

Académie d'Orléans –Tours
Université François-Rabelais

FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

Année 2015-2016

N°

Thèse

pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

Diplôme d'Etat

Par

PERIN Mikaël

Né le 16/06/1987 à Nîmes

Présentée et soutenue publiquement le 26 Février 2016

TITRE

**COMPARAISON *IN VITRO* DE L'EFFET DU PLASMA FRAIS CONGELE
ET D'UN CONCENTRE DE COMPLEXE PROTHROMBINIQUE SUR LA
GENERATION DE THROMBINE EN TRANSPLANTATION HEPATIQUE
ORTHOTOPIQUE**

Jury

Président de Jury : Monsieur le Professeur Yves GRUEL

Membres du jury : Monsieur le Professeur Marc LAFFON

Monsieur le Professeur Ephrem SALAME

Monsieur le Professeur Francis REMERAND

Madame le Docteur Martine FERRANDIERE

Monsieur le Docteur Laurent ARDILLON

RESUME

Introduction/but de l'étude : Les examens d'hémostase usuels reflètent mal le risque hémorragique des patients cirrhotiques opérés, et l'administration de plasma frais congelé (PFC) est fréquente, bien qu'elle augmente la volémie et l'hypertension portale. L'utilisation de concentrés de complexe prothrombinique (CCP) lors d'une transplantation hépatique orthotopique (THO) a donc été proposée mais sans évaluation préalable. Le test de génération de thrombine (TGT) reflétant globalement l'équilibre hémostatique, nous l'avons donc analysé après addition *in vitro* de PFC ou de CCP au plasma de patients cirrhotiques prélevés au cours d'une THO.

Patients et Méthodes : Dix patients ont été prélevés à différents temps : avant incision (P1), en fin d'hépatectomie (P2), avant déclamage porte (P3) et 30 minutes après reperfusion (P4). Les TGT ont été réalisés sur plasmas déplaquettés avant et après addition de PFC (5 ml/kg) ou de CCP (Confidex® 12.5 UI/Kg ou 25 UI/kg). Les résultats ont été comparés à ceux de sujets sains (n= 29 ; 22H/7F) (Mann et Whitney) et pour chaque prélèvement avant et après addition de PFC ou CCP (Wilcoxon).

Résultats : Les paramètres du TGT des patients avant incision (P1) ainsi qu'à P2 et P3 sont similaires à ceux des sujets sains. En revanche, après reperfusion (P4) une génération de thrombine plus faible est objectivée. L'addition de PFC à P4 n'entraîne aucun effet significatif sur cette hypocoagulabilité, qui est en revanche corrigée avec le CCP dès la plus faible concentration testée. Bien que le PFC soit en pratique souvent injecté dès le début de la procédure, il n'entraîne aucun effet significatif sur le TGT alors que le CCP induit une hypercoagulabilité dès la plus faible concentration testée.

Conclusion : Le TGT permet d'objectiver un état hémostatique équilibré chez les patients cirrhotiques. L'inefficacité du PFC à corriger la génération de thrombine *in vitro* à P4 soutient la non prescription peropératoire systématique de ce produit sanguin. A l'inverse, l'efficacité du CCP *in vitro* plaide en faveur de son utilité potentielle lors de la reperfusion (P4) mais non en début de procédure (P1) en raison d'un risque thrombotique probable, favorisé par une génération très majorée de thrombine.

Mots clés : Cirrhose ; concentré de complexe prothrombinique ; plasma frais congelé ; test de génération de thrombine ; transplantation hépatique

ABSTRACT

Effect of fresh frozen plasma and prothrombin complex concentrate on thrombin generation in patients undergoing orthotopic liver transplantation

Background: Fresh frozen plasma (FFP) is often transfused to cirrhotic patients to reduce the risk of bleeding during orthotopic liver transplantation (OLT). However, this practice is controversial, and infusion of prothrombin complex concentrates (PCC) has recently been proposed. We therefore evaluated the *in vitro* effects of PCC and FFP on thrombin generation (TG)

Patients and Methods: Ten patients undergoing OLT were sampled before incision (P1), at the end of hepatectomy (P2), before portal unclamping (P3) and 30 minutes after reperfusion (P4). TG (CAT-method, TF 5pm PLP 4μM) was studied on platelet-poor plasma (PPP) before and after addition of FFP (5 ml/kg) or PCC (12.5 IU/kg or 25 IU/kg). The results were compared with those of healthy subjects (n=29) (Mann and Withney test) and for each sample (Wilcoxon test), before and after addition of FFP or PCC.

Results: TG parameters at P1, particularly those of ETP (endogenous thrombin potential), were similar in patients and controls and did not vary at P2 and P3. However, ETP was significantly lower at P4 ($p<0.0001$), and not corrected by FFP. In contrast, the addition of a low dose of PCC significantly increased ETP at P4 ($p=0.002$), and also induced an apparent hypercoagulability when added to plasma collected at P1, with ETP values higher than in healthy controls ($p=0.002$).

Conclusion: At 5ml/kg, FFP failed to correct TG *in vitro*, thus supporting the non-systematic use of this product during OLT. In contrast, a low dose of PCC was able to restore normal TG during OLT and might be valuable at the time of reperfusion but not earlier because of the potential risk of thrombotic events.

Keywords :

Fresh frozen plasma; liver cirrhosis; liver transplantation; prothrombin complex concentrate; thrombin generation assay.

UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS
FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

DOYEN

Professeur Patrice DIOT

VICE-DOYEN

Professeur Henri MARRET

ASSESSEURS

Professeur Denis ANGOULVANT, *Pédagogie*
Professeur Mathias BUCHLER, *Relations internationales*
Professeur Hubert LARDY, *Moyens – relations avec l'Université*
Professeur Anne-Marie LEHR-DRYLEWICZ, *Médecine générale*
Professeur François MAILLOT, *Formation Médicale Continue*
Professeur Philippe ROINGEARD, *Recherche*

SECRETAIRE GENERALE

Madame Fanny BOBLETER

DOYENS HONORAIRES

Professeur Emile ARON (†) – 1962-1966
Directeur de l'Ecole de Médecine - 1947-1962
Professeur Georges DESBUQUOIS (†)- 1966-1972
Professeur André GOUAZÉ - 1972-1994
Professeur Jean-Claude ROLLAND – 1994-2004
Professeur Dominique PERROTIN – 2004-2014

PROFESSEURS EMERITES

Professeur Alain AUTRET
Professeur Catherine BARTHELEMY
Professeur Jean-Claude BESNARD
Professeur Philippe BOUGNOUX
Professeur Patrick CHOUTET
Professeur Etienne DANQUECHIN-DORVAL
Professeur Guy GINIES
Professeur Olivier LE FLOCH
Professeur Etienne LEMARIE
Professeur Chantal MAURAGE
Professeur Léandre POURCELOT
Professeur Michel ROBERT
Professeur Jean-Claude ROLLAND

PROFESSEURS HONORAIRES

P. ANTHONIOZ – A. AUDURIER – P. BAGROS – G. BALLON – P. BARDOS – J.L. BAULIEU – C. BERGER –
P. BEUTTER – C. BINET – P. BONNET – M. BROCHIER – P. BURDIN – L. CASTELLANI – B.
CHARBONNIER – J.P. FAUCHIER – F. FETISSOF – B. GRENIER – A. GOUAZE – M. JAN – J.P.
LAMAGNERE – F. LAMISSE – J. LANSAC – Y. LANSON – J. LAUGIER – P. LECOMTE – G. LELORD – G.
LEROY – Y. LHUINTE – M. MARCHAND – C. MERCIER – J. MOLINE – C. MORAINÉ – J.P. MUH – J.
MURAT – H. NIVET – P. RAYNAUD – A. ROBIER – A. SAINDELLE – J.J. SANTINI – D. SAUVAGE – J.
THOUVENOT – B. TOUMIEUX – J. WEILL

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

MM.	ALISON Daniel	Radiologie et imagerie médicale
	ANDRES Christian.....	Biochimie et biologie moléculaire
	ANGOULVANT Denis.....	Cardiologie
	ARBEILLE Philippe.....	Biophysique et médecine nucléaire
	AUPART Michel.....	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
	BABUTY Dominique	Cardiologie
	BALLON Nicolas.....	Psychiatrie ; addictologie
Mme	BARILLOT Isabelle.....	Cancérologie ; radiothérapie
MM.	BARON Christophe	Immunologie
	BERNARD Louis	Maladies infectieuses et maladies tropicales
	BODY Gilles.....	Gynécologie et obstétrique
	BONNARD Christian.....	Chirurgie infantile
Mme	BONNET-BRILHAULT Frédérique	Physiologie
MM.	BRILHAULT Jean	Chirurgie orthopédique et traumatologique
	BRUNEREAU Laurent.....	Radiologie et imagerie médicale
	BRUYERE Franck	Urologie
	BUCHLER Matthias.....	Néphrologie
	CALAIS Gilles	Cancérologie, radiothérapie
	CAMUS Vincent.....	Psychiatrie d'adultes
	CHANDENIER Jacques	Parasitologie, mycologie
	CHANTEPIE Alain	Pédiatrie
	COLOMBAT Philippe.....	Hématologie, transfusion
	CONSTANS Thierry.....	Médecine interne, gériatrie
	CORCIA Philippe	Neurologie
	COSNAY Pierre	Cardiologie
	COTTIER Jean-Philippe	Radiologie et imagerie médicale
	COUET Charles.....	Nutrition
	DE LA LANDE DE CALAN Loïc	Chirurgie digestive
	DE TOFFOL Bertrand.....	Neurologie
	DEQUIN Pierre-François	Thérapeutique
	DESTRIEUX Christophe.....	Anatomie
	DIOT Patrice	Pneumologie
	DU BOUEXIC de PINIEUX Gonzague	Anatomie & cytologie pathologiques
	DUCLUZEAU Pierre-Henri	Médecine interne, nutrition
	DUMONT Pascal	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
	EL HAGE Wissam	Psychiatrie adultes
	EHRMANN Stephan	Réanimation d'urgence
	FAUCHIER Laurent.....	Cardiologie
	FAVARD Luc	Chirurgie orthopédique et traumatologique
	FOUQUET Bernard	Médecine physique et de réadaptation
	FRANCOIS Patrick	Neurochirurgie
	FROMONT-HANKARD Gaëlle	Anatomie & cytologie pathologiques
	FUSCIARDI Jacques.....	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale ; médecine d'urgence
	GAILLARD Philippe	Psychiatrie d'adultes
	GOGA Dominique.....	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
	GOUDEAU Alain.....	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
	GOUPILLE Philippe.....	Rhumatologie
	GRUEL Yves	Hématologie, transfusion
	GUERIF Fabrice	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
	GUILMOT Jean-Louis.....	Chirurgie vasculaire, médecine vasculaire
	GUYETANT Serge.....	Anatomie et cytologie pathologiques
	GUYAN Emmanuel	Hématologie, transfusion
	HAILLOT Olivier.....	Urologie
	HALIMI Jean-Michel	Thérapeutique
	HANKARD Régis	Pédiatrie
	HERAULT Olivier.....	Hématologie, transfusion
	HERBRETEAU Denis.....	Radiologie et imagerie médicale
Mme	HOMMET Caroline	Médecine interne, gériatrie
MM.	HUTEN Noël.....	Chirurgie générale
	LABARTHE François.....	Pédiatrie
	LAFFON Marc.....	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale, médecine d'urgence
	LARDY Hubert.....	Chirurgie infantile
	LAURE Boris.....	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
	LEBRANCHU Yvon	Immunologie
	LECOMTE Thierry	Gastroentérologie, hépatologie
	LESCANNE Emmanuel	Oto-rhino-laryngologie
	LINASSIER Claude	Cancérologie, radiothérapie
	LORETTE Gérard	Dermato-vénéréologie
	MACHET Laurent	Dermato-vénéréologie
	MAILLOT François.....	Médecine interne, gériatrie

	MARCHAND-ADAM Sylvain	Pneumologie
	MARRET Henri	Gynécologie-obstétrique
Mme	MARUANI Annabel	Dermatologie-vénéréologie
MM.	MEREGHETTI Laurent	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
	MORINIERE Sylvain	Oto-rhino-laryngologie
Mme	MOUSSATA Driffa	Gastro-entérologie
MM.	MULLEMAN Denis	Rhumatologie
	ODENT Thierry	Chirurgie infantile
	PAGES Jean-Christophe	Biochimie et biologie moléculaire
	PAINTAUD Gilles	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
	PATAT Frédéric	Biophysique et médecine nucléaire
	PERROTIN Dominique	Réanimation médical, médecine d'urgence
	PERROTIN Franck	Gynécologie-obstétrique
	PISELLA Pierre-Jean	Ophtalmologie
	QUENTIN Roland	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
	REMERAND Francis	Anesthésiologie et réanimation, médecine d'urgence
	ROINGEARD Philippe	Biologie cellulaire
	ROSSET Philippe	Chirurgie orthopédique et traumatologique
	ROYERE Dominique	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
	RUSCH Emmanuel	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
	SALAME Ephrem	Chirurgie digestive
	SALIBA Elie	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
Mme	SANTIAGO-RIBEIRO Maria	Biophysique et médecine nucléaire
MM.	SIRINELLI Dominique	Radiologie et imagerie médicale
	THOMAS-CASTELNAU Pierre	Pédiatrie
Mme	TOUTAIN Annick	Génétique
MM.	VAILLANT Loïc	Dermato-vénéréologie
	VELUT Stéphane	Anatomie
	VOURC'H Patrick	Biochimie et biologie moléculaire
	WATIER Hervé	Immunologie

PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

M.	LEBEAU Jean-Pierre
Mme	LEHR-DRYLEWICZ Anne-Marie

PROFESSEURS ASSOCIES

MM.	MALLET Donatien	Soins palliatifs
	POTIER Alain	Médecine Générale
	ROBERT Jean	Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme	ANGOULVANT Théodora	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
M.	BAKHOS David	Physiologie
Mme	BERNARD-BRUNET Anne	Cardiologie
M.	BERTRAND Philippe	Biostatistiques, informatique médical et technologies de communication
Mme	BLANCHARD Emmanuelle	Biologie cellulaire
	BLASCO Hélène	Biochimie et biologie moléculaire
M.	BOISSINOT Éric	Physiologie
Mme	CAILLE Agnès	Biostatistiques, informatique médical et technologies de communication
M.	DESOUBEUX Guillaume	Parasitologie et mycologie
Mmes	DOMELIER Anne-Sophie	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
	DUFOUR Diane	Biophysique et médecine nucléaire
	FOUQUET-BERGEMER Anne-Marie	Anatomie et cytologie pathologiques
M.	GATAULT Philippe	Néphrologie
Mmes	GAUDY-GRAFFIN Catherine	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
	GOUILLEUX Valérie	Immunologie
	GUILLON-GRAMMATICO Leslie	Biostatistiques, Informatique médical et Technologies de Communication
MM.	HOARAU Cyrille	Immunologie
	HOURIOUX Christophe	Biologie cellulaire
Mmes	LARTIGUE Marie-Frédérique	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
	LE GUELLEC Chantal	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
	MACHET Marie-Christine	Anatomie et cytologie pathologiques
MM.	PIVER Eric	Biochimie et biologie moléculaire
	ROUMY Jérôme	Biophysique et médecine nucléaire
	PLANTIER Laurent	Physiologie

Mme	SAINT-MARTIN Pauline	Médecine légale et droit de la santé
MM.	SAMIMI Mahtab	Dermatologie-vénéréologie
	TERNANT David.....	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique

MAITRES DE CONFERENCES

Mmes	AGUILLON-HERNANDEZ Nadia.....	Neurosciences
	ESNARD Annick	Biologie cellulaire
M.	LEMOINE Maël.....	Philosophie
Mme	MONJAUZE Cécile	Sciences du langage - orthophonie
M.	PATIENT Romuald	Biologie cellulaire
Mme	RENOUX-JACQUET Cécile	Médecine Générale

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE

M.	IVANES Fabrice	Cardiologie
----	----------------------	-------------

CHERCHEURS INSERM - CNRS - INRA

M.	BOUAKAZ Ayache	Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
Mmes	BRUNEAU Nicole	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
	CHALON Sylvie	Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
MM.	CHARBONNEAU Michel	Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 7292
	COURTY Yves.....	Chargé de Recherche CNRS – UMR INSERM 1100
	GAUDRAY Patrick.....	Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 7292
	GILOT Philippe	Chargé de Recherche INRA – UMR INRA 1282
	GUILLEUX Fabrice	Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 7292
Mmes	GOMOT Marie	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
	GRANDIN Nathalie	Chargée de Recherche CNRS – UMR CNRS 7292
	HEUZE-VOURCH Nathalie.....	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
MM.	KORKMAZ Brice.....	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
	LAUMONNIER Frédéric.....	Chargé de Recherche INSERM - UMR INSERM 930
	LE PAPE Alain.....	Directeur de Recherche CNRS – UMR INSERM 1100
Mme	MARTINEAU Joëlle	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
MM.	MAZURIER Frédéric.....	Directeur de Recherche INSERM – UMR CNRS 7292
	MEUNIER Jean-Christophe.....	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 966
	RAOUL William.....	Chargé de Recherche INSERM – UMR CNRS 7292
Mme	RIO Pascale	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1069
M.	SI TAHAR Mustapha	Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

Pour l'Ecole d'Orthophonie

Mme	DELORE Claire	Orthophoniste
MM.	GOVIN Jean-Marie	Praticien Hospitalier
	MONDON Karl.....	Praticien Hospitalier
Mme	PERRIER Danièle	Orthophoniste

Pour l'Ecole d'Orthoptie

Mme	LALA Emmanuelle	Praticien Hospitalier
M.	MAJZOUB Samuel	Praticien Hospitalier

LISTE DES ABREVIATIONS

A2M : Alpha 2 macroglobuline
AT : Antithrombine
AVK : anti vitamine K
CaCl₂ : Chlorure de Calcium
CCP : Concentré de complexes prothrombinique
DPP : dossier patient partagé
EDTA : Éthylène Diamine Tétra Acétique
EFS : établissement français du sang
ETP : Endogenous thrombin potential ou potentiel endogène de thrombine
FT : facteur tissulaire
GEHT : Groupe d'Etude sur l'Hémostase et la Thrombose
HAS : Haute Autorité de Santé
HTP : Hypertension Portale
INR : International normalized ratio
Lagtime : temps de latence
MELD : Model for End-stage Liver Disease
PC : Protéine C
PDP : Plasma dépourvu de Plaquettes
Peak : Pic de génération de thrombine
PFC : Plasma frais congelé
PLP : Phospholipides
PPP : plasma pauvre en plaquettes
PS : Protéine S
TAFI : thrombin activated fibrinolysis inhibitor
TCA : Temps de céphaline activée
TCK : Temps de céphaline Kaolin
TFPI : Tissue Factor Pathway Inhibitor
TGT : Test de génération de thrombine
THO : transplantation hépatique orthotopique
TM : Thrombomoduline
TP : Taux de prothrombine
TQ : Temps de Quick
ttPeak : Temps au Pic
UI : Unité Internationale
VWF : Facteur Von Willebrand

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté,
de mes chers condisciples
et selon la tradition d'Hippocrate,
je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur
et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent,
et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux
ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira
les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas
à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres,
je rendrai à leurs enfants
l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime
si je suis fidèle à mes promesses.
Que je sois couvert d'opprobre
et méprisé de mes confrères
si j'y manque.

A monsieur le Professeur Yves Gruel, pour me faire l'honneur de présider et juger cette thèse. Vous m'avez poussé pour faire de ce travail ce qu'il est aujourd'hui, merci. Merci aussi pour l'ouverture sur un autre « monde » de la médecine.

A monsieur le Professeur Marc Laffon, pour me faire l'honneur de juger cette thèse. Merci pour votre enseignement, votre engagement et votre énergie permanente !!

A monsieur le Professeur Francis Remerand, pour me faire l'honneur de juger cette thèse, merci pour votre enseignement au cours de mon internat.

A monsieur le Professeur Ephrem Salamé, pour me faire l'honneur de juger cette thèse et d'y apporter votre regard et votre expertise

A madame le Docteur Martine Ferrandière, pour me faire l'honneur de juger cette thèse. Merci pour toutes les connaissances que tu nous transmets et ta disponibilité avec tous les internes, MERCI.

A monsieur le Docteur Laurent Ardillon, pour me faire le plaisir de juger cette thèse et ton soutien dans la réalisation de ce travail.

A Laurent Ardillon (encore !!) et Bénédicte Delahousse, merci pour leur soutien inestimable dans la réalisation de cette thèse, leur aide au jour le jour, leurs relectures (multiples) et leur bonne humeur quasi constante (je ne râle pas, j'explique). Merci aux équipes du services d'Hémostase pour leur accueil et notamment Brigitte Hamami pour toutes les manipulations que ce travail a nécessité. Un merci à Raphael pour l'initiation du travail, la pose des fondations de ce résultat.

A tous les médecins que j'ai pu côtoyer pendant mon externat et mon internat et qui m'ont donné envie et m'ont appris mon métier.

A Nîmes : Guillaume Cayla, Laurent Muller, Mr les Pr Ripart et Lefrant.

A Orléans : Khalid, Adnan, Denis (et les discussions domotique), Jean-Philippe (merci pour la rigueur transmise), Willy (lis en anglais petit...), Didier (l'iconoclaste pédagogue) Remi (merci pour cette ouverture d'esprit, et toi tu ferais quoi ?), Jean marc (le puriste), Isabelle puis François, Grégoire, Anne, Armelle et Dalila en réa med pour votre bonne humeur dans les tempêtes, A Thierry Boulain pour votre enseignement précieux, ce fut un honneur de travailler avec vous.

A Tours : Anne charlotte pour ta bonne humeur et la qualité de ton enseignement, Brice, Benco, Joseph, Fabien, Damien, Sabine, Edouard, Yvan, Mathilde, Jessica, Pascaline, Bénédicte. Aux anesthésistes et aux IADEs de cardiaque. Lionel et Stéphanie merci de m'avoir restimulé à la fin de l'internat. Aux Dr Mangin, Benardeau (mère et fille) et Bensenouci ainsi qu'à Ekaterina à Bretonneau pour leur enseignement, chacun à leur manière.

Merci aux super équipes du SAMU 37 !!! Merci pour toutes ces histoires à ajouter au carnet « histoire de chasse » et votre soutien lors des premières gardes...

Merci aux équipes de Nantes, le PTMC et l'HME resteront des souvenirs intenses (pour de multiples raisons), merci à tous les internes qui nous ont accueilli royalement ainsi qu'à Marwan et à Paul pour leur humour, ouverture et intelligence (et le Mc Allan). Merci pour votre soutien à l'annulation de cette thèse en Juin et dans les moments difficiles. Merci.

A tous les infirmiers, IADEs et paramédicaux croisés dans mon internat à Orléans, Tours et Nantes.

Merci à mes deux frères de médecine sans qui tout ça n'aurais pas eu la même saveur Christophe et Olivier avec qui j'ai autant appris sur la médecine que pris de pintes. Merci pour tout mes amis.

Merci aux Nîmois pour avoir fait de mon externat une fête inoubliable : Minigirl (pour les sous colles avec totoff aussi !!), Paul, Gaubuz, Romain, Totor, Lisa, François, Amandine, Raphaëlle, Herve Badou, Nicolas V, Naike...

Merci à tous les copains des premiers semestres, à l'internat de la Source, qui m'ont mis du baume au cœur à l'arrivée dans le « Nord », il y est né des amitiés fortes. Un merci à ma promo qui peut difficilement être mieux : Julietta, Steph, Grand Khalid, Evan, Simon, Sarah. Merci à mes co-internes de réa med : Sophie, Emanuelle, Nesrine, Alexandre... Des souvenirs intenses sont nés à cette période...

Denise merci pour l'adoption de cœur et pour les relectures (mais surtout pour le passage adoption hein...)

A mes grands parents Jeannine, Bernard, Carmen et François, merci d'être et d'avoir été si différents, vous m'avez transmis plus que ce que vous ne pensez.

A Josée et Pierre pour leur présence si rassurante, dans tous les moments importants.

A mon grand père, je ne pourrais pas dire ici tout ce que tu m'as apporté, cette thèse sera pour toujours empreinte de ta présence, j'aurai aimé voir ton regard aujourd'hui.

MERCI à mon frère, pour être mon pendant Ying/Yang, pour ton énergie et pour être aussi extraordinaire !! Tu seras un super anesthésiste, je n'ai aucun doute et ce sera un honneur de pouvoir travailler avec toi. Je ne peux pas tout dire ici, mais merci frerot.

Merci à mes parents, pour tout. Très chers maitres, vous m'avez transmis l'amour d'une médecine humaine et vraie, j'espère un jour être un aussi bon médecin et parent.

