

ANNEE 2004

N°69

MEMOIRE
DU DIPLÔME D'ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu devant le jury interrégional

Le 15 Novembre 2004

par M^{elle} Hélène LE BOLZER

*Conformément aux dispositions de l'arrêté
du 10 Septembre 1990 tient lieu de :*

THESE
POUR LE DIPLÔME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**INTERET DU SUIVI DES D-DIMERES POUR LE DIAGNOSTIC
DE THROMBOSE AU COURS DU TRAITEMENT PAR
L-ASPARAGINASE DES LAL DE L'ENFANT**

Président : Professeur IMBERT Berthe-Marie
Membres du Jury : Docteur TROSSAËRT Marc
 Docteur MECHINAUD Françoise
 Professeur AVET-LOISEAU Hervé

Je tiens à remercier,

Mme le Professeur Berthe-Marie Imbert,

Pour l'honneur que vous me faites d'avoir accepté la présidence de jury de cette thèse.

Sincères remerciements

Mr le Docteur Marc Trossaërt,

Pour m'avoir guidée tout au long de ce travail, pour tes précieux conseils, ta disponibilité, ta patience, et ta bonne humeur.

Sincères remerciements

Mme le Docteur Françoise Méchinaud,

Pour l'honneur que vous me faites de juger ce travail, pour votre disponibilité et votre gentillesse.

Sincères remerciements

M. le Professeur Hervé Avet-Loiseau,

Pour l'honneur que vous me faites de participer à ce jury.

Sincères remerciements

A tout le personnel du Laboratoire d'Hémostase,

A toute l'équipe de l'UPCO et à Marie Lecame-Baudon en particulier,

A toute l'équipe du service d'Oncologie Pédiatrique,

Pour leur aide, leur accueil,

Sincères remerciements

Je tiens également à remercier le laboratoire Diagnostica Stago qui m'a permis de réaliser cette étude.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	14
GENERALITES	16
I. LEUCEMIE AIGUË LYMPHOÏDE	17
I.1. La pathologie	17
I.2. Le traitement	17
I.2.1. La radiothérapie	17
I.2.2. La greffe de moelle osseuse	18
I.2.3. La chimiothérapie	18
I.3. Leucémie aiguë lymphoïde et thrombose	20
I.3.1. Effets de la maladie	20
I.3.2. Effets de la chimiothérapie	18
I.3.2.1. L'asparaginase	21
I.3.2.2. Effets des stéroïdes sur les protéines de l'hémostase	25
I.3.3. Effets des autres facteurs associés à la chimiothérapie	26
I.3.3.1. KTVC	26
I.3.3.2. Rôle des infections	26
I.3.4. Revue des différents protocoles et risques thrombotiques	26
II. RAPPELS SUR L'HEMOSTASE	29
II.1. Formation du caillot	29
II.1.1. Formation de la thrombine	29
II.1.2. Formation de la fibrine	32
II.1.3. Stabilisation de la fibrine par le XIIIa	34
II.2. Fibrinogénolyse et fibrinolyse	35
II.2.1. Produits de dégradation du fibrinogène, des monomères de fibrine induits par la plasmine	35
II.2.2. Produits de dégradation de la fibrine stabilisée	36
III. PLACE DES DIFFERENTS MARQUEURS BIOLOGIQUES DE LA THROMBOSE	38
IV. D DIMERES PRINCIPAL MARQUEUR DE THROMBOSE	40
IV.1. Principales méthodes de dosage	40

IV.1.1. Sensibilité et spécificité du dosage	40
IV.1.2. Standardisation	41
IV.1.3. Les techniques	42
IV.1.3.1. ELISA	42
IV.1.3.2. Méthodes d'agglutination avec des particules de latex	44
IV.1.3.3. Hémagglutination	44
IV.1.3.4. Test d'immuno-filtration rapide	45
IV.2. Revue des études clinico-biologiques	47
OBJECTIFS DU TRAVAIL ET MATERIELS ET METHODES	51
I. OBJECTIFS	52
I.1. Objectif principal	52
I.2. Objectif secondaire	52
II. MATERIELS	53
II.1. Population de l'étude	53
II.2. L'étude FRALLE 2000	54
II.3. Constitution d'une échantillothèque	55
II.3.1. Recueil des prélèvements	55
II.3.2. Prétraitement des échantillons	56
II.4. Bilans biologiques	56
III. METHODES	57
III.1. Dosage des D-dimères	57
III.1.1. Méthode immunoturbidimétrique : Liatest [®]	57
III.1.2. Méthode ELISA : Asserachrom [®]	59
III.2. Dosage de l'asparaginase	59
III.3. Analyse des résultats	60
RESULTATS	61
I. COMPARAISON DES DEUX TECHNIQUES UTILISEES :	
Asserachrom[®] et Liatest[®]	62
I.1. Corrélations	62
I.2. Comparaisons des résultats	63

II. ETUDES DES PATIENTS	64
II.1. Résultats des dosages des D-dimères	64
II.1.1. Description générale des résultats des dosages	64
II.1.2. Les événements thrombotiques	65
II.1.3. Evaluation d'un seuil pour les D-dimères	69
II.2. Interprétation des taux de D-dimères	76
II.2.1. En fonction de la clinique	76
II.2.2. En fonction du nombre de blastes au diagnostic	78
II.2.3. En fonction du taux d'asparaginase	81
DISCUSSION	83
I. LES TECHNIQUES	84
I.1. Corrélation des techniques	84
I.2. Comparaison des techniques	85
I.3. Avantages – Inconvénients	86
II. L'ETUDE	86
II.1. Prévalence des thromboses, moment de survenue	86
II.2. Place des D-dimères dans le diagnostic de thrombose	88
II.2.1. D-dimères dans les thromboses veineuses et artérielles	88
II.2.2. D-dimères dans la grossesse	90
II.2.3. D-dimères appliquées aux LAL traitées par asparaginase	90
II.3. Utilisation des D-dimères dans les LAL de l'enfant traitée par asparaginase	92
II.3.1. DD comme marqueur prédictif	92
II.3.2. DD comme marqueur d'exclusion de thrombose	93
II.3.3. Limites d'utilisation	94
CONCLUSION	96
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	98

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Mécanisme d'action de la L-asparaginase.	22
Figure 2	Localisation des thromboses	28
Figure 3	Schéma de la coagulation	31
Figure 4	Domaines structurels de la molécule de fibrinogène	32
Figure 5	Formation de la fibrine	33
Figure 6	Dégradation du fibrinogène par la plasmine et libération des différents fragments (X, Y, D, E,)	36
Figure 7	Dégradation du de la fibrine stabilisée par la plasmine et libération des différents complexes	37
Figure 8	Place des marqueurs biologiques dans le diagnostic de thrombose	38
Figure 9	Principe de la mesure des D-dimères par agglutination de particules de latex	58
Figure 10	Corrélation des techniques Asserachrom [®] et Liatest [®]	62
Figure 11	Corrélation des 2 techniques pour des valeurs inférieures à 1,5 µg/l	62
Figure 12	Taux de D-dimères au cours de l'induction et de l'intensification en Asserachrom [®]	64
Figure 13	Taux de D-dimères au cours de l'induction et de l'intensification en Liatest [®]	65
Figure 14	Evolution des D-dimères au cours des deux phases chez CT	66
Figure 15	Evolution des D-dimères au cours des deux phases chez VJ	67
Figure 16	Evolution des D-dimères au cours des deux phases chez VF	68
Figure 17	Représentation des seuils obtenus en Asserachrom [®]	71
Figure 18	Représentation des seuils obtenus en Liatest [®]	71
Figure 19	Exemple issu de la littérature de courbe ROC pour les D-dimères dans le diagnostic de l'embolie pulmonaire	74
Figure 20	Courbes ROC pour la phase d'induction et d'intensification en Asserachrom [®]	75
Figure 21	Courbe ROC pour la phase d'induction et d'intensification en Liatest [®]	75
Figure 22	Distribution des taux de blastes pour les deux groupes d'enfants	80
Figure 23	Taux moyen d'asparaginasémie au cours de l'induction et de l'intensification	81
Figure 24	Corrélation entre les taux de D-dimères et les taux de L-ASNase	82

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Revue des taux de thrombose	27
Tableau 2	Principales situations physiopathologiques associées à une augmentation du taux plasmatique de D-dimères	41
Tableau 3	Réactifs disponibles sur le marché pour le dosage des D-dimères	46
Tableau 4	Etudes clinico-biologiques évaluant la sensibilité et la spécificité des méthodes de dosage des D-dimères	48
Tableau 5	Comparaison des deux techniques	63
Tableau 6	Valeurs seuil déterminées pour l'Asserachrom	69
Tableau 7	Valeurs seuil déterminées pour le Liatest	70
Tableau 8	Résultats des D-dimères supérieurs aux seuils avec l'Asserachrom [®]	72
Tableau 9	Résultats des D-dimères supérieurs aux seuils avec le Liatest [®]	73
Tableau 10	Nombre de blastes chez les enfants ayant des D-dimères élevés ou bas	79
Tableau 11	Données récapitulatives sur les taux moyens de L-ASNase	81
Tableau 12	Comparaison des résultats observés avec les deux méthodes	85

LISTE DES ABREVIATIONS

AIEOP :	Associazione Italiana di Ematologia e Oncologia Pediatrica
AT :	antithrombine
BFM :	Berlin-Franckfurt-Munich
Ca++:	calcium
CHU :	Centre Hospitalier Universitaire
COALL :	Cooperative Acute Lymphoblastic Leukemia
DFCI :	Dana Farber Cancer Institute
<i>E. coli :</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELFA :	Enzyme-Linked Fluorescent Assay
ELISA :	Enzyme-Linked immunosorbent Assay
EP :	Embolie pulmonaire
ET :	Ecart-Type
FPA :	Fibrinopeptide A
FRALLE :	Français Leucémie Lymphoblastique Aigüe de l'enfant
FT :	Facteur Tissulaire
GIMENA :	Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell' Adulto
GMO :	Greffe de moelle osseuse
GVH :	Graft-Versus-Host
HLA :	Human Leucocyte Antigen
ICT :	Irradiation corporelle totale
IT :	Intra-thécale
IV :	intra-veineux
Kd :	kilo dalton
KTVC :	catheter veineux central
LAL :	Leucémie aiguë lymphoïde
L-ASNase :	L-asparaginase
LMNH :	lymphome malin non hodgkinien
MM :	Masse molaire
MO :	Moelle osseuse
MTEV :	Maladie thromboembolique veineuse
NFS :	Numération Formule Sanguine
PAI-1 :	Plasminogen Activator Inhibitor 1
RC :	Rémission complète

PARKAA :	Prophylactic Antithrombin Replacement in Kids with Acute Lymphoblastic Leukemia Treated with Asparaginase
SJCRH :	St Jude Children's Research Hospital
SNC :	Système nerveux central
TAT :	Complexes Thrombine - Antithrombine
t-PA :	activateur tissulaire du plasminogène
TVP :	Thrombose veineuse proximale
UEF :	Unité équivalent fibrinogène
UI :	Unité Internationale
UPCO :	Unité de Pharmacie Clinique Oncologique
VPN :	Valeur prédictive négative
VPP :	Valeur prédictive positive
VWF :	Facteur Willebrand

INTRODUCTION

Les progrès des traitements des Leucémies Aiguës Lymphoïdes (LAL) d'enfants ont permis d'atteindre un taux de survie sans événement à 5 ans d'environ 70% [1]. Bien que le but des futurs traitements est d'améliorer la survie, l'attention doit être portée sur la morbidité secondaire à la maladie elle-même et à son traitement.

La survie augmentée des enfants avec une LAL a été obtenue au prix d'effets secondaires d'importance et de sévérité variables. La plupart de ces effets est le résultat direct de chimiothérapie combinée administrée dans des protocoles complexes.

La L-asparaginase (L-ASNase), qui a une activité anti-leucémique majeure incontestable, est un agent de chimiothérapie hautement efficace avec des effets secondaires sérieux. En effet, son action n'est pas ciblée sélectivement sur les cellules leucémiques mais touche aussi les cellules normales.

Parce que l'efficacité de la L-ASNase dans le traitement des LAL offre de grands espoirs de rémission, celle-ci est toujours utilisée dans la plupart des protocoles de chimiothérapie de LAL de l'enfant. Mais une des complications les plus sérieuses liées à la thérapie par la L-ASNase est la survenue d'évènements thrombotiques.

En réalité, les mécanismes responsables des thromboses dans les LAL de l'enfant sont très complexes et impliquent le processus de la maladie elle-même, aussi bien que le traitement. Cependant, quel qu'en soit le mécanisme, il est nécessaire pour le clinicien de se donner les moyens de prévenir de façon optimale la survenue de ces thromboses.

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'intérêt des D-dimères au cours du traitement par L-ASNase des LAL de l'enfant. Sachant que les D-dimères ont une mauvaise spécificité et manquent de standardisation, il apparaît nécessaire de valider leur utilisation dans ce contexte clinique précis.

Dans une première partie, nous ferons le point sur l'état actuel des connaissances concernant la survenue de thromboses chez les enfants atteints de LAL et traités par L-ASNase. Nous ferons également un rappel bibliographique sur la physiologie des D-dimères, les différentes techniques utilisées et leurs performances.

La seconde partie expérimentale exposera les résultats des D-dimères obtenus dans le cadre du protocole FRALLE 2000 lors de l'induction et de l'intensification du traitement des LAL au CHU de Nantes dans le service du Pr Harrousseau.

GENERALITES

I. LEUCEMIE AIGUË LYMPHOÏDE

I.1. La pathologie.

Les LAL sont des hémopathies malignes aiguës caractérisées par une expansion clonale de lymphoblastes. Ces lymphoblastes dérivent d'une transformation maligne de précurseurs lymphoïdes B et plus rarement T. Ils infiltrent le sang, la moelle osseuse (MO), les organes lymphoïdes avec un tropisme plus ou moins fort pour les gonades et les méninges. L'expansion clonale entraîne un défaut de production d'éléments hématopoïétiques matures : insuffisance médullaire quantitative caractérisée par des cytopénies (neutropénie, anémie, thrombopénie) d'intensité variable dont les conséquences cliniques représentent le principal mode de découverte de la maladie.

Les LAL représentent globalement 30% des leucémies aiguës. Elles sont plus fréquentes chez l'enfant (60% des cas en dessous de 20 ans) [2].

Leur diagnostic repose sur la conjonction de la morphologie cellulaire, de la cytochimie et surtout aujourd'hui, de l'immunophénotype.

Leur pronostic dépend de l'âge, de l'importance du syndrome tumoral, de la leucocytose, mais surtout de la cytogénétique. On distingue les LAL à risque standard et les LAL à risque élevé.

I.2. Le traitement .

I.2.1. La radiothérapie :

« L'irradiation » de la totalité ou d'une partie du corps a pour objectif de détruire directement les cellules cancéreuses par l'action des rayons. La radiothérapie peut intervenir de différentes façons : elle peut compléter l'action de la chimiothérapie comme traitement d'appoint local (les indications d'irradiation crânio-spinale ont cependant fortement diminué, remplacées par l'utilisation du méthotrexate haute dose dans les protocoles les plus récents) ou être utilisée en traitement de préparation à la greffe de moelle osseuse (GMO).

I.2.2. La greffe de moelle osseuse :

La GMO consiste en une transfusion d'une MO saine provenant d'un donneur compatible (allogreffe phéno-identique si le donneur provient du fichier international de donneurs de MO ou géno-identique si le donneur est intra-familial HLA-identique). Les cellules saines injectées au malade colonisent sa MO à la place des cellules cancéreuses. Cette greffe est proposée en complément (ou échec) de la chimiothérapie pour certaines formes graves de LAL. Le receveur doit être « conditionné » pour recevoir la greffe. Le conditionnement s'effectue généralement par une irradiation corporelle totale qui détruit toutes les cellules de la MO (cellules leucémiques et cellules saines). La GMO prend généralement en 3 à 4 semaines, mais n'est pas dénuée de complications telles que des infections (traitement par antibiotiques et antifongiques) et/ou une réaction du greffon contre l'hôte (traitement immunosuppresseur). La GMO peut également ne pas prendre, et dans ce cas, le greffon est rejeté par l'hôte.

