramètres du TGTP corrélés avec les D-dimères dans le groupe H non traité ( $n = 10$ )

Pour le groupe H traité, il existe une corrélation statistiquement significative avec le pic de thrombine ( $p = 0.006$ ,  $r = -0.47$ ) et l'AUC thrombine ( $p = 0.04$  et  $r = -0.36$ ) (figures 17 A et 17B). Les paramètres de la plasmine ne sont pas corrélés de façon significative pour ce groupe.



**Figure 17 :** Paramètres du TGTP corrélés avec les D-dimères dans le groupe H traité ( $n = 33$ )

## H. Corrélation entre paramètres de génération de plasmine et complexes PAP



**Figure 18 :** Corrélation entre les paramètres de génération de plasmine et les complexes PAP tout groupe confondu (n=120)

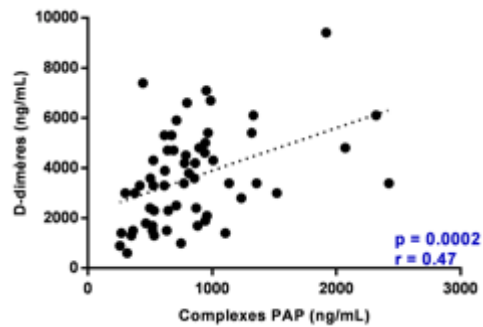
Tout groupe confondu, il est mis en évidence une corrélation faible entre les complexes PAP et le pic de plasmine ( $p = 0.006$  et  $r = -0.25$ ) (figure 18A). Cette corrélation est statistiquement significative et traduit une relation inverse entre ceux-ci : plus les complexes PAP augmentent, plus le pic de plasmine diminue.

En revanche, dans chaque groupe, il n'y a aucune corrélation entre les paramètres de plasmine et les complexes PAP (résultats non présentés).

## I. Corrélation entre complexes PAP et D-dimères

### a) Tout groupe confondu

La figure 19 montre les corrélations entre complexes PAP et D-dimères, tout groupe confondu et tout temps confondu.

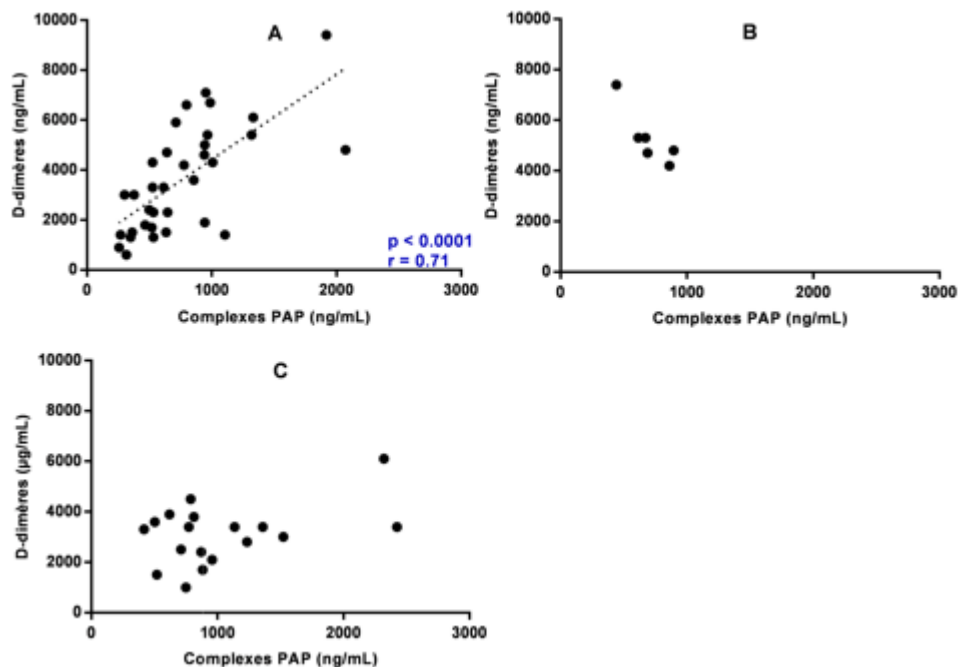


**Figure 19 :** Corrélation entre les complexes PAP et les D-dimères tout groupe confondu (n = 58)

Tout groupe confondu, on note une corrélation statistiquement significative ( $p = 0.0002$ ,  $r = 0.47$ ) : plus les complexes PAP augmentent, plus les D-dimères augmentent (figure 19).

### b) Dans chaque groupe

Les corrélations entre complexes PAP et D-dimères dans chaque groupe sont illustrées dans la figure 20.

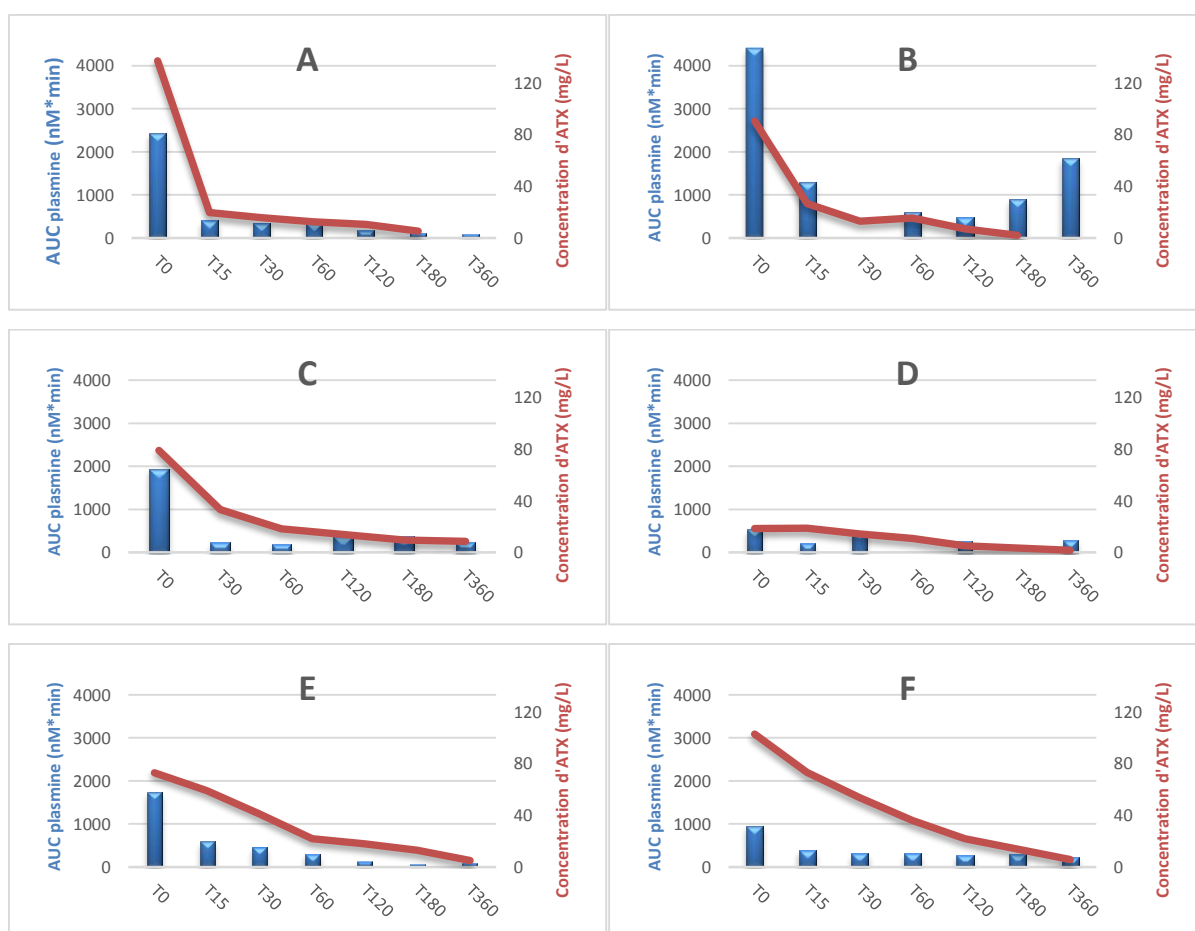


**Figure 20 :** Corrélation des complexes PAP avec les D-dimères dans chaque groupe (A : groupe NH, n = 34 ; B : groupe H non traité, n = 6 ; C : groupe H traité, n = 18)

La corrélation entre les complexes PAP et les D-dimères est observée de la même manière dans le groupe NH ( $p < 0.0001$ ,  $r = 0.71$ ) (figure 20A). Il n'y a pas de corrélation statistiquement significative dans le groupe H non traité (figure 20B), ni dans le groupe H traité (figure 20C).

## J. Corrélation entre génération de plasmine et concentration plasmatique d'ATX (groupe H traité)

La figure 21 représente l'évolution de l'AUC plasmine (représentant la quantité de plasmine générée) dans le temps par rapport à la concentration plasmatique d'ATX chez des patientes ayant reçu 0.5 g (figures 21A et 21B), 1 g (figures 21C et 21D) ou 2 g d'ATX (figures 21E et 21F).



**Figure 21 : Evolution dans le temps de l'AUC plasmine par rapport à la concentration plasmatique d'ATX chez 6 patientes traitées** (A et B : patientes 20 et 19 du groupe TXA0.5 ; C et D : patientes 24 et 25 du groupe TXA1 ; E et F : patientes 12 et 17 du groupe TXA2)

On observe une diminution de l'AUC plasmine dès le T15 pour l'ensemble des patientes. L'AUC plasmine ne remonte pas dans le temps, même si la concentration plasmatique d'ATX diminue jusqu'à devenir inférieure à 10 mg/L à T360. On note toutefois une exception pour la patiente 19 du groupe TXA0.5 (figure 21B) qui présente une réascension de l'AUC plasmine dès le T180. Cette patiente a également la particularité de présenter une capacité de génération de plasmine très élevée à T0 contrairement aux autres (AUC plasmine > 4000 nM\*min à T0).