Merci à toi Fanny, de faire de moi ce que je suis, de supporter au jour le jour mon caractère et mes gardes. Merci pour ton amour, pour ton soutien intense ces derniers temps. Tu es, au sens littéral, extraordinaire et fais de chaque jour de ma vie une chance. Merci.

TABLE DES MATIERES

RESUME	2
ABSTRACT	3
LISTE DES ABREVIATIONS	8
SERMENT D'HIPPOCRATE	9
TABLE DES MATIERES.....	12
INTRODUCTION.....	13
RAPPEL SUR L'HEMOSTASE.....	14
1. Hémostase primaire	14
2. Coagulation : initiation et amplification	16
3. Coagulation : régulation physiologique	17
4. Fibrinolyse	18
HEMOSTASE ET CIRRHOSE	19
1. Atteinte de l'hémostase primaire	19
2. Atteinte de la coagulation.	20
3. Atteinte de la Fibrinolyse.....	21
4. Un Etat d'Hémostase Equilibré	22
TESTS DE COAGULATION STANDARD ET CIRRHOSE	24
1. Description du temps de Quick / Taux de prothrombine	24
2. Reflet imparfait de l'hémostase du cirrhotique	25
3. Médiocre corrélation au risque hémorragique	25
4. Intérêt limité de l'apport de PFC sur l'hémostase <i>in vitro</i>	26
5. Augmentation du risque hémorragique par l'apport de PFC	26
TGT ET CIRRHOSE.....	27
1. Historique	27
2. Description du CAT	29
3. Thrombogramme.....	30
4. Hémostase du cirrhotique et TGT	32
OBJECTIF	33
ETUDE PERSONNELLE.....	34
ABSTRACT	36
INTRODUCTION	37
MATERIALS AND METHODS.....	38
RESULTS	41
DISCUSSION.....	43
TABLES AND FIGURES	46
CONCLUSION ET PERPECTIVES	50
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	52
ANNEXES N°1.....	58
ANNEXES N°2.....	69

INTRODUCTION

La cirrhose hépatique est caractérisée histologiquement par la présence d'une fibrose importante entourant des nodules de régénération au sein du tissu hépatique. Ces modifications architecturales du parenchyme sont la conséquence ultime de la fibrose secondaire à différentes agressions hépatiques (virale, toxique, auto-immune...)¹. Elle induit une dysfonction hépatocellulaire et une atteinte sinusoidale fonctionnelle et anatomique, par compression, qui mène à l'augmentation des résistances vasculaires intra hépatiques et à l'hypertension portale¹. La cirrhose affecte, à un stade décompensé, toutes les fonctions vitales de l'organisme par différents mécanismes. On retrouve ainsi un syndrome hépatorénal, hépato-pulmonaire et porto-pulmonaire, une encéphalopathie hépatique, une cardiopathie du cirrhotique et l'atteinte des fonctions hémostatiques.

Cette hépatopathie cirrhotique, toutes étiologies confondues, est la quatorzième cause de mortalité au monde, la quatrième en Europe centrale¹. Sa prévalence en France atteint 2000 à 3300 cas par million d'habitants en 2005² et le nombre de décès qui lui sont imputables est de 15.000 par an selon la HAS³. Dans sa forme terminale la seule thérapeutique définitive envisageable, hors contre indication, reste la transplantation hépatique qui demeure, encore parfois, une intervention à haut risque hémorragique.

La première transplantation hépatique réussie avec succès a eu lieu en 1967 (Thomas Starzl, Denver, USA) et cette technique s'est développée dans les années 80 avec l'essor des immunosuppresseurs, particulièrement la découverte de la ciclosporine. Les premières interventions chirurgicales étaient marquées par des pertes sanguines très importantes⁴, rattachées aux anomalies biologiques de l'hémostase de ces patients et traitées au moyen de transfusions massives⁴.

Avec l'expérience et l'amélioration des techniques chirurgicales et anesthésiques, ces pertes sanguines ont pu être réduites⁵, alors même que les tests biologiques d'hémostase restaient altérés. Ces constatations suggéraient déjà un état hémostatique plus complexe qu'imaginé initialement.

RAPPEL SUR L'HEMOSTASE

L'hémostase est un processus physiologique visant à arrêter le saignement au niveau d'une brèche vasculaire par la formation d'un thrombus fibrino-plaquettaire. On distingue trois phases intriquées ayant chacune une durée différente : l'hémostase primaire, qui correspond à la formation d'un thrombus plaquettaire ou « thrombus blanc » au niveau de la brèche vasculaire ; la coagulation qui va permettre la formation de fibrine et renforcer le thrombus plaquettaire et enfin la fibrinolyse qui va réguler la dissolution des caillots formés.

1. Hémostase primaire

Histologiquement la paroi vasculaire se compose de l'endothélium, au contact direct du sang, et de différentes couches sous-jacentes composant le sous endothélium (intima, média et adventice). En l'absence de lésion, l'endothélium remplit un rôle physiologique de thromborésistance empêchant la formation spontanée de thrombus intravasculaire en s'interposant entre le sang et les couches sous endothéliales. Lors de l'apparition d'une brèche, la mise à nu de l'endothélium met en contact ces couches sous-endothéliales, et les protéines qui y sont présentes, avec le sang circulant, déclenchant ainsi les processus d'hémostase.

Parmi ces protéines se trouvent le facteur Von Willebrand (VWF) et le collagène, sur lesquels les plaquettes vont alors venir rapidement adhérer grâce aux glycoprotéines présentes à leur surface. Cette adhésion à la structure sous endothéliale va avoir lieu soit via le facteur Willebrand lié au collagène (GP Ib V IX) soit directement via le collagène (GP Ia IIa, GP VI).

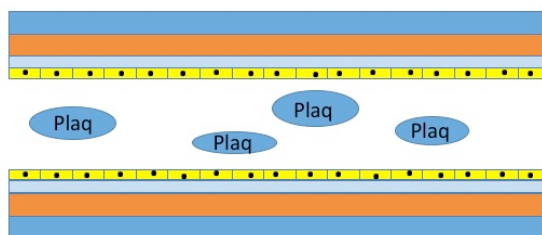
Après cette étape d'adhésion, les plaquettes vont s'activer et libérer différentes substances (fibrinogène, VWF, sérotonine, Calcium...) permettant l'activation et le recrutement d'autres plaquettes afin de consolider les agrégats plaquettaires en formation.

Lors de cette phase, les plaquettes génèrent de l'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires. Celui-ci, grâce au métabolisme des prostaglandines, est transformé en Thromboxane A₂, inducteur plaquettaire et puissant vasoconstricteur assurant un contrôle local de l'hémorragie.

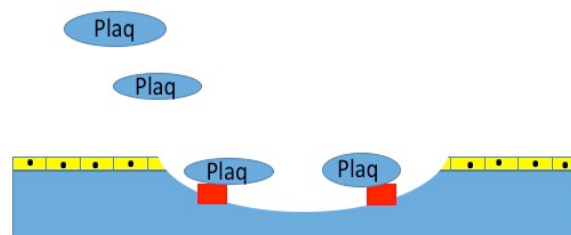
Leur membrane change aussi de conformation par un phénomène dit de « sphérisation » et les phospholipides anioniques membranaires ou phosphatidylsérines sont alors externalisées permettant d'obtenir une surface catalytique de liaison pour les facteurs de coagulation. La liaison à la surface plaquettaire, des complexes catalytiques des facteurs de coagulation prothrombinase et ténase, joue un rôle primordial dans le processus de coagulation.

Ensuite, intervient une agrégation plaquettaire caractérisée par une liaison des plaquettes entre elles via les glycoprotéines de surface (GP IIb IIIa) dont l'exposition est secondaire à l'activation plaquettaire. Elles peuvent se lier soit au fibrinogène et créer, avec lui, des ponts interplaquettaires à faible taux de cisaillement, soit au VWF à fort taux de cisaillement. Cette agrégation permet la formation du premier thrombus, ou « thrombus blanc ».

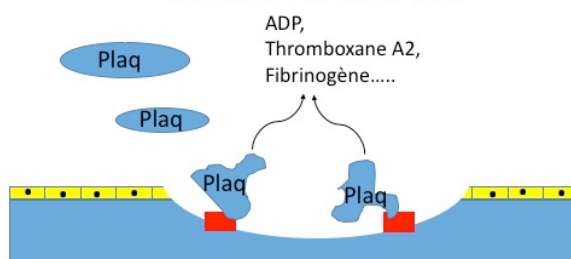
CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES



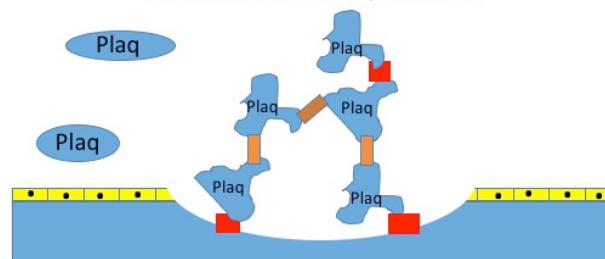
ADHESION PLAQUETTAIRE



ACTIVATION PLAQUETTAIRE



AGREGATION PLAQUETTAIRE



-  Endothélium
-  Facteur von Willebrand
-  Fibrinogène

2. Coagulation : initiation et amplification

Le processus de coagulation comporte différents acteurs : le fibrinogène, protéine soluble également appelée facteur I, les facteurs de la coagulation (Facteurs II, V, VII, IX, X, XI) qui sont des zymogènes de sérine protéases, les cofacteurs (Facteurs V et VIII) et le facteur XIII qui est un zymogène de transglutaminase. Ces protéines n'acquièrent leur activité biologique qu'après activation par protéolyse. Les facteurs II, VII, IX et X nécessitent, de plus, la présence de vitamine K pour une synthèse fonctionnelle.

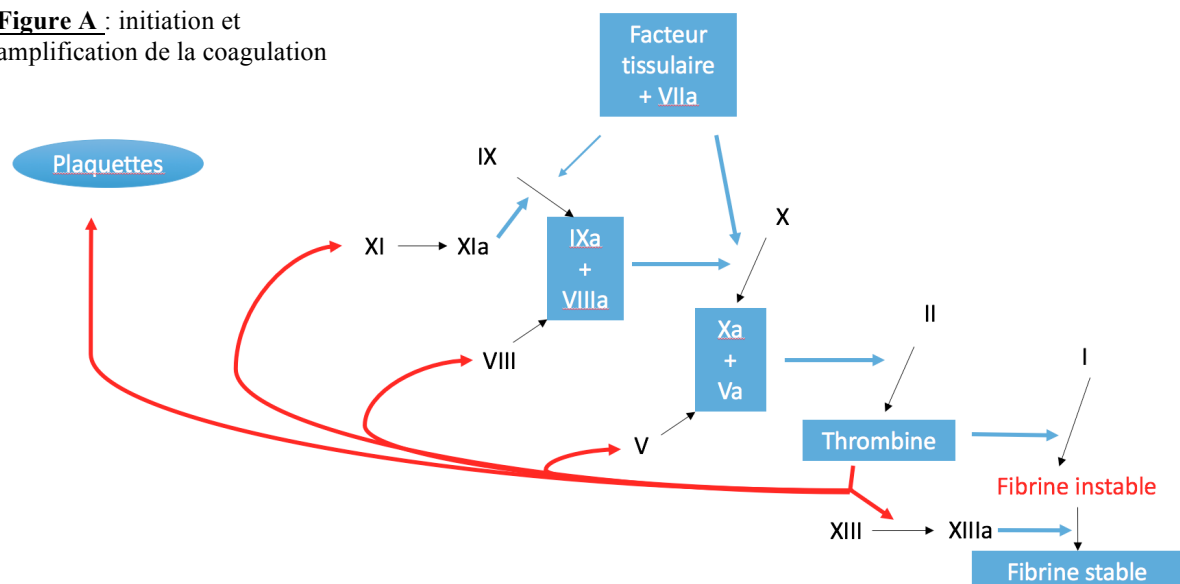
La cascade de la coagulation va être déclenchée, conjointement à l'hémostase primaire, par la mise en contact avec le sang circulant, du Facteur Tissulaire (FT) exprimé par les fibroblastes de l'adventice. Ce dernier initie le processus de coagulation en activant le Facteur VII (FVII) circulant, formant avec lui le complexe FT-FVIIa. Ce dernier permet l'activation du Facteur X mais également, à un degré moindre, du Facteur IX notamment quand le FT est en faible quantité. (Figure A)

Le FX activé, lié aux phospholipides de la membrane plaquettaire via des ponts calcium, forme avec son cofacteur Va, le complexe prothrombinase. Il permet la transformation de la prothrombine (FII) en thrombine (FIIa), enzyme clé du processus de coagulation.

La thrombine est alors générée à l'état de trace⁶, mais celle-ci va amplifier sa propre génération en activant le FV, FVIII et FXI menant à des concentrations beaucoup plus importantes (Figure A) qui permettent de recruter de nouvelles plaquettes en les activant et de transformer plus de fibrinogène (FI) en fibrine (FIIa). La production de cette dernière augmente en conséquence, créant un réseau de fibrine qui emprisonne les globules rouges et renforce le thrombus blanc en place. Le FIIa active de plus le Facteur XIII, qui transforme la fibrine instable en réseau de fibrine stable.

L'ensemble de ces réactions met en avant le rôle central de la thrombine dans le processus de coagulation et dans son amplification.

Figure A : initiation et amplification de la coagulation



3. Coagulation : régulation physiologique

Comme l'immense majorité des réactions physiologiques, l'hémostase comporte un système de rétrocontrôle. Il existe trois grandes voies régulatrices de la coagulation : l'antithrombine, le système de la protéine C et le TFPI.

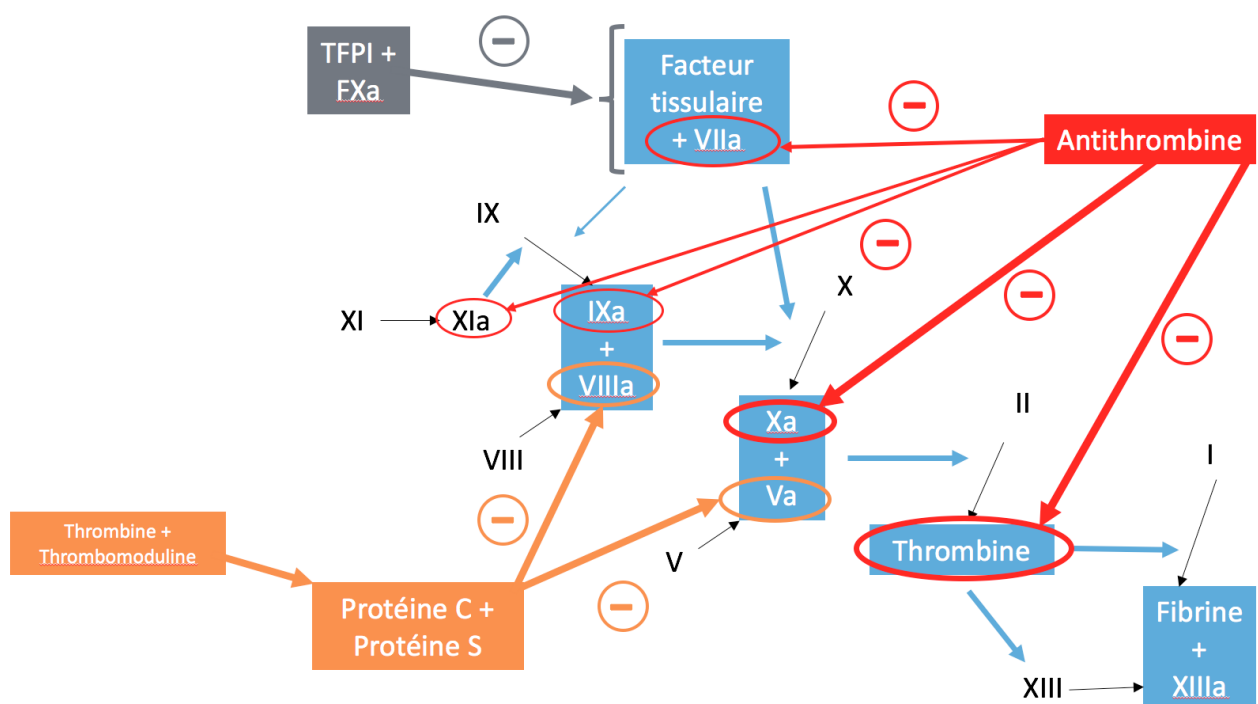
L'antithrombine (AT) est un puissant inhibiteur sécrété par le foie qui, fixé aux héparanes sulfates, inactive de manière irréversible majoritairement le FIIa et FXa mais aussi les FIXa, FXIa, FXIIa et FVIIa (Figure B). En thérapeutique, l'héparine permet une augmentation puissante de l'activité anticoagulante de cette enzyme.

Le système protéine C/protéine S inhibe fortement, pour sa part, les cofacteurs FVIIIa et FVa (Figure B). Cette réaction est initiée par la liaison d'une partie de la thrombine avec la thrombomoduline (TM) présente à la surface de l'endothélium. Une fois liée, elle perd sa capacité à transformer le fibrinogène en fibrine et peut activer la protéine C (PCa). Celle-ci en présence de son cofacteur la protéine S (PS), constitue finalement le système PCa-PS.

Le Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) : cette protéine, sécrétée par l'endothélium et les plaquettes, se lie avec le FXa et en régule la génération. Le complexe FXa-TFPI permet de diminuer l'activation du FX en inhibant l'action du complexe FT-FVIIa sur ce dernier (Figure B).

Enfin l' α -2 macroglobuline a également une action inhibitrice : présente dans le plasma, elle va se lier à la thrombine, l'englober et lui faire perdre ses capacités coagulantes.

Figure B : inhibition de la coagulation



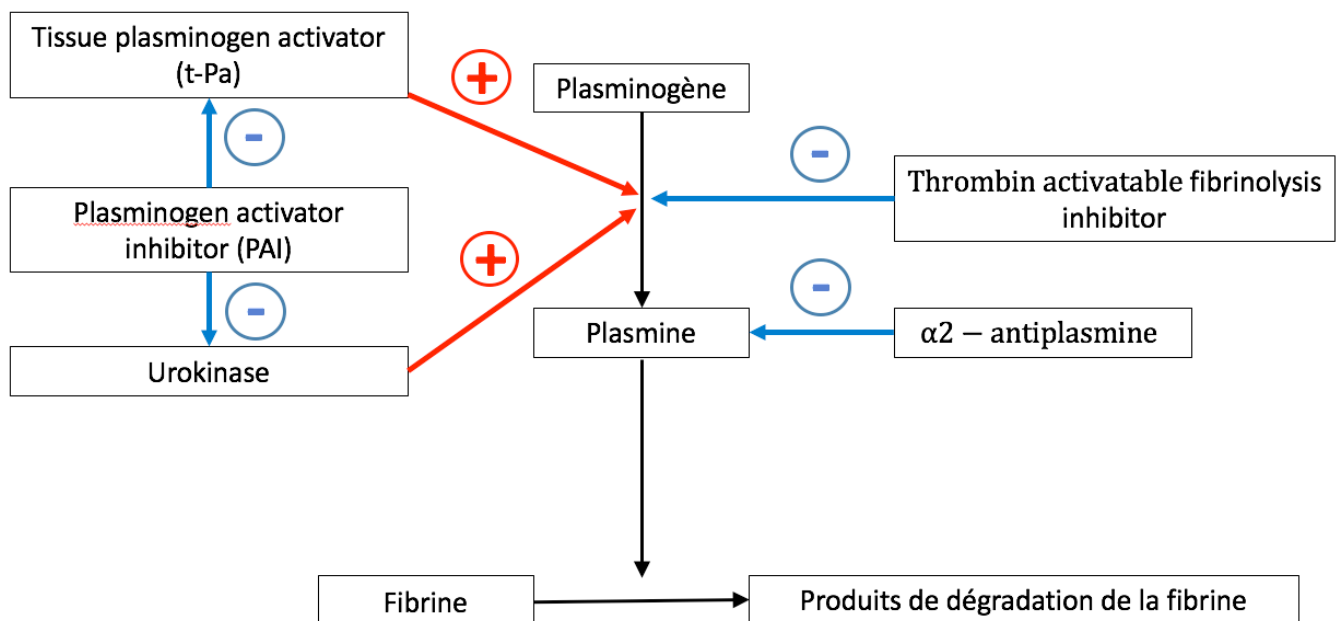
4. Fibrinolyse

La fibrinolyse est le système qui aboutit à la lyse du caillot de fibrine. La plasmine qui en est l'enzyme clé permet la restauration de la lumière vasculaire obstruée suite à la formation du caillot.

Le plasminogène, synthétisé par le foie, se fixe au caillot de fibrine. Celui-ci sous la dépendance d'un système activateur va se transformer en plasmine et lyser le caillot de fibrine, aboutissant à la formation de produits de dégradation de la fibrine et de D-dimères.

Les inducteurs de ce phénomène sont principalement le *tissue plasminogen activator* (t-PA) et l'urokinase. A l'inverse, *l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène* (PAI) neutralise ces deux derniers, l' α -2-antiplasmine inhibe directement la plasmine et le *thrombin activatable fibrinolysis inhibitor* (TAFI) empêche la liaison du t-PA et du plasminogène à la fibrine.

Figure C : Régulation de la Fibrinolyse



HEMOSTASE ET CIRRHOSE

1. Atteinte de l'hémostase primaire

2.1 Versant pro-hémorragique

Des anomalies quantitatives et qualitatives de l'hémostase primaire sont fréquentes chez le patient cirrhotique.

Ainsi, il est habituel de retrouver une thrombopénie, dont l'origine est multifactorielle⁷. L'étiologie dominante est un hypersplénisme secondaire à l'hypertension portale (HTP) mais d'autres mécanismes sont impliqués dans ce déficit quantitatif : hémodilution, diminution de la thrombopoïétine^{8,9}, présence d'auto anticorps anti-plaquettes et toxicité centrale virale et alcoolique^{7,10}. Certains auteurs avancent en outre, comme explication une consommation plaquettaire secondaire à un état dit « d'hypercoagulabilité » du cirrhotique¹¹.

En plus de cette thrombopénie, plusieurs mécanismes intriqués¹⁰ et notamment l'augmentation de produits endothéliaux dont le NO et les prostacyclines^{12,13}, induisant une thrombopathie acquise ont été décrits dans cette population.

2.2 Versant pro-thrombotique

Les taux élevés de VWF retrouvés chez ces patients peuvent, par contre, compenser ces défauts quantitatifs et fonctionnels, favorisant alors l'adhésion et l'agrégation plaquettaire. L'élévation des taux de VWF est probablement liée à une diminution de l'ADAMTS 13^{14,15} et à l'activation endothéliale induite par l'hypertension portale¹¹.

Par ailleurs, malgré la thrombopathie en place et le rôle important des fonctions plaquettaires dans la génération de thrombine *in-vivo*^{16,17}, il semble que leur soutien à la génération de thrombine, sous réserve d'un taux plaquettaire normalisé *in vitro*, soit conservé chez le cirrhotique, du moins *in-vitro*^{10,16}. En revanche la génération de FIIa diminue et est corrélée avec la thrombopénie *in vitro*.

2. Atteinte de la coagulation.

1.1. Versant pro-hémorragique

L'hépatocyte synthétise l'ensemble des facteurs de coagulation, à l'exception du facteur VIII. En cas d'insuffisance hépatocellulaire il existe donc une diminution globale de la synthèse de ces facteurs excepté le FVIII (Fibrinogène, FII, V, VII, IX, X, XI, XIII)¹⁴. Cette diminution est responsable des valeurs pathologiques des tests de coagulation usuels comme le taux de prothrombine (TP) et le temps de céphaline activé (TCA) ^{18,19}.

Cependant, s'il existe une réduction quantitative de ces facteurs corrélée au degré de gravité de la cirrhose, il s'y ajoute également une atteinte fonctionnelle pour les facteurs vitamine K dépendants et le fibrinogène.

Pour les premiers, la baisse de leur γ -carboxylation^{10,20} induite par la carence en vitamine K empêche une partie d'entre eux d'être activés ; ces précurseurs inactifs sont appelés PIVKA. Ils ne peuvent pas former de ponts calcium avec les membranes phospholipidiques plaquettaires et n'ont pas d'activité coagulante ou catalytique. Pour le second, la baisse de sa fonctionnalité^{10,15}, ou dysfibrinogénémie, est due à un excès d'acide sialique en cas de cirrhose.

1.2. Versant pro-thrombotique

Malgré la baisse de ces facteurs et du TP, on retrouve des thromboses portes plus fréquentes chez le cirrhotique que dans la population générale^{21,22} et il a également été démontré que ces patients étaient autant, voire plus exposés, que la population générale à la survenue d'un événement thromboembolique veineux au sens large^{23,24}.