I.2.3. La chimiothérapie :

La chimiothérapie anticancéreuse constitue le traitement de base de la LAL. Au Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, le protocole de prise en charge de la majorité des LAL *de novo* de l'enfant est le protocole **Fralle 2000**.

Après un bilan permettant de définir au mieux la maladie et la pose d'un cathéter veineux central, le traitement comprend les étapes suivantes :

La préphase (durée : 7 jours)

Lors de cette première semaine de traitement, la corticosensibilité de la LAL est évaluée par l'administration quotidienne de prednisone à 60 mg/m²/j en 2 fois de J1 à J7. L'injection intrathécale de méthotrexate assure un traitement prophylactique neuro-méningé.

L'induction (durée : 5 à 6 semaines)

Elle a pour but l'obtention de la rémission complète (RC), c'est à dire la normalisation apparente de la MO.

La consolidation (durée : 12 semaines)

Elle consolide la rémission obtenue. Il s'agit d'une cure peu intensive.

L'intensification n°1 (durée : 8 semaines)

Il s'agit d'une phase de traitement plus intensive. Elle consiste en une seconde induction tardive et a pour but d'augmenter la survie sans événement. Ainsi, elle diminue le risque de rechute, en rattrapant quelques enfants répondeurs lents, et en consolidant la qualité de la rémission pour les autres.

L'interphase (durée : 8 semaines)

Il s'agit d'une phase de « pause thérapeutique » qui permet d'éviter les toxicités cumulées trop rapprochées des deux phases d'intensification.

L'intensification n°2 (durée : 6 semaines)

Cette phase de traitement est moins agressive que l'intensification n°1. Elle a pour but d'améliorer la survie sans événement pour tous les enfants.

Le traitement d'entretien (durée : 24 mois)

Il est réalisé en ambulatoire en dehors de 12 injections intraveineuses (IV) mensuelles de vincristine et de 4 IT. Il a pour but d'éviter les rechutes tardives.

La durée globale du traitement est d'un peu moins de 3 ans.

I.3. Leucémie aiguë lymphoïde et thrombose.

Le maintien de l'hémostase repose sur une balance délicate entre l'activation et l'inhibition de la cascade des protéines de la coagulation.

L'activation des protéines, en particulier celle de la thrombine, doit être gardée sous contrôle par la formation de complexes avec des inhibiteurs tels que le cofacteur II de l'héparine et l'antithrombine (AT).

I.3.1. Effets de la maladie :

Une revue de la littérature a permis d'évaluer l'hémostase au moment du diagnostic chez les enfants atteints de LAL [3].

Les concentrations plasmatiques de la plupart des facteurs et des inhibiteurs de la coagulation se situent dans les valeurs normales au moment du diagnostic à l'exception du facteur VIII, du facteur Willebrand et du fibrinogène. Ces derniers sont significativement augmentés en raison de la réponse inflammatoire. D'autre part, presque toutes les études évaluant les paramètres relatant la génération de thrombine ont montré qu'elle était augmentée au moment du diagnostic.

En effet, des enfants avec une LAL non traitée présentent des marqueurs de génération de thrombine (F1+2 ; TAT) élevés par rapport aux enfants sains [4]. Ces enfants ne présentent pas d'infection, ce qui suppose que cette génération de thrombine est probablement liée à la présence de lymphoblastes.

Cette génération de thrombine peut représenter un facteur important dans la pathogenèse des accidents thromboemboliques observés au cours des LAL. Les mécanismes responsables de cette génération de thrombine sont probablement complexes et ne sont pas complètement élucidés à ce jour.

Par ailleurs, au moment du diagnostic, les concentrations plasmatiques de plasminogène, d' α_2 -antiplasmine et de l'inhibiteur de l'activation du plasminogène (PAI-1) se situent dans les valeurs normales. Au contraire, les niveaux plasmatiques du t-PA sont augmentés par rapport aux valeurs normales. Le ratio PAI-1/t-PA est donc diminué chez les enfants présentant une LAL par rapport aux enfants sains [5]. Le système fibrinolytique est donc

activé. Ceci est compatible avec des concentrations plasmatiques élevées de PDF et de D-dimères chez les enfants présentant une LAL non traitée.

Les LAL non traitées engendrent donc chez les enfants une génération endogène de thrombine et une activation du système fibrinolytique.

I.3.2. Effets de la chimiothérapie :

Malgré une génération de thrombine augmentée au moment du diagnostic, les thromboses chez les enfants avec LAL sont principalement rapportées après l'initiation de la chimiothérapie. Ceci constitue une particularité physiopathologique puisque, chez les adultes, la thrombose peut être, au contraire, un signe révélateur d'une malignité sous-jacente [6].

La chimiothérapie influence le système hémostatique soit directement par les agents antileucémiques, soit indirectement par le cathéter veineux central (KTVC) ou par les complications comme les infections secondaires à l'immunodépression [5-7].

Le traitement est donc impliqué dans la pathogénicité d'initiation du processus de thrombose.

I.3.2.1. L'asparaginase :

Différentes études cliniques ont démontré l'efficacité de la L-ASNase durant l'induction et l'intensification des traitements des LAL *de novo* aussi bien chez l'adulte que chez l'enfant [8, 9]. C'est une drogue majeure dans la prise en charge thérapeutique de cette pathologie.

- Origine :

Depuis la découverte de l'effet antitumoral du sérum du cochon guinéen en 1953, l'enzyme L-ASNase a été identifiée [8, 10], puis isolée, en 1964, à partir de la bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*) [11, 12] ce qui a permis une production massive et facile de la protéine.

Les asparaginases natives sont produites par différentes bactéries et diffèrent légèrement par leur composition, leur charge et leur mobilité électrophorétique. Ces variations dans la structure et la fonction des L-ASNase expliquent les différences décrites au niveau de la

pharmacodynamie et des effets cliniques. La L-ASNase est dérivée soit de *E. coli* (Kidrolase[®]) soit de *Erwinia chrysanthemi* (Erwinase[®]; ATU nominative, actuellement non disponible). Une troisième forme commerciale de L-ASNase issue d'*E. coli* et liée de manière covalente à des molécules de monométhoxy-polyéthylène glycol (PEG) a été plus récemment développée sous le nom d'Oncaspar[®] (ATU nominative).

- Mécanisme d'action (Figure 1):

La L-ASNase interfère avec la synthèse des protéines en catalysant l'hydrolyse de la L-asparagine en acide aspartique et ammonium. La plupart des cellules produisent l'asparagine synthétase, ce qui n'est pas le cas des lymphoblastes humains qui n'ont pas cette enzyme et ont besoin de l'asparagine exogène pour se multiplier : la diminution de leur biosynthèse protéique conduit à leur apoptose c'est à dire à leur mort cellulaire [13].

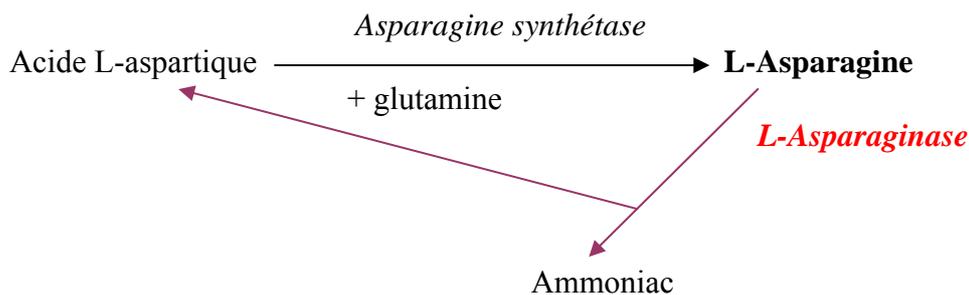


Figure n° 1 : Mécanisme d'action de la L-asparaginase

- Indications :

La découverte de la L-ASNase comme drogue anti-cancéreuse a conduit à son utilisation dans de nombreux protocoles de chimiothérapie pour le traitement de maladies hématopoïétiques malignes : les LAL et LMNH en particulier.

Dans les LAL, l'introduction de L-ASNase dans les protocoles de traitements pédiatriques a amené les taux de survie à 5 ans à environ 70% [1].

- Effets secondaires :

La L-ASNase a un spectre de toxicité qui dépend de sa capacité à causer une cessation immédiate de la synthèse protéique dans les tissus tributaires de l'asparagine exogène.

Sur le plan biologique, l'activité de la L-ASNase touche non seulement les cellules cibles blastiques mais aussi les cellules saines d'organes variés dont le métabolisme est intense, notamment le foie et le pancréas [13].

Les effets cliniques de l'arrêt de synthèse des protéines non liées à l'hémostase sont les suivants :

- Neurotoxicité ;
- Pancréatite ;
- Hépatite ;
- Hyperglycémie ;
- Réactions allergiques locales et systémiques.

Les troubles de la coagulation, une complication bien connue de la L-ASNase, sont caractérisés par des thromboses ou hémorragies, les thromboses étant plus fréquentes.

Effets de l'asparaginase sur l'hémostase :

La plupart des travaux étudient l'effet de la L-ASNase en association avec d'autres agents de chimiothérapie. Des différences existent entre ces résultats qui sont dues au type et à la dose de L-ASNase utilisée, au moment du prélèvement après l'injection, à l'état de la maladie et à la phase de la chimiothérapie étudiée. On observe cependant un résultat qui est constant entre les diverses études : **une diminution du plasminogène, du fibrinogène et de l'antithrombine.**

Nowak-Göttl *et al* ont d'ailleurs montré que cette diminution du plasminogène, du fibrinogène et de l'antithrombine est significativement plus importante en cas d'administration d'*E coli* asparaginase comparativement à l'*Erwinia* asparaginase [14]. Albertsen *et al* ont, quant à eux, remarqué une diminution des paramètres d'hémostase plus prononcée avec *Erwinia* asparaginase plutôt qu'avec *E. coli* asparaginase [15].

Des auteurs ont eu l'opportunité d'évaluer l'effet de la L-ASNase seule sur l'hémostase. Les protocoles de traitement des LAL développés au DFCI (Dana Farber Cancer Institute) ont une fenêtre thérapeutique où seule la L-ASNase est administrée [16]. La L-ASNase, comme seul agent, diminue significativement les concentrations plasmatiques de presque toutes les protéines de la coagulation et inhibiteurs mesurés, comparés au niveau plasmatique au moment du diagnostic.

Mais la **diminution de l'AT** est **significativement plus grande** que pour les autres protéines de la coagulation.

Pourtant, la teneur en asparagine de l'AT et son élimination métabolique sont similaires à d'autres facteurs de la coagulation mesurés dont la diminution n'est pas aussi importante. En effet, Nowak-Göttl *et al* ont montré que l'importance de la baisse des protéines de la coagulation et des protéines fibrinolytiques était reliée à l'activité en L-ASNase et au taux de déplétion en asparagine obtenu [14, 17, 18].

On peut expliquer la diminution plus marquée de l'AT par l'addition de deux phénomènes : cette diminution serait due non seulement à une **baisse de la synthèse protéique hépatique**, mais aussi à une **augmentation de la consommation due à la génération de thrombine**.

Une étude a été réalisée pour évaluer l'effet de la L-ASNase sur l'activité procoagulante des cellules mononucléaires. Celle-ci augmente après administration de L-ASNase [19].

D'autres auteurs considèrent que l'origine de l'événement thrombotique provient de lésions de l'endothélium provoquées par la L-ASNase [20]. Celle-ci activerait le facteur XII et le facteur Willebrand (VWF).

Tous ces mécanismes entraînent une activation de la coagulation contribuant au risque de survenue d'une thrombose chez les enfants atteints de LAL.

I.3.2.2. Effets des stéroïdes sur les protéines de l'hémostase :

Il a été suggéré que les stéroïdes induiraient un état prothrombotique par augmentation du complexe FVIII/VWF (hypercoagulabilité) et par diminution dose-dépendante du niveau de PAI-1 (hypofibrinolyse) [3].

Récemment, Nowak-Göttl *et al* ont rapporté que l'association de la dexaméthasone (10 mg/m²/j de J8 à J29 pendant l'induction) avec de l'*E. coli* asparaginase (5000 UI/m² à 3 jours d'intervalle de J12 à J33) dans le cadre du protocole BFM 2000 en oncologie pédiatrique entraînait un risque de thrombose moindre que chez les enfants recevant de la prednisone (60 mg/m²/j de J1 à J36) en association avec la L-ASNase à la même dose et avec le même schéma d'administration dans le cadre du protocole BFM 90/95 [21].

Les glucocorticoïdes administrés en même temps que la L-ASNase chez les enfants atteints de LAL ont des effets inhibiteurs sur la réaction inflammatoire. Les effets précoces sont l'inhibition du développement de l'œdème, de la dilatation capillaire, du dépôt de fibrine, et de la migration des leucocytes. Les effets tardifs sont l'inhibition de la prolifération capillaire, de la prolifération de fibroblastes et du dépôt de collagène. De plus, les corticoïdes ont un effet protecteur sur l'intégrité de la membrane cellulaire et diminuent la synthèse de prostaglandine et de thromboxane.

D'une part, la **dexaméthasone a un effet glucocorticoïde plus fort que la prednisone** ce qui peut expliquer le rôle plus protecteur de la dexaméthasone dans le développement des événements thrombotiques. D'autre part, la diminution plus prononcée des protéines de la coagulation serait due à un **effet synergique entre prednisone et asparaginase** dans la diminution de synthèse protéique au niveau du foie comparée à dexaméthasone et asparaginase [21].

I.3.3. Effets des autres facteurs associés à la chimiothérapie :

I.3.3.1. KTVC :

Les cathéters veineux centraux sont largement utilisés en oncologie pédiatrique et ont beaucoup amélioré les soins et la qualité de vie des enfants. Cependant ces dispositifs sont associés à des complications comme les infections, des dysfonctionnements de KT et des thromboses liées au KT [3].

I.3.3.2. Rôle des infections :

Les infections bactériennes sont des complications bien connues survenant principalement durant la phase d'induction dans le traitement des LAL. Ces infections activent la coagulation et peuvent ainsi augmenter le risque de thrombose [3].

Conclusion :

Bien que l'étiologie exacte ne soit pas connue, il semble que les enfants atteints d'une LAL présentent une génération de thrombine augmentée au moment du diagnostic. Cependant, les thromboses sont le plus souvent observées après l'initiation de la thérapie anti-leucémique, ce qui indique la part importante du traitement dans la survenue des thromboses. En effet, la L-ASNase entraîne une diminution marquée de l'AT, ce qui ne permet pas la régulation de la thrombine générée en excès.

I.3.4. Revue des différents protocoles et risques thrombotiques :

Dans les différentes études, la prévalence des thromboses parmi les enfants atteints de LAL recevant de la L-ASNase se situe entre 0 et 15% (**Tableau 1**). Ces variations peuvent être expliquées par les modalités de l'étude, les schémas thérapeutiques (la dose et le type de L-ASNase, l'utilisation concomitante de L-ASNase et de prednisone) et par les événements considérés.

Tableau n°1 : Revue des taux de thromboses .

Auteur - année	protocoles	n	% de thromboses(induction)
Pui et al (1985) [22]	SJCRH ALL	460	1,7%
Miniero et al (1987) [23]	ALL AIEOP	53	7,5%
Semeraro (1990) [19]		10	0,0%
Leone (1993) [24]	GIMENA ALL	25	8,0%
Nowak-Göttl (1994) [25]		46	15,0%
Nowak- Göttl (1996) [18]	BFM-90	40	5,0%
Nowak- Göttl (1999) [26]	BFM 90/95	289	10,0%
Sutor (1999) [27]	BFM-90	1100	1,5%
Mauz-Körlholz (2000) [28]	COALL 92-97	108	2,8%
Attarbaschi (2003) [29]	ALL-BFM 2000	16	0,0%
Mitchell (2003) [30]	PARKAA study	66	36,70%
Nowak- Göttl (2003) [21]	BFM-90/95	280	10,40%
	BFM 2000	56	1,80%

Les différentes études ont tenté d'expliquer la survenue des thromboses chez ces enfants. Dans une étude de Nowak-Göttl [26], les facteurs de risque prothrombotiques sont étudiés, comme le génotype MTHFR, la mutation du facteur II, du facteur V Leiden, les déficits en protéine C, protéine S, en AT et une Lp(a) élevée. Il se trouve que 46,5% des enfants avec un facteur de risque prothrombotique ont souffert d'une thrombose alors qu'une thrombose est survenue chez 2,2% des enfants n'ayant pas de facteur de risque.