## DISCUSSION

L'étude TRACES pilote, menée à la maternité de Jeanne de Flandre du CHRU de Lille, a permis de valider la faisabilité d'une étude multicentrique de plus grande ampleur. En effet, pour que la future étude TRACES soit menée dans les meilleures conditions, il a fallu mettre en place toute une logistique, du côté des soignants comme du côté du laboratoire. En raison de l'urgence que représente l'HPP et du nombre conséquent de temps de prélèvement, il a fallu organiser le circuit de prélèvement de la façon la plus pratique et simple possible pour les sages-femmes. Un travail important a été réalisé en amont en collaboration avec les chargés de clientèle du Centre de Biologie Pathologie pour mettre en place une prescription connectée (bilans types par temps enregistrés sur Cirus). Des tubes de couleurs différentes pour chaque temps ont également été mis à disposition pour améliorer le visuel et limiter les erreurs de prélèvement. Les fiches d'inclusion cliniques et biologiques ont été améliorées au cours de l'étude : mise en place d'un code couleur correspondant à celui des tubes, suppression des bilans « soins courants » aux T15, T60 et T180 jugés inutiles, ... En ce qui concerne l'acheminement des tubes, il a été constaté que la gestion différente selon le type de tube (prélèvements « soins courants » redonnés au RTE, prélèvements pour bilans spécifiques enregistrés par le laboratoire d'hémostase, prélèvements pour la toxicologie envoyés à part) était compliquée et source d'erreurs. Il a donc été convenu, pour le protocole TRACES, que les bilans « soins courants » seraient envoyés par le TAL et suivraient le circuit classique. Le tube citraté réservé au bilan de coagulation ne sera pas congelé comme dans l'étude pilote. Quant aux tubes réservés aux « bilans spécifiques » du protocole (TGTP, complexes PAP et dosages d'ATX), ils seront tous envoyés par le TAL, dans une pochette TRACES dédiée et transmise ensuite au laboratoire d'hémostase. Les tubes destinés aux dosages spécifiques d'hémostase seront enregistrés avec un numéro d'anonymat (numéro d'inclusion et initiales de la patiente, inscrits sur la fiche d'inclusion clinique) et l'unité fonctionnelle d'hémostase spécialisée, puis préparés et congelés comme pour le protocole pilote. Les tubes pour le dosage d'ATX seront transmis au laboratoire de toxicologie après réception

de tous les temps et après appel tracé du technicien d'hémostase à celui de toxicologie.

L'étude TRACES pilote a permis au laboratoire de toxicologie de développer et valider la technique de dosage de l'ATX dans le sang et les urines, mais aussi d'étudier la pharmacocinétique de l'ATX dans ce contexte clinique. Cela a permis de supprimer les temps T15 et T180 pour l'étude TRACES, jugés non indispensables au suivi pharmaco-biologique des patientes traitées par ATX. Par ailleurs, la diminution du nombre de temps facilitera le suivi clinico-biologique et limitera la spoliation sanguine chez des patientes le plus souvent anémiées.

En ce qui concerne les tests de coagulation classiques, nous aurions souhaité comparer, dans un premier temps, le groupe H non traité au groupe NH, puis dans un second temps, le groupe H non traité au groupe H traité. Le très faible effectif du groupe H non traité ( $n = 4$ , avec pour certains paramètres et temps deux valeurs seulement), comparé aux groupes NH et H traité, ne nous a pas permis d'en exploiter les données. Nous avons donc comparé les résultats entre les groupes NH et H traité. Les D-dimères sont significativement plus élevés à l'inclusion dans le groupe H traité, mais il n'y a pas de différence statistiquement significative aux temps suivants. Ceci pourrait témoigner de l'évolution favorable sous ATX puisque les taux à T360 sont comparables. Dans l'étude EXADELI, il avait été montré une atténuation de l'augmentation du taux de D-dimères chez les patientes présentant une HPP et traitées précocement par ATX (33). Le fibrinogène et le facteur II sont plus bas dans le groupe H traité et ce de façon statistiquement significative, plus particulièrement à T120 pour le facteur II. Bien que les résultats soient non significatifs, le facteur V est plus bas et les monomères sont plus élevés dans le groupe H traité ; il serait donc intéressant de réévaluer ceux-ci dans l'étude TRACES. Finalement, nous observons les mêmes tendances que dans l'étude EXADELI, ce qui semblerait être en faveur de l'atténuation de l'augmentation des D-dimères dans l'HPP traité précocement par ATX. Avec l'étude TRACES, l'effectif du groupe H non traité sera assez important et statistiquement exploitable pour appuyer nos résultats.

En ce qui concerne le test de génération simultanée de thrombine et de plasmine en un puits, cette étude était l'occasion, d'une part, de perfectionner la

technique qui est délicate ; d'autre part, d'évaluer la pertinence du TGTP pour l'évaluation du statut hémostatique des différentes patientes et le suivi du traitement par ATX au cours des césariennes hémorragiques.

La répétabilité a été réalisée et comparée à celle effectuée lors de l'évaluation du TGTP dans les déficits en FXI (31). Les CV sont plus faibles sauf pour le pic de plasmine (annexe 11). La reproductibilité a également été comparée, et là encore les CV sont plus bas et pour tous les paramètres (annexe 12). L'amélioration de la répétabilité et de la reproductibilité de la technique témoigne d'une meilleure maîtrise de celle-ci.

Concernant l'étude TRACES pilote à proprement parler, nous avons comparé dans un premier temps les groupes en dehors de tout traitement par ATX. Nous avons d'abord confronté les profils du groupe NH à T0 (15 minutes en moyenne après l'incision) à ceux de femmes en âge de procréer mais non enceintes (NE). On observe une génération de thrombine significativement plus forte chez le groupe NH (pic et AUC thrombine plus élevés). Ceci reflète l'état d'hypercoagulabilité des parturientes en fin de grossesse (8). Par contre, concernant les paramètres de plasmine, les patientes du groupe NH présentent un AUC plasmine plus faible que celles du groupe NE. D'après les travaux de S.C.L. Koh, dans les grossesses normales, on observe dans les 30 minutes suivant la délivrance une libération de t-PA dans la circulation maternelle, une diminution assez rapide du PAI-1, mais une quantité de PAI-2 qui reste encore très élevée. Le rôle du PAI-2 est ici crucial car il facilite le processus hémostatique au niveau des vaisseaux placentaires dans les minutes qui suivent la délivrance. Chez les femmes non enceintes, les taux de t-PA et de PAI-1 sont plus bas que chez les femmes au moment de la délivrance, et le PAI-2 est indétectable (34). On peut alors imaginer que la capacité à générer de la plasmine soit moins inhibée chez la femme non enceinte que chez la parturiente dans les minutes suivant la délivrance. Ceci pourrait peut-être expliquer la différence observée pour l'AUC plasmine (plus élevé chez les non enceintes, en raison de l'absence de PAI-2). Il serait intéressant de vérifier cela en dosant le PAI-1 et le PAI-2 pour certaines patientes du protocole TRACES.

Nous avons ensuite comparé les profils de génération de thrombine et de plasmine à T0 des groupes NH et H (traité ou non car avant injection du traitement).

Les seuls paramètres pour lesquels une différence statistiquement significative est mise en évidence sont le lag time et le temps du pic de thrombine, qui sont plus courts dans le groupe H. Les patientes du groupe NH étaient incluses quand le saignement était contrôlé et inférieur à 800 mL, dans les 15 minutes en moyenne suivant l'incision ; celles du groupe H l'étaient alors que l'hémorragie était encore active et dépassait les 800 mL, en moyenne 30 minutes après l'incision. De plus, comme vu précédemment, on observe des variations physiologiques importantes de certains paramètres d'hémostase dans les instants suivant la délivrance (34). Il se peut donc que l'équilibre hémostatique 15 minutes après incision soit différent de celui à 30 minutes de l'incision. Ainsi, le débit de saignement encore élevé chez les patientes du groupe H à T0 et cette différence de délai incision/inclusion entre les deux groupes, pourraient peut-être expliquer le raccourcissement du lag time et du temps du pic de thrombine dans le groupe H au moment de l'inclusion. L'étude TRACES nous permettra de vérifier cette observation.

Dans un second temps, nous avons étudié l'effet de l'ATX sur la génération de thrombine et de plasmine. L'étude *in vitro*, réalisée grâce à la gamme d'ATX testée sur un même pool témoin, montre l'influence dose-dépendante de la concentration plasmatique d'ATX sur la génération de plasmine. En effet, plus la concentration d'ATX est élevée, plus la génération de plasmine est inhibée. D'ailleurs, on peut noter que la génération de plasmine est effondrée à partir d'une concentration proche de 2 mg/L, ce qui est beaucoup plus faible que les concentrations efficaces attendues *in vivo* (de l'ordre de 10 à 15 mg/L) (23). Les profils de génération de thrombine n'étaient par contre pas influencés par les variations de concentration d'ATX. Nous avons ensuite voulu voir si ces observations *in vitro* pouvaient être transposées *in vivo*. Chez les patientes du groupe H traité, on note également un effondrement de la génération de plasmine et ce quelle que soit la dose d'ATX (écrasement du pic de plasmine et de sa vitesse, effondrement de l'AUC plasmine dès le T30). En revanche, l'effet-dose de l'ATX est plus difficile à démontrer *in vivo*. Premièrement, il existe une variation interindividuelle non négligeable dans la génération de plasmine à T0 (AUC plasmine entre 500 et 4400 nM\*min environ), ce qui complique l'évaluation de l'impact de l'ATX sur la génération de plasmine. Deuxièmement, l'étude *in vivo* est aussi cinétique : or, pour une même dose d'ATX, on remarque que la vitesse d'inhibition de la génération de plasmine est variable : elle peut être très progressive pour certaines patientes et plus rapide pour d'autres.