Ceci peut être expliqué, par l'observation d'un défaut de synthèse hépatique global, qui touche aussi bien les facteurs de la coagulation que les inhibiteurs de la coagulation. Ainsi les taux d'antithrombine, de protéine C, de protéine S, d'héparine co-facteur II et d' α -2 macroglobuline sont abaissés^{12,14,15,25,26}. Il existe aussi une diminution quantitative²⁷ et qualitative du TFPI, liée à la réduction des taux de protéine S²⁸. Toutes ces anomalies favorisent, elles, plutôt le risque thrombotique^{26,29}.

De plus si la fonction de synthèse du foie est importante, celle de métabolisation et d'épuration l'est tout autant et concourt par son altération, à la baisse d'épuration de nombreux composants pro-coagulants. Parmi eux, le facteur VIII³⁰, dont les concentrations sont d'autant plus augmentées²⁵ que sa production extra-hépatique semble conservée et que l'élévation des concentrations de VWF « protège » le FVIII circulant^{10,11,14}.

L'atteinte thrombotique préférentielle du réseau porte n'est d'ailleurs pas entièrement liée à la rhéologie locale mais également à l'augmentation du FVIII, et au défaut en protéine C, à cet endroit comparativement à la circulation systémique²¹. Cette considération peut d'ailleurs s'étendre aux thromboses artérielles du greffon qui ne sont probablement pas liées uniquement à un traumatisme ou une agression locale mais aussi à un déséquilibre hémostatique prothrombotique^{31,32}.

3. Atteinte de la Fibrinolyse

3.1 Versant fibrinolytique

Le foie est également responsable de la synthèse des acteurs de la fibrinolyse à l'exception du tPA et du PAI.

Les taux de tPA sont donc plutôt augmentés (synthèse conservée et épuration hépatique altérée) alors que les taux de TAFI, FXIII et alpha-2-antiplasmine sont, eux, diminués. Cette situation explique, pour certains auteurs, un état dit d'hyper-fibrinolyse favorisant la survenue de saignements, mais ces constatations sont discutées^{12,14,15,33}.

3.2 Versant pro-thrombotique

Malgré la mise en évidence des anomalies sus-citées, l'utilisation de tests d'exploration de la fibrinolyse ne permet pas formellement de mettre en évidence une tendance hyper-fibrinolytique³³. Probablement parce qu'il existe aussi une synthèse hépatique de plasminogène abaissée et des taux de PAI augmentés (par le même mécanisme que pour le tPA), en faveur cette fois d'une inhibition de « dissolution du caillot de fibrine »^{12,14,15,33}.

La littérature sur l'état de fibrinolyse chez le cirrhotique est moins claire et plus débattue, mais il semble que l'on retrouve là encore un état « équilibré » instable de fibrinolyse par baisse concomitante des acteurs pro- et anti-fibrinolytiques. Il faut cependant séparer les états d'insuffisance hépatocellulaire aigus ou d'hépatite fulminante, qui semblent induire de manière plus formelle une déstabilisation de l'équilibre sur un versant hypo-fibrinolytique¹¹.

4. Un Etat d'Hémostase Equilibré

Il y a donc en résumé une baisse globale de production, hormis du FVIII, et de fonction des facteurs de coagulation, une thrombopénie associée à une thrombopathie et une dérégulation de la fibrinolyse induite par l'insuffisance hépatocellulaire pouvant faire pencher le malade cirrhotique sur un versant à risque hémorragique.

Mais en parallèle de cette baisse des acteurs pro-coagulants, il existe une baisse de synthèse des inhibiteurs de la coagulation, de métabolisation du facteur VIII et une augmentation du VWF favorisant à la fois l'adhésion/agrégation plaquettaire et des taux circulants de FVIII plus élevés et, enfin, une diminution de la fibrinolyse. Tout cela favorise donc, *a contrario*, un état pro-thrombotique réaffirmé par des tests de coagulation mettant en évidence une certaine résistance à l'activation de la protéine C après ajout de thrombomoduline ou Protac® *in vitro*³⁴⁻³⁶.

Nous sommes donc en présence d'un état d'hémostase équilibré, mais fragile, secondaire à la baisse concomitante des acteurs activateurs et inhibiteurs de la coagulation, à la fois pour l'hémostase primaire, la coagulation et la fibrinolyse¹⁴.

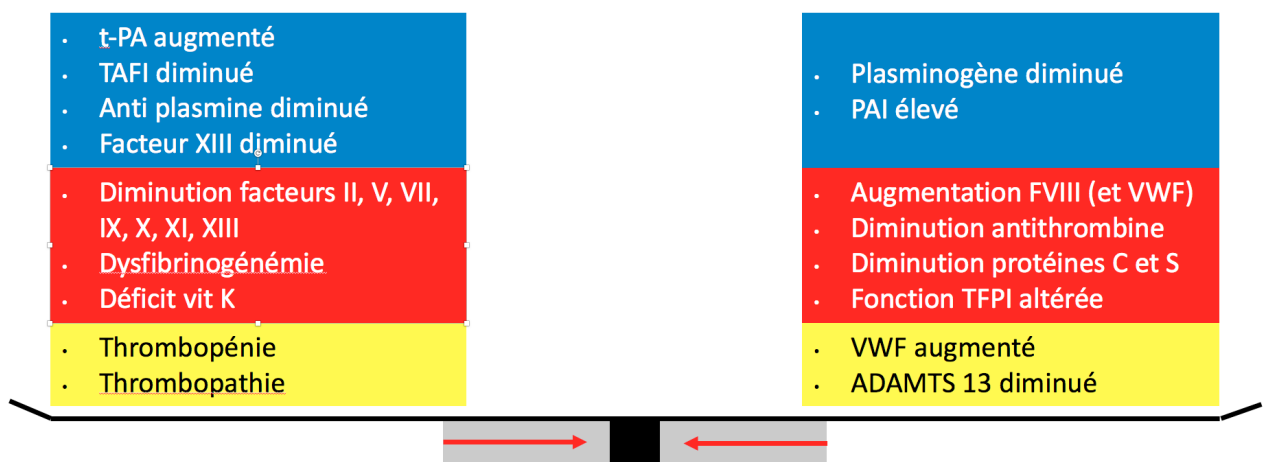
Cet état « rééquilibré » est confirmé par plusieurs études utilisant des tests de coagulation globaux montrant une génération de thrombine conservée^{14,15,30,33-35}, y compris chez les patients arrivant à la transplantation hépatique, malgré l'altération de leur tests de coagulation standards³⁵.

Cependant, si cet état se rapproche d'une hémostase équilibrée à un état stable, il ne peut être considéré comme un retour à un état physiologique. En effet, la diminution concomitante des activateurs et inhibiteurs de la coagulation a pour conséquence un « équilibre » hémostatique précaire qui peut se retrouver très rapidement déstabilisé indifféremment vers un versant hémorragique ou thrombotique^{12,14,15}.

Plusieurs facteurs déstabilisants ont d'ailleurs été mis en évidence comme la majoration ou l'installation d'une HTP favorisant la survenue de saignements notamment chirurgicaux³⁷⁻³⁹, la présence d'une insuffisance rénale^{40,41} pouvant être liée ou non à l'hépatopathie, la survenue d'infection⁴², la majoration de la dysfonction endothéliale déjà présente¹³, les flux vasculaires localement ralentis, et la répartition hétérogène de certains facteurs de coagulation²¹.

L'état hémostatique du malade cirrhotique arrivant à la transplantation est donc équilibré, mais extrêmement instable et complexe.

Balance de la coagulation schématisée du cirrhotique



TESTS DE COAGULATION STANDARD ET CIRRHOSE

Pour évaluer cet état hémostatique complexe, les praticiens ne disposent dans la pratique courante que de « tests classiques d'hémostase » dont le plus couramment utilisé, dans le cadre de la prise en charge de patients cirrhotiques, reste le TP. En effet, censé refléter le risque de saignement et d'obtention facile, il est aussi un des critères des scores de gravité de la cirrhose comme le Child-Pugh⁴³ et par extension, via l'INR, du MELD^{44,45}. Ce test comporte cependant, dans ce contexte, des limitations importantes.

1. Description du temps de Quick / Taux de prothrombine

1.1 Le temps de Quick

Le temps de Quick (TQ) est un test de coagulation décrit en 1935 par l'équipe du Dr Quick⁴⁶. Le résultat est exprimé en secondes et correspond au temps nécessaire à l'apparition de fibrine dans un plasma citraté à 37°C, déplaqueté puis recalcifié en présence de thromboplastine (facteur tissulaire + phospholipides en grande quantité). Ce test est sous la dépendance des facteurs II, V, VII, X et du fibrinogène avec une sensibilité plus ou moins variable selon les réactifs et les automates utilisés.

1.2 Le taux de prothrombine

Le temps de Quick est exprimé en France, malgré la pertinence discutée de ce terme, sous la forme de taux de prothrombine ou TP, exprimé en pourcentage. Ce taux de prothrombine est obtenu en comparant les valeurs des résultats des patients avec celles obtenues par un pool de plasmas sains « référents » dans le laboratoire. Le TQ est mesuré sur ce pool non dilué (1/1=100%) puis dilué par un volume équivalent à son volume initial de manière répétée (1/2=50% ; 1/3=33% ; 1/4=25%). Les résultats en seconde obtenus pour chaque dilution sont relevés et on obtient une droite de Thivolle avec la dilution en abscisse et la valeur de TQ en ordonnée. En reportant la valeur de TQ (sec) du patient sur cette courbe on obtient son TP (%).

2. Reflet imparfait de l'hémostase du cirrhotique

Le temps de Quick, et la valeur de TP qui en découle, n'explorent que les facteurs de coagulation de la voie extrinsèque (VII, X, V, II, fibrinogène). Le TCA sur un principe assez proche explore lui la voie dite intrinsèque (XI, IX, VIII, X, II, fibrinogène).

Si ces tests reflètent bien la baisse des facteurs de coagulation, et par voie de conséquence, la gravité de la cirrhose¹⁹, ils ne reflètent de manière fiable dans ce contexte, ni la diminution des inhibiteurs de la coagulation, ni l'augmentation du FVIII et ne peuvent donc pas renseigner sur l'équilibre hémostatique réel de ces malades. En outre, ils sont mal corrélés avec la capacité de génération de thrombine des hépatopathes, notamment, parce que 95% de la thrombine est générée après la formation du caillot^{47,48}.

Pour appuyer ces affirmations nous pouvons nous appuyer sur les résultats de tests permettant d'évaluer plus globalement l'hémostase (TGT, thromboelastographie, ROTEM...) et qui ont permis de montrer l'existence d'un état équilibré^{34,35} voir hypercoagulant⁴⁹ en dépit de temps de coagulation (TQ, TCA) perturbés.

De plus le TP et le TCA ne permettent d'explorer ni la fibrinolyse ni l'hémostase primaire, pourtant altérées de manière profonde chez le cirrhotique.

Le TQ, et par extension le TP, semblent donc mal refléter le potentiel hémostatique réel des patients cirrhotiques.

3. Médiocre corrélation au risque hémorragique

L'incapacité de ces tests à refléter la situation des cirrhotiques, se répercute logiquement sur leur aptitude à prédire le risque hémorragique de ces malades. De nombreuses études ont ainsi démontré, dans le cas de la cirrhose, l'absence de corrélation entre ces temps de coagulation et le risque de saignement, que ce soit lors d'hémorragies gastro-intestinales^{18,50,51}, lors de procédures invasives^{18,52-54} ou en per opératoire de transplantation hépatique^{55,56}.

D'ailleurs, la recherche de la normalisation des chiffres de TP, les considérant comme représentatifs de l'état d'hémostase, ne diminue pas significativement les saignements ni les recours aux transfusions⁵⁶⁻⁵⁸. La correction de ces valeurs biologiques par du PFC entraîne, en revanche un apport volémique et une augmentation de la pression veineuse centrale avec pour conséquence une aggravation de l'hypertension portale.

4. Intérêt limité de l'apport de PFC sur l'hémostase *in vitro*

D'autre part, même s'ils corrigent les valeurs pathologiques de TP, l'apport de plasma de personnes saines ne semblent pas modifier la génération de thrombine du cirrhotique *in vitro*, ni améliorer les valeurs de thromboelastographie en post-opératoire d'hépatectomie⁵⁹, posant la question de leur intérêt *in vivo*⁵⁹⁻⁶¹. Ces constatations s'ajoutent à l'expérience de nombreuses équipes anesthésiques et chirurgicales prenant en charge ces malades et qui rapportent une efficacité clinique parfois discutable. Certains ont même choisi de ne pas y recourir afin de ne pas entraîner d'augmentation significative des saignements^{5,62}.

5. Augmentation du risque hémorragique par l'apport de PFC

L'utilisation de PFC, sans diminuer le recours à des transfusions de concentrés de globules rouges (CGR), ni modifier la génération de thrombine *in vitro*, augmente donc l'HTP et risque paradoxalement d'augmenter le saignement^{5,37,55,63}. La transfusion de PFC a ainsi été reconnue par l'équipe de Massicotte et al. comme facteur de risque de transfusion au cours de la THO⁵⁶.

Plusieurs équipes ont du reste, montré que l'attitude inverse consistant à réduire la pression veineuse centrale en limitant l'utilisation de PFC et l'apport volémique au minimum, voire en réalisant des phlébotomies, permettrait de diminuer les saignements per-opératoires^{38,39,64,65}.

Le TP même s'il est couramment utilisé dans ce contexte, ne reflète donc pas globalement l'hémostase complexe du cirrhotique^{14,18,34}, ni le risque de saignement^{50,53,55}. Sa correction par l'apport de PFC ne diminue pas les saignements per opératoires et peut les majorer en raison de l'apport volémique^{37,56,66}.

TGT ET CIRRHOSE

1. Historique

Le test de génération de thrombine est donc (ré)apparu dans la littérature afin d'étudier l'hémostase « équilibrée » du cirrhotique.

Le principe général de ce test est d'initier une réaction de coagulation dans le plasma à tester et de mesurer les concentrations de thrombine générées au cours du temps. Ce test permet, par son principe, de tenir compte de l'action des inhibiteurs de la coagulation et il trouve donc une place importante dans l'étude des troubles de l'hémostase liés à la cirrhose. Les méthodes utilisées pour sa réalisation ont évolué au cours du temps, ont été standardisées et fiabilisées, jusqu'à être utilisables avec un taux de précision et de reproductibilité acceptable⁶⁷.

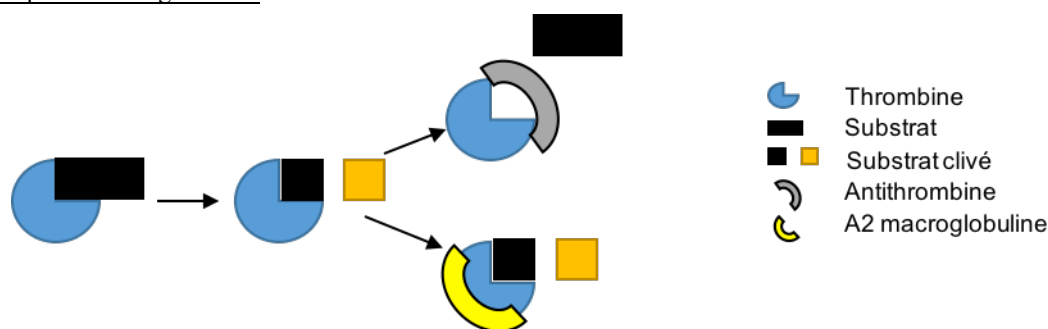
Les premières méthodes de mesure quantitative de la génération et de l'activité de la thrombine remontent à 1953 et ont été décrites par deux équipes : Mcfarlane et Biggs (Oxford), et Pitney et Dacie (London)⁶⁸. Ces techniques se déroulaient en deux étapes : la génération de thrombine était déclenchée dans un tube principal d'où étaient prélevés des échantillons à intervalles réguliers, transférés dans des tubes secondaires riche en fibrinogène. Le temps de formation du thrombus dans les tubes secondaires était mesuré, à partir duquel était extrapolé une concentration de thrombine pour chaque temps de prélèvement. Ces tests étaient longs, entachés de plusieurs biais^{48,68} et nécessitaient un personnel extrêmement qualifié.

Dans les années 1980, l'équipe des Dr Beguin et Hemker ont mis au point une amélioration de cette technique. Ces tests étaient toujours réalisés en deux étapes, mais les solutions de fibrinogène ont été remplacées par des solutions de substrats chromogéniques. La concentration de thrombine à chaque temps était extrapolée, non plus du temps de formation d'un thrombus mais du signal émis, secondaire au clivage du substrat par la thrombine et mesuré en densité optique.

L'utilisation du substrat chromogénique permettait de s'affranchir des limites du test initial⁶⁸ mais ce test avait également ses limites : le substrat a été amélioré pour limiter sa très forte affinité pour la thrombine présente qui provoquait, par compétition, une inhibition des phénomènes de rétrocontrôle thrombine-dépendant (thrombomoduline...) et une mesure imprécise de l'activité de la thrombine⁴⁸. Il était aussi initialement épuisé rapidement et ne reflétait que le début du processus de génération de thrombine⁴⁸.

Enfin, le niveau de densité optique détecté ne correspondait pas seulement aux concentrations de thrombine libre mais aussi à celle liée à l' α 2-macroglobuline (α 2M), ceci étant toujours applicable aux tests actuels. En effet si l' α 2M inhibe la fonction de la thrombine dans le processus de coagulation, elle n'inhibe pas sa capacité amidolytique à cliver le substrat et ainsi à générer le signal optique⁶⁸. De ce fait, la mesure optique obtenue correspond à l'activité de la thrombine libre ajoutée à celle liée à l' α 2M (Figure D). Afin d'obtenir uniquement les valeurs de thrombine libre, un algorithme a été créé⁶⁷.

Figure D: Clivage du substrat par la IIa lié a l'alpha 2 macroglobuline



La dernière évolution apparue, a été l'utilisation de substrats non plus chromogéniques mais fluorogéniques, eux aussi avec une affinité faible et consommés lentement. Les tests pouvaient ainsi être réalisés en une seule étape, y compris sans défibrination et dans un plasma riche en plaquettes. Cependant, l'équipe de Hemker et al. a, par contre, constaté que la cinétique de fluorescence ne dépendait pas uniquement des concentrations de thrombine, mais également d'autres phénomènes évolutifs au cours du processus⁶⁷ (inner filter effect, consommation et couleur du plasma).

Ceux-ci nécessitent d'utiliser un puits de calibration sur la même plaque, en parallèle, qui ne diffère du puits du plasma testé que par le remplacement de la préparation déclenchante (facteur tissulaire et phospholipides) par une solution de concentration de thrombine connue. Cela permet de calibrer en temps réel, les valeurs de fluorescence obtenues dans le plasma testé (cf. Figure E). Il est appelé *calibrated automated thrombogram* ou CAT et a été décrit par Hemker et al.⁶⁷.

2. Description du CAT

Le test de génération de thrombine que nous avons utilisé pour ce travail est donc de type CAT.

Les puits de plasma sont testés parallèlement avec des puits de calibration et les mesures sont réalisées au minimum en « duplicate », soit 2 puits de plasma et 2 puits de calibration pour chaque prélèvement. Une solution inductrice de facteur tissulaire et phospholipides est ajoutée dans le puits testé et une solution contenant une concentration donnée de thrombine (liée à l' $\alpha 2M$) dans le puits de calibration. Le plasma à tester est ensuite ajouté dans tous les puits. Ces manipulations sont réalisées dans un milieu réchauffé à 37°C.

La solution contenant le substrat fluorogénique et du calcium en excès ($CaCl_2$) est introduite dans les différents puits par un dispenseur automatique, afin de déclencher la réaction. L'introduction de cette solution sera automatiquement définie comme le temps 0 du test. La thrombine générée va alors se lier au substrat et le cliver, générant un signal fluorescent. (Figure E)

Ce signal est capté par le fluoromètre tout au long du test à la fois sur le puits à tester et sur le puits de calibration, permettant de calibrer le niveau de fluorescence mesuré dans le plasma. Ces mesures une fois calibrées par le logiciel thrombinoscope seront modifiées par ce dernier afin d'identifier, notamment, l'activité fluorométrique liée à la thrombine libre et celle liée au complexe thrombine- $\alpha 2M$ (Figure D). Enfin, une courbe de génération de thrombine libre ou thrombogramme est créée grâce aux concentrations de thrombine libre mesurées au cours du temps. (Figure F)

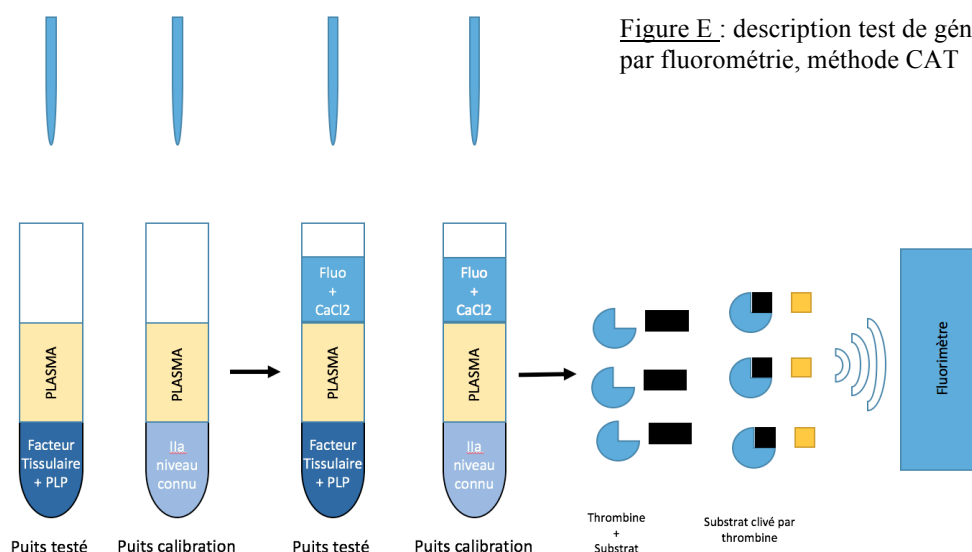


Figure E : description test de génération de thrombine par fluorométrie, méthode CAT

3. Thrombogramme

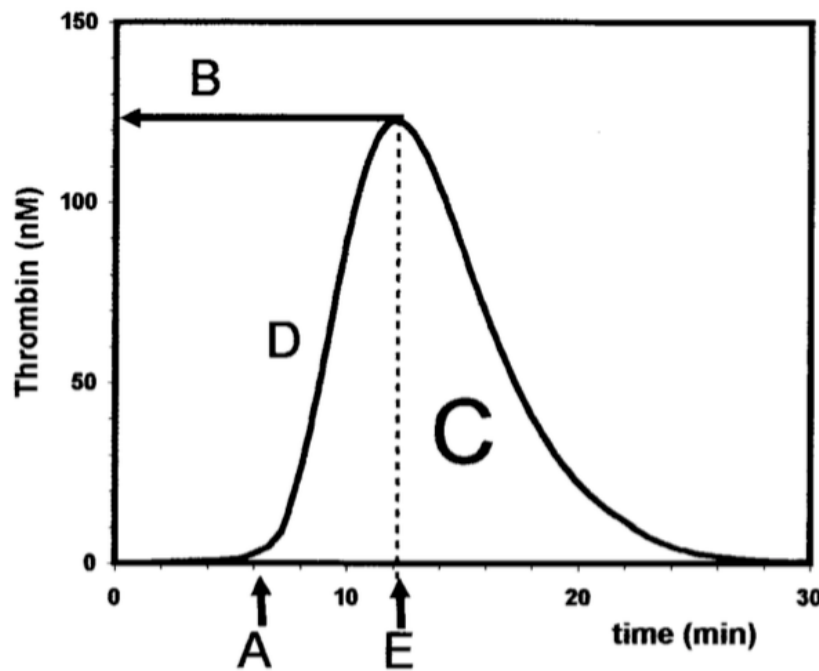


Figure F : Thrombogramme

A : Temps de latence
B : Pic
C : Potentiel endogène de thrombine
D : Vélacité
E : Temps au pic

Iconographie tirée de : Hemker et al, Thrombosis and haemostasis, 2006 ; 96: 553–61

Le thrombogramme (figure F) représente donc les concentrations de thrombine au cours du temps lors d'une réaction de coagulation déclenchée en présence de facteur tissulaire et de phospholipides. Il représente bien, visuellement, les trois phases décrites dans le processus de coagulation physiologique : une phase d'initiation (de T0 au temps de latence : A Figure F), d'amplification (entre A et le temps au pic : E) et de régulation (au delà de E).