Dans l'étude PARKAA [30], aucune association n'a été montrée entre la présence d'un facteur de risque prothrombotique et la survenue d'une thrombose. Par contre, sur 8 enfants ayant des anti-phospholipides, 4 ont présenté une thrombose.

Une autre étude a comparé un groupe d'enfants traité par la L-ASNase associée à la prednisone (n=280) avec un autre groupe traité par L-ASNase associée à la dexaméthasone (n=56). Aucune différence significative n'a été retrouvée concernant le taux de prévalence des facteurs de risque prothrombotiques. Pourtant, le taux de thrombose était de 10,4% dans le groupe traité par prednisone contre 1,8% dans le groupe traité par la dexaméthasone [21]. Le choix du traitement corticoïde paraît donc prédominant dans la survenue des thromboses.

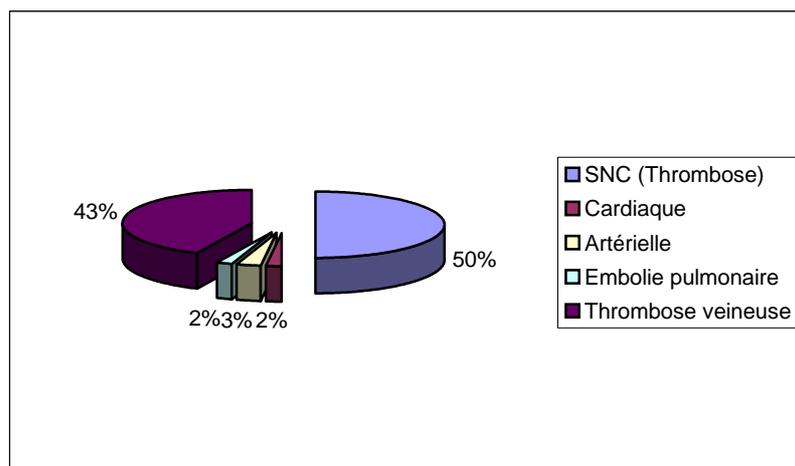
Le moment de la thrombose semble constant d'un protocole à l'autre [7]. La grande majorité des événements survient lors de l'administration de L-ASNase, rarement pendant les phases qui n'en incluent pas. La constance de cette association est remarquable étant donnée la variabilité des protocoles de chimiothérapie des centres européens ou nord-américains.

La majorité des complications (90%) survient lors de l'induction du protocole de traitement en particulier pendant la période qui inclut simultanément l'administration de glucocorticoïdes et de L-ASNase [27].

Dans l'étude PARKAA [30], le taux de prévalence de thrombose est de 36,7%, ce qui est nettement supérieur aux autres études. Suite au traitement par L-ASNase, les patients sont systématiquement évalués par des tests radiologiques (phlébographie, IRM) sensibles, ce qui permet le diagnostic de thromboses asymptomatiques mais avec une occlusion significative. Cette démarche permet d'éliminer un biais en ce qui concerne la prévalence et la localisation des thromboses. Dans cette étude, la proportion de thrombose au niveau du SNC est faible (4,5%) tandis que celle du système veineux périphérique est plus importante (95,5%). La valeur clinique des thromboses asymptomatiques peut être discutée.

Une revue de la littérature a analysé les différentes études et a ainsi fait le point sur la distribution des thromboses [31] (*Figure 2*).

Figure n° 2 : Localisation des thromboses [31]:



II. RAPPELS SUR L'HEMOSTASE

II.1. Formation du caillot.

II.1.1. Formation de la thrombine :

On distingue deux voies dans le déclenchement de la coagulation conduisant à l'activation du facteur Xa (**Figure 3**): les voies intrinsèque et extrinsèque, la voie extrinsèque étant la plus importante [32].

La voie extrinsèque :

La coagulation est déclenchée par la mise en contact du sang circulant avec le facteur tissulaire (FT) lors d'une lésion vasculaire.

Le facteur VIIa (FVIIa), à l'état de trace dans le plasma, se lie au FT favorisant ainsi l'autoactivation du facteur VII. Le complexe FVIIa-FT agit préférentiellement sur le facteur X (FX) mais aussi sur le facteur IX (FIX) permettant leur activation

Le FIXa complexé avec le facteur VIIIa à la surface des plaquettes activées est capable comme le complexe FVIIa-FT d'activer le FX.

La voie intrinsèque d'activation du facteur X :

Cette voie fait intervenir les facteurs contact : le facteur XII (FXII) et les kininogènes de haut poids moléculaire (KHPM) se fixent sur les surfaces chargées électronégativement.

La fixation du FXII sur ce type de surface induit son activation par protéolyse et le FXIIa active le FXI en F XIa. Celui-ci, en présence de calcium, active le FIX en FIXa.

La prékallikréine transformée en kallikréine par le FXIIa induit aussi la formation de FXIIa ce qui amplifie l'activation de cette phase contact.

Voie commune d'activation de la prothrombine (facteur II) :

Le FXa, en présence de son cofacteur d'activation, le FVa, transforme la prothrombine (FII) en trombine (FIIa) avec libération des fragments 1+2. Les traces de thrombine produite activent le VIII et le V. La génération de thrombine est ainsi amplifiée.

Le phénomène d'activation reste un mécanisme localisé puisque seules les plaquettes et les cellules endothéliales activées au contact de la brèche vasculaire, servent de support à l'activation des facteurs de coagulation.

La thrombine formée est rapidement inactivée dans le plasma par l'AT, son principal inhibiteur plasmatique avec formation de complexes d'inactivation: les **complexes thrombine-antithrombine (TAT)**. L'AT est une protéine circulante synthétisée par le foie. Elle piège les protéines activées de la coagulation : FXIa, FIXa et FIIa. Les complexes inactifs formés sont rapidement éliminés.

ALTERATION DE LA PAROI VASCULAIRE

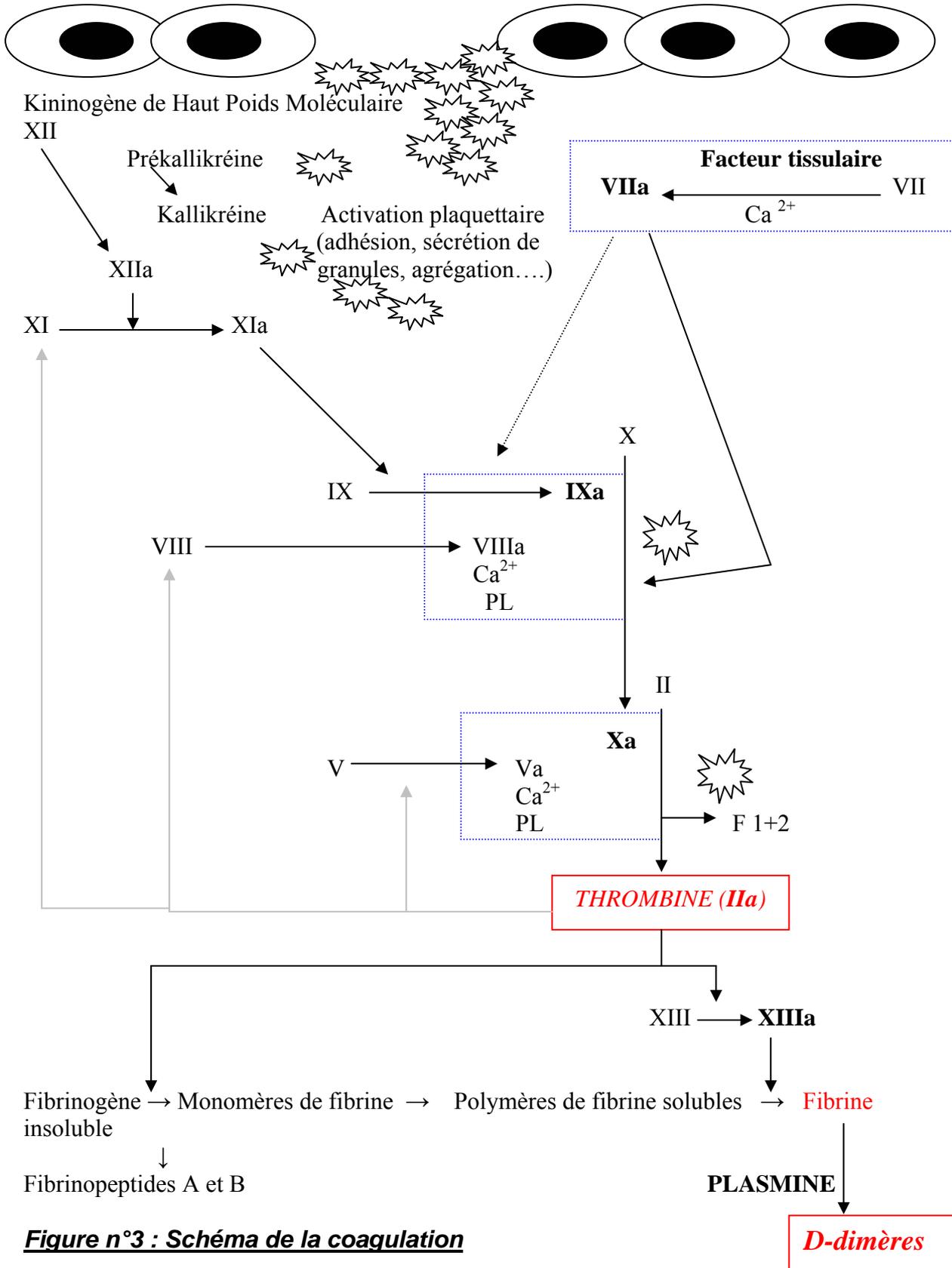


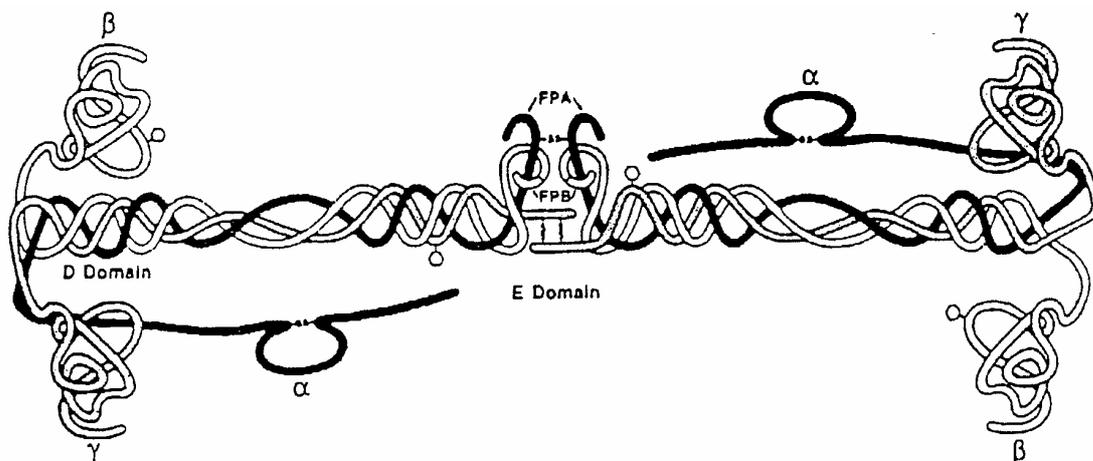
Figure n°3 : Schéma de la coagulation

II.1.2. Formation de la fibrine :

La molécule de fibrinogène :

Le fibrinogène est une glycoprotéine symétrique de 340 Kd composée de deux dimères constitués de trois chaînes polypeptidiques $A\alpha$, $B\beta$, γ réunies entre elles par des ponts disulfures (**Figure 4**). La partie centrale est appelée domaine E et est constituée des parties N-terminales des chaînes polypeptidiques. Les parties distales, constituées des zones C-terminales correspondent aux domaines D. Les trois chaînes sont synthétisées dans l'hépatocyte avant d'être secrétées dans la circulation. Le taux normal de fibrinogène varie de 1,6 à 3,0 g/l.

Figure n° 4 : Domaines structuraux de la molécule de fibrinogène. Sa structure fait apparaître une partie centrale N-terminale appelée domaine E, et deux parties C-terminales appelées domaine D [33].

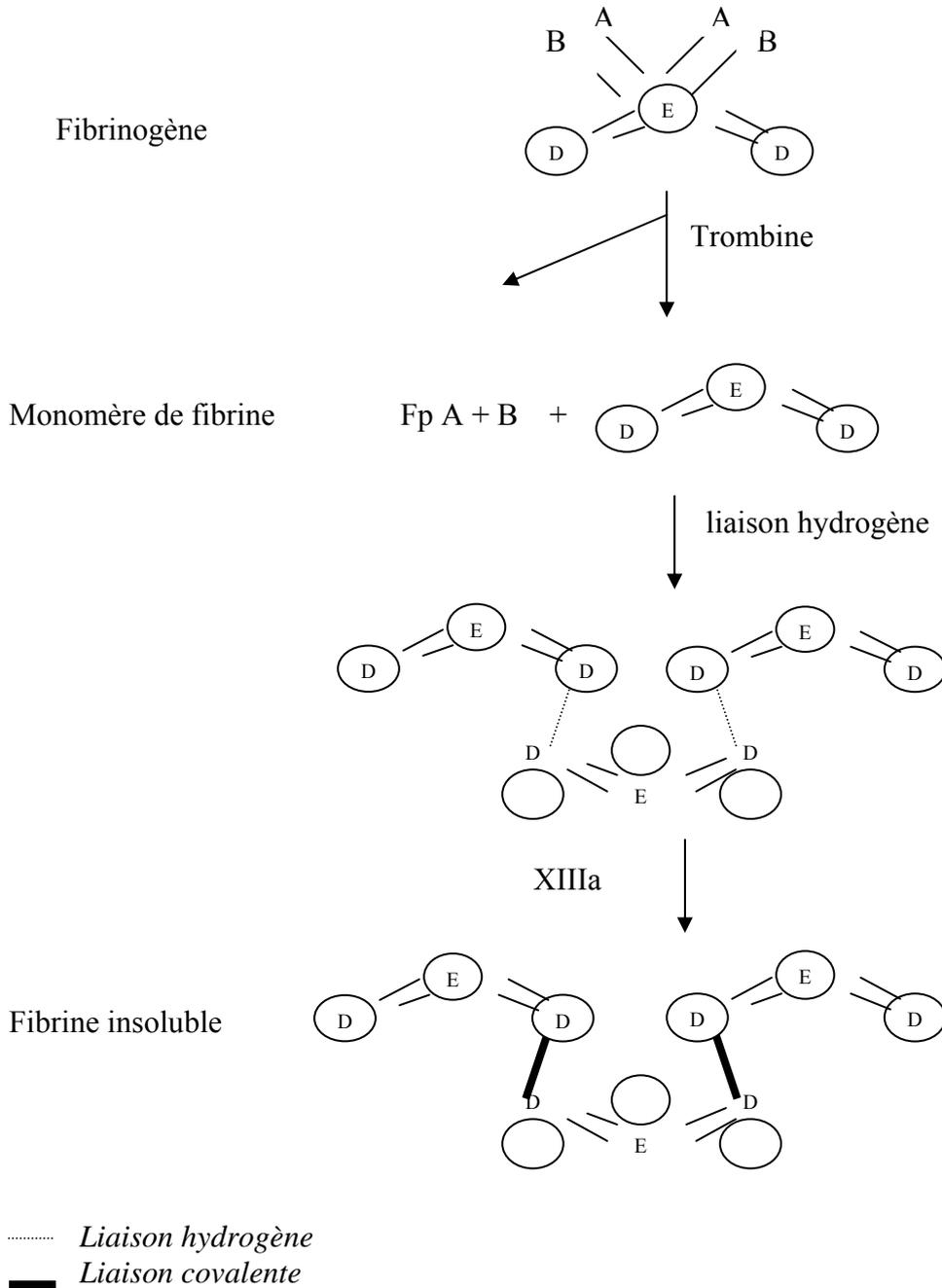


Action de la thrombine sur le fibrinogène :

La thrombine permet la génération de monomères de fibrine à partir du fibrinogène (**Figure 5**).