Troisièmement, on peut remarquer que les concentrations plasmatiques d'ATX mesurées chez les patientes traitées ne sont pas proportionnelles à la dose reçue : par exemple, les deux patientes ayant reçu une dose de 0.5 g ont un dosage plasmatique d'ATX à l'inclusion supérieur à 80 mg/L, alors que certaines patientes ayant reçu 1 ou 2 g ont une concentration bien inférieure. Cela pourrait être dû à l'hémodilution engendrée par la correction de l'hypovolémie, ou encore à une variabilité interindividuelle dans la biodisponibilité de l'ATX. Il y a certainement d'autres éléments à prendre en considération pour expliquer ces différences observées *in vivo* (étiologie de l'HPP, intensité du syndrome inflammatoire, ...). On peut toutefois noter que les concentrations plasmatiques minimales pour lesquelles on observe une abolition de la génération de plasmine avoisinent les 5 mg/L à T120 et les 1.5 mg/L à T360, ce qui est en accord avec ce qui est observé *in vitro*.

Nous avons étudié la relation entre les paramètres du TGTP, les D-dimères et les complexes PAP. Nous avons dans un premier temps recherché une corrélation en regroupant l'ensemble des patientes et tous les temps d'étude. On observe une corrélation négative faible entre le pic de plasmine et les complexes PAP. Cette corrélation n'est pas retrouvée lorsque les groupes sont étudiés séparément. En ce qui concerne les D-dimères, on observe une corrélation négative statistiquement significative avec l'AUC thrombine, retrouvée également dans les groupes H non traité et traité, mais non significative dans le groupe NH. Les taux croissants de D-dimères témoignent d'un processus fibrinolytique actif faisant suite à une activation de la coagulation plasmatique qui pourrait expliquer la diminution de la capacité des patientes à générer de la thrombine. Par ailleurs, nous avons retrouvé une corrélation positive statistiquement significative entre le taux de D-dimères et les complexes PAP, tous groupes confondus et dans le groupe NH (mais non significative dans les groupes H non traité et traité). Cela n'a rien d'étonnant, ces deux paramètres étant des marqueurs indirects de la fibrinolyse.

Enfin, nous avons essayé de voir s'il y avait une relation entre la capacité de génération de thrombine et de plasmine et les particularités cliniques des patientes. On pourrait effectivement s'attendre à ce que celles qui ont une capacité de génération de plasmine importante soient plus à risque d'HPP. Cela a pourtant été difficile à évaluer en raison du faible effectif et de l'hétérogénéité des tableaux

cliniques des patientes incluses. Nous avons choisi d'étudier les cinq patientes qui présentaient un pic de plasmine  $> 7$  nM à T0 (soit au moins deux fois la valeur moyenne du pic dans le groupe NH) : la patiente 6 du groupe NH, la patiente 15 du groupe H non traité, la patiente 19 du groupe TXA0.5, la patiente 24 du groupe TXA1 et la patiente 12 du groupe TXA2. La patiente 6 du groupe NH avait des pics de thrombine et de plasmine élevés, n'avait aucune pathologie de grossesse et n'a perdu que 325 mL de sang. La patiente 12 du groupe TXA2 avait des valeurs de pics similaires mais présentait une prééclampsie sévère sans CIVD biologique, et a eu une hémorragie chiffrée à 1200 mL. La patiente 15 du groupe H non traité avait approximativement les mêmes valeurs de pics. Toutefois, elle a présenté une atonie et a perdu 1700 mL de sang. Ces trois patientes avaient des profils de génération de thrombine et de plasmine similaires, mais c'est certainement la présence d'un facteur de risque d'HPP chez les patientes 12 et 15 et pas chez la patiente 6, qui explique l'issue différente. La patiente 19 présentait le pic de plasmine le plus élevé avec en contraste un pic de thrombine faible. Pourtant, le volume des pertes sanguines de cette patiente n'est pas le plus important (1200 mL). La prise en charge étiologique rapide (curetage et suture du col utérin) a permis de supprimer la cause du saignement, ce qui pourrait expliquer pourquoi cette patiente n'a pas présenté une HPP trop abondante. La patiente 24 par contre, avait également un pic de plasmine élevé et un pic de thrombine faible, mais a perdu 2700 mL de sang. Elle présentait une atonie utérine qui est un facteur de risque majeur d'HPP (5). A l'inverse de la patiente 19, la prise en charge étiologique de l'hémorragie a été moins radicale car médicamenteuse (administration d'utérotoniques), ce qui pourrait expliquer pourquoi le saignement a été plus important chez cette patiente. Nous pouvons constater qu'il y a probablement un risque plus élevé d'HPP quand la capacité de génération de plasmine est élevée et quand le ratio génération de thrombine/génération de plasmine penche en faveur de la fibrinolyse. Il serait intéressant d'évaluer l'équilibre entre génération de thrombine et génération de plasmine à l'aide d'un ratio pic de thrombine/pic de plasmine par exemple. Toutefois, c'est essentiellement la présence ou non de facteurs de risque d'HPP ainsi que la rapidité et l'efficacité de la prise en charge étiologique qui semble préjuger de l'importance de l'hémorragie. Il serait donc intéressant, dans l'étude TRACES, de confronter ces données cliniques au ratio pic de thrombine/pic de plasmine.

Le test de génération simultanée de thrombine et de plasmine est un test opérateur-dépendant qui nécessite une maîtrise rigoureuse de la technique, en raison des très faibles quantités de réactifs manipulées.

Il ne tient pas compte de certains acteurs importants de l'hémostase, tels que les plaquettes, l'endothélium et les leucocytes. Il serait donc utile de développer le TGTP sur sang total. Des équipes ont tenté d'adapter le test de génération de thrombine sur sang total, mais les résultats sont insuffisants (35).

Le TGTP présente l'inconvénient de ne pas pouvoir être utilisé en routine, notamment en situation d'urgence, car c'est un test coûteux (50 euros par patient environ) et long (temps d'analyse : 70 minutes).

Le faible effectif de chaque groupe, plus particulièrement du groupe H non traité, ne nous a pas permis d'exploiter les données biologiques (TGTP et paramètres de coagulation) dans leur totalité. Nous aurions notamment souhaité comparer le groupe H non traité au groupe NH puis au groupe H traité. Nous devons tout de même rappeler que, cette étude pilote avait pour but principal, non pas d'évaluer l'efficacité de l'ATX dans le traitement des césariennes hémorragiques, mais d'évaluer la faisabilité d'une étude de plus grande ampleur, qui elle le permettrait.

L'effectif de l'étude TRACES a d'ailleurs été calculé de sorte que sa puissance soit suffisante pour mettre en évidence une différence significative. Au total, il est prévu que 390 patientes soient incluses : 48 dans un groupe témoin NH (hémorragie < 800 mL) et 342 dans un groupe H (hémorragie > 800 mL). Ce dernier sera subdivisé en trois groupes selon la dose d'ATX reçue : TXA0 (0 g d'ATX), TXA0.5 (0.5 g d'ATX) et TXA1 (1 g d'ATX). Les groupes TXA0, TXA0.5 et TXA1 seront chacun composés de 114 patientes pour l'étude clinique. Parmi ces 114 patientes, 48 feront également partie d'une « sous-étude » pharmaco-biologique. Cet effectif permettra, entre autres, une meilleure exploitation des données relatives aux tests biologiques, que ce soit les tests d'hémostase de routine (D-dimères notamment), le TGTP, les complexes PAP, ou les dosages d'ATX. Par ailleurs, les dosages de l'antithrombine et des complexes TAT seront ajoutés dans l'étude TRACES pour compléter le bilan des patientes. Enfin, confronter les données cliniques des patientes aux données du TGTP, en particulier au ratio pic de thrombine/pic de plasmine, pourrait aider à comprendre pourquoi, pour une même situation initiale à risque d'HPP, les patientes présentent des évolutions différentes.

## CONCLUSION

Cette étude pilote a été une étape préliminaire indispensable à l'organisation de l'étude TRACES. Elle a permis d'améliorer le circuit d'analyse, du pré-analytique au post-analytique, afin que l'inclusion et le suivi des patientes se fassent dans les meilleures conditions. Avec cette étude pilote, le laboratoire de toxicologie a également pu mettre en place et valider la technique de dosage d'ATX. Enfin, cette étude pilote était l'occasion d'évaluer l'intérêt du TGTP dans la description de l'hémostase chez les parturientes et pour l'évaluation du suivi du traitement par ATX au cours des césariennes hémorragiques.

L'étude pharmaco-biologique de l'ATX, utilisé comme agent antifibrinolytique dans les césariennes hémorragiques, sera poursuivie dans le protocole TRACES et pourra contribuer à déterminer la dose minimale efficace d'ATX pour réduire les pertes sanguines.