Ainsi, le thrombogramme est composé de différents paramètres analysables lors de sa lecture.

Chronologiquement, le premier paramètre étudié va être le lag-time ou temps de latence (A sur la figure F), il correspond au délai entre T0 et la phase d'amplification de génération de thrombine ou « burst ». Il représente la phase d'initiation de la transformation de prothrombine en thrombine où les premiers nM de thrombine sont générés^{17,47,6}. Ce paramètre correspond schématiquement aux temps de coagulation (TQ, TCA) et à la formation du caillot⁴⁷.

Le temps de latence est raccourci par la diminution des taux de TFPI⁶⁹, de protéine S et de fibrinogène, ainsi que par l'augmentation des concentrations de facteur tissulaire utilisées pour le TGT. En effet lors de l'utilisation de 5pm de FT le lag-time est environ deux fois plus court que lors de l'utilisation de 1pm⁷⁰. Par contre celui-ci est prolongé par la diminution du FV, FVII, FII et FX, que ce soit à 1pm ou 5pm de FT⁶⁹⁻⁷¹.

Il apparaît, secondairement, une ascension brutale et importante de la courbe qui correspond à la phase d'auto-amplification de la génération de thrombine par l'activation des facteurs V, VIII et XI. (Cf. rappels hémostasie).

Au point d'inflexion de la courbe, à la fin de cette phase de « burst », se situe le pic (Peak) qui correspond à la concentration maximum de thrombine générée (**B**) ; le temps au pic ou time to peak (**E**) correspond, lui, au délai nécessaire pour atteindre ce pic. Enfin la Vitesse (**D**) est calculée par la formule $V = \text{Peak} / (\text{ttPeak} - \text{Lagtime})$. Elle évalue la cinétique de la réaction de la phase de burst.

Le pic est le moment où, la cinétique d'inactivation de la thrombine atteint celle de la transformation de prothrombine en thrombine⁴⁷. Lors de la réalisation du TGT avec 1pm de FT, il évolue à la baisse lors de la diminution des facteurs FII, FVIII, FIX et FX, mais aussi lors de l'augmentation de l'AT. Cet effet est moins marqué lors de l'utilisation de 5pm de FT hormis pour le FII et le FX qui restent fortement corrélés avec le Pic⁷⁰.

La décroissance apparaissant ensuite sur le thrombogramme correspond à la régulation de la génération de thrombine par les systèmes de l'antithrombine, du TFPI et des protéines C et S (en présence de thrombomoduline). L'inactivation de la thrombine est alors supérieure à l'activation de prothrombine.

Enfin, le dernier paramètre abordé est le potentiel endogène de thrombine (Endogenous Thrombin Potential soit ETP) (**C**) qui correspond à l'aire sous la courbe de génération de thrombine. Il permet l'évaluation « globale » de l'activité enzymatique de la thrombine et reste l'un des paramètres le plus utilisé dans la littérature, pour sa corrélation avec des états prothrombotiques^{47,72} ou à risque hémorragique^{47,48,73}, démontrée dans plusieurs travaux. Il est principalement sous la dépendance des niveaux de FII, FX et d'antithrombine (en l'absence de thrombomoduline)^{69,70} mais aussi, à un moindre niveau, du fibrinogène et du FVII. Le FIX et FVIII peuvent avoir un effet sur l'ETP mais uniquement à de faibles taux de FT 1pm⁷⁰.

4. Hémostase du cirrhotique et TGT

Le TGT est donc particulièrement utilisé chez les patients cirrhotiques car il permet d'évaluer leur potentiel hémostatique en tenant compte de la baisse des facteurs de coagulation et des inhibiteurs de la coagulation. Il a été démontré, grâce à celui-ci, par plusieurs équipes une génération de thrombine conservée (principalement sur le critère de l'ETP) malgré des chiffres de TP ou TCA altérés^{33,34}. Dans certaines circonstances, ce test reflète même un état « hypercoagulant » encore une fois à l'inverse des tests standards^{29,36}.

Cette étude de la génération de thrombine peut, par ailleurs, se faire avec ou sans thrombomoduline qui est activatrice du système de la protéine C. Plusieurs travaux ont montré que l'hémostase du cirrhotique se caractérise par une « résistance » à l'action de la thrombomoduline, due à la baisse de la protéine C chez ces malades^{21,29,34,36}. Ainsi il existe une diminution des valeurs d'ETP beaucoup plus faible chez le cirrhotique que chez la personne saine après activation de la protéine C (Figure G). C'est le cas dans d'autres pathologies induisant une résistance à la PCa comme le FV Leiden.

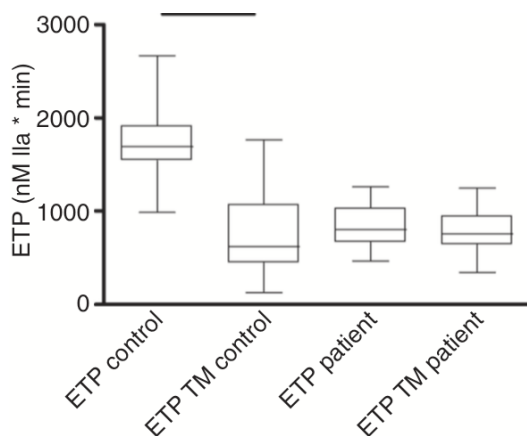


Figure G : Effet de la thrombomoduline sur l'ETP de patients sains (control) et cirrhotiques (patient)

Iconographie tirée de Lisman T et al. Intact thrombin generation and decreased fibrinolytic capacity in patients with acute liver injury or acute liver failure. *J Thromb Haemost.* 2012

OBJECTIF

Les patients cirrhotiques éligibles à une THO présentent donc un état d'hémostase bien plus complexe qu'une simple « hypocoagulation » liée à la baisse des facteurs de coagulation.

Il existe un état hémostatique rebalancé^{12,14}, confirmé par une génération de thrombine conservée^{34,35} voir augmentée³⁶ chez ces patients malgré des tests de coagulation standards altérés³⁴⁻³⁶. L'incapacité des tests de coagulation standards à représenter, à la fois le potentiel hémostatique¹⁸ et le risque hémorragique⁵⁵ de ces malades a aussi été démontrée. La correction de valeurs anormales de TP ne diminue pas significativement les transfusions et pourrait être délétère, en termes de saignements⁷⁴, à cause de l'augmentation de la volémie induite par les PFC en per-opératoire⁵⁶. A contrario, un effet bénéfique du contrôle de la pression veineuse centrale par différents moyens dont l'épargne transfusionnelle de PFC, a été retrouvé^{38,64,65,75}.

Il n'existe, cependant, aucune recommandation formelle sur l'utilisation des PFC et malgré la mise en évidence de ces éléments, la pratique usuelle reste de corriger les anomalies des tests de coagulation classiques avec du plasma frais congelé. L'intérêt peut être cliniquement discutable, d'autant que l'effet *in vitro* de ces produits semble limité^{59,60,62}.

L'utilisation de CCP, apportant les facteurs de coagulation sous faible volume et plus sûres car nanofiltrés, a ainsi été proposée^{65,76}. Cependant, l'efficacité de ces produits *in vitro* ou *in vivo* n'a pas été étudiée au cours de la transplantation hépatique. Notre objectif est d'évaluer, grâce au TGT qui fournit un reflet plus fiable de l'état hémostatique des cirrhotiques, l'effet *in vitro* de l'apport de PFC et de CCP au plasma de patients cirrhotiques, bénéficiant d'une transplantation hépatique, en pré et per opératoire.

ETUDE PERSONNELLE

Comparative *in vitro* evaluation of the thrombin generation assay after addition of fresh frozen plasma or prothrombin complex concentrate to plasma samples of patients undergoing orthotopic liver transplantation

Comparative *in vitro* evaluation of the thrombin generation assay after addition of fresh frozen plasma or prothrombin complex concentrate to plasma samples of patients undergoing orthotopic liver transplantation

Mikael Perin¹, Bénédicte Delahousse², Laurent Ardillon², Raphael Denhaut¹, Ephrem Salamé³, Francis Remerand¹, Yves Gruel²

1. Département d'Anesthésie et Réanimation, Hôpital Trousseau, Tours, France
2. Service d'Hématologie-Hémostase et UMR CNRS 7292, Université François Rabelais, Tours, France
3. Service de Chirurgie Digestive Endocrinienne et Transplantation hépatique, Tours, France ; INSERM V1082 Poitiers, France

Word count:

Corresponding author: Yves Gruel, Department of Hematology-Hemostasis, CHU Trousseau, 37044 Tours Cedex, France.

Phone : 33 2 47 47 46 72 Fax : 33 2 47 47 59 04

E-mail: gruel@med.univ-tours.fr

Key words: fresh frozen plasma, liver transplantation, prothrombin complex concentrate, thrombin generation assay.

ABSTRACT

Fresh frozen plasma (FFP) is often transfused to cirrhotic patients to reduce the risk of bleeding during orthotopic liver transplantation (OLT). However, this practice is controversial, and infusion of prothrombin complex concentrates (PCC) has recently been proposed. We therefore evaluated the *in vitro* effects of PCC and FFP on thrombin generation (TG).

Ten patients undergoing OLT were sampled before incision (P1), at the end of hepatectomy (P2), before portal unclamping (P3) and 30 minutes after reperfusion (P4). TG (CAT-method, TF 5pm PLP 4 μ M) was studied on platelet-poor plasma (PPP) before and after addition of FFP (5 ml/kg) or PCC (12.5 IU/kg or 25 IU/kg). The results were compared with those of healthy subjects (n=29), before and after addition of FFP or PCC.

TG parameters at P1, particularly those of ETP (endogenous thrombin potential), were similar in patients and controls and did not vary at P2 and P3. However, ETP was significantly lower at P4 ($p<0.0001$), and not corrected by FFP. In contrast, the addition of a low dose of PCC significantly increased ETP at P4 ($p=0.002$), and also induced an apparent hypercoagulability when added to plasma collected at P1, with ETP values higher than in healthy controls ($p=0.002$).

In conclusion, FFP failed to correct TG *in vitro*, thus supporting the non-systematic use of this product during OLT. In contrast, a low dose of PCC was able to restore normal TG during OLT and might be valuable at the time of reperfusion but not earlier because of the potential risk of thrombotic events.

INTRODUCTION

Liver cirrhosis is a potentially severe disease ultimately affecting all vital functions¹ including haemostasis¹⁴. Orthotopic liver transplantation (OLT) is thus the only therapeutic solution in end-stage liver disease, and bleeding with transfusion was not unusual during the first surgical procedures that were performed⁴. Significant improvement in surgical and anaesthetic techniques then progressively limited the need for blood products⁵, although coagulation assays reveal changes in most patients. However, the management of bleeding, and especially the methods to be used to treat coagulation disorders during OLT, remains a matter of debate.

Modifications of haemostasis in cirrhotic patients are complex, with multiple clotting factor defects, low platelet counts with impaired platelet function and fibrinolysis abnormalities¹⁰. At the same time, levels of coagulation inhibitors (antithrombin, C and S protein) often decrease, with increased FVIII and Willebrand factor concentrations, which may contribute to the thrombotic events, that are fairly frequent in cirrhotic patients despite deficiency in multiple coagulation factors²²⁻²⁴.

This particular haemostatic status in cirrhotic patients with relatively well “balanced” coagulation has been confirmed by thrombin generation assay (TGA)^{15,34,35} since the endogenous thrombin potential (ETP) measured with citrated platelet-poor plasma has been shown to be identical to that of healthy subjects, despite abnormal conventional coagulation assays.

Indeed, both the prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT) are usually prolonged and correlated with deficiencies in procoagulant proteins. However, these assays do not reflect the low levels of inhibitors or the increase in factor VIII levels, and they are therefore not effective in evaluating the bleeding risk before and during OLT^{12,52,53,55}. Nevertheless, fresh frozen plasma (FFP) units are frequently infused before surgery to correct PT and/or aPTT abnormalities, but this practice is controversial.

The value of normalizing PT with FFP to reduce red blood cell (RBC) transfusion seems quite low^{62,63} and FFP can contribute to increased risk of portal venous congestion and of bleeding complications⁶⁴.

Moreover, the ability of FFP to increase thrombin generation *in vitro* is low⁶⁰ despite the normalization of PT.

The use of prothrombin complex concentrates (PCC), which provide all vitamin-K dependent procoagulant and anticoagulant proteins at a smaller volume than FFP, has recently been proposed in OLT⁷⁶, but no study had compared the haemostatic effectiveness of FFP and PCC in cirrhotic patients.

We therefore undertook a comparative study of the effects of FFP and PCC on thrombin generation, when added to the plasma from cirrhotic patients collected during OLT.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Data for this prospective, non-interventional study were collected from 10 patients (7 males and 3 females, mean age 62.5 years) with advanced cirrhosis (Child-Pugh score B or C), undergoing OLT in our hospital.

The criteria for non-inclusion were: patients younger than 18 years, Child-Pugh score A, recent transfusion of fresh frozen plasma, current hospitalization in an intensive care unit or early re-transplantation. The exclusion criteria were patient disagreement and Swan Ganz failure.

The anaesthesiology team in charge of liver transplantation screened patients and informed the study team.

Plasma samples from 29 healthy volunteers (22 men and 7 women not taking combined oral contraceptives) had previously been studied as controls to define the reference values of TGA parameters²¹.

All participating subjects were informed of the aims of the study and gave written consent.

Fresh frozen plasma (FFP) and Prothrombin complex concentrate (PCC)

FFP was a non-pooled human frozen plasma from one single donor provided by the Blood Center of Tours. This type of plasma is currently the only type available and is used on a daily

basis in France. The mean dose of FFP infused to patients during OLT in our centre is about 5ml/kg, and a corresponding concentration was therefore tested *in vitro* in TGA.

Prothrombin Complex Concentrate (PCC), Confidex[®] (CSL Behring, Marburg, Germany), currently being used in our institution, was tested in this study. This PCC contains 20-48 IU/ml of Factor II, 10-25 IU/ml of FVII, 20-31 IU/ml of FIX, 22-60 IU/ml of FX, 15-45 IU/ml of protein C and 12-38 IU/ml of protein S.

The *in vitro* effects of two concentrations, corresponding to two doses of PCC, i.e. 25 IU/Kg of FIX (the most common dose infused in patients treated with a vitamin K antagonist) and 12.5 IU/kg, were evaluated in our experiments.

Blood samples

Blood samples were collected during OLT immediately after induction of anaesthesia (P1), at the end of hepatectomy (P2), at the end of the anhepatic phase (P3), and 30 minutes after reperfusion (P4), according to the procedure usually applied for the monitoring of these patients. The anaesthetic and surgical management of the procedure was also performed as defined by the OLT protocol of our institution, regardless of this study. Blood samples were drawn into 3.2% sodium citrate vacuum tubes (1vol/9vol; 2.7 ml, Becton Dickinson) from a non-heparinised arterial line required for the usual anaesthetic management of the patient, and the first 15 ml of blood were systematically discarded. When laboratory tests other than those related to haemostasis had to be performed, we ensured that the sodium citrate tubes were taken first.

Samples were rapidly centrifuged (4,440G, 120 seconds) in order to perform conventional coagulation assays (PT and aPTT) in emergency. Samples were then centrifuged twice at 2,250 G for 15 minutes at 18-25°C to obtain platelet-free plasma (PFP) (<10G/L). The samples were stored in aliquots at -80°C until TGA were performed.

Usual Coagulation tests

Prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (aPTT) and fibrinogen levels (FG) were measured with an automated coagulation analyzer (STA-R, Stago) using usual validated procedures (Neoplastine CI Stago, CK-Prest Stago, Fibriphen Hyphen Biomed).

Thrombin generation assay (TGA)

TGA were carried out according to the Calibrated Automated Thrombogram method, as previously described^{21,67}, with a Fluorocan Ascent (ThermoLab systems, Helsinki, Finland), an automated dispenser (Biodis, Signes, France) and Thrombinoscope Synapse v3.0 software (Thrombinoscope BV, Maastricht, The Netherlands).

Platelet-free plasma (PFP) samples were quickly thawed at 37°C and TGA were performed using 80 µl of PFP tested alone or in which FFP or PCC was added at concentrations equivalent to doses of 5ml/kg or 12.5 and 25 IU/Kg, respectively. TGA was measured after addition of 20 µl of PPP reagent[®] Stago (final concentrations of 5 pM recombinant tissue factor and 4 µM phospholipids) and 20 µl of Z-gly-Gly-Arg- AMC fluorogenic substrate (FluCa-KIT[®] Stago). Twenty µl of Thrombin calibrator[®] (Stago) were used instead of PPP reagent[®] for the calibrating wells. Each sample was tested in duplicate and TGA was run for 60 to 120 minutes. Endogenous thrombin potential (ETP), thrombin peak, lag time (time before generation of thrombin burst), time to peak (time to reach peak) and velocity index [Velocity=Peak/(ttPeak-LagTime)] were calculated using Thrombinoscope Synapse software.

The same batch of a commercial external pool of normal plasma (Cryocheck[™], Cryopep[®], Montpellier, France) was tested in each TGA run to improve the inter-assay reproducibility (23, 24). Normalized results of ETPs and peaks were expressed as a percentage of the results obtained with the external normal plasma pool {(Patient result / Cryocheck result)x100} and normalized lag times as the Lagtime patient / Lagtime external pool ratio.

Statistical analysis

An intermediate analysis was scheduled in the protocol after 10 patients to assess the study power in view of the lack of data concerning evaluation of FFP and PCC efficacy using TGA.

Statistical analysis and graphs were performed with GraphPad PRISM v6.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA) and the results were expressed as median and minimum-maximum values unless otherwise specified.

The Wilcoxon paired nonparametric test was used to compare patients' TGA parameter values before and after addition of FFP or PCC. Results obtained in patients and healthy subjects were compared with the Mann-Whitney unpaired nonparametric test. A *P*-value of <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Patient characteristics

Ten patients undergoing orthotopic liver transplantation were included from March 2014 to August 2014. Patient characteristics are summarized in Table 1.

Evolution of TGA parameters during OLT

The lag-time measured before surgery (P1 samples) and until reperfusion (P2, P3 samples) was shorter in patients than in controls (figure 1).

Moreover, the IIa peak appeared lower, but the differences observed were not statistically significant, particularly when the results obtained were normalized.

Importantly, ETP values before surgery (P1), at the end of hepatectomy (P2), and at the end of the anhepatic phase (P3) were also not statistically different to those obtained in healthy subjects.

Finally, after reperfusion (P4), ETP and the thrombin peak significantly decreased, with prolongation of the lag-time, and these modifications were actually the most significant that were evidenced during the surgical procedure.

In vitro effects of FFP and PCC on TGA parameters

We first evaluated the effects of FFP and PCC by testing the plasma collected after reperfusion (P4), since the greatest changes in TGA parameters were found at this specific time.

As shown in figure 2, the addition of FFP to P4 plasma did not correct ETP, and the other parameters also remained unchanged.

In contrast, together with shortening of the lag-times, a strong increase in ETP values and thrombin peaks was measured after PCC was added to P4 plasma.

These parameters were slightly higher than those of healthy controls in the presence of the lowest dose of PCC tested (12.5 IU/Kg), with a median normalized ETP of 167% (extreme values 104-201) compared to 85% (56-105) in controls ($p=0.002$).

When a concentration of PCC corresponding to a dose of 25 IU/kg was added to P4 plasma, this TG increase was enhanced, with higher values of ETP and thrombin peak, compared to the controls.

We then tested the effect of PCC added to plasma P1 collected on the beginning of surgery and as expected, a dramatic increase in ETP and thrombin peak was also registered with both doses tested. On the other hand, no significant change in any TGA parameter was measured when FFP was added to P1 plasma.

DISCUSSION

To our knowledge, no previous study has compared the *in vitro* effects of FFP and PCC on thrombin generation in cirrhotic patients during liver transplantation.

Our results confirmed first that thrombin generation was not significantly affected in cirrhotic patients, in agreement with previous studies^{34,35}. ETP values were indeed comparable to those measured in healthy subjects despite abnormal results on standard coagulation assays.

This situation remained stable in all patients of our cohort during the surgical procedure until reperfusion, after which a clear and significant reduction in thrombin generation was evidenced. This effect, comparable to those described by Lisman *et al*³⁵, may in part be explained by heparin-like molecules that can be released after reperfusion during liver transplantation^{77,78}.

In current clinical practice, fresh frozen plasma is often administered to surgical patients who exhibit a bleeding risk, but we demonstrated that this product completely failed to modify thrombin generation after it was added to the plasma of cirrhotic patients. This lack of effect of FFP was also evidenced in samples collected both on initiation of surgery (a period during which FFP is frequently infused at a mean dosage of 5 ml/kg in our department) and after reperfusion, i.e. when thrombin generation was significantly decreased. This result is also in agreement with those of Tripodi *et al.*⁶⁰, who did not find any significant effect of pooled normal plasma on thrombin generation measured in similar patients. Schofield *et al.* also showed that FFP did not modify thromboelastography parameters after hepatectomy⁵⁹.

In contrast, a significant increase in thrombin generation was measured after addition of PCC to the plasma of cirrhotic patients, and this effect was achieved with the lowest concentration tested (equivalent of a dose of 12.5 IU/Kg). When a higher amount of PCC corresponding to a dose of 25 IU/Kg was added, particularly in P1 plasma collected before the liver transplantation, more potent thrombin generation was measured.

FFP is a source of both pro-coagulant and anti-coagulant factors, while PCC only contains vitamin K-dependent proteins, without antithrombin or TFPI. PCC is therefore characterized by

“low antithrombin” and “high prothrombin” contents, and this combination has previously been shown to be more efficient in thrombin generation^{69,79}.

For clinical practice, our results strongly support the hypothesis that infusion of FFP or PCC before OLT is useless. In addition, this therapeutic approach might also be harmful, particularly if PCC is more frequently administered. Routine coagulation assays such as PT poorly predict hemorrhagic risk in surgical patients¹⁸, and the absence of effect of FFP on thrombin generation in vitro also sustains the “non-FFP” policy, as proposed several years ago^{62,74}.

On the other hand, a relationship has previously been established between high levels of thrombin generation and the risk of thrombosis^{72,80,81}. Therefore, the safety of PCC administered before incision in asymptomatic patients with liver failure is questionable, even when coagulation tests such as PT are prolonged, and it has to be carefully evaluated since graft arterial thrombosis is a potential complication of OLT³². A randomized placebo-controlled trial, which evaluate the benefit / safety of PCC in reducing blood loss during OLT in patients with $INR \geq 1.5$ without thrombotic complication has therefore recently been initiated⁷⁶.

Our results showed that a low dose of PCC was highly effective in restoring normal thrombin generation after reperfusion. This plasma-derived product, which is safer than FFP since it is nanofiltered can be injected at low volumes without any deleterious increase in portal venous pressure, and could therefore be particularly useful in bleeding OLT patients with severely impaired coagulation.

However, our study has certain limitations. First and as in a previous study³⁵, a limited number of cirrhotic patients were evaluated, although the results obtained were homogeneous.

Secondly, although thrombin generation assay reflects more comprehensively the haemostasis status of cirrhotic patients than usual coagulation tests, it does not evaluate platelet function nor fibrinolysis, which can be impaired during OLT in such patients. Moreover, TGA cannot easily be performed in routine laboratories, and therefore the results obtained cannot be used in clinical practice.

Thirdly, the effects of FFP and PCC on TG were only measured *in vitro*, and require confirmation *in vivo*.

In conclusion, this study demonstrates that FFP does not improve thrombin generation in patients undergoing orthotopic liver transplantation, and therefore this blood product is likely not to be useful in this clinical situation. In contrast, PCC significantly increases thrombin generation and could be used in cases of bleeding only, but its efficacy / safety has to be confirmed.

WHAT IS KNOWN ABOUT THIS TOPIC?

- Thrombin generation is not impaired in cirrhotic patients requiring liver transplantation, despite abnormal results on routine coagulation tests.
- Fresh frozen plasma (FFP) is often administered to cirrhotic patients during orthotopic liver transplantation but is probably ineffective and by increasing portal vein pressure may be harmful.

WHAT DOES THIS PAPER ADD?

- FFP does not improve thrombin generation before surgery and during OLT, particularly after the reperfusion phase.
- Prothrombin complex concentrates normalize impaired thrombin generation during OLT, but its use may lead to a hypercoagulable state with potential risk of thrombosis.

TABLES AND FIGURES

Table 1 : Baseline characteristics of patients (n=10)

HCV : hepatitis C virus, MELD : model for end-stage liver disease, BMI: body mass index.

Results are expressed as median [min-max] except specification.