Le processus est réalisé par le clivage des segments amino-terminaux des chaînes $A\alpha$ et $B\beta$ au niveau du domaine central E libérant ainsi les fibrinopeptides A et B. La libération de ces quatre fibrinopeptides entraîne une modification de la charge électrique de la région E et permet la formation de complexes entre les différents monomères par des liaisons hydrogènes, non covalentes : il s'agit de la fibrine soluble.

Figure n°5 : Formation de la fibrine



II.1.3. Stabilisation de la fibrine par le XIIIa :

Le facteur XIIIa (FXIIIa) est un enzyme composé de deux sous-unités A et B circulant dans le plasma sous forme d'un tétramère A₂B₂ de 320 Kd en partie lié au fibrinogène. L'activation de l'enzyme est effectuée par la thrombine et nécessite du Ca⁺⁺.

Le FXIIIa est une transglutaminase qui va permettre la stabilisation de la fibrine par **l'introduction de liaisons covalentes** entre les chaînes (*Figure 5*). Il établit des liaisons non covalentes entre les domaines E et D et la formation de liaisons covalentes entre deux domaines D de monomères adjacents. Ces dernières liaisons sont appelées « cross-links ». La fibrine est alors insoluble et donne son armature au caillot. Le FXIIIa se lie aussi à d'autres molécules du réseau de fibrine et en particulier à l'inhibiteur rapide de la plasmine : l' α_2 -antiplasmin qui va réguler la dissolution du caillot [34].

La thrombine est retenue dans le réseau fibrineux et garde son activité procoagulante. Elle permet ainsi de réguler l'extension du caillot par adjonction de nouveaux monomères de fibrine, d'autant plus que sa liaison à la fibrine le protège de l'inactivation par l'AT [35].

La stabilisation de la fibrine masque les sites de haute affinité pour l'activateur tissulaire du plasminogène (protéine de la fibrinolyse) et diminue également la fixation du plasminogène, créant ainsi ses mécanismes propres de régulation [36].

II.2. Fibrinogénolyse et fibrinolyse

La formation de fibrine (constituant principal du thrombus) est immédiatement suivie d'une activation du système fibrinolytique conduisant à la formation de plasmine.

II.2.1. Produits de dégradation du fibrinogène, des monomères de fibrine induits par la plasmine :

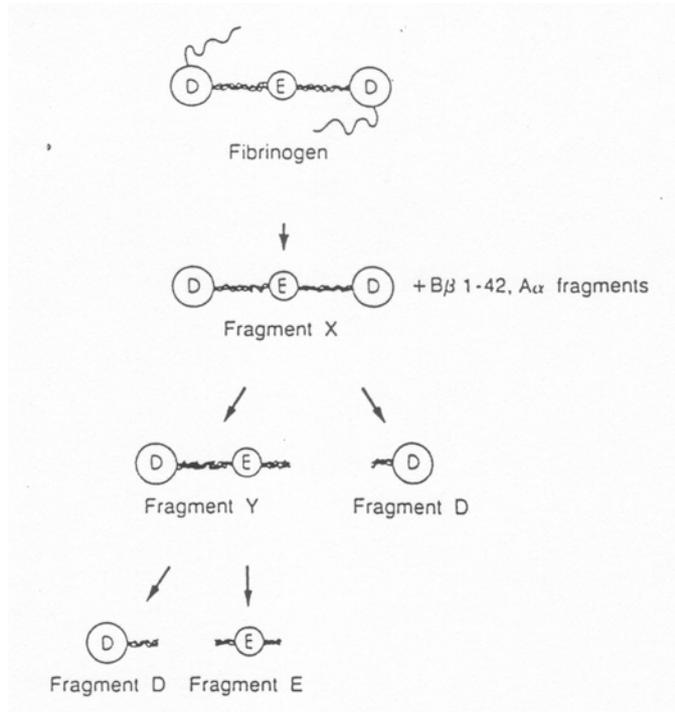
Le plasminogène est le précurseur de la plasmine. Il est synthétisé par le foie puis libéré dans la circulation, sa concentration plasmatique est de 200 mg/l. Le plasminogène est une glycoprotéine de 90 kd formée d'une seule chaîne polypeptidique. Il faut distinguer trois régions : la partie C terminale appelée chaîne B, la partie centrale comprenant 5 structures particulières appelées «kringle» qui sont le siège des liaisons du plasminogène avec la fibrine et l' α_2 -antiplasmine, et enfin la partie N-terminale.

La plasmine a une affinité plus grande pour la fibrine, mais elle peut aussi attaquer le fibrinogène dans certaines situations pathologiques telles que : une coagulation intravasculaire disséminée, une transplantation hépatique, un cancer de la prostate ou une thrombolyse thérapeutique [37, 38]. Dans les conditions physiologiques, la plasmine est neutralisée par l' α_2 -antiplasmine.

La plasmine possède de nombreux points d'attaque sur les chaînes du fibrinogène libérant plusieurs types de fragments (**Figure 6**):

- les fragments X issus de l'action de la plasmine sur le fibrinogène et les monomères de fibrine. Le fragment X sera ensuite coupé asymétriquement pour donner naissance aux fragments Y et D.
- le fragment Y est asymétrique et composé d'une région E et d'une région D. Il sera scindé pour donner les fragments D et les fragments E.

Figure n°6 : Dégradation du fibrinogène par la plasmine et libération des différents fragments (X,Y,D,E) [39]



II.2.2. Produits de dégradation de la fibrine stabilisée :

Le plasminogène joue un rôle central, il peut être activé de différentes façons :

1. Par la voie extrinsèque qui fait intervenir l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA).
2. Par la voie intrinsèque qui fait intervenir la phase contact de la coagulation : le FXII (facteur Hageman).

En se fixant sur son substrat, la molécule de plasmine échappe à son inhibiteur, l' α_2 -antiplasmine. De ce fait, le processus fibrinolytique reste circonscrit à la molécule de fibrine au niveau des thrombi et ne se propage pas à la circulation générale.

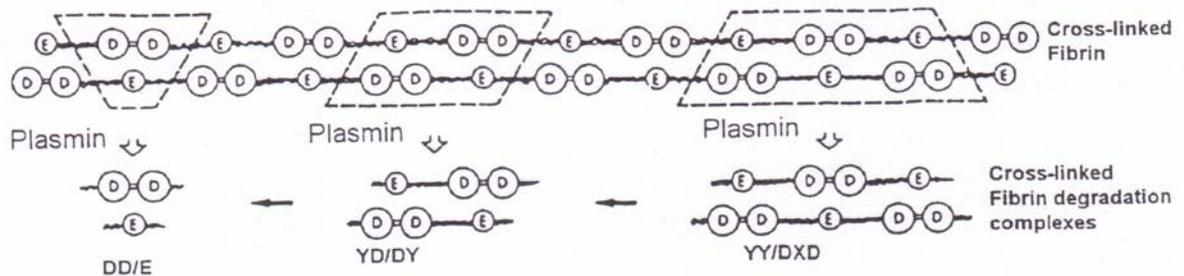
La plasmine possède de nombreux sites de coupure au niveau des chaînes constituant la fibrine mais n'est pas capable de scinder la ou les liaisons entre les deux régions D (**liaisons « cross-links »**) [40]. Les fragments issus de la digestion de la fibrine stabilisée contiennent des dimères, des trimères et des tétramères de la région D qui peuvent donc être

de taille extrêmement variable. Après l'action de la plasmine, la plus petite molécule observée composée de deux domaines D et d'un domaine E est communément appelée **D-dimère** (*Figure 7*).

Les **D-dimères** témoignent d'un **processus exclusivement fibrinolytique** [33].

Le fragment **D-dimère** est le produit terminal de la dégradation ; sa masse moléculaire est de 184,6 Kd. Mais la dénomination « D-dimères » désigne un mélange de produits issus de la dégradation de la fibrine exposant l'épitope caractéristique du D-dimère (deux fragments D reliés par liaison covalente). Cet épitope est absent sur le fibrinogène natif, sur les produits de dégradation du fibrinogène et sur les monomères de fibrine. Les produits de dégradation de la fibrine générés dans les divers contextes cliniques sont très hétérogènes par leur nature et leur taille et sont fonction de la pathologie et de l'équilibre coagulolytique du patient. [41].

Figure n°7 : Dégradation de la fibrine stabilisée par la plasmine et libération des différents complexes [39].



III. PLACE DES DIFFERENTS MARQUEURS BIOLOGIQUES DE LA THROMBOSE

L'activation de la coagulation aboutit habituellement à la protéolyse limitée du fibrinogène, les monomères de fibrine s'organisant ensuite en réseau. Cependant, la génération de fibrine ne suffit pas à définir la thrombose. Différents marqueurs peuvent mettre en évidence une activation du processus d'hémostase (*Figure 8*). On ne pourra cependant pas différencier thrombose et état préthrombotique (situation où la constitution d'une thrombose est probable).

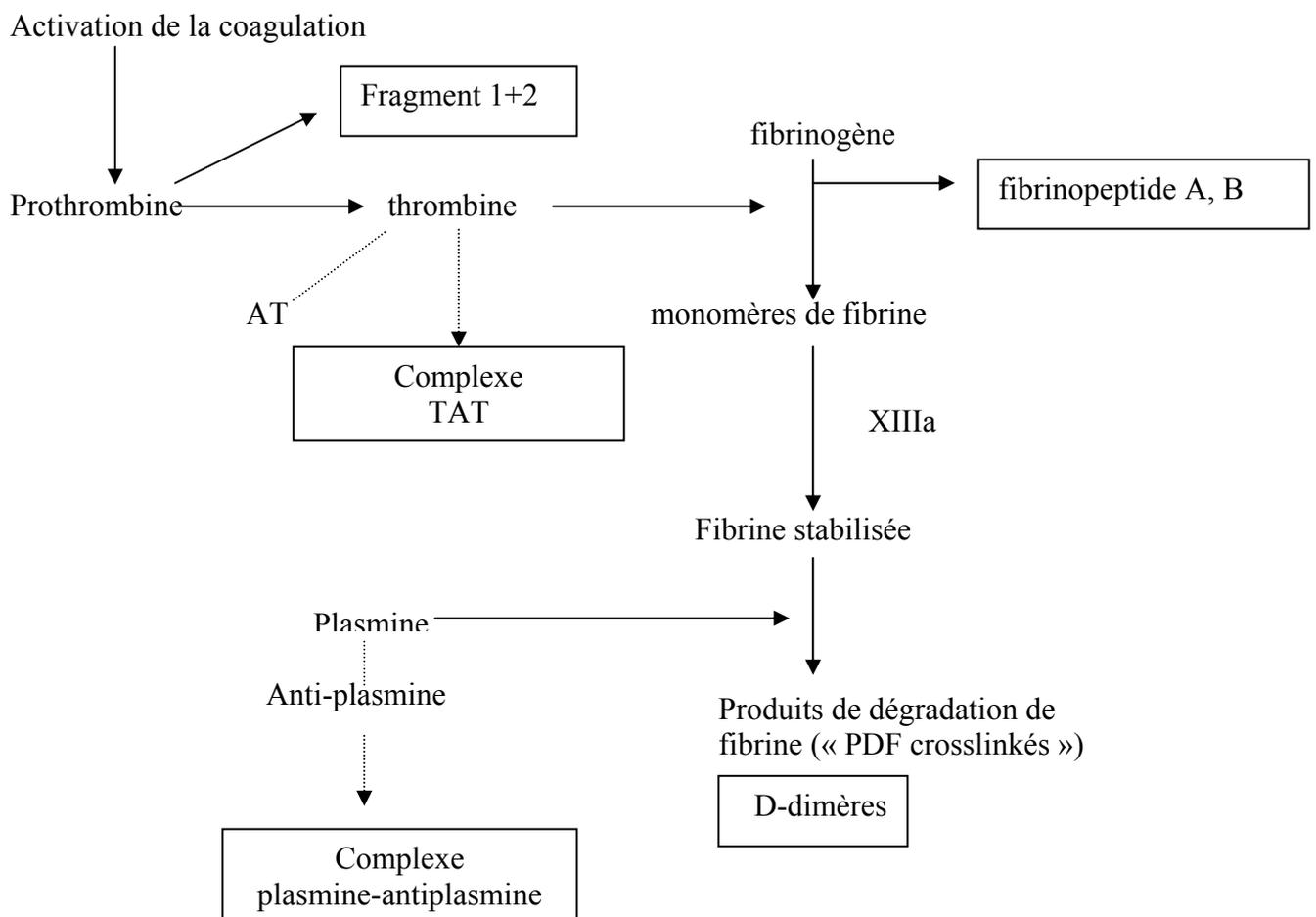


Figure n°8 : Place des marqueurs biologiques dans le diagnostic de thrombose [42] : (Les marqueurs qui peuvent être utilisés sont encadrés.)

MARQUEURS D'ACTIVATION DE LA COAGULATION [43]:

Métabolites formés lors de l'activation

Fragments 1+2 de la prothrombine :

La transformation de la prothrombine en thrombine libère les Fragments 1+2 qui peuvent être dosés par la méthode ELISA. Leur demi-vie est d'environ 90 minutes. Ils reflètent l'action du FXa sur la prothrombine. La standardisation des tests reste imparfaite.

Fibrinopeptide A :

La protéolyse du fibrinogène par la thrombine libère deux petits peptides : les fibrinopeptides A et B. Le dosage du fibrinopeptide A (FPA) est possible par méthode compétitive ELISA, mais il est très délicat. De plus, le FPA n'est pas spécifique de l'action de la thrombine, puisque la plasmine peut aussi libérer du FPA à partir du fibrinogène. La demi-vie plasmatique est de 3 à 5 minutes.

Complexes enzyme-inhibiteur

Complexes thrombine-antithrombine :

Ce composé peut être facilement dosé par méthode ELISA. Sa demi-vie est brève, environ 15 minutes. Il ne reflète que la quantité de thrombine générée et non adsorbée sur le caillot ou les monomères de fibrine.

MARQUEURS D'ACTIVATION DE LA FIBRINOLYSE :

Complexes plasmine-antiplasmine (PAP) :

La plasmine générée est très rapidement neutralisée par l' α 2-antiplasmine. Une élévation des taux plasmatiques de complexes PAP, dosés par ELISA a été trouvée dans des circonstances où la génération de fibrine est augmentée.

Produits de dégradation de la fibrine:

La fibrine est dégradée par la plasmine en D-dimères. Le dosage de ce composé est simple et sa demi-vie est de 8 heures

Au cours de la dernière décennie, le dosage des D-dimères s'est imposé comme un auxiliaire diagnostique utile en présence d'une suspicion de maladie thrombo-embolique veineuse. Toutefois, les performances diagnostiques étaient fortement dépendantes du test utilisé, les tests au latex se révélant nettement moins sensibles que les tests ELISA (voir revue de la littérature plus loin).

IV. D DIMERES : PRINCIPAL MARQUEUR DE THROMBOSE

La présence de D-dimères témoigne de la formation d'un réseau fibrineux et également d'un processus de fibrinolyse.

IV.1. Principales méthodes de dosage.

IV.1.1. Sensibilité et spécificité du dosage :

Le dosage des D-dimères est réalisé, le plus souvent sur plasma, par des méthodes immunologiques, fondées sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux reconnaissant différents épitopes présents uniquement sur les dimères de fragments D. Ces néo-antigènes sont absents de la molécule de fibrinogène native, des produits de dégradation du fibrinogène ou des monomères solubles de fibrine [44].

Ils présentent donc une bonne spécificité analytique (pas de réaction croisée). Mais, les D-dimères n'étant que le résultat d'une activation de la coagulation, leur taux plasmatique n'est pas associé à une bonne spécificité diagnostique.

En effet, des taux élevés de D-dimères peuvent être retrouvés dans de nombreuses situations cliniques au cours desquelles une activation de la fibrinolyse succède à une activation de la coagulation (*Tableau 2*).