Il serait également intéressant d'évaluer chez ces patientes la corrélation entre l'équilibre thrombine/plasmine, les étiologies d'HPP présentées, l'évolution de l'hémorragie et l'impact du traitement par ATX.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

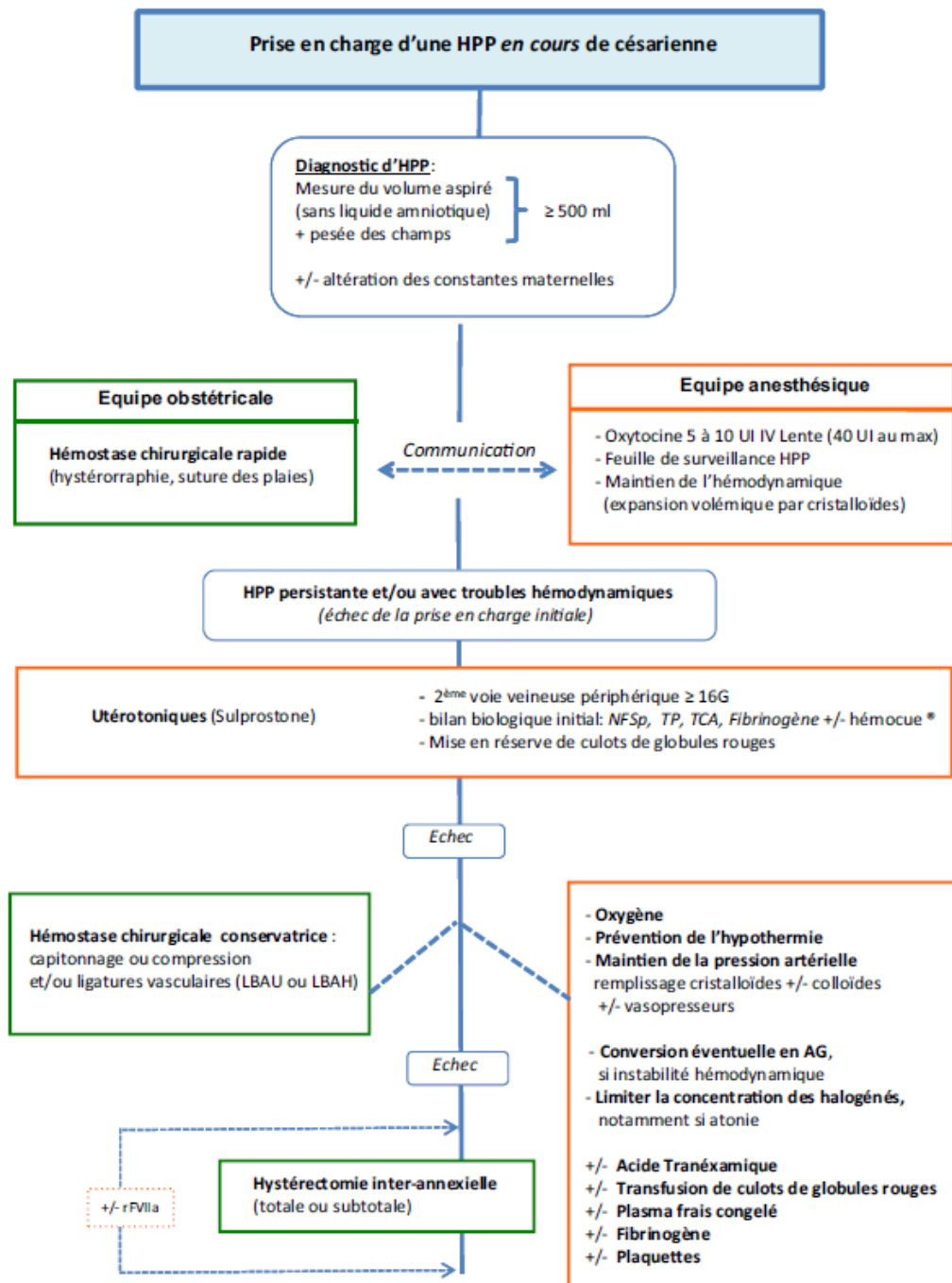
1. Sentilhes L, Vayssière C, Mercier FJ, Aya AG, Bayoumeu F, Bonnet M-P, et al. [Postpartum hemorrhage: Guidelines for clinical practice - Text of the Guidelines (short text)]. *J Gynécologie Obstétrique Biol Reprod*. 2014 Dec;43(10):1170–9.
2. WHO Recommendations for the Prevention and Treatment of Postpartum Haemorrhage [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2012 [cited 2016 Aug 8]. (WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK131942/>
3. Hogan MC, Foreman KJ, Naghavi M, Ahn SY, Wang M, Makela SM, et al. Maternal mortality for 181 countries, 1980-2008: a systematic analysis of progress towards Millennium Development Goal 5. *Lancet Lond Engl*. 2010 May 8;375(9726):1609–23.
4. Saucedo M, Deneux-Tharaux C, Bouvier-Colle M-H, French National Experts Committee on Maternal Mortality. Ten years of confidential inquiries into maternal deaths in France, 1998-2007. *Obstet Gynecol*. 2013 Oct;122(4):752–60.
5. Deneux-Tharaux C, Bonnet M-P, Tort J. [Epidemiology of post-partum haemorrhage]. *J Gynécologie Obstétrique Biol Reprod*. 2014 Dec;43(10):936–50.
6. Solomon C, Collis RE, Collins PW. Haemostatic monitoring during postpartum haemorrhage and implications for management. *Br J Anaesth*. 2012 Dec 1;109(6):851–63.
7. Durier M, Grynberg M, Charles C, Gabriel R. Délivrance normale et pathologique. *EMC - Obstétrique*. 2010 Jan;5(1):1–17.
8. Katz D, Beilin Y. Disorders of coagulation in pregnancy. Hemmings HC, editor. *Br J Anaesth*. 2015 Dec;115(suppl 2):ii75-ii88.
9. Charbit B, Mandelbrot L, Samain E, Baron G, Haddaoui B, Keita H, et al. The decrease of fibrinogen is an early predictor of the severity of postpartum hemorrhage. *J Thromb Haemost*. 2007 Feb;5(2):266–73.
10. Olson JD. D-dimer. In: *Advances in Clinical Chemistry* [Internet]. Elsevier; 2015 [cited 2017 Jan 12]. p. 1–46. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065242314000407>
11. Fourrier F. Fibrinolyse et fibrinogénolyse en réanimation Fibrinolysis and fibrinogenolysis in intensive care. *Réanimation*. 2002 Jul;11(5):341–8.

12. Ducloy-Bouthors A-S, Jude B, Duhamel A, Broisin F, Huissoud C, Keita-Meyer H, et al. High-dose tranexamic acid reduces blood loss in postpartum haemorrhage. *Crit Care Lond Engl*. 2011;15(2):R117.
13. Tengborn L, Blombäck M, Berntorp E. Tranexamic acid – an old drug still going strong and making a revival. *Thromb Res*. 2015 Feb;135(2):231–42.
14. Estcourt LJ, Desborough M, Brunskill SJ, Doree C, Hopewell S, Murphy MF, et al. Antifibrinolytics (lysine analogues) for the prevention of bleeding in people with haematological disorders. In: The Cochrane Collaboration, editor. *Cochrane Database of Systematic Reviews* [Internet]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2016 [cited 2017 Jan 8]. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD009733.pub3>
15. CRASH-2 trial collaborators, Shakur H, Roberts I, Bautista R, Caballero J, Coats T, et al. Effects of tranexamic acid on death, vascular occlusive events, and blood transfusion in trauma patients with significant haemorrhage (CRASH-2): a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Lond Engl*. 2010 Jul 3;376(9734):23–32.
16. Karski JM, Teasdale SJ, Norman P, Carroll J, VanKessel K, Wong P, et al. Prevention of bleeding after cardiopulmonary bypass with high-dose tranexamic acid. Double-blind, randomized clinical trial. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1995 Sep;110(3):835–42.
17. Jiménez JJ, Iribarren JL, Brouard M, Hernández D, Palmero S, Jiménez A, et al. Safety and effectiveness of two treatment regimes with tranexamic acid to minimize inflammatory response in elective cardiopulmonary bypass patients: a randomized double-blind, dose-dependent, phase IV clinical trial. *J Cardiothorac Surg*. 2011 Oct 14;6:138.
18. Zhou X, Tao L, Li J, Wu L. Do we really need tranexamic acid in total hip arthroplasty? A meta-analysis of nineteen randomized controlled trials. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2013 Jul;133(7):1017–27.
19. Irisson E, Hémon Y, Pauly V, Parratte S, Argenson J-N, Kerbaul F. L'acide tranexamique réduit les pertes sanguines et les coûts transfusionnels de la chirurgie prothétique de première intention de hanche et de genou. *Rev Chir Orthopédique Traumatol*. 2012 Sep;98(5):419–25.
20. Poeran J, Rasul R, Suzuki S, Danninger T, Mazumdar M, Opperer M, et al. Tranexamic acid use and postoperative outcomes in patients undergoing total hip or knee arthroplasty in the United States: retrospective analysis of effectiveness and safety. *BMJ*. 2014;349:g4829.
21. Rosencher N, Ozier Y, Samama CM, Godier A. Tranexamic acid is not expensive, no more thrombotic contraindication, no reason for not using it. *Sang Thromb Vaiss*. 2015;1-2;(1):34–42.
22. Mannucci PM. Hemostatic drugs. *N Engl J Med*. 1998 Jul 23;339(4):245–53.
23. McCormack PL. Tranexamic acid: a review of its use in the treatment of hyperfibrinolysis. *Drugs*. 2012 Mar 26;72(5):585–617.