Patients n= 10	Characteristics
Age (years)	62,5 [35-65]
Sex male (n, %)	7 (70)
Size (cm)	172 [160-180]
Weight (kg)	68,5 [59-96]
BMI (kg/m ²)	24,4 [19-31]
Primary OLT indication	
Alcoholic cirrhosis (%)	80
Alcoholic + HCV (%)	20
CHILD score	11 [8-13]
MELD score	19,5 [11-29]
Incision ascites (ml)	2900 [0-8500]
Prothrombin rate (%)	36 [31-62]
aPTT (ratio)	1,47 [1,22-1,61]
Platelets (10 ⁹ .litre ⁻¹)	111 [47-319]
Fibrinogen (g.litre ⁻¹)	1,9 [1,34-2,67]
Cold ischaemic length (hour)	5,81 [4,3-9,7]
Surgery (hour)	6,82 [4-11]
Reperfusion syndrome (n, %)	8 (80%)
FFP transfusion (units)	5 [2-19]
RBC transfusion (units)	4 [0-9]
Platelets (units)	1,5 [0-4]
Fluids intake (ml)	2625 [1000-5000]

Figure 1: Evolution of normalized TGA parameters during liver transplantation compared to healthy subjects (n=29). P1 = Before surgery, P2 = End of hepatectomy, P3 = End of anhepatic phase, P4 = Reperfusion.

* $p < 0.05$ vs. healthy subjects, ■ $p < 0.05$ vs. before surgery values (P1)

Figure 1

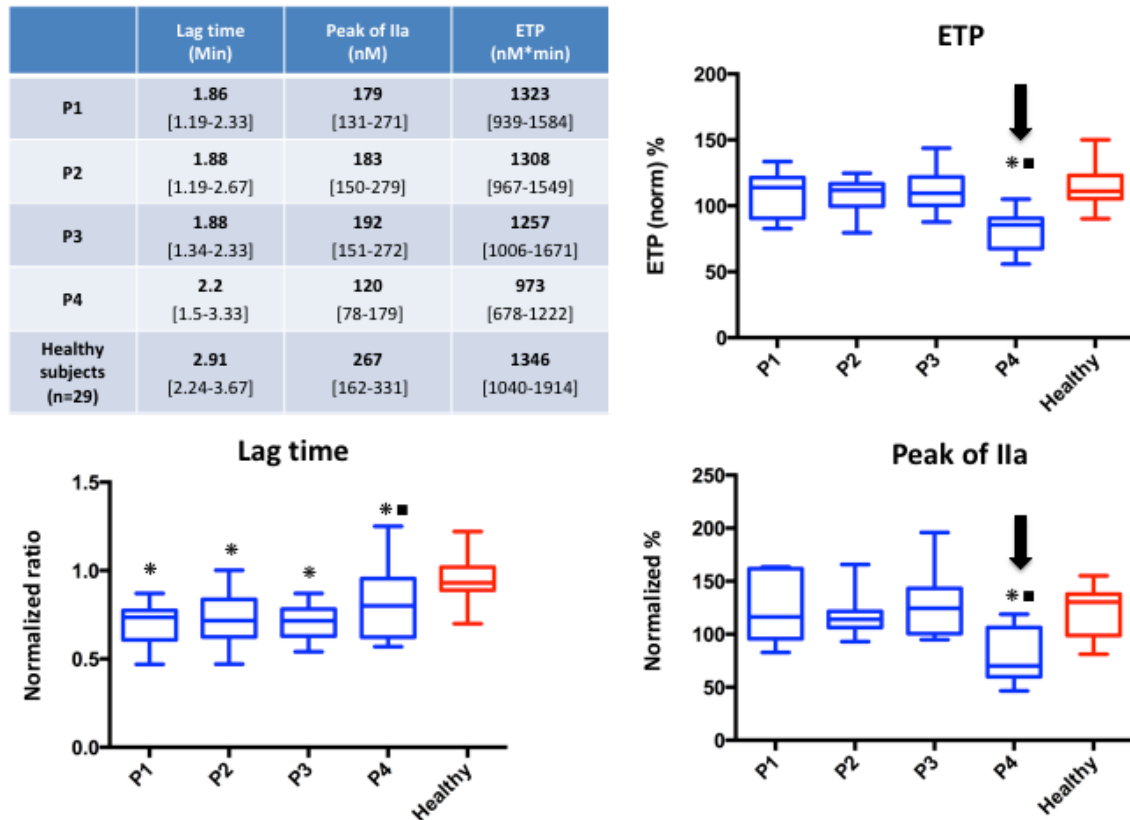


Figure 2: *In vitro* effects of FFP and PCC on TGA after reperfusion (P4).

Results obtained before (P4) and after addition to P4 plasma of 5ml/Kg of FFP (P4+FFP), 12.5 IU/Kg of PCC (P4+PCC 12), or 25 IU/Kg of PCC (P4+PCC 25).

* $p < 0.05$ vs. P4, ■ $p < 0.05$ vs. P4+FFP, ▲ $p < 0.05$ vs. healthy subjects

Figure 2

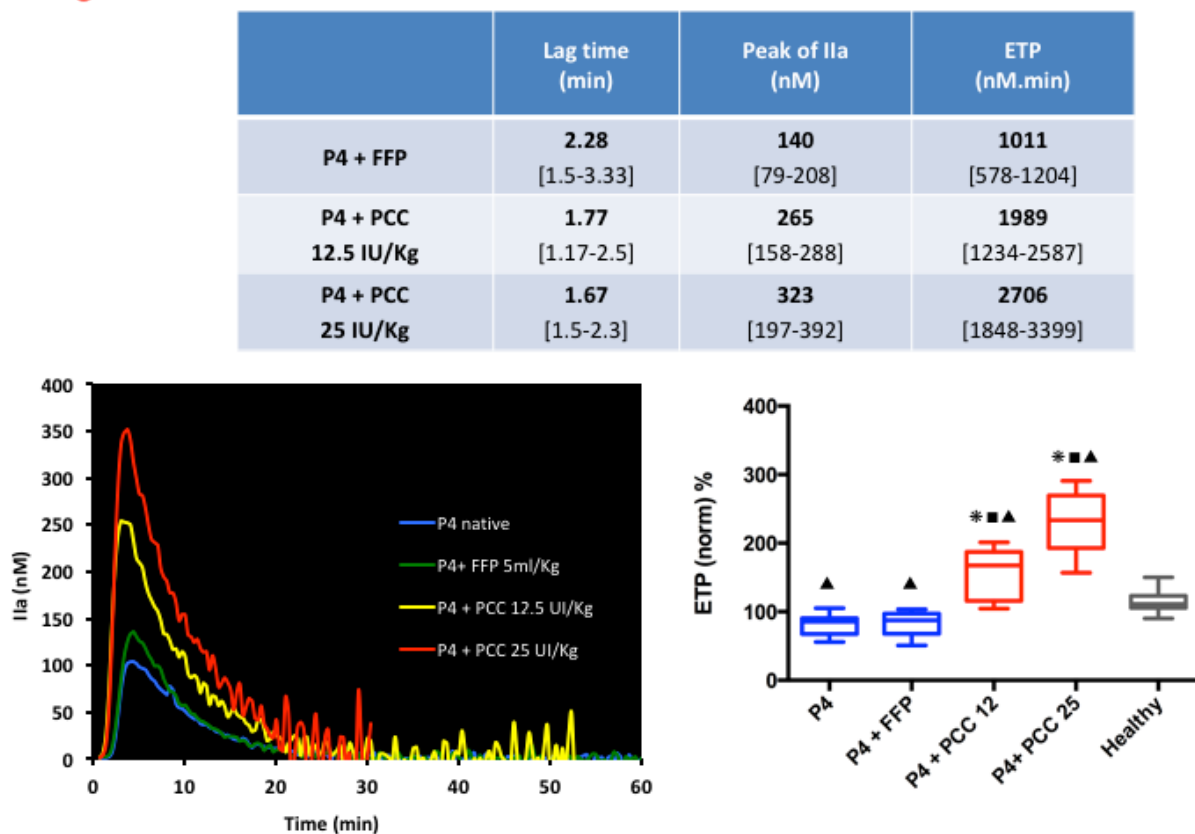
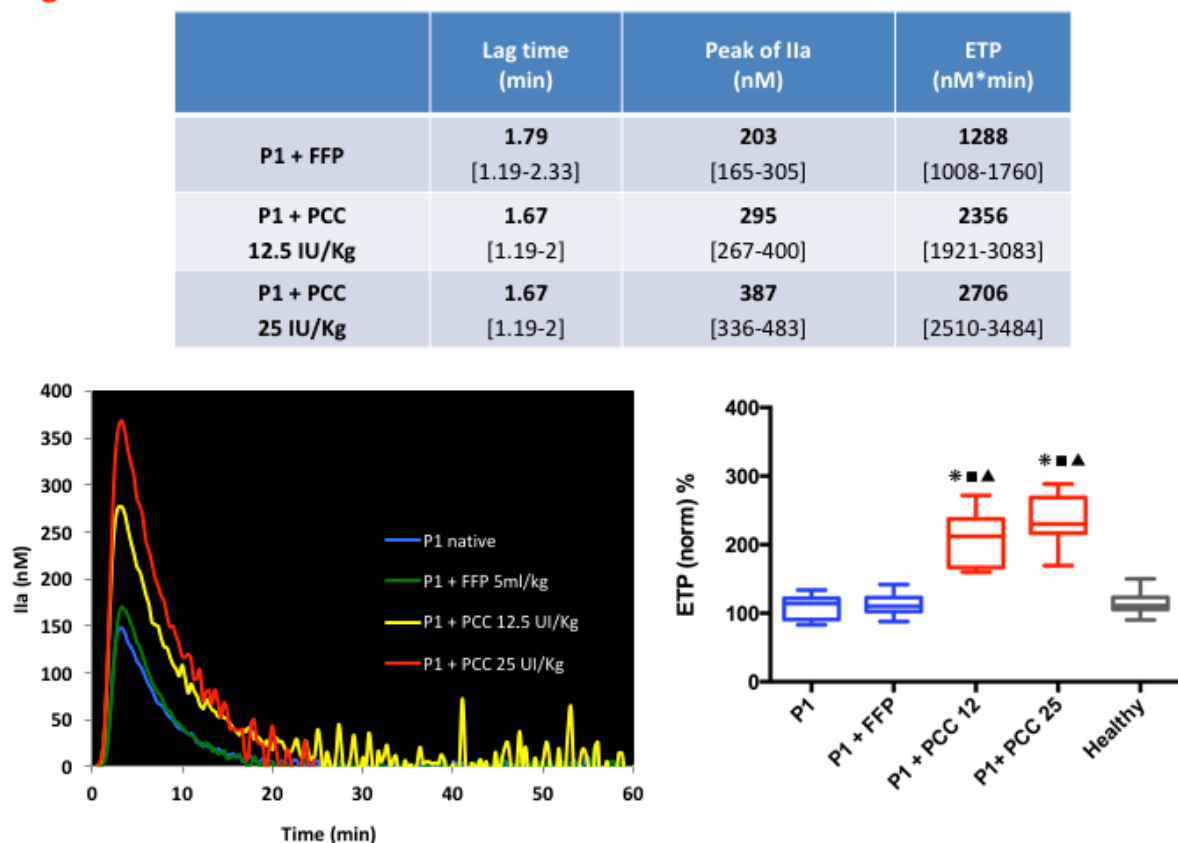


Figure 3: *In vitro* effects of FFP and PCC on TGA before surgery (P1).

Results obtained before (P1) and after addition to P1 plasma of 5ml/Kg of FFP (P1+FFP), 12.5 IU/Kg of PCC (P1+PCC 12), or 25 IU/Kg of PCC (P1+PCC 25).

* $p < 0.05$ vs. P1, ■ $p < 0.05$ vs. P1+FFP, ▲ $p < 0.05$ vs. healthy subjects

Figure 3



CONCLUSION ET PERPECTIVES

Ce travail est le premier évaluant l'efficacité comparée du PFC et d'un CCP sur la génération de thrombine au cours de la transplantation hépatique. Il confirme plusieurs données de la littérature, et notamment l'existence d'une génération de thrombine conservée chez les patients cirrhotiques, malgré l'altération des tests de coagulation classiques. Ensuite, au cours de la transplantation, il objective une altération de la coagulation après déclampage du transplant. Enfin, nous démontrons l'inefficacité des PFC à augmenter la génération de thrombine chez ces patients, malgré la normalisation des chiffres de TP.

Cette étude apporte également de nouvelles données sur le sujet, démontrant notamment l'inefficacité des PFC à corriger in vitro l'altération de la coagulation observée après reperfusion. A l'inverse, nous avons pu démontrer que le CCP augmente la génération de thrombine, avec des valeurs d'ETP (potentiel endogène de Thrombine) plus élevées que chez les sujets sains et pouvant refléter une hypercoagulabilité. Ces constatations sont valables dès les plus faibles doses de CCP utilisées (12,5 UI/Kg), avant incision et après reperfusion.

Les informations apportées par notre travail, appellent de nouvelles recherches. En effet ces résultats, soutenus par la littérature, pourraient être un argument supplémentaire pour réévaluer la pertinence des transfusions peropératoires systématiques de PFC. L'efficacité du CCP in vitro est encourageante, mais l'augmentation marquée, voire supra-physiologique, de la génération de thrombine, souligne l'importance d'en préciser les indications et les posologies dans ce contexte à risque thrombotique non négligeable. Les résultats de l'étude PROTON-trial apporteront, de ce fait, des données complémentaires à nos résultats.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK. Liver cirrhosis. *Lancet*. 2014;383(9930):1749-1761. doi:10.1016/S0140-6736(14)60121-5.
2. Naveau S, Perlemuter G, Balian A. [Epidemiology and natural history of cirrhosis]. *Rev Prat*. 2005;55(14):1527-1532.
3. Haute Autorité de Santé. Guide ALD 6 - Cirrhoses. November 2008:1-38.
4. Butler P, Israel L, Nusbacher J, Jenkins DE, Starzl TE. Blood transfusion in liver transplantation. *Transfusion*. 1985;25(2):120-123.
5. Massicotte L, Denault AY, Beaulieu D, et al. Transfusion rate for 500 consecutive liver transplantations: experience of one liver transplantation center. *Transplantation*. 2012;93(12):1276-1281. doi:10.1097/TP.0b013e318250fc25.
6. Brummel KE, Paradis SG, Butenas S, Mann KG. Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation. *Blood*. 2002;100(1):148-152.
7. Giannini EG. Review article: thrombocytopenia in chronic liver disease and pharmacologic treatment options. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006;23(8):1055-1065. doi:10.1111/j.1365-2036.2006.02889.x.
8. Goulis J, Chau TN, Jordan S, et al. Thrombopoietin concentrations are low in patients with cirrhosis and thrombocytopenia and are restored after orthotopic liver transplantation. *Gut*. 1999;44(5):754-758.
9. Rios R, Sangro B, Herrero I, Quiroga J, Prieto J. The Role of Thrombopoietin in the Thrombocytopenia of Patients with Liver Cirrhosis. *Am J Gastroenterol*. 2005;100(6):1311-1316. doi:10.1111/j.1572-0241.2005.41543.x.
10. Lisman T, Leebeek FWG. Hemostatic alterations in liver disease: a review on pathophysiology, clinical consequences, and treatment. *Dig Surg*. 2007;24(4):250-258. doi:10.1159/000103655.
11. Potze W, Porte RJ, Lisman T. Management of coagulation abnormalities in liver disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;9(1):103-114. doi:10.1586/17474124.2014.934673.
12. Caldwell SH, Hoffman M, Lisman T, et al. Coagulation disorders and hemostasis in liver disease: pathophysiology and critical assessment of current management. In: Vol 44. 2006:1039-1046. doi:10.1002/hep.21303.
13. Iwakiri Y. Endothelial dysfunction in the regulation of cirrhosis and portal hypertension. *Liver Int*. 2012;32(2):199-213. doi:10.1111/j.1478-3231.2011.02579.x.
14. Tripodi A, Mannucci PM. The coagulopathy of chronic liver disease. *N Engl J Med*. 2011;365(2):147-156. doi:10.1056/NEJMra1011170.
15. Lisman T, Porte RJ. Rebalanced hemostasis in patients with liver disease: evidence and clinical consequences. *Blood*. 2010;116(6):878-885. doi:10.1182/blood-2010-02-261891.
16. Tripodi A, Primignani M, Chantarangkul V, et al. Thrombin generation in patients with cirrhosis: the role of platelets. *Hepatology*. 2006;44(2):440-445. doi:10.1002/hep.21266.

17. Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(9):1381-1389.
18. Tripodi A, Caldwell SH, Hoffman M, Trotter JF, Sanyal AJ. Review article: the prothrombin time test as a measure of bleeding risk and prognosis in liver disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007;26(2):141-148. doi:10.1111/j.1365-2036.2007.03369.x.
19. Caldwell S, Shah N. The prothrombin time-derived international normalized ratio: great for Warfarin, fair for prognosis and bad for liver-bleeding risk. *Liver Int.* 2008;28(10):1325-1327. doi:10.1111/j.1478-3231.2008.01881.x.
20. Blanchard RA, Furie BC, Jorgensen M, Kruger SF, Furie B. Acquired vitamin K-dependent carboxylation deficiency in liver disease. *N Engl J Med.* 1981;305(5):242-248. doi:10.1056/NEJM198107303050502.
21. Delahousse B, Labat-Debelleix V, Decalonne L, d'Alteroche L, Perarnau JM, Gruel Y. Comparative study of coagulation and thrombin generation in the portal and jugular plasma of patients with cirrhosis. *Thromb Haemost.* 2010;104(4):741-749. doi:10.1160/TH10-01-0040.
22. Tsochatzis EA, Senzolo M, Germani G, Gatt A, Burroughs AK. Systematic review: portal vein thrombosis in cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2010;31(3):366-374. doi:10.1111/j.1365-2036.2009.04182.x.
23. Dabbagh O, Oza A, Prakash S, Sunna R, Saettele TM. Coagulopathy does not protect against venous thromboembolism in hospitalized patients with chronic liver disease. *Chest.* 2010;137(5):1145-1149. doi:10.1378/chest.09-2177.
24. Annamalai A, Kim I, Sundaram V, Klein A. Incidence and risk factors of deep vein thrombosis after liver transplantation. *Transplant Proc.* 2014;46(10):3564-3569. doi:10.1016/j.transproceed.2014.09.113.
25. Tripodi A, Primignani M, Chantarangkul V, et al. An Imbalance of Pro- vs Anti-Coagulation Factors in Plasma From Patients With Cirrhosis. *YGAST.* 2009;137(6):2105-2111. doi:10.1053/j.gastro.2009.08.045.
26. Tripodi A, Primignani M, Lemma L, Chantarangkul V, Mannucci PM. Evidence that low protein C contributes to the procoagulant imbalance in cirrhosis. *Journal of Hepatology.* 2013;59(2):265-270. doi:10.1016/j.jhep.2013.03.036.
27. Oksüzoğlu G, Simsek H, Haznedaroğlu IC, Kirazli S. Tissue factor pathway inhibitor concentrations in cirrhotic patients with and without portal vein thrombosis. *Am J Gastroenterol.* 1997;92(2):303-306.
28. Potze W, Arshad F, Adelmeijer J, et al. Decreased tissue factor pathway inhibitor (TFPI)-dependent anticoagulant capacity in patients with cirrhosis who have decreased protein S but normal TFPI plasma levels. *Br J Haematol.* 2013;162(6):819-826. doi:10.1111/bjh.12462.
29. Tripodi A, ANSTEE QM, SOGAARD KK, Primignani M, VALLA DC. Hypercoagulability in cirrhosis: causes and consequences. *J Thromb Haemost.* 2011;9(9):1713-1723. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04429.x.
30. Tripodi A, Primignani M, Lemma L, et al. Detection of the imbalance of procoagulant versus anticoagulant factors in cirrhosis by a simple laboratory method. *Hepatology.* 2010;52(1):249-255. doi:10.1002/hep.23653.

31. Lisman T, Porte RJ. Hepatic artery thrombosis after liver transplantation: more than just a surgical complication? *Transpl Int*. 2009;22(2):162-164. doi:10.1111/j.1432-2277.2008.00762.x.
32. Arshad F, Lisman T, Porte RJ. Hypercoagulability as a contributor to thrombotic complications in the liver transplant recipient. *Liver Int*. 2013;33(6):820-827. doi:10.1111/liv.12140.
33. Lisman T, Bakhtiari K, Adelmeijer J, Meijers JCM, Porte RJ, Stravitz RT. Intact thrombin generation and decreased fibrinolytic capacity in patients with acute liver injury or acute liver failure. *J Thromb Haemost*. 2012;10(7):1312-1319. doi:10.1111/j.1538-7836.2012.04770.x.
34. Tripodi A, Salerno F, Chantarangkul V, et al. Evidence of normal thrombin generation in cirrhosis despite abnormal conventional coagulation tests. *Hepatology*. 2005;41(3):553-558. doi:10.1002/hep.20569.
35. Lisman T, Bakhtiari K, Pereboom ITA, Hendriks HGD, Meijers JCM, Porte RJ. Normal to increased thrombin generation in patients undergoing liver transplantation despite prolonged conventional coagulation tests. *Journal of Hepatology*. 2010;52(3):355-361. doi:10.1016/j.jhep.2009.12.001.
36. Gatt A, Riddell A, Calvaruso V, Tuddenham EG, Makris M, Burroughs AK. Enhanced thrombin generation in patients with cirrhosis-induced coagulopathy. *J Thromb Haemost*. 2010;8(9):1994-2000. doi:10.1111/j.1538-7836.2010.03937.x.
37. Castañeda B. Effects of blood volume restitution following a portal hypertensive-related bleeding in anesthetized cirrhotic rats. *Hepatology*. 2001;33(4):821-825. doi:10.1053/jhep.2001.23437.
38. Li Z, Sun Y-M, Wu F-X, Yang L-Q, Lu Z-J, Yu W-F. Controlled low central venous pressure reduces blood loss and transfusion requirements in hepatectomy. *World J Gastroenterol*. 2014;20(1):303-309. doi:10.3748/wjg.v20.i1.303.
39. Massicotte L, Perrault M-A, Denault AY, et al. Effects of phlebotomy and phenylephrine infusion on portal venous pressure and systemic hemodynamics during liver transplantation. *Transplantation*. 2010;89(8):920-927. doi:10.1097/TP.0b013e3181d7c40c.
40. Noris M, Remuzzi G. Uremic bleeding: closing the circle after 30 years of controversies? *Blood*. 1999;94(8):2569-2574.
41. Agarwal B, Gatt A, Riddell A, et al. Hemostasis in patients with acute kidney injury secondary to acute liver failure. *Kidney Int*. 2013;84(1):158-163. doi:10.1038/ki.2013.92.
42. Montalto P, Vlachogiannakos J, Cox DJ, Pastacaldi S, Patch D, Burroughs AK. Bacterial infection in cirrhosis impairs coagulation by a heparin effect: a prospective study. *Journal of Hepatology*. 2002;37(4):463-470.
43. Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg*. 1973;60(8):646-649.
44. Malinchoc M, Kamath PS, Gordon FD, Peine CJ, Rank J, Borg ter PC. A model to predict poor survival in patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunts. *Hepatology*. 2000;31(4):864-871. doi:10.1053/he.2000.5852.
45. Kamath PS, Kim WR, Advanced Liver Disease Study Group. The model for end-stage

- liver disease (MELD). *Hepatology*. 2007;45(3):797-805. doi:10.1002/hep.21563.
46. QUICK AJ, STANLEY-BROWN M, BANCROFT FW. A STUDY OF THE COAGULATION DEFECT IN HEMOPHILIA AND IN JAUNDICE.*. *The American Journal of the Medical Sciences KW* . 1935;190 N2 -(4).
 47. Coenraad Hemker H, Dieri RA, De Smedt E, Béguin S. Thrombin generation, a function test of the haemostatic thrombotic system. *Thromb Haemost*. October 2006. doi:10.1160/TH06-07-0408.
 48. Dieri Al R, de Laat B, Hemker HC. Thrombin generation: what have we learned? *Blood Rev*. 2012;26(5):197-203. doi:10.1016/j.blre.2012.06.001.
 49. Krzanicki D, Sugavanam A, Mallett S. Intraoperative hypercoagulability during liver transplantation as demonstrated by thromboelastography. *Liver Transpl*. 2013;19(8):852-861. doi:10.1002/lt.23668.
 50. Schemmer P, Decker F, Dei-Anane G, et al. The vital threat of an upper gastrointestinal bleeding: Risk factor analysis of 121 consecutive patients. *World J Gastroenterol*. 2006;12(22):3597-3601.
 51. Basili S, Ferro D, Leo R, et al. Bleeding time does not predict gastrointestinal bleeding in patients with cirrhosis. The CALC Group. Coagulation Abnormalities in Liver Cirrhosis. *Journal of Hepatology*. 1996;24(5):574-580.
 52. Terjung B, Lemnitzer I, Dumoulin FL, et al. Bleeding complications after percutaneous liver biopsy. An analysis of risk factors. *Digestion*. 2003;67(3):138-145.
 53. Ewe K. Bleeding after liver biopsy does not correlate with indices of peripheral coagulation. *Dig Dis Sci*. 1981;26(5):388-393.
 54. Segal JB, Dzik WH, Transfusion Medicine/Hemostasis Clinical Trials Network1. Paucity of studies to support that abnormal coagulation test results predict bleeding in the setting of invasive procedures: an evidence-based review. *Transfusion*. 2005;45(9):1413-1425. doi:10.1111/j.1537-2995.2005.00546.x.
 55. Massicotte L, Beaulieu D, Thibeault L, et al. Coagulation defects do not predict blood product requirements during liver transplantation. *Transplantation*. 2008;85(7):956-962. doi:10.1097/TP.0b013e318168fcd4.
 56. Massicotte L, Capitanio U, Beaulieu D, Roy J-D, Roy A, Karakiewicz PI. Independent validation of a model predicting the need for packed red blood cell transfusion at liver transplantation. *Transplantation*. 2009;88(3):386-391. doi:10.1097/TP.0b013e3181aed477.
 57. Lodge JPA, Jonas S, Jones RM, et al. Efficacy and safety of repeated perioperative doses of recombinant factor VIIa in liver transplantation. *Liver Transpl*. 2005;11(8):973-979. doi:10.1002/lt.20470.
 58. Planinsic RM, van der Meer J, Testa G, et al. Safety and efficacy of a single bolus administration of recombinant factor VIIa in liver transplantation due to chronic liver disease. *Liver Transpl*. 2005;11(8):895-900. doi:10.1002/lt.20458.
 59. Schofield N, Sugavanam A, Henley M, Thompson K, Riddell A, Mallett SV. An in vitro study comparing two dose regimes of fresh frozen plasma on conventional and thromboelastographic tests of coagulation after major hepatic resection. *Transfus Med*. 2015;25(2):85-91. doi:10.1111/tme.12194.