Tableau n°2 : Principales situations physiopathologiques associées à une augmentation du taux plasmatique de D-dimères [45].

Physiologie	<ul style="list-style-type: none"> - Age (>70 ans) - Grossesse
Pathologie	<ul style="list-style-type: none"> - MTEV (thrombose veineuse profonde et embolie pulmonaire) - Thrombose artérielle, athérombose, infarctus du myocarde - Chirurgie et période post-opératoire - Syndromes inflammatoires - Infections virales, bactériennes et parasitaires - Tumeurs solides, hémopathies malignes - Syndromes hémorragiques - Hémolyse - CIVD - Perfusion IV, cathéters centraux
Thérapeutiques	<ul style="list-style-type: none"> - Traitements thrombolytiques - Syndrome de lyse tumorale

IV.1.2. Standardisation :

L'un des principaux problèmes rencontrés dans le dosage des D-dimères est l'impossibilité de standardiser les différents systèmes de mesure. Cela peut aisément se comprendre si l'on considère, d'une part la grande hétérogénéité des mélanges de produits de dégradation possibles dans un échantillon et, d'autre part, les différences de réactivité des anticorps vis-à-vis de chacun de ces produits [46]. Le meilleur anticorps est celui qui reconnaît spécifiquement un déterminant antigénique du D-dimère présent uniquement sur le D-dimère. Il n'en est pas ainsi et les variations des résultats obtenus par les laboratoires sont en partie dues aux réactions croisées de leurs anticorps avec des antigènes présents ailleurs, notamment sur d'autres produits de dégradation de la fibrine.

IV.1.3. Les techniques :

Jusqu'à il y a peu de temps, deux types de méthodes de dosage des D-dimères étaient disponibles : les méthodes latex et les méthodes ELISA.

Les méthodes latex étaient rapides mais avaient une sensibilité et une valeur prédictive négative (VPN) insuffisante (85%) pour le diagnostic d'exclusion thromboembolique. Les méthodes ELISA se distinguaient par une meilleure sensibilité (voisine de 100%) et une VPN satisfaisante pour leur utilisation en clinique mais ces techniques étaient longues et mal adaptées à l'urgence.

Depuis ces dernières années, de nouveaux tests rapides de détection des D-dimères sont apparus sur le marché. Il s'agit de tests unitaires ELISA ou apparentés adaptés à l'urgence (Nycocard® Merck, Vidas D-dimères® Biomérieux) ou de tests turbidimétriques (Turbiquant D-dimère® Dade Behring, STA Liatest D-Di® Stago). Il existe aussi des techniques d'hémagglutination [47].

IV.1.3.1. ELISA :

-classique :

Ces techniques sont basées sur la méthode immunoenzymatique de type sandwich en deux étapes. Un support plastique recouvert d'anticorps monoclonaux anti-D-dimères fixe l'antigène correspondant. Dans un deuxième temps, la molécule de D-dimère est révélée à l'aide d'un immunoconjugué lié à un enzyme qui en présence du substrat correspondant, entraîne une réaction colorée. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de D-dimères de l'échantillon analysé. La concentration est déterminée par référence à une droite d'étalonnage réalisée pour chaque série.

Les ELISA, même si elles constituent toujours les techniques de référence, présentent peu d'intérêt en routine, compte tenu de leurs contraintes de réalisation technique (temps de réalisation, non adaptée au dosage unitaire...)

On peut citer Asserachrom® D-Di de Diagnostica Stago, Fibrinostika® FbDP de Organon Teknika, Dimertest Gold® de AGEN Biomédical, Enzygnost® D-Dimer micro® de Dade-Behring et TinitElize D-Dimer® de Biopool.

-technique apparentée = ELFA : VIDAS[®] BioMérieux

Cette technique dérivée de l'ELISA est apparue en 1996 [48]. Le principe de dosage associe une technique immunoenzymatique de type sandwich à une détection en fluorescence. Il s'agit d'un test unitaire, quantitatif et automatisé qui a été l'une des premières technologies à permettre le dosage des D-dimères dans un délai raisonnable. En effet, ce test commercialisé sous le nom de VIDAS[®] D-DIMER BioMérieux permet d'obtenir un résultat dans un délai de 35 min.

La première étape de dépôt de plasma est faite manuellement (200 µl de plasma dans une cupule), le reste de la technique est automatisée. Celle-ci repose sur une succession de cycles d'aspiration/refoulement du milieu réactionnel grâce à un cône à usage unique qui sert à la fois de phase solide (anticorps anti-D-dimères P10B5E12C9) et de système de pipetage. La première aspiration permet de transférer l'échantillon dans un puit contenant l'anticorps anti-D-dimères (P2C5A10) marqué par une enzyme (phosphatase alcaline). La liaison entre les anticorps fixés sur le cône et les complexes D-dimères/conjugués résulte de la succession d'aspirations/refoulements. Après une étape de saturation suivie de lavages, l'enzyme du conjugué hydrolyse le substrat (4-méthyl-ombelliferyl-phosphate) et libère un produit fluorescent.

La détection de la fluorescence émise se fait à 450 nm. Le taux de D-dimères est interprété en fonction d'une courbe de calibration mémorisée par l'appareil. La limite supérieure de détection de cet automate est de 1000 ng/ml ; il n'y a pas de dilution automatique possible.

En pratique, le seuil de D-dimères utilisé pour le diagnostic d'exclusion de l'embolie pulmonaire est de 500 ng/ml ; il a été validé par plusieurs études clinico-biologiques.

Il est à noter que le VIDAS[®] D-DIMER New (BioMérieux) récemment commercialisé permet une lecture jusqu'à 10 000 ng/ml. Au delà de cette valeur, les échantillons doivent être dilués. Le seuil de détection reste inchangé.

IV.1.3.2. Méthodes d'agglutination avec des particules de latex :

-macro-agglutination : technique semi-quantitative

C'est une agglutination de particules de latex. On peut citer DDitest[®].

Les particules de latex sont sensibilisées par des anticorps monoclonaux de souris anti-D-dimères humains. C'est une méthode rapide, semi-quantitative (± 1 dilution). Le seuil de détection est de 500 ng/ml. Il existe des interférences avec le facteur rhumatoïde. Cette méthode n'est pas assez sensible pour être utilisée seule dans le diagnostic d'exclusion des TVP/EP.

-techniques immuno-turbidimétriques :

Ce sont des techniques récemment commercialisées qui sont fondées sur le principe de l'agglutination de microbilles de latex recouvertes par un anticorps monoclonal. La plupart de ces tests sont automatisables sur les principaux appareils d'hémostase (ceux du même industriel). Leurs principaux intérêts résident dans leur rapidité d'exécution (quelques minutes), dans leur automatisation sur le même analyseur que les bilans standards d'hémostase et dans leur coût plus faible que l'ELISA. On peut citer STA-Liatest[®] D-Di de Diagnostica Stago mais aussi MDA[®] D-Dimer de Organon Teknika, Auto Dimertest[®] de AGEN Biomédical et Tinaquant D-Dimer[®] de Roche Diagnostics.

IV.1.3.3. Hémagglutination :

C'est une méthode de dosage réalisable sur sang total qui fait appel à une technique d'agglutination des hématies autologues. On peut citer SimpliRed[®] de AGEN Biomédical. La mise en évidence des D-dimères est réalisée par un réactif (conjugué) couplé à deux anticorps : le premier se fixant sur les hématies (sans entraîner d'agglutination), le second spécifique des D-dimères. En cas de taux élevé de D-dimères dans le sang, le complexe D-Dimère-conjugué formé se fixera sur les hématies par le premier anticorps, entraînant ainsi leur agglutination macroscopique. Le résultat de ce test, facilement réalisable, peut-être obtenu en 2 minutes.

IV.1.3.4. Test d'immuno-filtration rapide :

Schématiquement, le plasma ou le sang total à tester est déposé sur une membrane filtrante en présence d'une solution contenant un anticorps monoclonal anti-D-dimères couplé à des particules d'or. Après migration chromatographique sur cette membrane, le complexe est révélé par « capture » grâce à un second anticorps immobilisé. Ces tests donnent un résultat en 5 à 10 minutes, mais ne sont que semi-quantitatifs (résultats inférieurs ou supérieurs à une valeur seuil fixée par le fabricant). Leur lecture, dépendante de l'observateur, est parfois subjective [49, 50].

On peut citer par exemple le NycoCard[®] (Nycomed Pharma) ou le SimplifyTM D-Dimer[®] (AGEN Biomedical).

Techniques	Test	Fabriquant
ELISA classique (microplaque)	Asserachrom [®] D-Di Fibrinostika [®] FbDP Dimertest [®] Gold Enzygnost [®] D-dimer micro TinitElize [®] D-Dimer	DIAGNOSTICA STAGO ORGANON TEKNIKA AGEN BIOMEDICAL DADE-BEHRING BIOPOOL
ELFA	VIDAS [®] D-Dimer	BIOMERIEUX
Agglutination particules de latex sur carte	D-Di test [®] Dimertest [®]	DIAGNOSTICA STAGO INSTRUMENTATION LABORATORY
Immuno-turbidimétrie	STA-Liatest [®] D-Di MDA [®] D-dimères Auto Dimertest [®] Tinaquant [®] D-Dimer	DIAGNOSTICA STAGO ORGANON TEKNIKA AGEN BIOMEDICAL ROCHE DIAGNOSTICS
Hémagglutination	SimpliRed [®]	AGEN BIOMEDICAL
Immunofiltration sur carte	NycoCard [®] SimplifyTM [®] D-Dimer	MERCK AGEN BIOMEDICAL

Tableau n° 3: Réactifs disponibles sur le marché pour le dosage des D-dimères

IV.2. Revue des études clinico-biologiques.

Les études publiées sur la prise en charge multidisciplinaire de la maladie veineuse thromboembolique soulèvent plusieurs points quant au dosage des D-dimères dans le diagnostic d'exclusion. Il est nécessaire que les tests soient rapides, possèdent une valeur prédictive négative proche de 100% et surtout une bonne sensibilité en particulier au niveau de la valeur seuil, afin de trouver leur place dans les approches globales.

Compte tenu des contraintes de la technique de référence, elle n'est pas utilisable en pratique courante pour le diagnostic d'exclusion de la MTEV.

La technique ELFA sous le nom de VIDAS D-Dimer[®] a fait l'objet de nombreuses études clinico-biologiques ayant permis de valider la valeur seuil de 0,5 µg/ml.

Dans une recherche d'optimisation et de minimisation des délais, d'autres techniques semblent intéressantes à évaluer en particulier celles adaptables sur les automates de coagulation.

Comme nous l'avons déjà évoqué, il existe de nombreux tests faisant appel à différentes méthodologies (particules de latex sensibilisées, immunofiltration, agglutination d'hématies autologues...). L'évaluation de ces différentes techniques passe par des études clinico-biologiques ce qui a fait l'objet de nombreuses publications récentes. Néanmoins, à l'exception du Liatest[®] à l'origine de plusieurs travaux [51-54], le manque d'études cliniques prospectives regroupant de grandes cohortes de patients pourrait encore freiner l'éventuelle utilisation de ces nouveaux tests dans le diagnostic d'exclusion de la MTEV.

Le **Tableau 4** résume les différents travaux publiés.

Tableau n°4 : Etudes clinico-biologique évaluant la sensibilité et la spécificité des méthodes de dosage des D-dimères.

auteur année	méthodes	patients (n)	DVT ou EP %	sensibilité	spécificité	VPP	VPN	imagerie
ELISA								
Bounameaux 1988 [55]	Asserachrom®	46	22% (EP)	100%	81%	59%	100%	OUI
Quinn 1999 [56]	Asserachrom®	103	34%(EP)	100%	13%	37%	100%	OUI
Schutgens 2003 [57]	Asserachrom®	537	42% (DVT)	97%	33%	NS	94%	NS
Gosselin 2003 [58]	Asserachrom®	151	23,2%(DVT)	88,6%	40,7%	NS	92,2%	OUI
de Moerloose 1996 [48]	VIDAS®	195	NS	100%	37,60%	33,10%	100%	NS
D'Angelo 1996 [59]	VIDAS®	103	21% (DVT)	96%	75%	51%	98%	OUI
Houbouyan-Reveillard 2000 [52]	VIDAS®	123	41% (DVT/PE)	96,1%	38,9%	52.7%	93,3%	OUI
Larsen 2002 [60]	VIDAS New®	113	43% (DVT)	90%	42%	NS	85%	OUI
Schutgens 2003 [57]	VIDAS New®	537	42% (DVT)	100%	8%	NS	96%	NS
Agglutination latex sur lame								
Boneu 1991 [61]	Dimertest®	116	29% (DVT)	76%	58%	43%	86%	NS
Siragusa 2001 [62]	Dimertest®	116	NS (DVT)	77%	81%	65%	89%	NS
Van Beek 1993 [63]	Dimertest®	129	43% (EP)	96%	22%	48%	89%	NS

Immunoturbidimétrie								
Villa 2000 [64]	IL test D dimer [®]	86	72% (DVT)	98,30%	NS	NS	88,90%	OUI
Houbouyan-Reveillard 2000 [52]	MDA [®] D-dimer	123	41% (DVT/PE)	98%	41.7%	54.3%	96,8%	OUI
Larsen 2002 [60]	auto-Dimer [®]	113	43% (DVT)	88%	44%	NS	83%	OUI
Gosselin 2000 [58]	Miniquant [®]	255	DVT PE	95% 100%	21% 26%	NS NS	94% 100%	OUI
Schutgens 2003 [57]	Miniquant [®]	537	42% (DVT)	99%	52%	NS	94%	NS
Meyer 1998 [65]	Liatest [®]	142	40% (PE)	93%	44%	NS	NS	OUI
Oger 1998 [53]	Liatest [®]	386	37,8% (PE)	100%	NS	NS	100%	NS
Houbouyan-Reveillard 2000 [52]	Liatest [®]	123	41% (DVT/PE)	96,1%	38,9%	52.7%	93,3%	OUI
Reber 1998 [54]	Liatest [®]	501	30% (PE)	99%	44%	NS	99,4%	OUI
Schutgens 2003 [57]	Liatest [®]	537	42% (DVT)	98%	32%	NS	95%	NS
Immunofiltration								
Dale 1994 [49]	NycoCard D- dimer [®]	92	43%	100%	42%	57%	100%	OUI
Hein-Rasmussen 2000 [50]	NycoCard D- dimer [®]	92	NS (DVT)	50%	58%	55%	54%	OUI
Larsen 2002 [60]	NycoCard D- dimer [®]	113	43% (DVT)	63%	67%	NS	71%	OUI

La principale limitation de la mesure plasmatique des D-dimères dans l'approche diagnostique d'une thrombose est l'utilisation de la technique ELISA qui n'est pas adaptée à l'urgence. Elle reste cependant la technique de référence. Elle a une bonne sensibilité et une bonne VPN (de 88,6% à 100%; de 92,2% à 100%). Pour palier à cet inconvénient, plusieurs auteurs ont utilisé les tests d'agglutination au latex. Mais la sensibilité et la VPN sont mauvaises ce qui rend cette technique insuffisante pour exclure seule une thrombose (de 76% à 96%; de 86% à 89%).

D'autres tests ont été mis au point afin d'obtenir une méthode rapide adaptée à l'urgence, automatisée donc observateur-indépendante.

La méthode par ELFA (VIDAS) est dérivée de l'ELISA : elle est plus rapide (35 min) et on obtient les mêmes sensibilité et VPN (respectivement de 90% à 100% ; de 85% à 100%)

La méthode par immunoturbidimétrie est encore plus rapide (de l'ordre de quelques minutes) et a une bonne sensibilité (de 88% à 100%) et une bonne VPN (de 88,9% à 100%). Elle a l'avantage de passer sur le même appareil que le reste du bilan d'hémostase.

La technique par immunofiltration est seulement semi-quantitative. On rend un résultat supérieur ou inférieur au seuil de détection. Elle est rapide (quelque minutes) mais sa sensibilité (de 63% à 100%) et sa VPN (de 54% à 100%) n'atteignent pas les valeurs de la méthode de référence.