24. Godier A, Roberts I, Hunt BJ. Tranexamic acid: less bleeding and less thrombosis? *Crit Care*. 2012;16(3):135.
25. Matsumoto T, Nogami K, Shima M. Simultaneous measurement of thrombin and plasmin generation to assess the interplay between coagulation and fibrinolysis. *Thromb Haemost*. 2013 Oct;110(4):761–8.
26. Dargaud Y, Luddington R, Gray E, Lecompte T, Siegemund T, Baglin T, et al. Standardisation of thrombin generation test--which reference plasma for TGT? An international multicentre study. *Thromb Res*. 2010 Apr;125(4):353–6.
27. Berntorp E, Salvagno GL. Standardization and clinical utility of thrombin-generation assays. *Semin Thromb Hemost*. 2008 Oct;34(7):670–82.
28. Simpson ML, Goldenberg NA, Jacobson LJ, Bombardier CG, Hathaway WE, Manco-Johnson MJ. Simultaneous thrombin and plasmin generation capacities in normal and abnormal states of coagulation and fibrinolysis in children and adults. *Thromb Res*. 2011 Apr;127(4):317–23.
29. van Geffen M, Loof A, Lap P, Boezeman J, Laros-van Gorkom BAP, Brons P, et al. A novel hemostasis assay for the simultaneous measurement of coagulation and fibrinolysis. *Hematol Amst Neth*. 2011 Nov;16(6):327–36.
30. Ricard C, Jeanpierre E. Mise au point d'un test de génération simultanée de thrombine et plasmine application en Obstétrique. Université de Lille 2, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille; 2013.
31. Giovannoni S, Jeanpierre E. Intérêt du test de génération de thrombine et plasmine simultanée chez les patients présentant un déficit constitutionnel en Facteur XI. Université de Lille 2, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille; 2015.
32. Delavenne X, Montbel A, Hodin S, Zufferey P, Basset T. Quantification of total and unbound tranexamic acid in human plasma by ultrafiltration liquid chromatography/tandem mass spectrometry: application to pharmacokinetic analysis. *J Pharm Biomed Anal*. 2014 Mar;91:32–6.
33. Ducloy-Bouthors AS, Duhamel A, Kipnis E, Tournoys A, Prado-Dupont A, Elkalioubie A, et al. Postpartum haemorrhage related early increase in D-dimers is inhibited by tranexamic acid: haemostasis parameters of a randomized controlled open labelled trial. *Struys MMRF*, editor. *Br J Anaesth*. 2016 May;116(5):641–8.
34. Koh SCL, Arulkumaran S, Biswas A, Ratnam SS. The Influence of Labor and Placental Separation on Hemostasis in Term Pregnancy. *Clin Appl Thromb*. 1998 Oct;4(4):262–7.
35. van Geffen M, van Heerde WL. Global haemostasis assays, from bench to bedside. *Thromb Res*. 2012 Jun;129(6):681–7.

## ANNEXES

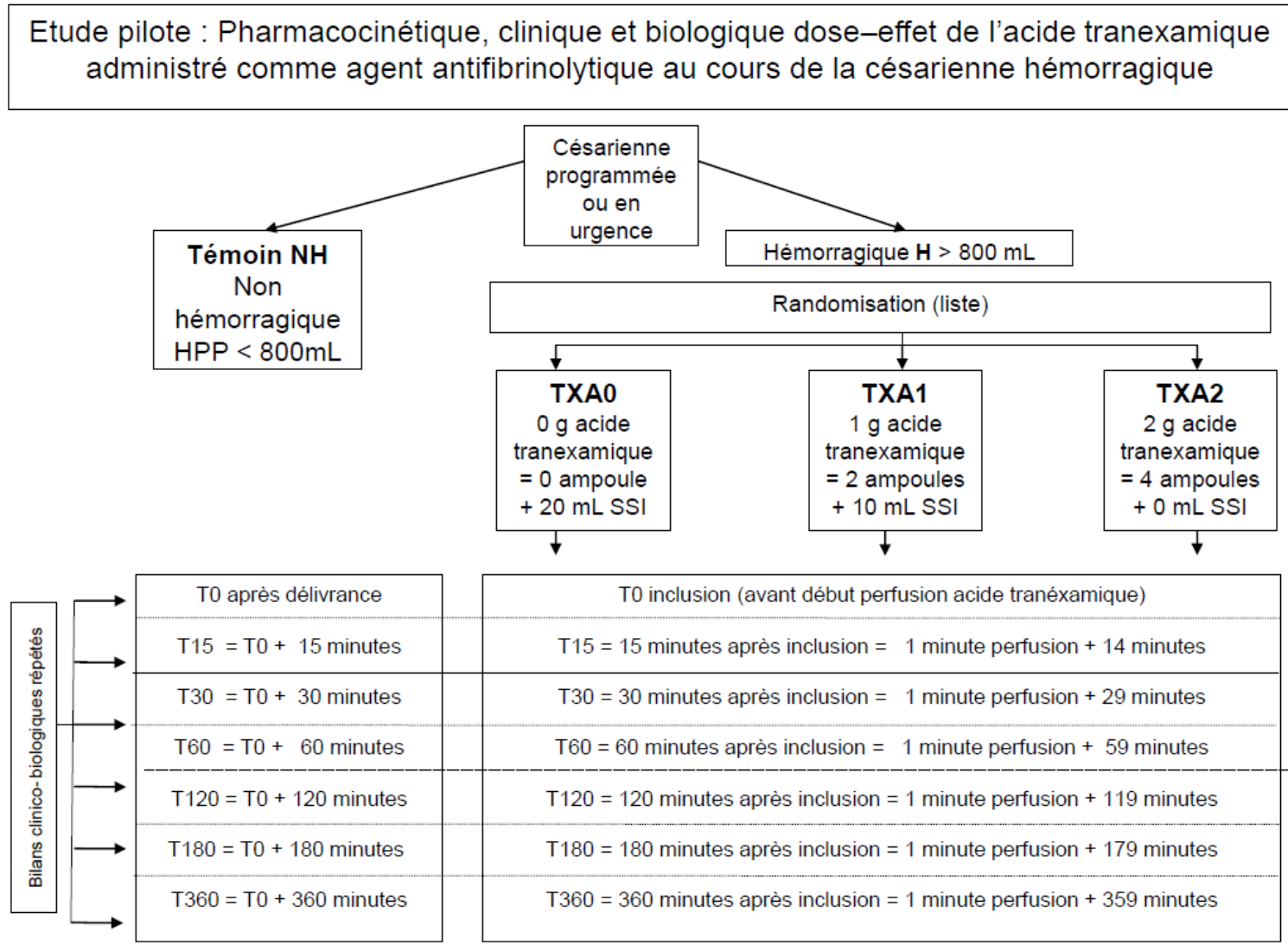
Annexe 1 : Prise en charge de l'HPP en contexte de césarienne  
(algorithme tiré des recommandations pour la pratique clinique du CNGOF (1))



Annexe 2 : Valeurs de référence des paramètres du TGTP, établies à partir de 30 sujets sains sans anomalie de la coagulation (31)

Paramètres étudiés	Thrombine				Plasmine		
	Lag time (min)	Temps du pic (min)	Pic (nM)	AUC (nM*min)	Temps de lyse (min)	Pic (nM)	AUC (nM*min)
<b>Moyenne</b>	10,44	15,89	1304,64	27818,97	7,52	3,29	1619,66
<b>Ecart-type</b>	2,45	3,76	293,62	3841,21	2,36	0,92	551,27
<b>CV (%)</b>	23,43	23,64	22,51	13,81	31,38	28	34,04
<b>Min</b>	4,35	9,48	768,07	22246,44	3,75	1,41	892,81
<b>Max</b>	15,30	23,84	2140,48	38312,10	12,35	5,90	4142,04

Annexe 3 : Déroulement de l'étude



## Annexe 4 : Fiche d'inclusion clinique au protocole TRACES pilote

**PROCOLE TRACES**

**ETP-EPP**

**HEMOSTASE**

2 TUBES CITRATES POUR CHAQUE TEMPS

**SANG**

T0	Yellow
T15	Orange
T30	Red
T60	Dark Red
T120	Olive Green
T180	Dark Green
T360	Blue

Etiquette patient

prescripteur : Bloc obstétrical, Jeanne d'André poste 37517 ou 46616

## Annexe 5 : Fiche d'inclusion biologique au protocole TRACES pilote

<b>FICHE INCLUSION <u>Protocole Traces</u> Et suivi</b>	
<b>UNE BOITE PAR PATIENT</b>	<b>N°</b>
<b>T0</b> (avant perfusion de tracers)  Déjà Enregistré dans Cirrus (étiquette Molis ici)  (Puis congélation selon protocole)	<b>CIVD GTP (NG)</b>
<b>T15</b>  A Enregistrer Id complète, uf 4160, GTP (étiquette Molis ici)  (Puis congélation selon protocole)	<b>GTP</b>
<b>T30</b>  Déjà Enregistré dans Cirrus (étiquette Molis ici)  (Puis congélation selon protocole)	<b>CIVD GTP (NG)</b>
<b>T60</b>  A Enregistrer Id complète, uf 4160, GTP (étiquette Molis ici)  (Puis congélation selon protocole)	<b>GTP</b>
<b>T120</b>  Déjà Enregistré dans Cirrus (étiquette Molis ici)  (Puis congélation selon protocole)	<b>CIVD GTP (NG)</b>
<b>T180</b>  A Enregistrer Id complète, uf 4160, GTP (étiquette Molis ici)  (Puis congélation selon protocole)	<b>GTP</b>
<b>T360</b>  Déjà Enregistré dans Cirrus (étiquette Molis ici)  (Puis congélation selon protocole)	<b>CIVD GTP (NG)</b>