60. Tripodi A, Chantarangkul V, Primignani M, et al. Thrombin generation in plasma from patients with cirrhosis supplemented with normal plasma: considerations on the efficacy of treatment with fresh-frozen plasma. *Intern Emerg Med*. 2011;7(2):139-144. doi:10.1007/s11739-011-0528-4.
61. Tripodi A, Chantarangkul V, Primignani M. Fresh frozen plasma transfusion fails to influence the hemostatic balance in critically ill patients with a coagulopathy: comment. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2015;13(10):1941-1943. doi:10.1111/jth.13056.
62. Dupont J, Messiant F, Declerck N, et al. Liver transplantation without the use of fresh frozen plasma. *Anesthesia & Analgesia*. 1996;83(4):681-686.
63. Massicotte L, Sassine M-P, Lenis S, Roy A. Transfusion predictors in liver transplant. *Anesthesia & Analgesia*. 2004;98(5):1245–51–tableofcontents.
64. Massicotte L, Lenis S, Thibeault L, Sassine M-P, Seal RF, Roy A. Effect of low central venous pressure and phlebotomy on blood product transfusion requirements during liver transplantations. *Liver Transpl*. 2006;12(1):117-123. doi:10.1002/lt.20559.
65. Clevenger B, Mallett SV. Transfusion and coagulation management in liver transplantation. *World J Gastroenterol*. 2014;20(20):6146-6158. doi:10.3748/wjg.v20.i20.6146.
66. Feng Z-Y, Xu X, Zhu S-M, Bein B, Zheng S-S. Effects of Low Central Venous Pressure During Preanhepatic Phase on Blood Loss and Liver and Renal Function in Liver Transplantation. *World J Surg*. 2010;34(8):1864-1873. doi:10.1007/s00268-010-0544-y.
67. Hemker HC, Giesen P, AlDieri R, et al. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2002;32(5-6):249-253.
68. Baglin T. The measurement and application of thrombin generation. *Br J Haematol*. 2005;130(5):653-661. doi:10.1111/j.1365-2141.2005.05612.x.
69. Butenas S, van't Veer C, Mann KG. "Normal" thrombin generation. *Blood*. 1999;94(7):2169-2178.
70. Duchemin J, Pan-Petes B, Arnaud B, Blouch M-T, Abgrall JF. Influence of coagulation factors and tissue factor concentration on the thrombin generation test in plasma. *Thromb Haemost*. 2008;99(4):1-7. doi:10.1160/TH07-09-0581.
71. Dielis AWJH, Castoldi E, Spronk HMH, et al. Coagulation factors and the protein C system as determinants of thrombin generation in a normal population. *J Thromb Haemost*. 2008;6(1):125-131. doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02824.x.
72. Couturaud F, Duchemin J, Leroyer C, Delahousse B, Abgrall JF, Mottier D. Thrombin generation in first-degree relatives of patients with venous thromboembolism who have factor V Leiden. A pilot study. *Thromb Haemost*. December 2007. doi:10.1160/TH07-08-0515.
73. Dieri Al R, Peyvandi F, Santagostino E, et al. The thrombogram in rare inherited coagulation disorders: its relation to clinical bleeding. *Thromb Haemost*. 2002;88(4):576-582. doi:10.1267/th02100576.
74. Massicotte L, Lenis S, Thibeault L, Sassine M-P, Seal RF, Roy A. Reduction of blood product transfusions during liver transplantation. *Can J Anesth/J Can Anesth*. 2005;52(5):545-546. doi:10.1007/BF03016538.

75. Massicotte L, Perrault M-A, Denault AY, et al. Effects of phlebotomy and phenylephrine infusion on portal venous pressure and systemic hemodynamics during liver transplantation. *Transplantation*. 2010;89(8):920-927. doi:10.1097/TP.0b013e3181d7c40c.
76. Arshad F, Ickx B, van Beem RT, et al. Prothrombin complex concentrate in the reduction of blood loss during orthotopic liver transplantation: PROTON-trial. *BMC Surg*. 2013;13(1):22. doi:10.1186/1471-2482-13-22.
77. Senzolo M, Agarwal S, Zappoli P, Vibhakorn S, Mallett S, Burroughs AK. Heparin-like effect contributes to the coagulopathy in patients with acute liver failure undergoing liver transplantation. *Liver Int*. 2009;29(5):754-759. doi:10.1111/j.1478-3231.2009.01977.x.
78. Kettner SC, Gonano C, Seebach F, et al. Endogenous heparin-like substances significantly impair coagulation in patients undergoing orthotopic liver transplantation. *Anesthesia & Analgesia*. 1998;86(4):691-695.
79. Allen GA, Wolberg AS, Oliver JA, Hoffman M, Roberts HR, Monroe DM. Impact of procoagulant concentration on rate, peak and total thrombin generation in a model system. *J Thromb Haemost*. 2004;2(3):402-413.
80. Eikelboom JW, Ivey L, Ivey J, Baker RI. Familial thrombophilia and the prothrombin 20210A mutation: association with increased thrombin generation and unusual thrombosis. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1999;10(1):1-5.
81. Hron G, Kollars M, Binder BR, Eichinger S, Kyrle PA. Identification of patients at low risk for recurrent venous thromboembolism by measuring thrombin generation. *JAMA*. 2006;296(4):397-402. doi:10.1001/jama.296.4.397.

ANNEXES N°1

Fiches individuelles des patients inclus

Patient n° 1

Sexe : Masculin
Age : 49
Taille : 180 cm
Poids : 80 kg
IMC : 24,7

Etiologie de la cirrhose : Alcool et Hépatite C
CHILD : C 11
Score de MELD : 20

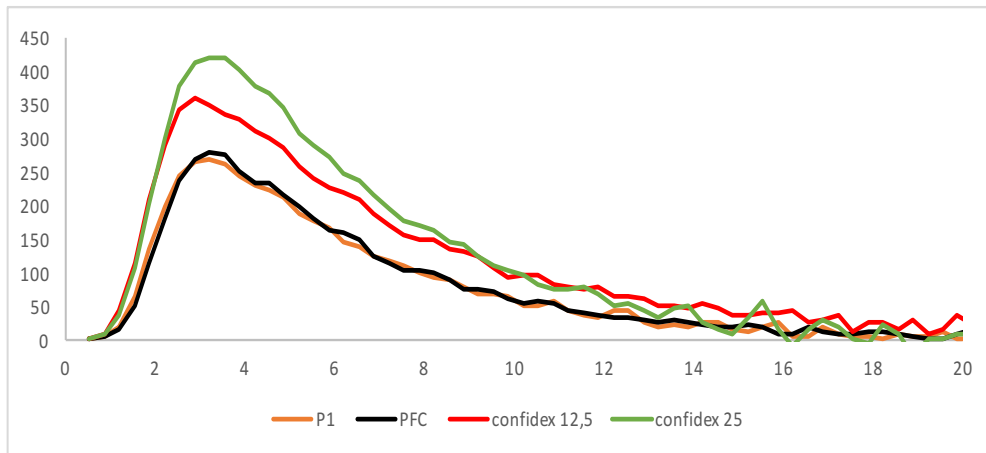
Temps opératoire : 10h
Durée d'anhépatie : NC
Ascite à l'incision : aucune
Pertes sanguines totales : 1200
Syndrome de reperfusion : Non
PAM moyenne : NC

Plasma frais congelé(s) : 2
Culot globulaire : 0
Concentré plaquettaire : 0
Remplissage autre : 1000 ml

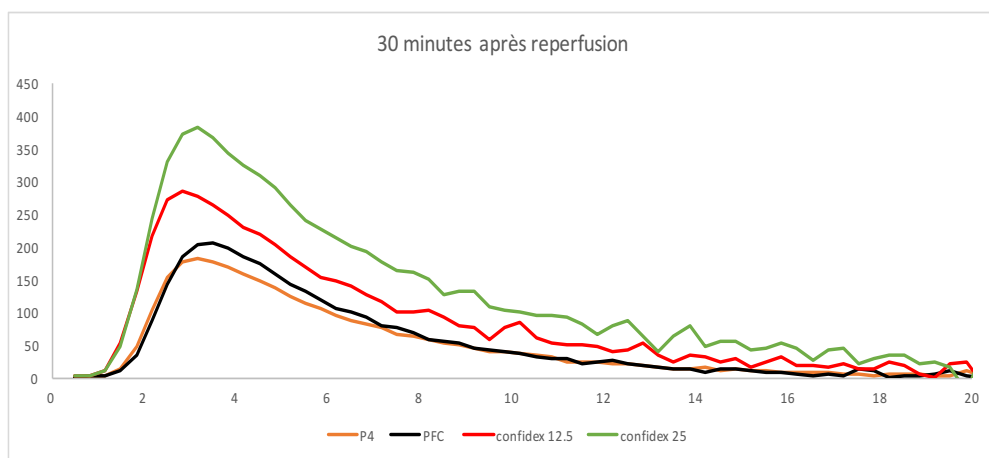
Antécédents :

Tabagisme, Hépatite C, glycogénose non classée, thrombose porte, Guillain Barré, Appendicectomie

Thrombogramme avant incision avec ajout de PFC et de CCP



Thrombogramme après reperfusion avec ajout de PFC et de CCP



Patient n° 2

Sexe : Féminin
Age : 64 ans
Taille : 165 cm
Poids : 64 kg
IMC : 23,51

CHC : Non
Etiologie de la cirrhose : Alcoolique
CHILD : C 11
Score de MELD : 20
Rupture VO : Non

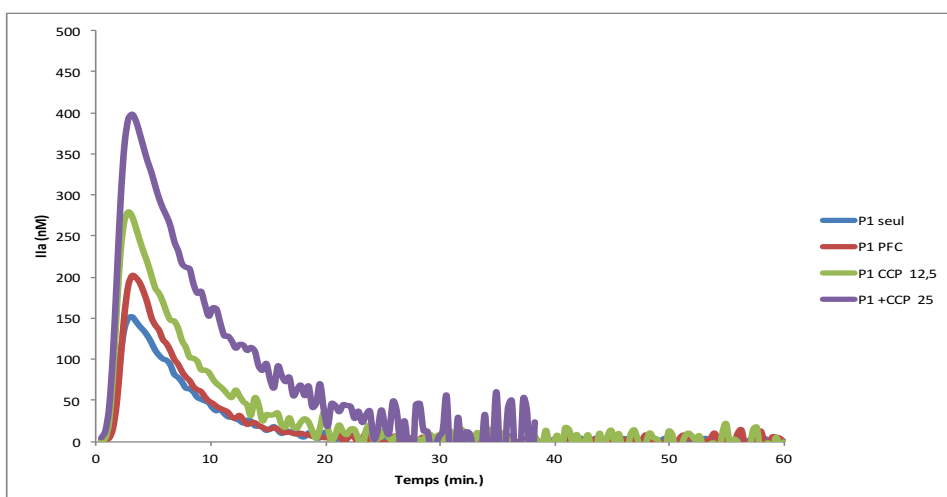
Temps opératoire : 10h
Durée d'anhépatie : NC
Ascite à l'incision : 4600 ml
Pertes sanguines totales : 620 ml
Syndrome de reperfusion : Oui
PAM moyenne : NC

Plasma frais congelé(s) : 5
Culot globulaire : 5
Concentré plaquettaire : 1
Remplissage autre : 2500 ml

Antécédents :

Sténose carotidienne (endarterectomie) , HTA, dyslipidémie, tabagisme, pyélonéphrite, ovariectomie avec hystérectomie

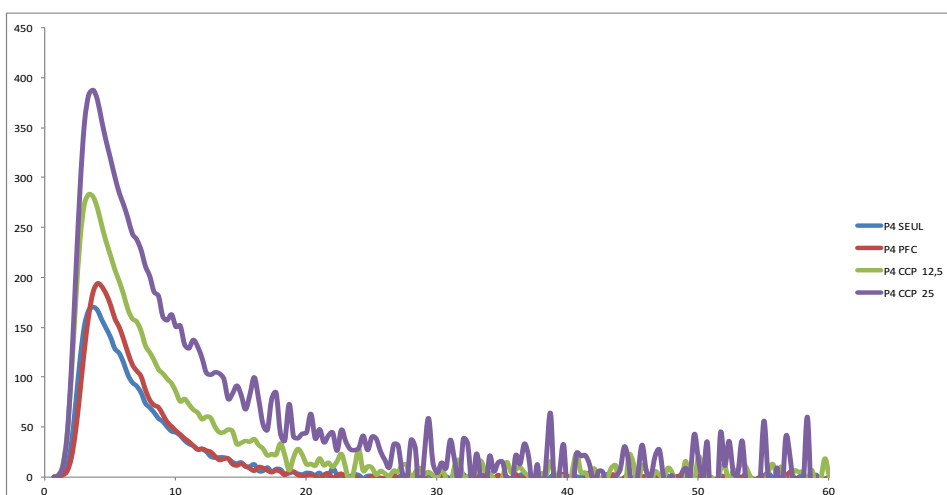
Thrombogramme avant incision avec ajout de PFC et de CCP



TP : 33%
TCK : 1,42
Plaquettes : 98 G/L
Fibrinogène : 1,84

Latence : 1,5 min
Pic : 150 nM
Temps au pic : 3,34 min
ETP : 1017 nM.min
Vélocité : 82

Thrombogramme après reperfusion avec ajout de PFC et de CCP



TP : 38%
TCK : 1,43
Plaquettes : 88 G/L
Fibrinogène : 1,54 g/L

Latence : 1,67 min
Pic : 169 nM
Temps au pic : 3,83 min
ETP : 1001 nM.min
Vélocité : 78,67

Patient n° 3

Sexe : Féminin

Age : 60 ans

Taille : 160 cm

Poids : 70 kg

IMC : 27,34

CHC : Non

Etiologie de la cirrhose : 1

CHILD : C 11

Score de MELD : 17

Varices Oesophagiennes : NC

Temps opératoire : 6 h 7 min

Durée d'anhépatie : 1 h 39 min

Ascite à l'incision : 1900 ml

Pertes sanguines : 555 ml

Syndrome de reperfusion : Oui

PAM moyenne : 72 mmHg

Plasma frais congelé(s) : 2

Culot globulaire : 4

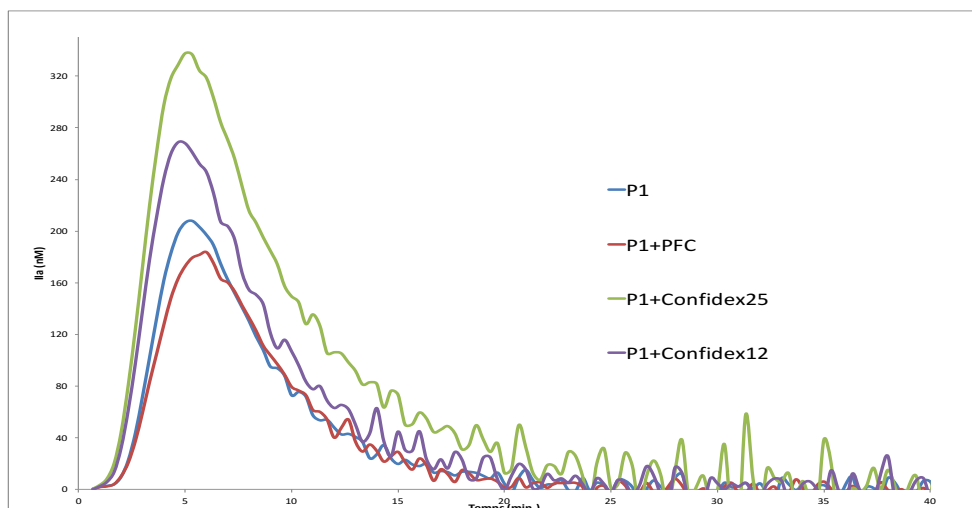
Concentré plaquettaire : 0

Remplissage autre : 2750 ml

Antécédents :

RGO

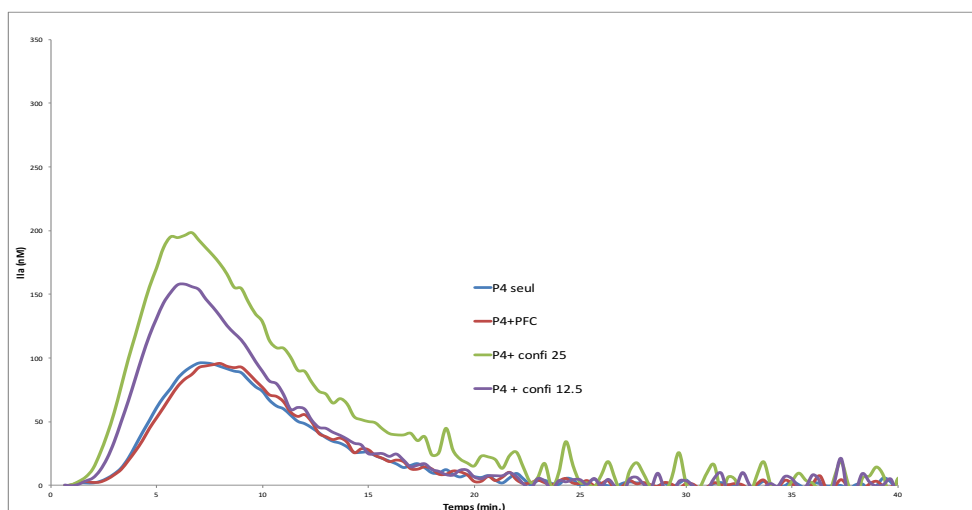
Thrombogramme avant incision avec ajout de PFC et de CCP



TP : 51 %
TCK : 1,4
Plaquettes : 191 G/L
Fibrinogène : NC

Latence : 2,33 min
Pic : 207 nM
Temps au pic : 5,33 min
ETP : 1410 nM.min
Vélocité : 69

Thrombogramme après reperfusion avec ajout de PFC et de CCP



TP : 45%
TCK : 1,28
Plaquettes : 133 G/L
Fibrinogène : 1,71 g/L

Latence : 3,33 min
Pic : 96 nM
Temps au pic : 7,33 min
ETP : 828 nM.min
Vélocité : 24

Patient n° 4

Sexe : Masculin

Age : 62 ans

Taille : 172 cm

Poids : 67 kg

IMC : 22,6

CHC : Oui

Etiologie de la cirrhose : Alcool Hépatite c

CHILD : C 10

Score de MELD : 15

Varices oesophagiennes : grade 1

Temps opératoire : 9 h

Durée d'anhépatie : 1 h 25

Ascite à l'incision : 2900 ml

Pertes sanguines totales : 414 ml

Syndrome de reperfusion : Oui

PAM moyenne : 73,6

Plasma frais congelé(s) : 6

Culot globulaire : 5

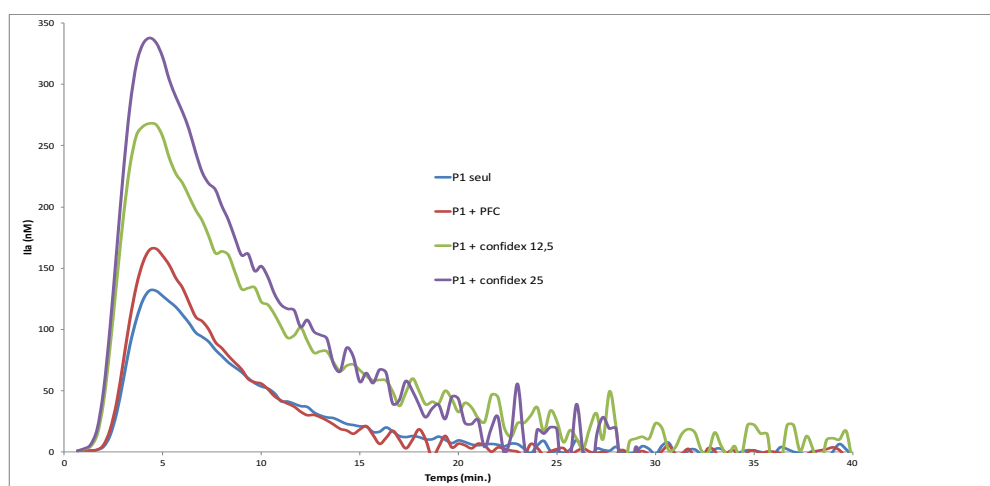
Concentré plaquettaire : 2

Remplissage autre : 5000 ml

Antécédents :

HTA, Diabète de type 2, Hépatite B

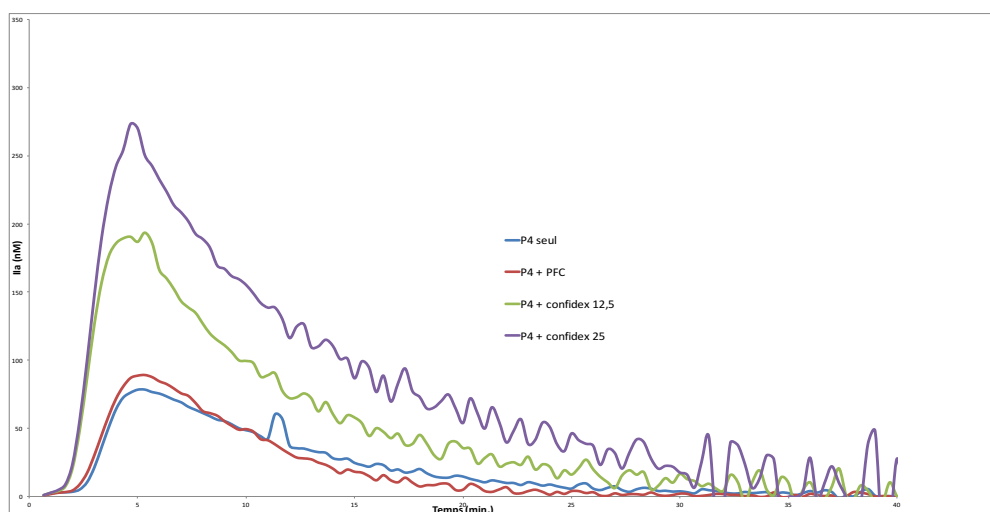
Thrombogramme avant incision avec ajout de PFC et de CCP



TP : 44 %
TCK : 1,6
Plaquettes : 66 G/L
Fibrinogene : 2,2

Latence : 2,33 min
Pic : 131 nM
Temps au pic : 4,67 min
ETP : 974 nM.min
Vélocité : 56

Thrombogramme après reperfusion avec ajout de PFC et de CCP



TP : 16 %
TCK : 4,02
Plaquettes : 142 G/L
Fibrinogene : 0,88 g/L

Latence : 2,67 min
Pic : 78 nM
Temps au pic : 5,33 min
ETP : 843 nM.min
Vélocité : 29