En conclusion, la méthode par immunoturbidimétrie semble la plus proche de la référence et la plus adaptée à l'urgence. Cependant, les études sur les nouvelles techniques de dosage des D-dimères sont encore limitées et sont constituées le plus souvent de faible cohorte ce qui est peu représentatif.

**OBJECTIFS DU
TRAVAIL
et
MATERIELS ET
METHODES**

I. OBJECTIFS

I.1. Objectif principal:

Les administrations de L-ASNase entraînent une déplétion rapide d'asparagine menant à une diminution de synthèse protéique au niveau du foie. Les valeurs de fibrinogène, plasminogène, antithrombine et protéine C sont ainsi diminuées. La L-ASNase induit aussi des lésions de l'endothélium conduisant à l'activation de la coagulation. Il s'ensuit chez ces enfants un état d'hypercoagulabilité pouvant conduire avec d'autres facteurs à la thrombose.

Chez ces patients à risque thromboembolique élevé, il n'existe à l'heure actuelle aucun marqueur biologique capable de prédire le risque de survenue thrombotique.

D'autre part, il est maintenant établi que le dosage des D-dimères est un excellent marqueur d'exclusion de la maladie thromboembolique. Bien que ce test ait une spécificité médiocre, il semble concevable qu'un suivi du taux de D-dimères permette le dépistage d'un état préthrombotique.

L'objectif de ce travail est d'étudier, dans le cadre du protocole FRALLE 2000, les D-dimères au cours des injections de L-ASNase. Nous comparerons les taux obtenus à la survenue de manifestations thromboemboliques pour valider la valeur prédictive du taux de D-dimères.

I.2. Objectif secondaire :

Sur chaque prélèvement, un dosage de D-dimères sera réalisé selon la technique de référence (Asserachrom[®]). Parallèlement, les mêmes prélèvements pourront être testés selon la méthode Liatest[®] afin de valider cette technique dans le contexte évoqué.

II. MATERIELS

II.1. Population de l'étude.

RECRUTEMENT :

Ce travail sur les D-dimères est réalisé en parallèle d'une étude descriptive sur le monitoring de la L-asparaginase chez les enfants atteints de LAL *de novo* traité par le protocole Fralle 2000. La durée d'inclusion est de 18 mois pendant lesquels 30 enfants devraient être inclus.

Dans cette étude, le recrutement des enfants s'effectue à partir des centres hospitaliers de La Roche-sur-Yon, St Nazaire et Nantes dans le cadre de la Fédération Interhospitalière d'Oncologie Pédiatrique des Pays de la Loire coordonnée par le Dr Méchinaud.

Critères d'inclusion :

Les enfants atteints de LAL *de novo* traités selon le protocole Fralle 2000.

Critères d'exclusion :

- LA de Burkitt
- suivi non assuré
- ceux dont les parents ne signent pas le formulaire de consentement éclairé.

DESCRIPTION DE LA POPULATION :

A ce jour, 26 enfants ont été inclus. Cette population est composée de 9 filles et de 17 garçons. Ils sont âgés de **6,7 ans** en moyenne (minimum : 1 an ; maximum : 17 ans). Deux enfants sont sortis de l'étude après la phase d'induction car ils ont bénéficié d'une allogreffe. Cinq enfants n'ont pas encore commencé leur 1^{ère} phase d'intensification.

II.2. L'étude FRALLE 2000.

Le schéma général du protocole Fralle 2000 comporte 7 phases de traitement (préphase, induction, consolidation, intensification n°1, interphase, intensification n°2 et entretien).

Certains patients présentant de très hauts risques seront allogreffés après l'intensification n°1.

Les injections de L-ASNase se répartissent comme suit :

-9 administrations de J10 à J26 de la phase d'induction à 6000 UI/m² de L-ASNase (Kidrolase[®]) en IM.

-6 administrations de J3 à J15 de la phase d'intensification n°1 à 6000UI/m² de L-ASNase (Kidrolase[®]) en IM.

-4 administrations de J1 à J30 de la phase d'intensification n°2 à 20 000 UI/m² de L-ASNase (Kidrolase[®]) en IM.

La voie intra-musculaire est la voie d'administration recommandée dans le protocole. En cas de thrombopénie (< 50 000) , la L-ASNase sera administrée en IV lente pendant 15 min.

L'objectif de cette étude FRALLE 2000 est de déterminer le pourcentage de patients présentant une activité enzymatique de *E. coli* asparaginase altérée (< 100 UI/L) et un taux d'anticorps élevé pour détecter les enfants dits « répondeurs silencieux ». Elle a pour but aussi d'élaborer un modèle pharmacocinétique/pharmacodynamique de population construit à l'aide des paramètres pharmacocinétiques primaires de *E. coli* asparaginase préalablement déterminés, permettant de prévoir l'évolution de la déplétion en acides aminés en fonction des variations d'activité enzymatique observées et des taux d'anticorps.

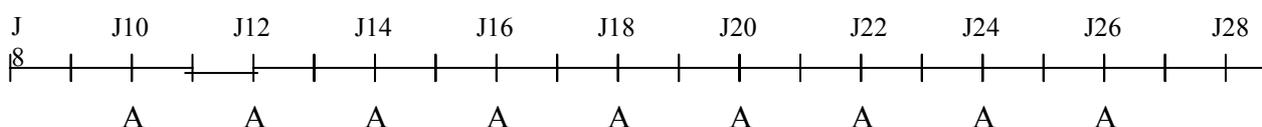
II.3. Constitution d'une échantillothèque.

II.3.1. Recueil des prélèvements :

Seules les phases d'induction et d'intensification n°1 sont suivies. Le prélèvement en vue du dosage des D-dimères est réalisé sur tube citraté (9 volumes de sang pour 1 volume de citrate trisodique 0,109 M) en même temps que le monitoring biologique dans le cadre du protocole Fralle 2000. Par conséquent, aucune prise de sang supplémentaire n'a été nécessaire. Exceptionnellement, en cas de suspicion de thrombose, des prélèvements supplémentaires sont réalisés au moment de l'événement.

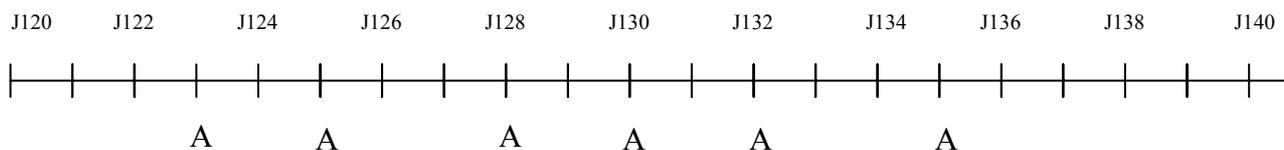
Préphase : de J1 à J7 (aucune administration de L-ASNase), correspond à un test de corticosensibilité.

Induction : de J8 à J29 => 9 administrations de L-ASNase tous les 2 jours.



Consolidation : de J42 à J119 (aucune administration de L-ASNase)

Intensification n°1 : de J120 à J141 => 6 administrations de L-ASNase.



A : injection de L-ASNase

On a reçu les prélèvements destinés aux dosages des D-dimères à peu près au moment des injections de L-ASNase.

Au total, on a recueilli en moyenne **7,15 prélèvements** (de 4 à 12) par enfant pendant l'induction et **3,1 prélèvements** (de 1 à 4) pendant l'intensification par enfant.

II.3.2. Prétraitement des échantillons :

Les tubes sont double-centrifugés 15 min à 35000 tours. Le plasma est ensuite aliquoté et congelé à -20°C .

II.4. Bilans biologiques.

Les numérations et formules sanguines ainsi que les bilans d'hémostase ont été recueillis pour chaque enfant au cours des deux phases.

Les taux de L-ASNase (48h après l'injection précédente) ont également été recueillis auprès du laboratoire de Biochimie du CHU de Nantes.

III. METHODES

Les échantillons sont traités en série. Pour réaliser ces dosages, ils sont décongelés au bain-marie à 37°C pendant 10 min puis après homogénéisation, sont laissés au moins 15 minutes à température ambiante avant leur utilisation.

Les deux méthodes sont réalisées le même jour. La méthode automatisée est réalisée en première. En effet, cette méthode effectue des dilutions automatiques, ce qui permet d'évaluer à peu près la dilution à faire pour réaliser la méthode ELISA.

III.1. Dosage des D-dimères .

III.1.1. Méthode immunoturbidimétrique : Liatest[®] :

Cette technique utilise des microparticules de latex sensibilisées par deux anticorps monoclonaux anti-D-dimères. Elle possède contrairement aux tests au latex semi-quantitatifs, une meilleure sensibilité et la possibilité d'être automatisée sur de nombreux appareils d'hémostase de routine. C'est le cas pour le Liatest[®] qui a été choisi pour notre étude.

Il s'agit d'un test fondé sur la mesure de l'augmentation de la turbidité d'une suspension de microparticules de latex. Sur celles-ci (diamètre 0,1 µm), deux anticorps monoclonaux anti-D-dimères (8D2 et 2-1-16) sont fixés par liaisons covalentes. La mesure est réalisée à une longueur d'onde de 540 nm, sur un mode cinétique de 140 secondes. En l'absence d'antigène le milieu est presque transparent. Les microsphères étant de diamètre inférieur à la longueur d'onde, la lumière n'est absorbée que très faiblement. En revanche, lorsque la réaction antigène-anticorps se produit, les particules s'agglutinent formant un réseau qui augmente la turbidité du milieu (*Figure n°9*).

L'augmentation de l'absorption du milieu est fonction du taux de D-dimères présents dans le plasma testé.

La technique Liatest[®] est utilisée sur un automate de coagulation de routine le STA-R[®] (Diagnostica Stago).

Les réactifs sont précalibrés ; cette précalibration est identique pour tous les réactifs d'un même lot. Les coordonnées de la courbe d'étalonnage sont intégrées dans l'automate. La calibration sera validée après le dosage des D-dimères de deux contrôles; l'un normal (Liatest[®] Control N), l'autre anormal (Liatest[®] Control P).

Le seuil de détection communiqué par le fabricant pour cette technique est **0,22 µg/ml** et la dilution automatique de l'automate au 1/5 permet d'obtenir des résultats jusqu'à une limite de 20 µg/ml. Les plasmas lipémiques ainsi que la présence de facteur rhumatoïde sont évidemment des éléments susceptibles de fausser les dosages.

Le délai d'obtention du résultat est de l'ordre de **7 minutes**.

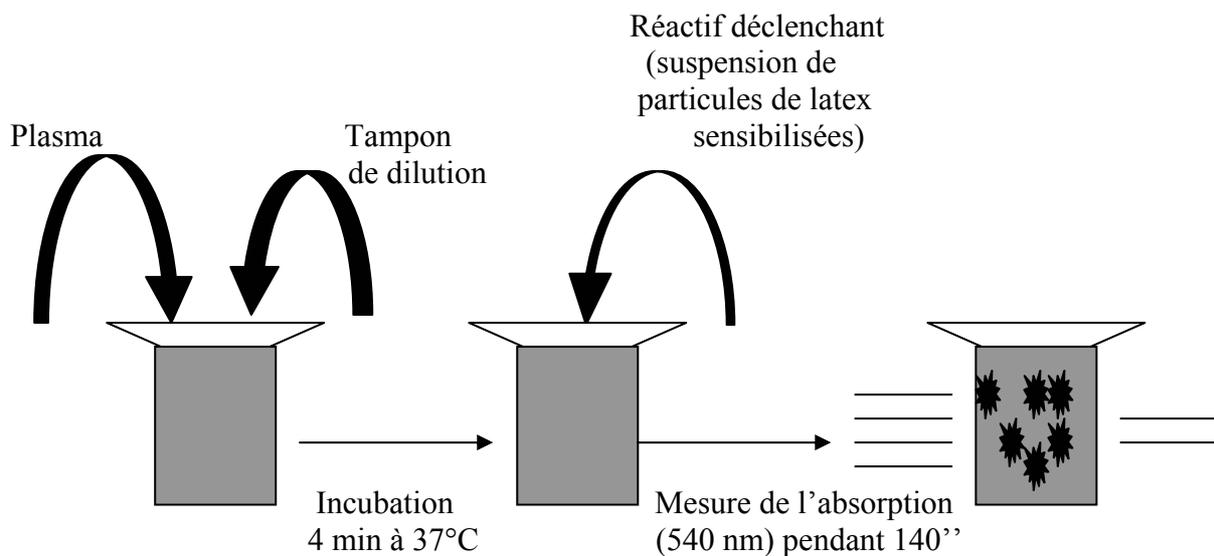


Figure n°9: Principe de la mesure des D-dimères par agglutination de particules de latex .

III.1.2. Méthode ELISA : Asserachrom[®] :

La technique de dosage des D-dimères en microplaques est apparue au milieu des années 80, et elle reste la technique de référence grâce à sa très bonne sensibilité. Le coffret utilisé pour les dosages de l'étude est un coffret Asserachrom[®] (Diagnostica Stago)

Cette technique immuno-enzymatique classique utilise, d'une part des fragments F(ab')₂ d'anticorps monoclonaux de souris anti-D-dimères humains fixés sur un support plastique et d'autre part des immunoglobulines de lapin anti-fragment D couplées à la peroxydase. Les D-dimères contenus dans le plasma sont retenus au niveau des fragments F(ab')₂ spécifiques puis après plusieurs lavages, l'immunoconjugué se fixe au niveau des déterminants antigéniques libres. Le substrat (ortho-phénylènediamine et peroxyde d'urée) clivé par la peroxydase produit une intense coloration. Après arrêt de la réaction par un acide fort (acide chlorhydrique), l'absorbance est mesurée à 492 nm (lecteur de plaque THERMOMAX)

Les concentrations en D-dimères des échantillons sont calculées à partir de la courbe d'étalonnage (mode non linéaire) effectuée de manière concomitante aux tests. Le seuil de détection du fabricant est de **5 ng/ml** et la limite supérieure de mesure dépend de la gamme d'étalonnage (dans nos essais 1000 ng/ml).

Pour nos dosages, tous les prélèvements (étalons, contrôles, patients) ont été testés en double, afin d'établir la moyenne comme résultat final. Le blanc est effectué à partir du réactif de dilution (fourni dans le coffret).

Le délai d'obtention de résultat est de l'ordre de **3 heures**.

III.2. Dosage de l'asparaginase.

La méthode de dosage la plus couramment utilisée est celle décrite par Werber et coll. [66]. Les unités de l'activité enzymatique de la L-ASNase sont définies comme les micromoles d'ammoniac libérées pendant une minute à 37°C. La mesure de l'activité enzymatique s'effectue par incubation du sérum dans un tampon contenant de la L-Asn, puis après arrêt de la réaction, par dosage de l'ammonium avec le réactif de Nessler. C'est une méthode lourde en pratique quotidienne. Le laboratoire de Biochimie du CHU de Nantes a développé une méthode automatisée sur Hitashi 917 de dosage de l'activité enzymatique de la L-ASNase. Il s'agit d'une méthode similaire à la réaction de Nessler de dosage du taux d'ammoniac plasmatique par colorimétrie, mais cette technique est plus rapide et plus précise.

III.3. Analyse des résultats.

Les résultats ont été analysés à l'aide des logiciels Excel et Statview pour les calculs de moyennes, d'écart types, de corrélations et de comparaisons (Student, Spearman et Mann Whitney).

La spécificité, la sensibilité, la valeur prédictive positive et la valeur prédictive négative ont été calculés pour évaluer chaque technique :

Sensibilité

C'est la proportion de tests positifs chez les malades.

$$Se = VP/(VP+FN)$$

Spécificité

C'est la proportion de tests négatifs chez les non-malades.

$$Sp = VN/(FP+VN)$$

Valeur prédictive positive

Probabilité que le sujet soit malade si le test est positif.

$$VPP = VP/(VP+FP)$$

Valeur prédictive négative

Probabilité que le sujet ne soit pas malade si le test est négatif.

$$VPN = VN/(VN+FN)$$

VP = vrai positif

FP = faux positif

VN = vrai négatif

FN = faux négatif

VPP = valeur prédictive positive

VPN = valeur prédictive négative

RESULTATS

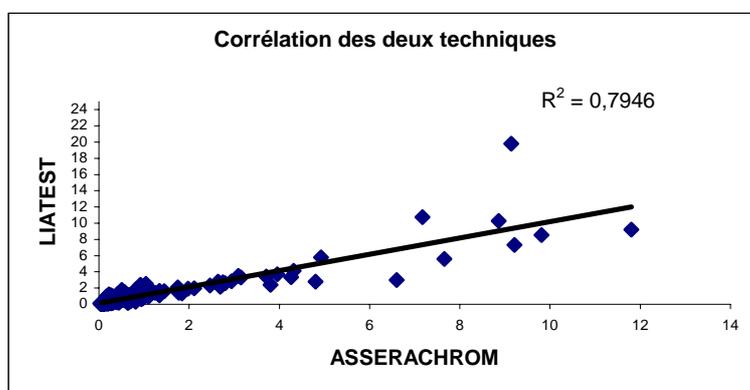
I. COMPARAISON DES DEUX TECHNIQUES UTILISEES : Asserachrom[®] et Liatest[®]

I.1. Corrélations.