## Annexe 6 : Données du TGTP pour les patientes du groupe NH

Patiente	Temps	Paramètres de Thrombine				Paramètres de Plasmine			
		Lag time	Temps du pic	Pic	AUC	Pic	Vélocité du pic	AUC	Temps de lyse
5	T0	8,7	15,6	1550	31364	4,76	0,37	1120	12,6
	T15	8,2	15,7	1744	35145	4,38	0,43	1397	9,4
	T30	8,2	15,7	1750	36762	5,07	0,43	1449	13,2
	T60	5,7	13,9	1504	35217	5,54	0,63	1524	9,3
	T120	5,7	12,6	1784	35727	3,71	0,28	1487	13,2
	T180	5,7	12,0	1930	37455	6,47	0,57	1784	11,2
	T360	4,4	11,9	1954	33368	4,88	0,29	1373	16,3
6	T0	5,7	12,6	2065	42784	8,16	0,55	2833	13,8
	T15	5,0	12,0	2391	43792	7,76	0,58	3352	13,8
	T30	.	.	.	.	.	.	.	.
	T60	.	.	.	.	.	.	.	.
	T120	.	.	.	.	.	.	.	.
	T180	.	.	.	.	.	.	.	.
	T360	5,0	12,6	2122	42696	7,38	0,51	3063	14,4
7	T0	5,7	13,8	1840	33183	3,33	0,22	763	15,0
	T15	5,6	13,2	1950	34824	3,96	0,25	756	16,9
	T30	5,7	12,6	2225	36543	4,79	0,29	1044	17,0
	T60	5,0	12,0	2099	36131	3,74	0,28	1083	13,9
	T120	.	.	.	.	.	.	.	.
	T180	3,8	10,1	2000	33835	2,83	0,25	970	12,5
	T360	5,0	11,9	1943	30193	3,14	0,20	831	17,5
8	T0	4,4	12,0	2283	36787	6,43	0,32	1109	20,1
	T15	5,0	11,9	2420	36472	4,42	0,22	1094	20,1
	T30	3,8	12,0	2349	38183	4,84	0,29	1053	17,0
	T60	4,4	11,9	2421	36905	5,77	0,32	1146	18,2
	T120	3,2	10,1	2644	38471	3,04	0,15	1036	21,3
	T180	.	.	.	.	.	.	.	.
	T360	.	.	.	.	.	.	.	.
9	T0	7,6	15,7	1530	31745	3,25	0,18	740	17,0
	T15	4,3	12,0	1711	31956	2,11	0,09	652	19,5
	T30	5,5	14,5	1528	30162	2,61	0,12	604	20,1
	T60	5,7	15,1	1537	33697	2,36	0,16	756	15,1
	T120	5,1	12,7	1593	31983	2,84	0,17	860	15,1
	T180	5,7	15,1	1538	32090	6,11	0,34	798	17,6
	T360	5,7	14,5	1616	33860	3,24	0,22	850	16,3
10	T0	6,4	13,2	1825	36708	3,45	0,15	735	22,6
	T15	5,7	12,5	1854	38009	4,89	0,23	873	20,1
	T30	5,1	12,0	2031	37257	2,69	0,22	905	12,6
	T60	5,0	12,0	1471	29227	1,97	0,16	674	13,9
	T120	5,7	14,5	1552	33841	4,44	0,33	805	13,1
	T180	4,4	11,9	1564	33618	3,21	0,23	804	13,2
	T360	3,2	9,5	1952	37517	2,49	0,16	822	15,1
11	T0	5,0	11,9	1761	36179	5,03	0,36	1759	14,0
	T15	5,0	12,0	1805	33909	5,40	0,35	1885	15,1
	T30	6,1	10,0	1835	37281	5,25	0,41	1971	13,2
	T60	.	.	.	.	.	.	.	.
	T120	3,8	10,1	1801	37568	3,87	0,30	1864	12,6
	T180	3,1	10,0	1892	36270	4,26	0,28	1756	14,4
	T360	5,0	12,0	1876	34566	5,22	0,29	1575	17,5
13	T0	7,4	15,0	2515	48824	3,43	0,14	1060	25,7
	T15	7,0	14,5	2567	47830	5,02	0,24	1172	23,2
	T30	6,9	15,7	2324	47658	3,62	0,18	915	22,0
	T60	7,0	17,6	2161	44844	2,44	0,11	807	25,0
	T120	6,9	18,2	2057	42928	2,67	0,18	777	18,8
	T180	5,0	12,0	2303	43532	2,85	0,12	805	24,4
	T360	6,3	14,4	2241	45176	2,91	0,12	928	25,7
14	T0	7,6	15,1	2046	32992	4,15	0,57	834	23,2
	T15	6,8	15,0	1800	33549	3,93	0,53	894	18,8
	T30	6,3	15,1	1627	29130	3,35	0,55	806	14,3
	T60	6,3	13,2	1894	31005	4,63	0,87	888	15,6
	T120	5,7	13,2	2125	33814	4,05	0,51	957	18,3
	T180	4,9	12,0	1716	32581	3,53	0,23	1074	15,0
	T360	4,4	12,0	2229	35162	4,07	0,41	914	21,3
16	T0	8,8	17,6	1451	36556	0,96	0,13	533	7,2
	T15	8,8	15,7	1530	38565	3,57	0,17	1041	7,1
	T30	7,0	13,9	1724	40199	4,83	0,35	1877	9,6
	T60	8,2	15,7	1535	39426	3,84	0,26	1437	8,3
	T120	6,9	14,5	1558	39227	4,73	0,21	1424	8,9
	T180	5,0	12,6	1521	39006	3,85	0,18	1485	12,1
	T360	5,1	12,1	1597	38345	3,81	0,39	1934	11,2

## Annexe 7 : Données du TGTP pour les patientes du groupe H non traité

Patiente	Temps	Paramètres de Thrombine				Paramètres de Plasmine			
		Lag time	Temps du pic	Pic	AUC	Pic	Vélocité du pic	AUC	Temps de lyse
2	T0	6,3	15,0	1679	36944	4,30	0,65	1463	6,2
	T15	6,4	17,7	1138	32429	4,81	0,78	1437	6,2
	T30	6,9	17,6	1177	32895	3,62	1,05	1362	3,1
	T60	5,8	12,6	1441	34085	6,06	1,08	1745	5,6
	T120	5,7	13,8	1506	34189	5,85	0,80	1571	6,9
	T180	.	.	.	.	.	.	.	.
	T360	5,0	12,6	1548	31569	2,57	0,36	839	5,7
15	T0	3,7	11,9	2238	39727	7,75	0,45	2628	17,0
	T15	4,3	12,0	2159	41948	7,18	0,50	3003	13,9
	T30	6,3	14,4	1931	38725	5,75	0,35	2505	16,3
	T60	5,0	12,6	2236	41951	6,54	0,42	2695	15,7
	T120	5,0	11,9	2236	41668	7,42	0,56	3248	13,2
	T180	3,8	10,1	2074	41893	7,57	0,77	2586	9,4
	T360	.	.	.	.	.	.	.	.
21	T0	4,4	11,9	1914	35470	3,26	0,22	748	16,3
	T15	4,4	12,0	1861	35622	3,17	0,22	754	15,0
	T30	3,2	12,0	1717	37172	3,10	0,19	714	18,1
	T60	3,2	12,0	1747	37707	3,17	0,17	737	20,1
	T120	3,1	10,0	1778	37317	2,67	0,16	702	20,7
	T180	.	.	.	.	.	.	.	.
	T360	2,5	9,4	1964	35191	3,90	0,20	801	20,7
22	T0	3,0	10,0	1568	37510	5,60	0,42	2137	13,2
	T15	.	.	.	.	.	.	.	.
	T30	4,9	8,8	1126	25927	3,14	0,33	1165	9,4
	T60	.	.	.	.	.	.	.	.
	T120	3,6	10,0	1601	35302	3,60	0,53	1881	10,7
	T180	5,6	10,1	1768	34410	6,93	0,55	2314	12,5
	T360	5,0	9,4	1705	35340	6,43	0,40	2254	11,2