Patient n° 5

Sexe : Masculin

Age : 65 ans

Taille : 176 cm

Poids : 59 kg

IMC : 19

CHC : Non

Etiologie de la cirrhose : Alcoolique

CHILD : C 12

Score de MELD : 22

Rupture VO : Oui

Temps opératoire : 11 h

Durée d'anhépatie : 2 h

Ascite à l'incision : 4600 ml

Pertes sanguines totales : 3536 ml

Syndrome de reperfusion : Oui

PAM moyenne : 78 mmHg

Plasma frais congelé(s) : 19

Culot globulaire : 9

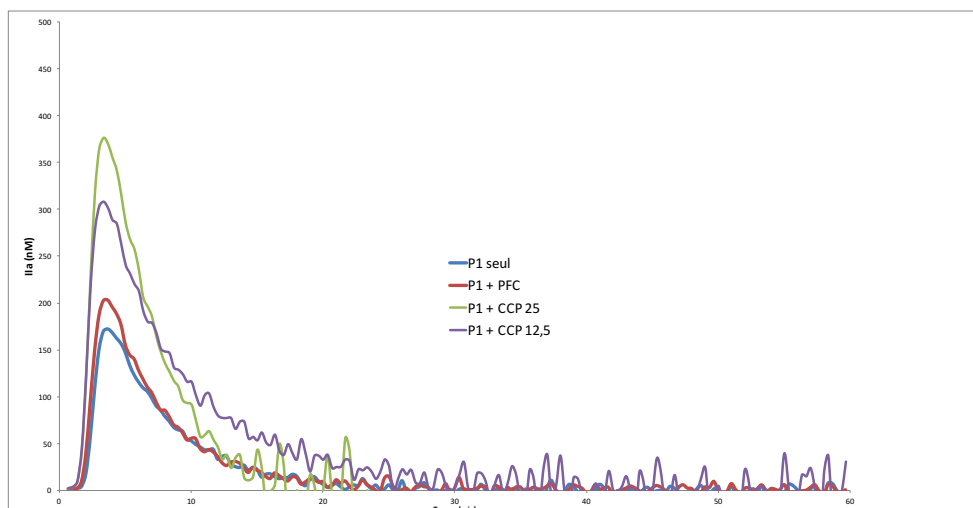
Concentré plaquettaire : 2

Remplissage autre : 4250 ml

Antécédents :

Spondylarthropathie, Arthrose cervicale, fracture genou gauche

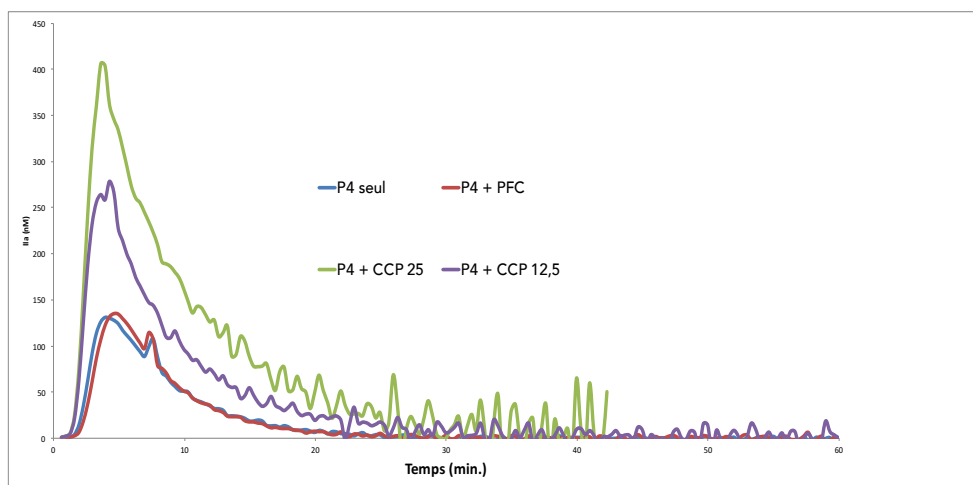
Thrombogramme avant incision avec ajout de PFC et de CCP



TP : 35 %
TCK : 1,47
Plaquettes : 138 G/L
Fibrinogène : 1,96

Latence : 1,83 min
Pic : 174 nM
Temps au pic : 3,67 min
ETP : 1126,5 nM.min
Vélocité : 94

Thrombogramme après reperfusion avec ajout de PFC et de CCP



TP : 29 %
TCK : 2,91
Plaquettes : 101 G/L
Fibrinogène : 1,27 g/L

Latence : 2,07 min
Pic : 131 nM
Temps au pic : 4,41 min
ETP : 1011 nM.min
Vélocité : 55

Patient n° 6

Sexe : Masculin

Age : 63 ans

Taille : 174 cm

Poids : 96 kg

IMC : 31

CHC : Non

Etiologie de la cirrhose : Alcoolique

CHILD : C 11

Score de MELD : 17

Rupture VO : Non

Ascite à l'incision : 4500 ml

Temps opératoire : 5 h 42

Durée d'anhépatie : 1 h 21

Pertes sanguines totales : 1754 ml

Syndrome de reperfusion : Oui

PAM moyenne : 76,53 mmHg

POD incision : 14

Plasma frais congelé(s) : 9

Culot globulaire : 5

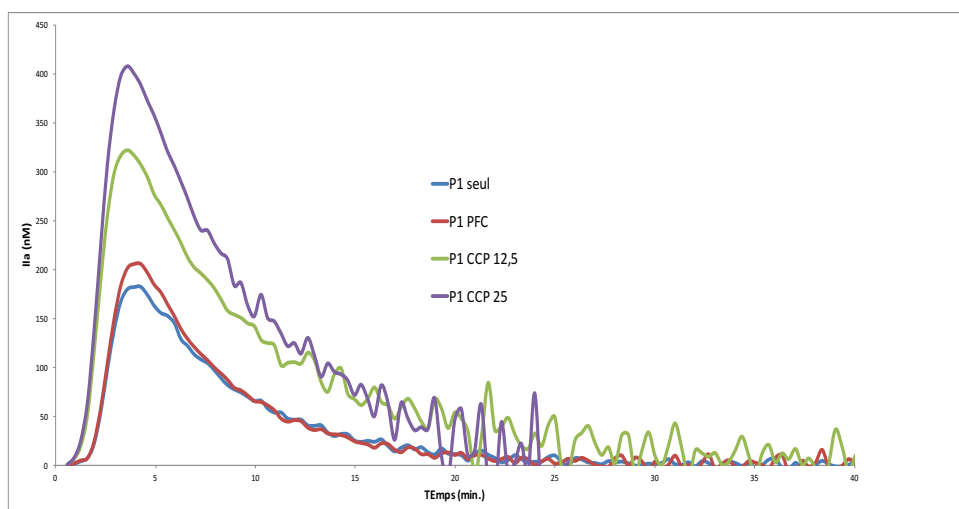
Concentré plaquettaire : 4

Remplissage autre : 2500 ml

Antécédents :

HTA, rétrécissement aortique non serré, dyslipidémie, hémorroïdes, Dupuytren bilatéral, appendicectomie

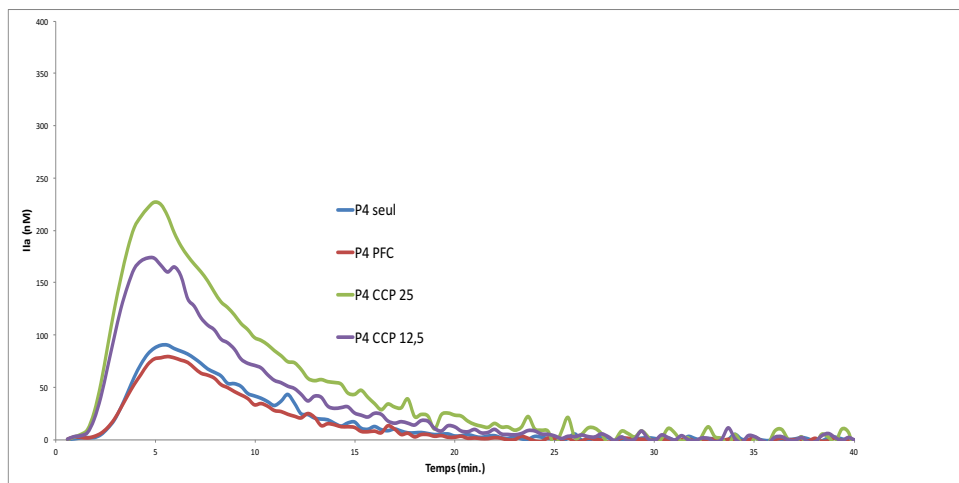
Thrombogramme avant incision avec ajout de PFC et de CCP



TP : 36 %
TCK : 1,59
Plaquettes : 135 G/L
Fibrinogène : NC

Latence : 1,91 min
Pic : 183 nM
Temps au pic : 4,09 min
ETP : 1362 nM.min
Vélocité : 84

Thrombogramme après reperfusion avec ajout de PFC et de CCP



TP : 40 %
TCK : 2,05
Plaquettes : 186 G/L
Fibrinogène : 1,91 g/L

Latence : 2,5 min
Pic : 90 nM
Temps au pic : 5,33 min
ETP : 678 nM.min
Vélocité : 32

Patient n° 7

Sexe : Masculin

Age : 63 ans

Taille : 172 cm

Poids : 81 kg

IMC : 27,38

CHC : Oui

Etiologie de la cirrhose : Alcoolique

CHILD : C 13

Score de MELD : 27

Varices oesophagiennes : grade 2

Temps opératoire : 7 h 7 min

Durée d'anhépatie : 2 h

Ascite à l'incision : 8500 ml

Pertes sanguines totales : 510 ml

Syndrome de reperfusion : Non

PAM moyenne : 71,38 mmHg

POD incision : 22

Plasma frais congelé(s) : 4

Culot globulaire : 2

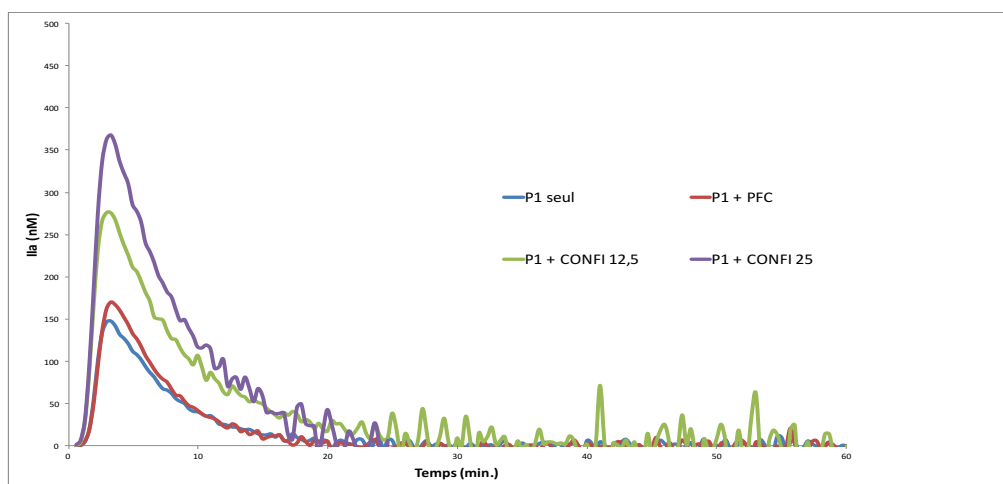
Concentré plaquettaire : 2

Remplissage autre : 4000 ml

Antécédents :

Diabète de type 2, appendicectomie, rupture coiffe des rotateurs opérée bilatérale, fracture genou

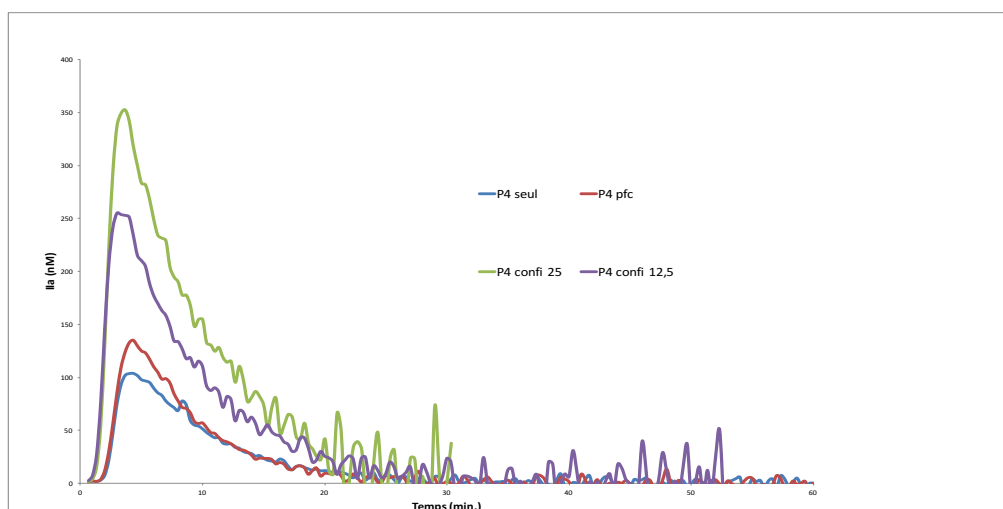
Thrombogramme avant incision avec ajout de PFC et de CCP



TP : 31 %
TCK : 1,6
Plaquettes : 70 G/L
Fibrinogène : 1,34

Latence : 1,57 min
Pic : 146 nM
Temps au pic : 3,41 min
ETP : 939 nM.min
Vélocité : 79

Thrombogramme après reperfusion avec ajout de PFC et de CCP



TP : 16 %
TCK : 3,06
Plaquettes : 120 G/L
Fibrinogène : 0,71 g/L

Latence : 2 min
Pic : 104 nM
Temps au pic : 4,33 min
ETP : 945 nM.min
Vélocité : 44

Patient n° 8

Sexe : Masculin

Age : 65 ans

Taille : 170 cm

Poids : 61 kg

IMC : 21

CHC : Non

Etiologie de la cirrhose : Alcoolique

CHILD : C 12

Score de MELD : 19

Varices oesophagiennes : Stade 2

Temps opératoire : 6 h 30 min

Durée d'anhépatie : 1 h

Ascite à l'incision : 1700 ml

Pertes sanguines totales : 1043 ml

Syndrome de reperfusion : Oui

PAM moyenne : 73,67 mmHg

POD incision : 9

Plasma frais congelé(s) : 8

Culot globulaire : 3

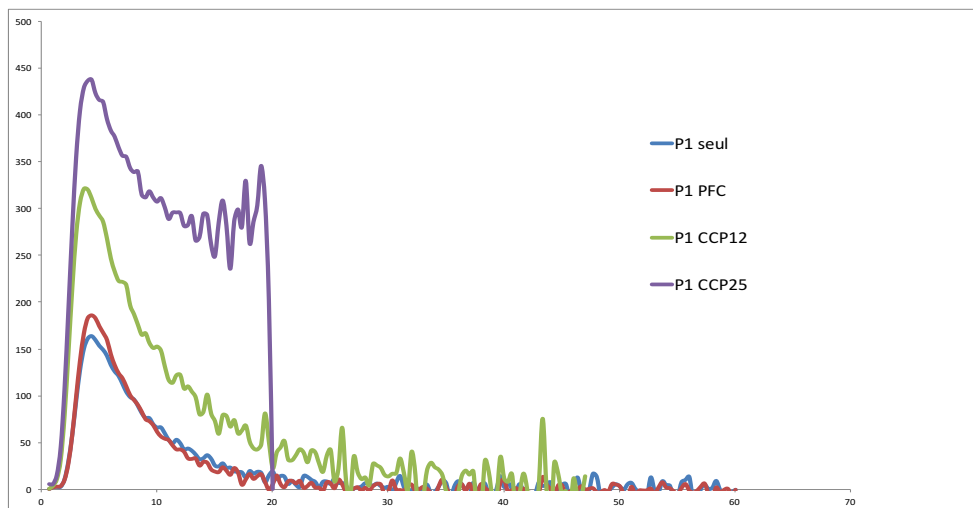
Concentré plaquettaire : 2

Remplissage autre : 2500 ml

Antécédents :

Brucellose, tabagisme, gastrite hypertension portale, Hernie inguinale, cataracte, péricardite, BPCO, HTAP

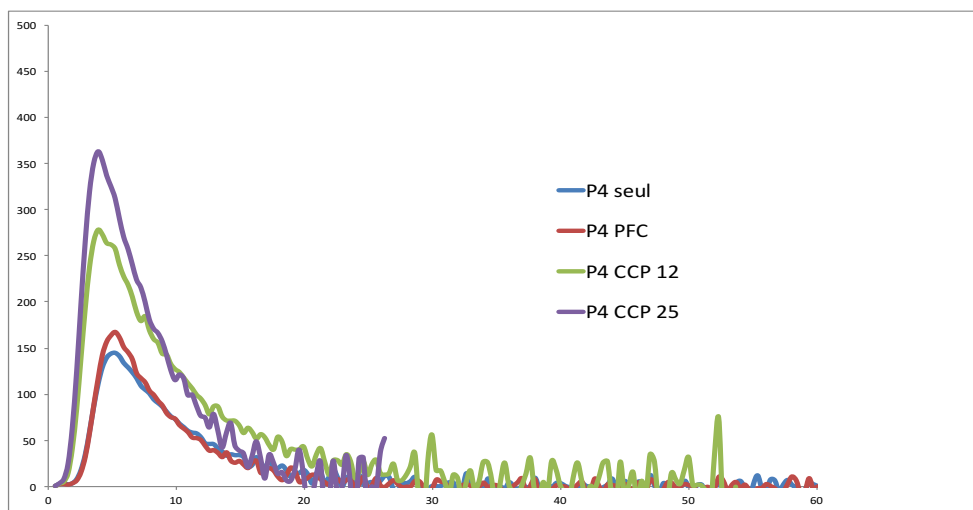
Thrombogramme avant incision avec ajout de PFC et de CCP



TP : 41 %
TCK : 1,61
Plaquettes : 104 G/L
Fibrinogène : 1,63

Latence : 2 min
Pic : 163 nM
Temps au pic : 4,5 min
ETP : 1285 nM.min
Vélocité : 65,24

Thrombogramme après reperfusion avec ajout de PFC et de CCP



TP : 36 %
TCK : 1,9
Plaquettes : 113 G/L
Fibrinogène : 1,24 g/L

Latence : 2,55 min
Pic : 144 nM
Temps au pic : 5,22 min
ETP : 1180 nM.min
Vélocité : 54

Patient n° 9

Sexe : Féminin
Age : 35 ans
Taille : 163 cm
Poids : 64 kg
IMC : 24

CHC : Oui
Etiologie de la cirrhose : Alcoolique
CHILD : B 8
Score de MELD : 11
Rupture VO : Non

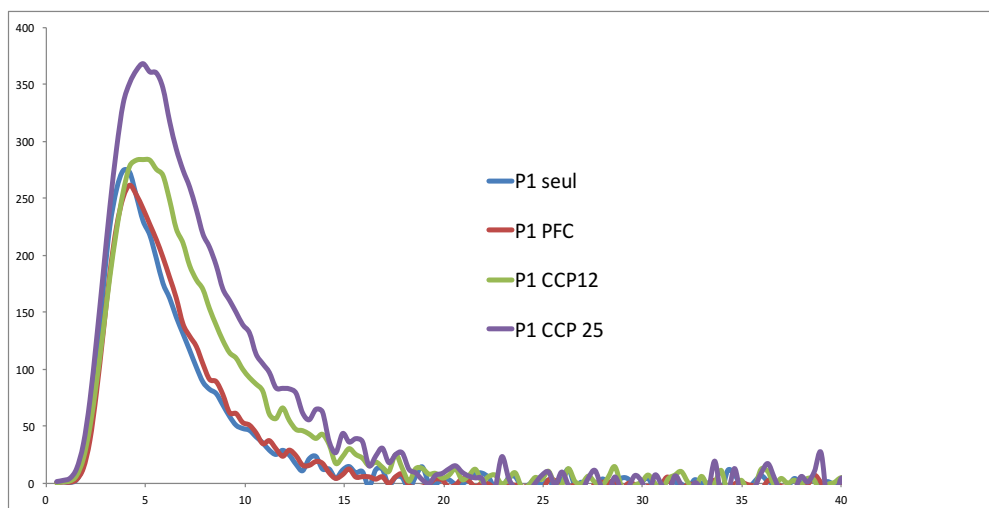
Temps opératoire : 5 h
Durée d'anhépatie : 1 h 30 min
Ascite à l'incision : 1000 ml
Pertes sanguines totales : 470 ml
Syndrome de reperfusion : Oui

PAM moyenne : 84 mmHg
POD incision : 7
Plasma frais congelé(s) : 5
Culot globulaire : 4
Concentré plaquettaire : 0
Remplissage autre : 3500 ml

Antécédents :

Tabagisme, diabète de type 1, hernie ombilicale, infection liquide ascite, peritonite : iléostomie

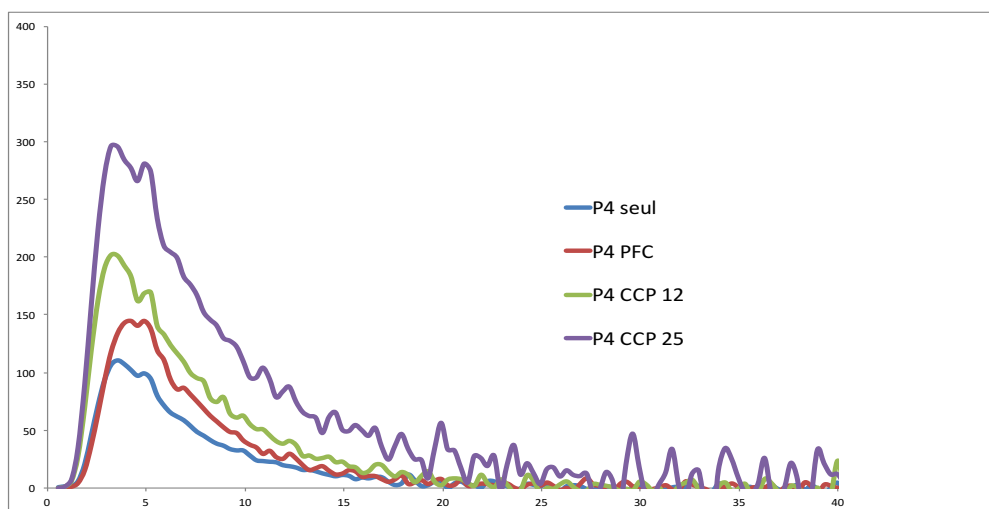
Thrombogramme avant incision avec ajout de PFC et de CCP



TP : 62 %
TCK : 1,22
Plaquettes : 319 G/L
Fibrinogène : 2,3

Latence : 1,89 min
Pic : 270 nM
Temps au pic : 4,22 min
ETP : 1360 nM.min
Vélocité : 116

Thrombogramme après reperfusion avec ajout de PFC et de CCP



TP : 34 %
TCK : 1,83
Plaquettes : 241 G/L
Fibrinogène : 1,23 g/L

Latence : 1,52 min
Pic : 109 nM
Temps au pic : 3,7 min
ETP : 680 nM.min
Vélocité : 50

Patient n° 10

Sexe : Masculin
Age : 50 ans
Taille : 175 cm
Poids : 76 kg
IMC : 24

CHC : Non
Etiologie de la cirrhose : Alcoolique
CHILD : C 12
Score de MELD : 29
Varices oesophagiennes : grade 2

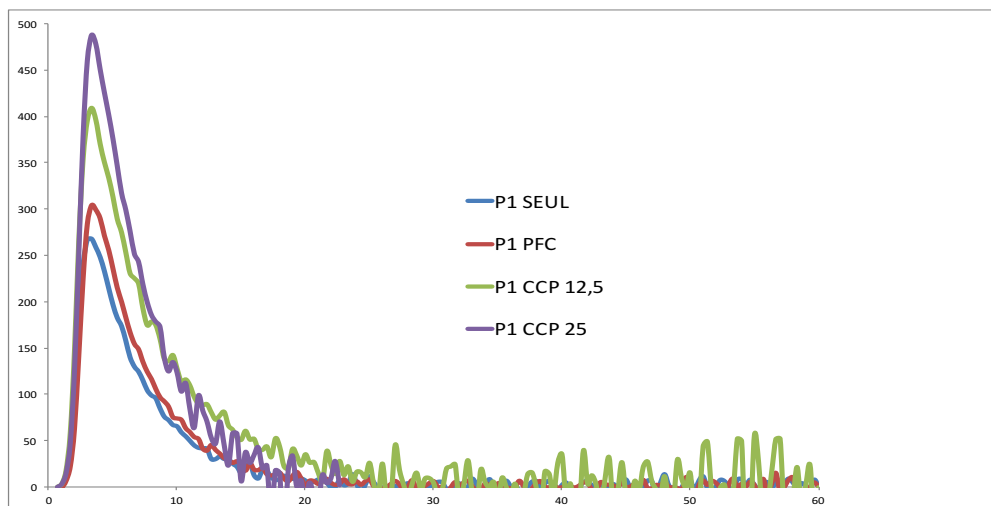
Temps opératoire : 7 h 51 min
Durée d'anhépatie : 2 h
Ascite à l'incision : NC
Pertes sanguines totales : 450 ml
Syndrome de reperfusion : Oui