Sur les 247 prélèvements, **245** ont été traités selon les deux techniques : la méthode ELISA Asserachrom[®] et la méthode immunoturbidimétrique Liatest[®]. En effet, pour deux échantillons, la quantité de plasma était insuffisante pour pratiquer les deux dosages.

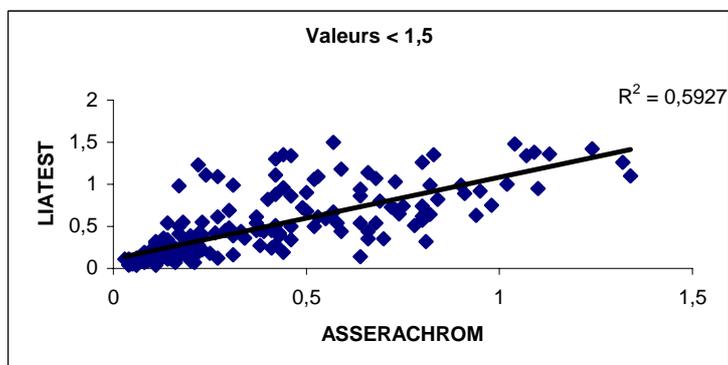
Une corrélation entre les deux méthodes a pu être établie (**Figure 10**). Celle-ci est satisfaisante ($r^2= 0,795$; $p < 0,001$) sur des valeurs s'étalant de 0 à 12 $\mu\text{g/ml}$.

Figure n°10: Corrélation des techniques Asserachrom[®] et Liatest[®] :



Malgré une dispersion plus importante des résultats, la corrélation reste bonne ($r^2=0,5995$; $p < 0,0001$) lorsqu'on se base sur des valeurs inférieures à 1,5 $\mu\text{g/ml}$ ($n=203$) (**Figure 11**).

Figure n°11 : Corrélation des 2 techniques pour des valeurs inférieures à 1,5 $\mu\text{g/l}$:



La technique Liatest[®] est donc bien corrélée à la méthode de référence.

I.2. Comparaison des résultats.

Si on prend la totalité des valeurs de D-dimères (n=245), il existe une différence significative entre les deux techniques (t-Student $p = 0,034$). La moyenne des dosages en Liatest[®] est de 1,009 $\mu\text{g/ml}$ pour 0,891 $\mu\text{g/ml}$ en Asserachrom[®].

Si on ne prend que les valeurs inférieures à 1,5 $\mu\text{g/ml}$ (n = 203), la différence entre les deux valeurs s'accroît : les résultats sont significativement plus élevés quand la technique Liatest[®] est utilisée (t-student $p < 0,00001$) (*Tableau 5*)

Tableau n°5: Comparaison des deux techniques.

N= 245	ASSERACHROM [®]	LIATEST [®]
Moyenne ($\mu\text{g/ml}$)	0,891	1,009
Ecart-type	1,714	1,937
Minimum-Maximum	0,030 – 11,800	0,040- 19,800

N =203	ASSERACHROM [®]	LIATEST [®]
Moyenne ($\mu\text{g/ml}$)	0,341	0,438
Ecart-type	0,304	0,378
Minimum-Maximum	0,030 – 1,340	0,040 – 1,480

II. ETUDES DES PATIENTS

II.1. Résultats des dosages des D-dimères.

II.1.1. Description générale des résultats des dosages :

Lors de la phase d'induction, **26 enfants** ont été suivis avec des dosages de D-dimères. Lors de la phase d'intensification, nos résultats concernent seulement **19 enfants** puisque 2 sont sortis du protocole après la phase d'induction et 5 enfants n'avaient pas encore commencé leur phase d'intensification.

Figure n°12: Taux de D-dimères au cours de l'induction et de l'intensification en Asserachrom®.

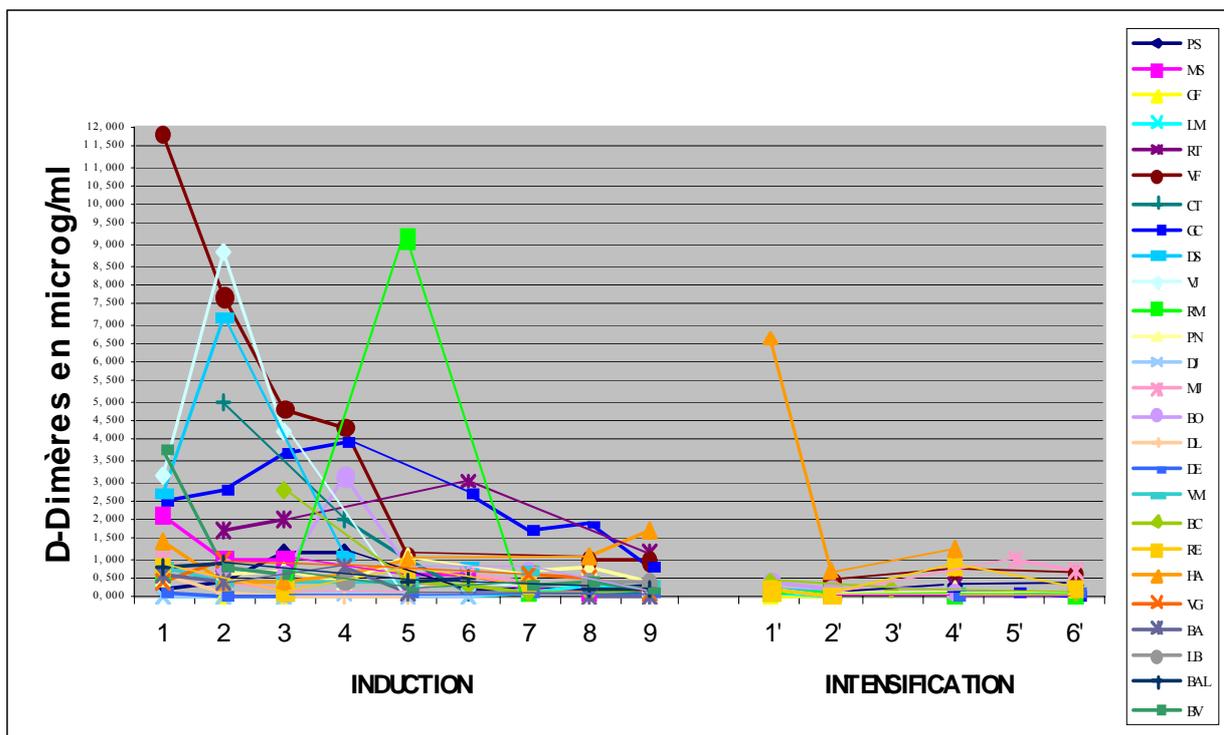
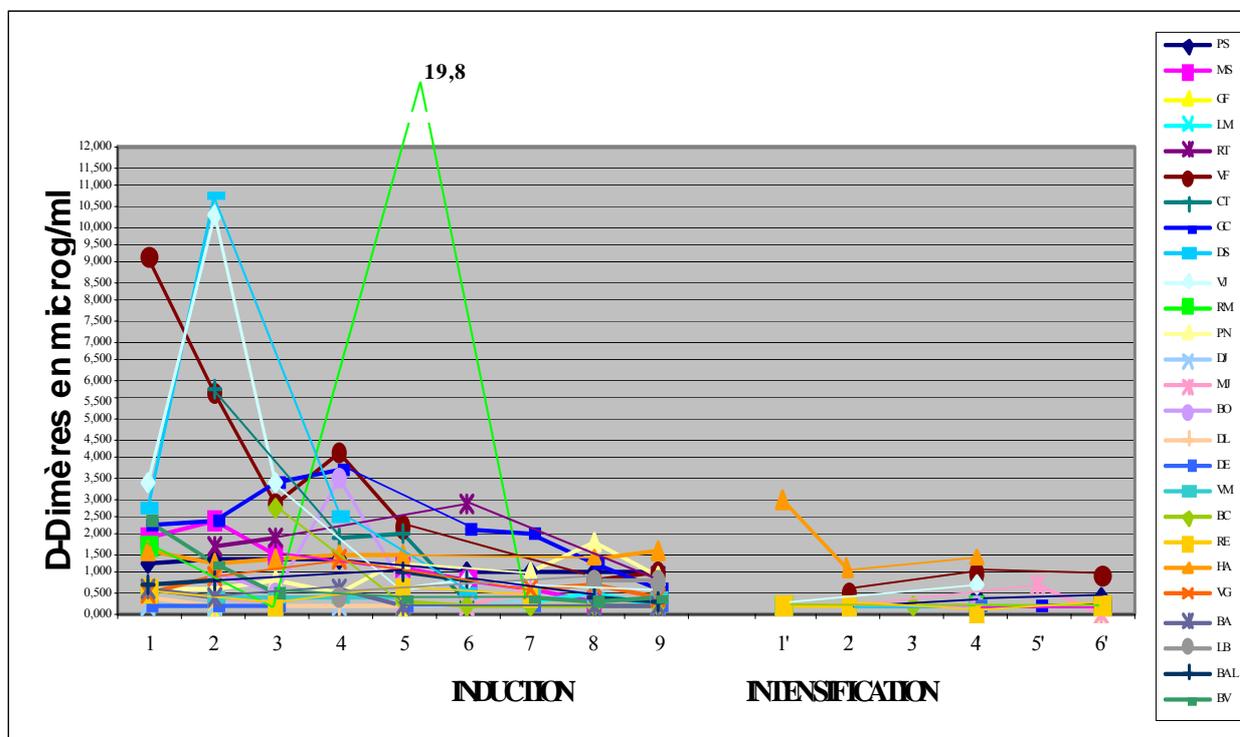


Figure n°13 : Taux de D-dimères au cours de l'induction et de l'intensification en Liatest®.



Nous avons gardé uniquement les résultats des dosages des D-dimères correspondant aux injections de L-ASNase (9 injections lors de la phase d'induction ; 6 injections lors de la phase d'intensification) afin que la construction des courbes d'évolution des D-dimères pour les deux méthodes soit simplifiée et plus claire (*Figures 12 et 13*).

Les taux de D-dimères diminuent au cours de l'induction. Ils sont très bas dans la plupart des cas pendant l'intensification.

II.1.2. Les événements thrombotiques :

Sur les 26 patients suivis depuis le début du protocole, deux enfants ont présenté des thromboses veineuses (une **phlébite** et une **EP**) et un enfant a présenté une thrombose artérielle (**AVC**).

Au cours de ce travail, le taux de survenue de thromboses est donc de **11,5%** et de **7,7%** pour les thromboses veineuses uniquement.

- **Thromboses veineuses :**

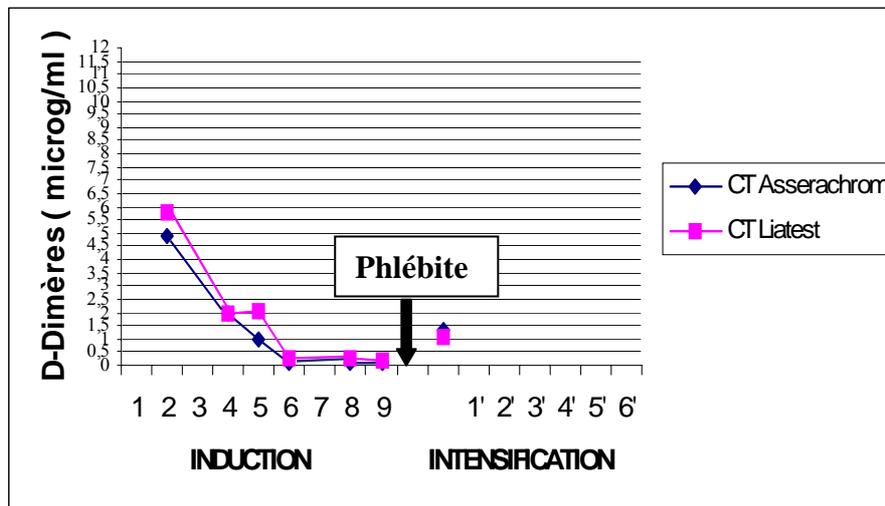
➤ L'enfant CT présente une phlébite à la fin de l'induction (Figure 14).

Au début de l'induction, les D-dimères sont élevés jusqu'à la 4^{ème} (en Asserachrom[®]) et 5^{ème} injection (en Liatest[®]). A l'injection suivante, les taux de D-dimères sont bas jusqu'à la fin de la phase d'induction.

Sept jours après la 9^{ème} injection de L-ASNase de la phase d'induction, il présente une douleur au mollet et l'écho doppler objective une thrombose veineuse de la veine fémorale superficielle : il est mis sous anticoagulant.

Six jours après l'évènement thrombotique, il présente un taux de D-dimères à **1,34 µg/ml** en Asserachrom[®] et **1,1 µg/ml** en Liatest[®]. Mais, ces D-dimères sont difficilement interprétables. En effet, depuis 3 jours il est fébrile : ce taux élevé est-il dû à la fièvre ou à la séquelle de la thrombose ?

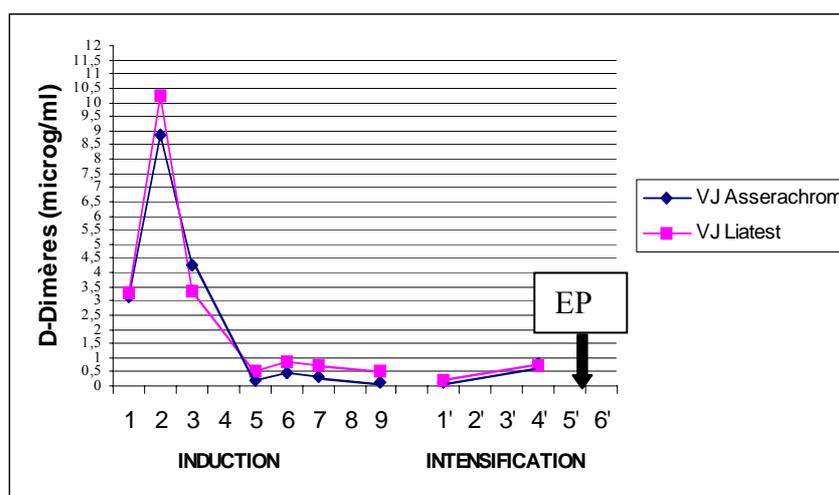
Figure n°14: Evolution des D-dimères au cours des deux phases chez CT.



➤ L'enfant VJ présente une embolie pulmonaire au cours de l'intensification (Figure15).

Au début de la phase d'induction, les taux de D-dimères par les deux méthodes sont élevés. A la phase d'intensification, le taux de D-dimères à la 1^{ère} injection de L-ASNase est très bas. Puis, à la 4^{ème} injection, le taux s'élève (**0,8 µg/ml** en Asserachrom[®] et **0,74 µg/ml** en Liatest[®]). A cette période, il est apyrétique. Quatre jours après, il est hospitalisé pour dyspnée. La scintigraphie pulmonaire montre une image pouvant évoquer une embolie pulmonaire. Il est mis sous anticoagulant. Trois jours après la mise sous anticoagulant, le taux de D-dimères diminue (0,11 µg/ml en Asserachrom[®] et 0,16 µg/ml en Liatest[®]: valeurs non figurées ici)

Figure n°15: Evolution des D-dimères par les deux techniques au cours des deux phases chez VJ.