## Annexe 8 : Données du TGTP pour les patientes du groupe H traité

Patiente	Groupe	Temps	Paramètres de Thrombine				Paramètres de Plasmine			
			Lag time	Temps du pic	Pic	AUC	Pic	Vélocité du pic	AUC	Temps de lyse
19	TXA0.5	T0	5,0	11,9	1482	38539	11,13	1,35	4404	8,1
		T15	4,4	12,0	1595	41672	3,11	0,19	1305	18,1
		T30	.	.	.	.	.	.	.	.
		T60	4,3	11,9	1507	35226	1,28	0,13	597	16,3
		T120	4,5	12,0	1581	35212	0,70	0,07	476	13,1
		T180	4,4	12,0	1509	37526	1,36	0,07	891	15,6
		T360	3,8	12,0	1635	35912	4,40	0,30	1847	14,4
20	TXA0.5	T0	6,4	13,2	2126	45625	6,40	0,37	2432	17,5
		T15	4,4	11,9	2078	50588	0,89	0,06	403	16,3
		T30	3,8	10,1	2209	52470	2,22	0,11	355	17,0
		T60	3,7	11,9	2124	50026	0,83	0,05	346	15,0
		T120	5,7	12,6	2232	49710	0,54	0,04	182	13,1
		T180	4,4	10,1	2149	47380	2,63	0,14	113	13,7
		T360	5,0	12,6	1883	43222	0,23	0,03	94	11,9
1	TXA1	T0	.	.	.	.	.	.	.	.
		T15	7,0	15,1	1789	38943	0,24	0,05	188	11,3
		T30	5,7	14,4	1899	42214	0,28	0,03	254	10,6
		T60	.	.	.	.	.	.	.	.
		T120	5,7	14,4	1961	40890	0,39	0,05	226	11,3
		T180	4,4	12,0	2087	37352	0,56	0,05	253	11,9
		T360	4,4	12,0	2058	39057	0,50	0,06	252	9,4
3	TXA1	T0	2,5	9,4	1925	35436	3,09	0,18	1196	16,9
		T15	.	.	.	.	.	.	.	.
		T30	6,4	13,9	1533	34101	2,23	0,13	771	16,3
		T60	6,9	12,0	1466	33153	1,63	0,10	698	15,1
		T120	7,6	14,5	1605	34982	1,62	0,09	517	16,3
		T180	7,5	15,0	1627	34358	0,77	0,05	235	15,0
		T360	7,5	14,5	1791	36299	1,46	0,08	320	15,7
24	TXA1	T0	4,4	12,0	1237	28942	7,40	0,41	1940	17,5
		T15	3,1	12,0	1025	26500	0,82	0,04	441	17,6
		T30	3,1	10,1	1438	28211	0,80	0,04	235	17,0
		T60	3,2	12,0	1366	27436	0,61	0,03	200	17,5
		T120	5,0	12,6	1381	29339	0,76	0,04	377	16,2
		T180	4,4	11,9	1445	30434	0,82	0,05	374	15,6
		T360	3,2	11,9	1475	31910	0,58	0,03	244	20,1
25	TXA1	T0	1,9	8,8	2118	43880	1,14	0,05	536	18,2
		T15	3,2	9,5	1941	39559	0,69	0,03	221	21,4
		T30	3,8	12,0	2120	46031	1,05	0,05	493	17,6
		T60	.	.	.	.	.	.	.	.
		T120	3,8	10,1	2127	43766	0,50	0,02	262	16,9
		T180	.	.	.	.	.	.	.	.
		T360	2,6	8,8	2051	41884	0,71	0,03	290	17,6
27	TXA1	T0	3,2	10,1	1770	34565	3,45	0,24	1473	13,8
		T15	.	.	.	.	.	.	.	.
		T30	3,2	10,1	1720	32612	0,90	0,07	707	13,1
		T60	2,6	8,9	1637	35036	0,58	0,07	425	9,3
		T120	2,5	8,8	1533	36063	0,62	0,07	378	9,4
		T180	.	.	.	.	.	.	.	.
		T360	1,9	8,2	1535	31406	0,47	0,05	625	9,4
4	TXA2	T0	.	.	.	.	.	.	.	.
		T15	3,2	10,0	1678	39318	0,85	0,10	436	17,6
		T30	3,1	10,0	1657	35264	0,72	0,07	364	17,6
		T60	3,1	10,0	1487	32006	0,71	0,07	342	18,2
		T120	3,2	10,1	1488	33538	0,71	0,09	323	18,2
		T180	3,7	11,9	2024	39970	1,08	0,08	350	18,2
		T360	3,1	11,9	1877	39273	1,56	0,10	419	16,9
12	TXA2	T0	10,0	17,6	2477	43013	7,75	0,37	1726	20,7
		T15	10,0	17,6	2184	41366	2,34	0,12	590	19,4
		T30	9,4	17,6	2159	42934	1,81	0,09	466	18,8
		T60	3,1	10,0	2061	40950	1,70	0,09	302	21,3
		T120	8,2	15,1	2173	38358	0,51	0,02	124	20,1
		T180	6,4	13,9	2127	35832	0,45	0,02	73	20,7
		T360	6,3	13,8	1964	34304	0,38	0,02	88	19,4
17	TXA2	T0	4,4	11,9	1749	34115	2,58	0,14	952	15,1
		T15	3,2	12,0	1375	35093	0,50	0,04	386	11,2
		T30	3,1	11,9	1482	36075	0,45	0,04	316	10,7
		T60	3,2	12,0	1498	36026	0,48	0,06	319	10,1
		T120	3,1	11,9	1475	34738	0,43	0,06	280	8,8
		T180	3,2	10,1	1495	34674	0,52	0,09	300	6,2
		T360	3,2	9,5	1756	37581	0,58	0,06	228	8,8
23	TXA2	T0	8,1	15,6	1325	30688	5,12	0,34	1176	11,4
		T15	10,1	17,6	919	29663	11,42	1,09	2196	10,6
		T30	13,2	23,2	1185	28985	2,50	0,24	678	11,3
		T60	8,8	15,7	832	30705	1,43	0,13	476	11,3
		T120	8,2	15,7	975	27616	0,47	0,02	61	13,1
		T180	8,2	17,6	1001	23269	0,42	0,02	51	12,5
		T360	6,4	15,1	581	12513	0,40	0,03	42	11,3

## Annexe 9 : Descriptif des données du TGTP par groupe

<b>Groupe NH n = 10</b>							
	<b>T0</b>	<b>T15</b>	<b>T30</b>	<b>T60</b>	<b>T120</b>	<b>T180</b>	<b>T360</b>
Lag time (min)	6,9 [5,5-7,9]	5,7 [5,0-7,3]	6,1 [5,3-7,0]	5,7 [5,0-6,8]	5,7 [4,1-6,6]	5,0 [4,0-5,5]	5,0 [4,4-5,4]
Temps du pic T (min)	14,4 [12,4-15,7]	12,9 [12,0-15,2]	13,9 [12,0-15,4]	13,5 [12,0-15,5]	13,0 [10,7-14,5]	12,0 [10,6-12,4]	12,0 [11,9-13,5]
Pic T (nM)	1832 [1545-2119]	1829 [1736-2398]	1835 [1675-2275]	1716 [1512-2145]	1792 [1567-2108]	1804 [1545-1982]	1952 [1746-2176]
AUC T (nM*min)	36337 [32680-38286]	35809 [33819-39872]	37257 [33353-39191]	35674 [31678-38796]	36647 [33821-39038]	35053 [32840-38618]	35162 [33614-40521]
Pic P (nM)	3,80 [3,31-5,38]	4,40 [3,84-5,12]	4,79 [3,02-4,96]	3,79 [2,38-5,31]	3,79 [2,89-4,34]	3,69 [2,94-5,65]	3,81 [3,03-5,05]
Vélocité pic P (nM.min-1)	0,27 [0,15-0,42]	0,25 [0,21-0,46]	0,29 [0,20-0,42]	0,27 [0,16-0,55]	0,25 [0,17-0,32]	0,24 [0,19-0,33]	0,29 [0,18-0,40]
AUC P (nM*min)	947 [739-1280]	1067 [844-1519]	1044 [856-1663]	986 [769-1364]	996 [819-1471]	1022 [805-1688]	928 [841-1754]
Temps de lyse (min)	16,0 [13,5-22,8]	17,9 [12,7-20,1]	14,3 [12,9-18,6]	14,5 [10,4-17,6]	14,2 [12,7-18,7]	13,8 [12,2-17,0]	16,3 [14,8-19,4]
<b>Groupe H non traité n = 4</b>							
	<b>T0</b>	<b>T15</b>	<b>T30</b>	<b>T60</b>	<b>T120</b>	<b>T180</b>	<b>T360</b>
Lag time (min)	4,0 [3,2-5,8]	4,4 [4,3-6,4]	5,6 [3,6-6,8]	5,0 [3,2-5,8]	4,3 [3,2-5,5]	4,7 [3,8-5,6]	5,0 [2,5-5,0]
Temps du pic T (min)	11,9 [10,5-14,2]	12,0 [12,0-17,7]	13,2 [9,6-16,8]	12,6 [12,0-12,6]	11,0 [10,0-13,3]	10,1 [10,1-10,1]	9,4 [9,4-12,6]
Pic T (nM)	1797 [1596-2157]	1861 [1138-2159]	1447 [1139-1878]	1747 [1441-2236]	1690 [1530-2122]	1921 [1768-2074]	1705 [1548-1964]
AUC T (nM*min)	37227 [35839-39173]	35622 [32429-41948]	35033 [27669-38337]	37707 [34085-41951]	36310 [34467-40580]	38151 [34410-41893]	35191 [31569-35340]
Pic P (nM)	4,95 [3,52-7,21]	4,81 [3,17-7,18]	3,38 [3,11-5,22]	6,06 [3,17-6,54]	4,73 [2,90-7,03]	7,25 [6,93-7,57]	3,90 [2,57-6,43]
Vélocité pic P (nM.min-1)	0,44 [0,27-0,60]	0,50 [0,22-0,78]	0,34 [0,23-0,88]	0,42 [0,17-1,08]	0,55 [0,25-0,74]	0,66 [0,55-0,77]	0,36 [0,20-0,40]
AUC P (nM*min)	1800 [927-2506]	1437 [754-3003]	1264 [827-2219]	1745 [737-2695]	1726 [919-2906]	2450 [2314-2586]	839 [801-2254]
Temps de lyse (min)	14,8 [8,0-16,8]	13,9 [6,2-15,0]	12,9 [4,7-17,7]	15,7 [5,6-20,1]	12,0 [7,9-18,8]	11,0 [9,4-12,5]	11,2 [5,7-20,7]
<b>Groupe H traité n = 11</b>							
	<b>T0</b>	<b>T15</b>	<b>T30</b>	<b>T60</b>	<b>T120</b>	<b>T180</b>	<b>T360</b>
Lag time (min)	4,4 [2,9-7,3]	4,4 [3,2-8,5]	3,8 [3,1-7,2]	3,2 [3,1-5,6]	5,0 [3,2-7,6]	4,4 [4,1-7,0]	3,8 [3,1-6,3]
Temps du pic T (min)	11,9 [9,7-14,4]	12,0 [11,0-16,3]	12,0 [10,1-15,2]	11,9 [10,0-12,0]	12,6 [10,1-14,5]	12,0 [11,0-14,5]	12,0 [9,5-13,8]
Pic T (nM)	1770 [1403-2122]	1678 [1200-2009]	1688 [1471-2130]	1498 [1416-1849]	1581 [1475-2127]	1627 [1470-2107]	1791 [1535-1964]
AUC T (nM*min)	35435 [32402-43446]	39318 [32378-41519]	35670 [31705-43708]	35036 [31355-38488]	33538 [34467-40890]	35832 [32396-38748]	36299 [31910-39273]
Pic P (nM)	5,12 [2,84-7,58]	0,85 [0,60-2,73]	0,98 [0,65-2,22]	0,83 [0,60-1,53]	0,54 [0,47-0,71]	0,77 [0,49-1,22]	0,58 [0,40-1,46]
Vélocité pic P (nM.min-1)	0,34 [0,16-0,39]	0,06 [0,04-0,16]	0,07 [0,04-0,12]	0,07 [0,06-0,12]	0,05 [0,02-0,07]	0,05 [0,04-0,09]	0,05 [0,03-0,08]
AUC P (nM*min)	1473 [1064-2186]	436 [304-947]	415 [301-685]	346 [311-537]	280 [182-378]	253 [93-362]	252 [94-419]
Temps de lyse (min)	16,9 [12,6-17,9]	17,6 [11,2-18,8]	16,7 [11,1-17,6]	15,1 [10,7-17,9]	13,1 [11,3-16,9]	15,0 [12,2-16,9]	14,4 [9,4-17,6]

T= thrombine P = plasmine ; certains temps étant manquants pour certaines patientes, le nombre de valeurs pris en compte est variable : groupe NH n = 8 à 10, groupe H non traité n = 2 à 4, groupe H traité n = 9 à 11. Données du groupe H non traité données à but indicatif uniquement, en raison du très faible effectif. Résultats exprimés en médiane [interquartile].