PAM moyenne : 73,28 mmHg
POD incision : 7
Plasma frais congelé(s) : 5
Culot globulaire : 2
Concentré plaquettaire : 0
Remplissage autre : 2000 ml

Antécédents :

Thrombus mural veine mésentérique, tabagisme, syndrome dépressif, ligamentoplastie genou gauche

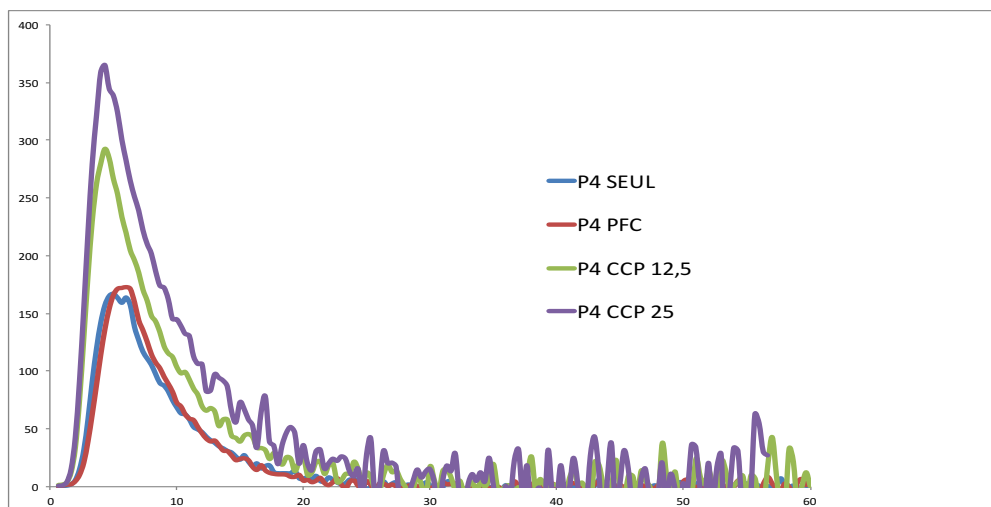
Thrombogramme avant incision avec ajout de PFC et de CCP



TP : 37 %
TCK : 1,47
Plaquettes : 119 G/L
Fibrinogène : 2,67

Latence : 1,67 min
Pic : 271 nM
Temps au pic : 3,5 min
ETP : 1579 nM.min
Vélocité : 148

Thrombogramme après reperfusion avec ajout de PFC et de CCP



TP : 30 %
TCK : 1,68
Plaquettes : 80 G/L
Fibrinogène : 1,64 g/L

Latence : 2,33 min
Pic : 165 nM
Temps au pic : 5,33 min
ETP : 1221 nM.min
Vélocité : 55

ANNEXES N°2

Poster présenté au congrès de la Société Française d'Hématologie
(Paris, 1-3 Avril 2015)

Communication orale au congrès de l'International Society of
Thrombosis and Haemostasis
(Toronto, 20-25 Juin 2015)

Communication orale au congrès de la Société Française d'Anesthésie et
de Réanimation
(Paris, 17-19 Septembre 2015)

M. Perin (1) ; R. Denhaut (1) ; L. Ardillon (2) ; B. Delahousse (2) ; E. Salamé (3) ; Y. Gruel (2)

(1) Département d'anesthésie, CHU TOURS, Tours ; (2) Hématologie-hémostase, Hôpital Trousseau CHU de Tours, Chambray-lès-Tours ; (3) Chirurgie digestive, Hôpital Trousseau CHU de Tours, Chambray-lès-Tours

INTRODUCTION

- La gestion per opératoire de l'hémostase d'une THO est mal définie :
- Bien que les examens d'hémostase usuels reflètent mal le risque hémorragique des patients cirrhotiques¹ opérés et que leur génération de thrombine semble conservée^{2,3}, des transfusions de PFC sont parfois systématiques pour corriger les anomalies des examens d'hémostase.
- L'utilisation du PFC est controversée⁴ car l'augmentation de la volémie induite par ce type de transfusion aggraverait l'hypertension portale et par conséquent le risque hémorragique⁵.
- L'utilisation de CCP, apportant les facteurs de coagulation vitamine K-dépendants sous faible volume est proposée, mais aucune étude n'a cependant évalué l'efficacité *in vitro* de ces produits chez les patients au cours d'une THO.
- Dans cette étude, nous avons comparé l'effet *in vitro* du PFC et du CCP sur le TGT réalisé sur des échantillons de plasmas de patients cirrhotiques prélevés au cours d'une THO.

PATIENTS et METHODES

- 10 patients au moment de leur transplantation hépatique (7H/3F), âge médian 62,5 ans, Child médian 11 (min-max 8-13), Taux de prothrombine (TP) médian 36 % (min-max 32-62 %) ont été prélevés à différents temps peropératoires : avant incision (P1), en fin d'hépatectomie (P2), avant déclampage porte (P3) et 30 minutes après reperfusion (P4).
- Les TGT (méthode CAT[®], réactifs Stago, concentration finale de FT 5pM, PPP reagent[™]) ont été réalisés sur les plasmas déplaquetés avant et après ajout de PFC (concentration finale équivalente à 5 ml/kg) ou de CCP (concentrations finales équivalentes à 12.5 UI/kg et 25 UI/kg). Un pool commercial de plasmas normaux (Cryocheck[™], Cryopep, Montpellier, France) a été utilisé en tant que témoin interne et analysé en parallèle sur chaque plaque afin de normaliser les résultats de la façon suivante : ETP et pics normalisés = [(valeurs brutes mesurée / valeurs témoin interne) x 100], latence normalisée = (valeur brute mesurée / valeur témoin interne).
- Les résultats des TGT ont été comparés à ceux d'une population de sujets sains (n=29 ; 22H/7F) (test de Mann et Whitney) et, pour chaque prélèvement, avant et après addition au plasma de PFC ou de CCP (test de Wilcoxon).

RESULTATS

1- TGT avant et au décours de la greffe comparativement à des témoins sains

	TGT valeurs brutes mesurées		
	Latence, min médiane (min-max)	Pic de lila, nM médiane (min-max)	ETP, nM.min médiane (min-max)
Patients (n=10)			
Prélèvement P1	1,86 (1,19-2,33)	179 (131-271)	1323 (939-1584)
Prélèvement P2	1,88 (1,19-2,67)	183 (150-279)	1308 (967-1549)
Prélèvement P3	1,88 (1,34-2,33)	192 (151-272)	1257 (1006-1671)
Prélèvement P4	2,2 (1,5-3,33)	120 (78-179)	973 (678-1222)
Sujets sains (n=29)	2,91 (2,24-3,67)	267 (162-331)	1346 (1040-1914)

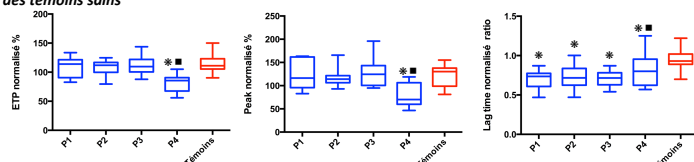


Figure 1 : Evolution au cours de la greffe des paramètres du TGT exprimés en valeurs normalisées = [(valeurs brutes / valeurs témoin interne) x 100 et comparés aux sujets sains (n=29)]
P1 = valeurs avant incision, P2 = fin d'hépatectomie, P3 = fin d'antéshock, P4 = reperfusion
* p<0,05 vs valeurs sujets sains, ** p<0,05 vs valeurs avant incision (P1).

Les paramètres du TGT avant la greffe (P1) sont comparables à ceux mesurés chez les sujets sains témoignant d'un état hémostatique équilibré, conservé en fin d'hépatectomie (P2) et avant déclampage (P3). En revanche une hypocoagulabilité est mise en évidence 30 minutes après reperfusion (P4) avec des pics de thrombine et des valeurs d'ETP statistiquement plus faibles que chez les sujets sains.

2- Effets du PFC et du CCP sur le TGT à P4

	TGT valeurs brutes mesurées		
	Latence, min médiane (min-max)	Pic de lila, nM médiane (min-max)	ETP, nM.min médiane (min-max)
Patients (n=10)			
Prélèvement P4	2,2 (1,5-3,33)	120 (78-179)	973 (678-1222)
P4 ajout de PFC	2,28 (1,5-3,33)	140 (79-208)	1011 (578-1204)
P4 ajout de CCP 12,5 UI/kg	1,77 (1,17-2,5)	265 (158-288)	1989 (1234-2587)
P4 ajout de CCP 25 UI/kg	1,67 (1,2-2,3)	323 (197-392)	2706 (1848-3399)
Sujets sains (n=29)	2,91 (2,24-3,67)	267 (162-331)	1346 (1040-1914)

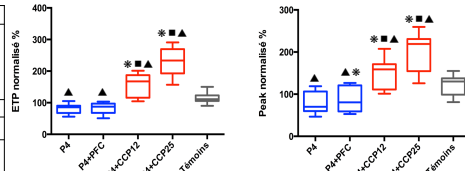
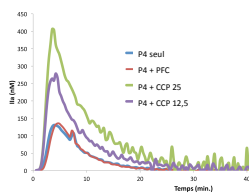


Figure 2 : Effets du PFC et du CCP après reperfusion, paramètres du TGT exprimés en valeurs normalisées = [(valeurs brutes / valeurs témoin interne) x 100]
P4 = valeurs avant incision, P4+PFC = valeurs après ajout de 5ml/kg de PFC à P4, P4+CCP 12 = valeurs après ajout de 12,5 UI/kg de CCP à P4, P4+CCP25 = valeurs après ajout de 25 UI/kg à P4
* p<0,05 vs P4, ** p<0,05 vs PFC, *** p<0,05 vs sujets sains.



Thrombogrammes 1 : Effets du PFC et du CCP sur le TGT réalisé sur les plasmas patients à P4.

Le PFC ajouté *in vitro* est inefficace pour corriger l'hypocoagulabilité observée sur les échantillons prélevés à P4. En revanche une correction est obtenue avec le CCP dès la plus faible concentration testée (12,5 UI/kg).

En pratique, l'injection d'un PFC ou d'un CCP est souvent réalisée dès le début de la procédure. Nous avons donc évalué l'effet de ces 2 produits sur le TGT au temps P1.

3- Effets du PFC et du CCP sur le TGT à P1

	TGT valeurs brutes mesurées		
	Latence, min médiane (min-max)	Pic de lila, nM médiane (min-max)	ETP, nM.min médiane (min-max)
Patients (n=10)			
Prélèvement P1	1,86 (1,19-2,33)	179 (131-271)	1323 (939-1584)
P1 ajout de PFC	1,79 (1,19-2,33)	203 (165-305)	1288 (1008-1760)
P1 ajout de CCP 12,5 UI/kg	1,67 (1,19-2)	295 (267-400)	2356 (1921-3083)
P1 ajout de CCP 25 UI/kg	1,67 (1,19-2)	387 (336-483)	2706 (2510-3484)
Sujets sains (n=29)	2,91 (2,24-3,67)	267 (162-331)	1346 (1040-1914)

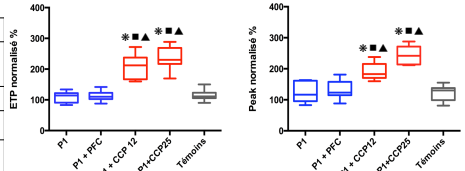
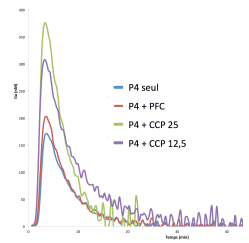


Figure 3 : Effets du PFC et du CCP avant incision, paramètres du TGT exprimés en valeurs normalisées = [(valeurs brutes / valeurs témoin interne) x 100]
P1 = valeurs avant incision, P1+PFC = valeurs après ajout de 5ml/kg de PFC à P1, P1+CCP 12 = valeurs après ajout de 12,5 UI/kg de CCP à P1, P1+CCP25 = valeurs après ajout de 25 UI/kg à P1
* p<0,05 vs P1, ** p<0,05 vs PFC, *** p<0,05 vs sujets sains.



Thrombogrammes 2 : Effets du PFC et du CCP sur le TGT réalisé sur les plasmas patients à P1.

L'addition de CCP au plasma prélevé à P1 entraîne une élévation significative de la génération de thrombine (pic et ETP) dès la plus faible concentration testée (12,5 UI/kg).

CONCLUSION

Comme déjà rapporté, le TGT permet d'objectiver un état hémostatique équilibré chez les patients cirrhotiques. L'inefficacité du PFC à corriger la génération de thrombine *in vitro* à P4 est un argument qui soutient la non prescription per opératoire systématique de ce produit sanguin. A l'inverse, l'efficacité du CCP *in vitro* plaide en faveur de son utilisation lors de la reperfusion (P4) mais non en début de procédure (P1) en raison d'un risque thrombotique vraisemblablement non négligeable comme le suggère la génération très majorée de thrombine.

- Références bibliographiques : 1-Tripodi A, Caldwell SH, Hoffman M, Trotter JF, Samyali A. Review article: the prothrombin time test as a measure of bleeding risk and prognosis in liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007;26(2):141-148.
2-Lisman T, Baillieux K, Perreboom TA, Hendriks HGB, Meijers JCM, Porte RJ. Normal to increased thrombin generation in patients undergoing liver transplantation despite prolonged conventional coagulation tests. *Journal of Hepatology*. 2010;52(3):355-361.
3-Tripodi A, Salerno F, Chantarangkul V, et al. Evidence of normal thrombin generation in cirrhosis despite abnormal conventional coagulation tests. *Hepatology*. 2005;42(5):1531-1538.
4-Tripodi A. Thrombin generation in plasma from patients with cirrhosis supplemented with normal plasma: considerations on the efficacy of treatment with fresh-frozen plasma. *Int J Hematol*. 2011; 139-44.
5-Masiccotti C, Capitanio G, Reale D, Ray A, Karalencic P. Independent Validation of a Model Predicting the Need for Fresh Red Blood Cell Transfusion at Liver Transplantation. *Transplantation*. 2009;88(3):386-391.
6-Hemker HC, Giesen P, Adair R, et al. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2002;32(5-6):249-253.

Comparative *in vitro* evaluation of thrombin generation assay (TGA) after spiking fresh frozen plasma (FFP) or prothrombin complex concentrate (PCC) to samples of patients undergoing orthotopic liver transplantation (OLT)

M. Perin¹, R.Denhaut¹, L.Ardillon², B. Delahousse², E.Salamé³, F. Remerand¹, Y.Gruel²

1-Department of anaesthesiology, 2-Department of hematology and hemostasis, 3- Department of digestive surgery and liver transplantation. University hospital of Tours, France

Abstract :

Background:

The haemostatic management of cirrhotic patients during OLT is not well defined. Despite the discrepancy observed in these patients between bleeding risk and results of standard coagulation assays, FFP are often transfused to correct their biological anomalies. However this practice is a matter of debate. PCC infusion was proposed but none study has today evaluate the efficiency of both products in this surgical context.

This preliminary work was conducted to comparatively evaluate the *in vitro* effect of PCC and FFP on results of thrombin generation assay during OLT.

Patients and Methods:

10 patients, 7H/3F, mean age 62 years, Child-Pugh score min-max 8-13, prothrombin time (PT%) min-max 32-62%. Blood samples were taken before incision (P1), at the end of hepatectomy (P2), before portal unclamping (P3) and 30 minutes after reperfusion (P4). TGA (CAT-method FT 5pm PLP 4μM) were performed on platelet-poor plasmas before and after addition of FFP (5 ml/kg) or PCC (12.5UI/kg or 25UI/kg). The results were compared with those of healthy subjects (n=29; 22H/7F) (Mann and Withney test) and for each sample before and after spiking (Wilcoxon test).

Results:

The TGA parameters at P1 were similar in patients and controls : ETP(min-max) = 939-1584 nM*min vs controls =1040-1914 nM*min $p=0,24$ and did not vary at P2 and P3. However at P4 ETP significantly decreased : min-max= 678-1222 nM*min $p<0.0001$. FFP did not achieve any correction while PCC induced a significant increase of ETP from the lower dosages used (min-max) =1234-2587 nM*min $p=0.002$. Interestingly if no effect was seen at P1 with FFP, a marked hypercoagulability was induced by PCC from 12,5UI/Kg : ETP (min-max) =1920-3083 nM*min $p=0.002$

Conclusion:

The failure of FFP to correct ETP *in vitro* argues for a non-systematic use of this product during OLT. In contrast results with PCC could be in favour of its usefulness at the moment of reperfusion but not earlier in the process because of a potential thrombotic risk.

Keywords:

Fresh frozen plasma, Orthotopic liver transplantation, Prothrombin complex concentrate, Thrombin generation assay.

Comparaison in vitro de l'effet du plasma frais congelé (PFC) et d'un concentré de complexe prothrombinique (CCP) sur la génération de thrombine (TGT) en transplantation hépatique orthotopique (THO)



Mikael Perin^{1,*}, Laurent Ardillon², Benedicte Delahousse²,
Raphael Denhaut¹, Ephrem Salame³, Francis Remerand¹,
Yves Gruel²

¹ Département d'anesthésie

² Hématologie hémostase

³ Chirurgie digestive, CHU Trousseau, Tours, France

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : mikaelperin@gmail.com (M. Perin)

Introduction Bien que les examens d'hémostase usuels reflètent mal le risque hémorragique des patients cirrhotiques opérés, des transfusions de PFC sont parfois systématiques pour en corriger les anomalies. Cette pratique est controversée en raison de l'augmentation de la volémie induite aggravant l'hypertension portale et le risque hémorragique.

L'utilisation de CCP apportant les facteurs de coagulation sous faible volume est proposée. Aucune étude n'a cependant évalué son efficacité chez les patients au cours d'une THO.

Le TGT reflétant plus globalement l'équilibre hémostatique que les tests d'hémostase usuels, nous avons analysé les paramètres du TGT après addition in vitro de PFC ou de CCP aux échantillons de plasmas de patients cirrhotiques prélevés au cours d'une THO.

Patients et méthodes Cette étude a été menée sur fonds de tube dans le cadre du soin courant. Dix patients, 7H/3F, âge médian 62,5 ans, Child médian 11 [8–13], taux de prothrombine (TP) médian 36 % [32–62] ont été prélevés à différents temps peropératoire : avant incision (P1), en fin d'hépatectomie (P2), avant déclampage porte (P3) et 30 minutes après reperfusion (P4). Les TGT (méthode CAT, concentrations finales de facteur tissulaire et de phospholipides respectivement 5 pM et 4 μM, PPP reagent® Stago) ont été réalisés sur les plasmas déplaquetés avant et après ajout de PFC (5 mL/kg) ou de CCP (Confidex® 12,5 UI/kg ou 25 UI/kg). Les résultats ont été comparés à ceux d'une population de sujets sains ($n=29$; 22 H/7 F) (test de Mann et Whitney) et pour chaque prélèvement avant et après surcharge des plasmas (test de Wilcoxon).

Résultats Les paramètres du TGT des patients avant incision (P1) ainsi qu'à P2 et P3 sont similaires à ceux des sujets sains : $ETP_{P1 \text{ basal}} \text{ min-max } [939-1584] \text{ nM} \cdot \text{min}$ vs $ETP_{\text{sujets sains}} [1040-1914] \text{ nM} \cdot \text{min}$ $p=0,24$. En revanche à P4 une génération de thrombine significativement plus basse est objectivée : $ETP_{P4 \text{ basal}} [678-1222] \text{ nM} \cdot \text{mn}$ $p<0,0001$ vs sujets sains. L'addition de PFC à P4 n'entraîne aucune correction significative de l'hypocoagulabilité, en revanche une correction est obtenue avec le CCP dès la plus faible concentration testée (12,5 UI/kg) $ETP_{P4+CCP \text{ 12,5 UI/kg}} [1234-2587] \text{ nM} \cdot \text{min}$ $p=0,002$ vs P4. Nous avons évalué l'effet de ces produits sur le TGT au temps P1 en raison de l'injection de PFC souvent réalisée dès le début de la procédure. Le PFC n'entraîne pas d'effet significatif $ETP_{P1+PFC} [1008-1760] \text{ nM} \cdot \text{mn}$ $p=0,10$ vs P1 alors que l'addition de CCP induit un effet significatif : $ETP_{P1+CCP \text{ 12,5 UI/kg}} [1920-3083] \text{ nM} \cdot \text{mn}$ $p=0,002$ vs P1 avec une hypercoagulabilité dès la plus faible concentration.

Discussion Le TGT permet d'objectiver un état hémostatique équilibré chez les patients cirrhotiques que ne reflète pas le TP. L'inefficacité du PFC à corriger la génération de thrombine in vitro à P4 est un argument qui soutient la non prescription peropératoire systématique de ce produit sanguin. À l'inverse, l'efficacité du CCP in vitro plaide en faveur de son utilisation lors de la reperfusion (P4) mais non en début de procédure (P1) en raison d'un risque thrombotique comme le suggère la génération très majorée de thrombine.

Déclaration d'intérêts Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.anrea.2015.07.251>

Communications libres — Vendredi 18 septembre 2015

Vu, le Directeur de Thèse
« signature »

Vu, le Doyen
de la Faculté de médecine de TOURS
« signature »

PERIN Mikael

Thèse n°

72 pages – 1 tableaux – 12 figures – 2 annexes

Résumé :

Introduction/but de l'étude : Les examens d'hémostase usuels reflètent mal le risque hémorragique des cirrhotiques opérés, et l'administration de plasma frais congelé (PFC) est fréquente, bien qu'elle augmente la volémie et l'hypertension portale. L'utilisation de concentrés de complexe prothrombinique (CCP) lors d'une THO a donc été proposée mais sans évaluation préalable. Le test de génération de thrombine (TGT) reflétant globalement l'équilibre hémostatique, nous l'avons donc analysé après addition *in vitro* de PFC ou de CCP au plasma de patients cirrhotiques prélevés au cours d'une THO.

Patients et Méthodes : 10 patients ont été prélevés à différents temps : avant incision (P1), en fin d'hépatectomie (P2), avant déclampage porte (P3) et 30 minutes après reperfusion (P4). Les TGT ont été réalisés sur plasmas déplaquetés avant et après addition de PFC (5 ml/kg) ou de CCP (Confidex® 12.5 UI/Kg ou 25 UI/kg). Les résultats ont été comparés à ceux de sujets sains (n= 29 ; 22H/7F) (Mann et Whitney) et pour chaque prélèvement avant et après addition de PFC ou CCP (Wilcoxon).

Résultats : Les paramètres du TGT des patients avant incision (P1) ainsi qu'à P2 et P3 sont similaires à ceux des sujets sains. En revanche, après reperfusion (P4) une génération de thrombine plus faible est objectivée. L'addition de PFC à P4 n'entraîne aucun effet significatif sur cette hypocoagulabilité, qui est en revanche corrigée avec le CCP dès la plus faible concentration testée. Bien que le PFC soit en pratique souvent injecté dès le début de la procédure, il n'entraîne aucun effet significatif sur le TGT alors que le CCP induit une hypercoagulabilité dès la plus faible concentration testée.

Conclusion : Le TGT permet d'objectiver un état hémostatique équilibré chez les patients cirrhotiques. L'inefficacité du PFC à corriger la génération de thrombine *in vitro* à P4 soutient la non prescription peropératoire systématique de ce produit sanguin. A l'inverse, l'efficacité du CCP *in vitro* plaide en faveur de son utilisation lors de la reperfusion (P4) mais non en début de procédure (P1) en raison d'un risque thrombotique probable, favorisé par une génération très majorée de thrombine

Mots clés : Cirrhose ; concentré de complexe prothrombinique ; plasma frais congelé ; test de génération de thrombine ; transplantation hépatique

Jury :

Président : Monsieur le Professeur Yves GRUEL
Membres : Monsieur le Professeur Marc LAFFON
Monsieur le Professeur Ephrem SALAME
Monsieur le Professeur Francis REMERAND
Madame le Docteur Martine FERRANDIERE
Monsieur le Docteur Laurent ARDILLON

Date de la soutenance : 26 Février 2016