## Annexe 10 : Données cliniques relatives à chaque patiente incluse

Patiente	Groupe	Indication césarienne	Program- mée (O/N)	Age	Pathologie chronique maternelle	Gestité Parité	Terme (SA)	Nombre de fœtus	Poids fœtal (g)	Pathologie de grossesse	Atonie (O/N)	Volume de l'hémor- ragie (mL)	Volume de remplis- sage	Sulpro- stone (O/N)	Transfusion de PSL et MDS	Gestes obstétricaux
5	NH	Utérus cicatriciel	O	28	.	G2P2	39	1	4850	.	N	300	1000	N	.	.
6	NH	Utérus cicatriciel	O	31	.	G2P2	39	1	3110	.	N	325	500	N	.	.
7	NH	Utérus cicatriciel	O	37	.	G4P4	39	1	3440	.	N	200	500	N	.	.
8	NH	Utérus cicatriciel	O	33	.	G3P2	39	1	3140	.	N	200	1000	N	.	.
9	NH	Trauma du bassin	O	32	EM	G1P1	39	1	3830	.	N	400	500	N	.	.
10	NH	Présentation défavorable	O	28	.	G1P1	39	1	3320	.	N	100	1000	N	.	.
11	NH	Utérus cicatriciel	O	28	Obésité	G3P3	38	1	3430	.	N	250	1000	N	.	.
13	NH	RCIU	O	24	.	G1P1	33	1	1050	.	N	300	500	N	.	.
14	NH	Utérus cicatriciel	O	42	.	G10P8	38	1	3590	DG	N	400	1500	N	.	.
16	NH	PE sévère	O	25	.	G1P2	32	2	1790	PE	N	600	500	N	.	.
2	TXA0	Placenta percreta recouvrant	O	32	.	G5P4	36	1	2630	DG + AIP	N	1800	3500	N	3g Fib	Interruption flux*
15	TXA0	Présentation défavorable	O	30	.	G1P1	39	1	2760	.	O	1700	2000	O	2 CGR + 4,5g Fib	.
21	TXA0	ARCF	N	34	Lupus	G4P2	39	1	3900	.	N	900	2000	N	.	.
22	TXA0	ARCF sur HRP	N	35	.	G1P1	37	1	2470	DG	N	1100	2500	N	.	.
19	TXA0.5	Utérus cicatriciel	O	34	.	G4P4	38	1	2410	.	N	1200	2500	N	2 CGR	Interruption flux**
20	TXA0.5	ARCF sur HRP	O	30	Obésité	G3P3	34	1	1460	PE	N	1100	2500	N	.	.
1	TXA1	Placenta recouvrant + macrosomie	O	32	EM	G2P2	39	1	3820	AIP	N	1400	2500	O	3g Fib	.
3	TXA1	Dystocie	N	25	.	G1P1	41	1	3940	.	O	1300	1500	O	3g Fib	Compression***
24	TXA1	ARCF	N	31	EM	G2P3	37	2	3145	.	O	2700	2500	O	.	.
25	TXA1	ARCF	N	28	Obésité	G2P2	41	1	3600	.	O	1600	2000	O	.	.
27	TXA1	Placenta accreta + Hystérectomie	O	33	.	G2P2	37	1	2400	AIP	N	1320	2000	N	Cellsaver	Hystérectomie°
4	TXA2	RCIU	O	23	.	G1P2	31	2	1290	.	N	1150	1400	O	3g Fib	.
12	TXA2	PE sévère + RCIU	O	41	Obésité	G5P5	30	1	930	PE + DG	N	1200	1500	N	Cellsaver	.
17	TXA2	Tératome sacro-coccygien	O	33	.	G4P4	33	1	NR	.	N	1100	2000	N	.	.
23	TXA2	ARCF	N	36	.	G1P2	38	2	2670	PE	O	2950	5100	O	2 CGR + 6g Fib	Interruption flux°°

AIP = anomalie d'insertion placentaire ; ARCF = anomalie du rythme cardiaque fœtal ; CGR = concentrés de globules rouges ; DG = diabète gestationnel ; EM = endométriose ; Fib = concentré de fibrinogène ; HRP = hématome rétroplacentaire ; MDS = médicaments dérivés du sang ; NR = non renseigné ; O/N = oui/non ; PE = prééclampsie ; PSL = produits sanguins labiles ; RCIU = retard de croissance intra-utérin ; \* embolisation à J58 pour hémorragie sur envahissement vésical ; \*\* curetage et suture du col utérin ; \*\*\* capitonage ; ° hystérectomie programmée ; °° ballon de Bakri puis triple ligature.

*Annexe 11 : Variabilité intra-essai des paramètres du TGTP calculée lors d'une application antérieure (31)*

Paramètres étudiés	Thrombine				Plasmine		
	Lag time (min)	Temps du pic (min)	Pic (nM)	AUC (nM*min)	FLT (min)	Pic (nM)	AUC (nM*min)
CV (%)	10,47	5,39	4,23	2,81	26,10	13,55	7,61

*Annexe 12 : Variabilité inter-essai des paramètres du TGTP lors d'une application antérieure (31)*

Paramètres étudiés	Thrombine				Plasmine		
	Lag time (min)	Temps du pic (min)	Pic (nM)	AUC (nM*min)	FLT (min)	Pic (nM)	AUC (nM*min)
CV (%)	19,78	15,40	12,78	13,91	28,97	25,45	21,56

**AUTEUR : Nom : SAIDI**

**Prénom : Imen**

**Date de Soutenance : 13/03/2017**

**Titre de la Thèse : Intérêt du test de génération simultanée de thrombine et de plasmine pour l'évaluation du traitement par acide tranexamique au cours des césariennes hémorragiques : étude pilote.**

**Thèse - Médecine - Lille 2017**

**Cadre de classement : Médecine**

**DES + spécialité : Biologie médicale**

**Mots-clés : Césarienne – Hémorragie du post-partum – Acide tranexamique – Test de génération simultanée de thrombine et de plasmine**

**Résumé :**

**Contexte :** L'hémorragie du post-partum (HPP) est la première cause de morbi-mortalité maternelle. L'administration à forte dose d'acide tranexamique (ATX) est efficace pour réduire le volume d'hémorragie dans l'HPP survenant après accouchement par voie basse. La dose minimale efficace d'ATX, nécessaire pour réduire les pertes sanguines au cours des césariennes hémorragiques, sera déterminée grâce à l'étude TRACES. L'objectif de notre travail (étude TRACES pilote) est de valider la faisabilité de cette étude et d'évaluer l'intérêt du test de génération simultanée de thrombine et de plasmine (TGTP) pour l'évaluation du statut hémostatique de ces patientes et le suivi du traitement par ATX.

**Méthode :** 25 patientes ayant subi une césarienne ont été incluses et réparties entre un groupe témoin non hémorragique NH (<800 mL) (n=10) et un groupe hémorragique H (>800 mL) (n=15). Celui-ci était divisé en H non traité (n=4) et H traité (0,5, 1 ou 2 g d'ATX IV) (n=11). L'ATX était administré juste après le T0 (temps de l'inclusion). Une surveillance cinétique de la biologie a été effectuée (D-dimères, TGTP, dosage d'ATX ...) chez ces patientes. Le TGTP a également été réalisé sur un groupe de femmes non enceintes (NE). Une gamme d'ATX *in vitro* a été testée sur un pool témoin.

**Résultats :** Les D-dimères sont plus élevés dans le groupe H traité par rapport au groupe NH à T0 (3600 vs 1500 ng/mL, p=0.02). Concernant le TGTP, la capacité de génération de thrombine (reflétée par l'AUC thrombine) est plus élevée dans le groupe NH que dans le groupe NE (p=0.02), la capacité de génération de plasmine (reflétée par l'AUC plasmine) est plus faible (p=0.002). Dans le groupe H traité, la diminution de l'AUC plasmine reflète l'inhibition de la génération de plasmine par l'ATX. Cependant, l'effet-dose n'est pas aussi remarquable qu'*in vitro*.

**Conclusion :** Cette étude pilote a permis de valider la faisabilité de l'étude TRACES et de montrer l'intérêt du TGTP dans l'évaluation du statut hémostatique des différents groupes de patientes et du suivi du traitement par ATX dans les césariennes hémorragiques.

**Composition du Jury :**

**Présidente : Mme le Professeur Sophie SUSEN**

**Asseseurs : Mme le Professeur Annabelle DUPONT, Mme le Docteur Anne-Sophie DUCLOY-BOUTHORS, M. le Docteur Benjamin HENNART**

**Directrice de thèse : Mme le Docteur Emmanuelle JEANPIERRE**