- **Thrombose artérielle :**

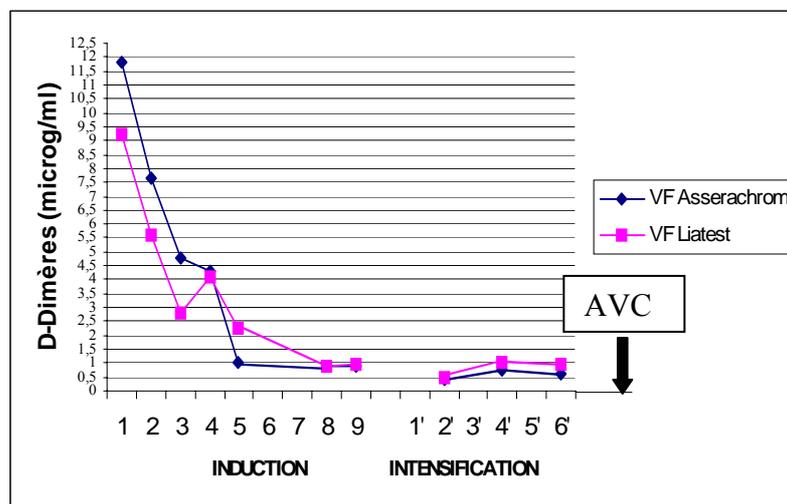
L'enfant VF a fait un accident vasculaire cérébral (AVC) après la phase d'intensification (**Figure 16**). La phase d'induction est très bien tolérée et VF reste apyrétique. On ne note pas d'effet secondaire majeur. La phase d'intensification est, elle aussi, bien tolérée et elle se déroule sans complication.

Les taux de D-dimères sont très élevés pendant la phase d'induction. Pendant la phase d'intensification, alors que la plupart des enfants ont des taux de D-dimères très bas, VF présente des taux assez élevés ($>0,5 \mu\text{g/ml}$).

24 jours après la 6^{ème} injection de L-ASNase de la phase d'intensification, il est hospitalisé pour déficit moteur de l'hémicorps droit d'apparition brutale.

L'IRM montre des images correspondant à un **AVC ischémique**. Il n'y a pas d'image de thrombophlébite cérébrale.

Figure n°16: Evolution des D-dimères au cours des deux phases chez VF.



II.1.3. Evaluation d'un seuil pour les D-dimères :

Seulement 5/26 (19%) enfants ont des valeurs inférieures à 0,5 µg/mL avec la technique Liatest® et 4 /26 (15%) avec la technique Asserachrom® pendant toute la durée de leur traitement.

Devant l'allure de ces courbes (*Figure 12 et 13*), il semble intéressant d'évaluer un seuil normal de D-dimères dans ce contexte clinique précis de LAL traitée par L-ASNase.

En effet, il existe en phase d'induction un syndrome inflammatoire et un syndrome de lyse tumorale souvent accompagné d'un tableau infectieux. La valeur seuil 0,5 µg/ml valable pour l'exclusion de la thrombose chez les sujets sains ne peut pas être utilisée. Nous devons donc établir des valeurs seuils en fonction de la phase de traitement.

- Seuil = moyenne + 2 écart-types :

L'établissement de normales biologiques doit être basé sur un calcul statistique dans une population de sujets normaux, ayant toutes les caractéristiques des patients sans la pathologie concernée. Ainsi, nous avons choisi de définir les seuils, à **chaque injection de L-ASNase**, comme la moyenne +/- 2 écart-types chez les patients de cette étude **sans accident thrombotique artériel ou veineux** (soit 23/26 patients) (*Tableau 6 et 7*).

Tableau n°6 : Valeurs seuils déterminées pour l'Asserachrom®:

Injections (induction)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
n	13	16	13	10	15	10	15	9	16
Moyenne (M)	0,492	0,458	0,301	0,575	0,413	0,886	0,329	0,261	0,197
Ecart-type (ET)	0,294	0,328	0,243	0,369	0,344	1,047	0,215	0,153	0,129
Seuil = M + 2 ET	1,080	1,113	0,787	1,313	1,101	2,98	0,758	0,567	0,454

Injections (intensification)	1	2	3	4	5	6
n	10	12	1	9	2	10
Moyenne (M)	0,202	0,083	*	0,133	*	0,132
Ecart-type (ET)	0,126	0,029	*	0,101	*	0,089
Seuil = M + 2 ET	0,454	0,141	*	0,335	*	0,309

Tableau n°7 : Valeurs seuils déterminées pour le Liatest® :

Injections (induction)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
n	12	15	11	12	15	8	13	12	17
Moyenne (M)	0,472	0,649	0,321	1,370	0,599	0,525	0,398	0,626	0,456
écart-type (ET)	0,194	0,427	0,135	1,241	0,465	0,379	0,153	0,449	0,292
Seuil (M + 2 ET)	0,859	1,509	0,590	3,852	1,528	1,284	0,704	1,524	1,041

Injections (intensification)	1	2	3	4	5	6
n	10	13	1	6	2	8
Moyenne (M)	0,224	0,220	*	0,220	*	0,220
Ecart-type (ET)	0,008	0,000	*	0,000	*	0,000
Seuil (M + 2 ET)	0,241	0,220	*	0,220	*	0,220

* : effectif insuffisant

Les seuils obtenus sont compris entre **0,5 et 1,5 µg/ml** pendant l'induction et entre **0,2 et 0,5 µg/ml** pendant l'intensification pour les deux techniques.

Curieusement, on observe un pic à la 6^{ème} en Asserachrom® à la 4^{ème} injection en Liatest®. Ces seuils élevés sont dus à de forts écart-types. La courbe des seuils est plus lissée avec l'Asserachrom® (*Figure 17 et 18*).

Figure n°17 : Représentation des seuils obtenus en Asserachrom®.

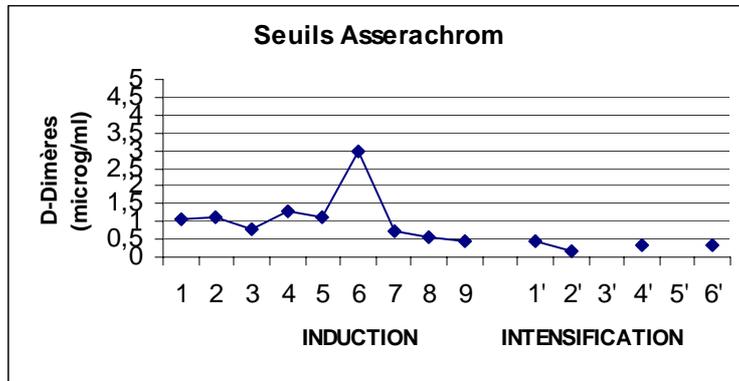
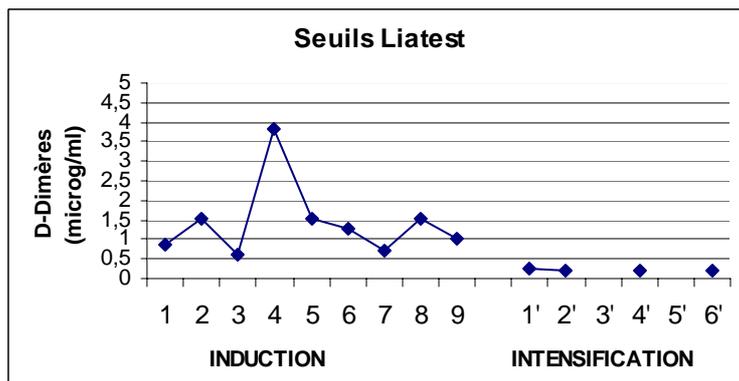


Figure n°18 : Représentation des seuils obtenus en Liatest®.



Durant l'intensification, les seuils de D-dimères par technique Liatest® sont inférieurs à 0,22 µg/ml qui est la limite inférieure de détection de la méthode.

Le calcul de ces seuils ont permis de réaliser les **Tableaux 8 et 9** qui permettent de visualiser rapidement les taux supérieurs aux seuils.

Tableau n°8 : Résultats des D-dimères supérieurs aux seuils avec l'Asserachrom® :

Asserachrom® induction	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEUILS	1,08	1,113	0,787	1,313	1,101	2,98	0,758	0,567	0,454
PS	0,22	0,44	1,09	1,13		0,24	0,27	0,17	0,31
MS	2,11	0,92	0,99		0,59	0,64	0,27	0,12	
GF		0,07	0,06		0,12		0,13		0,26
LM	0,06	0,07	0,07			0,07	0,13	0,3	0,11
RT		1,76	1,98			2,94			1,1
VF	11,8	7,66	4,8	4,32	1,04			0,91	0,9
CT		4,92		2	0,98	0,11		0,1	0,11
GC	2,46	2,72	3,71	3,95		2,69	1,75	1,84	0,8
DS	2,64	7,17		1,04		0,78			
VJ	3,15	8,86	4,26		0,18	0,46	0,3		0,14
RM	0,51		0,42		9,14		0,11		
PN	0,5	0,57	0,69	0,37	1,07		0,68	0,82	0,44
DJ	0,06	0,04	0,04	0,1	0,06	0,05	0,22		0,04
MJ	0,94	0,43	0,18		0,14	0,64	0,37		0,06
BO		0,82	0,58	3,09	0,75		0,66		0,19
DL	0,59	0,11	0,07	0,06	0,06			0,1	
DE	0,15	0,09	0,08		0,12		0,1		0,12
VM	0,82	0,38	0,43	0,43	0,43		0,68		0,39
BC			2,75		0,38	0,31	0,11	0,13	0,17
RE	0,8		0,19		0,74		0,33		
HA	1,45	0,42	0,46	0,57	1			1,04	1,67
VG	0,46	0,95		0,83			0,53	0,49	0,13
BA	0,55	0,37		0,81	0,12			0,07	0,05
LB				0,41				0,42	0,4
BAL	0,73	0,84			0,42	0,5		0,23	0,18
BV	3,8	0,8	0,64		0,2		0,34	0,42	0,2

Asserachrom® intensification	1	2	3	4	5	6
SEUILS	0,454	0,141	*	0,335	*	0,309
PS		0,14		0,31		0,3
MS		0,1		0,04		0,08
GF	0,07	0,05		0,07		0,03
LM	0,11	0,08				
RT				0,29		0,1
VF		0,42		0,73		0,64
CT						
GC	0,16	0,09			0,1	0,07
DS	0,2	0,11		0,11		
VJ	0,12			0,8		
RM	0,12	0,11		0,06		0,05
PN	0,19	0,09		0,16		0,19
DJ						
MJ		0,07			0,98	0,66
BO	0,44	0,22		0,1		
DL		0,04				
DE		0,06		0,06		0,14
VM	0,11					
BC	0,41		0,17			0,11
RE	0,21	0,06		0,81		0,25
HA	6,6	0,66		1,24		
VG						
BA						
LB						
BAL						
BV						

Tableau n°9 : Résultats des D-dimères supérieurs aux seuils avec le Liatest® :

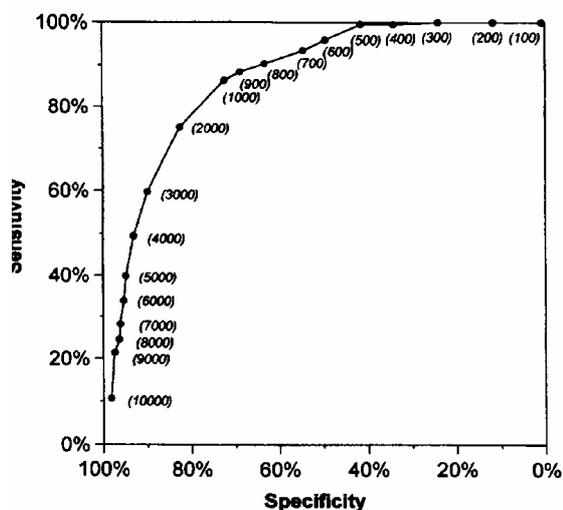
Liatest® induction	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEUILS	0,859	1,509	0,59	3,852	1,528	1,284	0,704	1,524	1,041
PS	1,23	1,35	1,38	1,36		1,11	1,09	0,98	0,99
MS	1,97	2,39	1,51		1,18	0,86	0,61	0,3	
GF		<0,22	<0,22		0,24		0,26		0,42
LM	<0,22	<0,22	<0,22			<0,22	0,26	0,48	0,24
RT		1,72	1,94			2,83			0,95
VF	9,21	5,61	2,81	4,12	2,27			0,89	0,89
CT		5,79		1,98	2,07	0,3		0,23	<0,22
GC	2,31	2,38	3,41	3,71		2,17	2,08	1,33	0,62
DS	2,78	10,74		2,53		0,51			
VJ	3,31	10,26	3,36		0,55	0,86	0,69		0,54
RM	1,77		0,45		19,8		0,32		
PN	0,68	0,67	0,8	0,54	1,34		1,07	1,87	0,96
DJ	<0,22	<0,22	<0,22	<0,22	<0,22	<0,22	0,28		<0,22
MJ	0,63	0,42	0,28		0,27	<0,22	0,61		<0,22
BO		0,99	0,54	3,49	0,74		0,44		0,27
DL	0,44	<0,22	<0,22	<0,22	<0,22			<0,22	
DE	<0,22	<0,22	<0,22		<0,22		<0,22		<0,22
VM	0,64	0,46	0,4	0,4	0,39		0,54		0,44
BC			2,7		0,27	<0,22	<0,22	<0,22	<0,22
RE	0,57		<0,22		0,65		0,44		
HA	1,6	1,3	1,34	1,5	1,52			1,48	1,67
VG	0,5	0,92		1,35			0,61	0,72	0,34
BA	0,59	0,45		0,67	<0,22			<0,22	<0,22
LB					0,45			0,88	0,82
BAL	0,7	0,82			1,1	0,9		0,4	0,26
BV	2,39	1,26	0,54		0,39		0,36	0,28	0,35

Liatest® intensification	1	2	3	4	5	6
SEUILS	0,241	0,22		0,22		0,22
PS		<0,22		0,39		0,45
MS		<0,22		<0,22		<0,22
GF	<0,22	<0,22		<0,22		<0,22
LM	<0,22	<0,22				
RT				0,45		<0,22
VF		0,51		1,03		0,94
CT						
GC	<0,22	<0,22			<0,22	<0,22
DS	<0,22	<0,22		<0,22		
VJ	<0,22			0,74		
RM	0,22	<0,22		<0,22		<0,22
PN	0,24	<0,22		0,24		0,28
DJ						
MJ		<0,22			0,75	0,35
BO	<0,22	<0,22		<0,22		
DL		<0,22				
DE		<0,22		<0,22		<0,22
VM	<0,22					
BC	0,24		<0,22			<0,22
RE	<0,22	<0,22		0,32		<0,22
HA	2,98	1,14		1,42		
VG						
BA						
LB						
BAL						
BV						

- **Courbes ROC (Receiver Operating Characteristics):**

L'établissement de courbes ROC est un très bon moyen pour déterminer des seuils d'interprétation d'une technique. Celles-ci ont été utilisées pour choisir le seuil 0,5 µg/ml pour exclure un thrombose chez le sujet sain (*Figure n°19*).

Figure n°19 : Exemple issu de la littérature de Courbe ROC pour les D-dimères dans le diagnostic de l'embolie pulmonaire [67].



On détermine, pour des valeurs croissantes du seuils, les valeurs de sensibilité et de spécificité. Les couples obtenus sont ensuite représentés dans un carré de surface 1, avec en abscisse (1-Spécificité) et en ordonnée la Sensibilité [68].

Le seuil optimal sera choisi en fonction de la sensibilité et de la spécificité désirée pour le test.

A partir des résultats de D-dimères de notre étude, et utilisant ces courbes ROC, nous avons cherché à établir un seuil pour chaque phase de traitement (*Figure 20 et 21*).

On a considéré comme élément positif les enfants qui, à un moment donné, ont présenté une thrombose artérielle ou veineuse (n = 3). On a ainsi pu calculer des sensibilités et spécificités pour chaque seuil.

Figure n°20: Courbes ROC pour la phase d'induction et d'intensification en Asserachrom®.

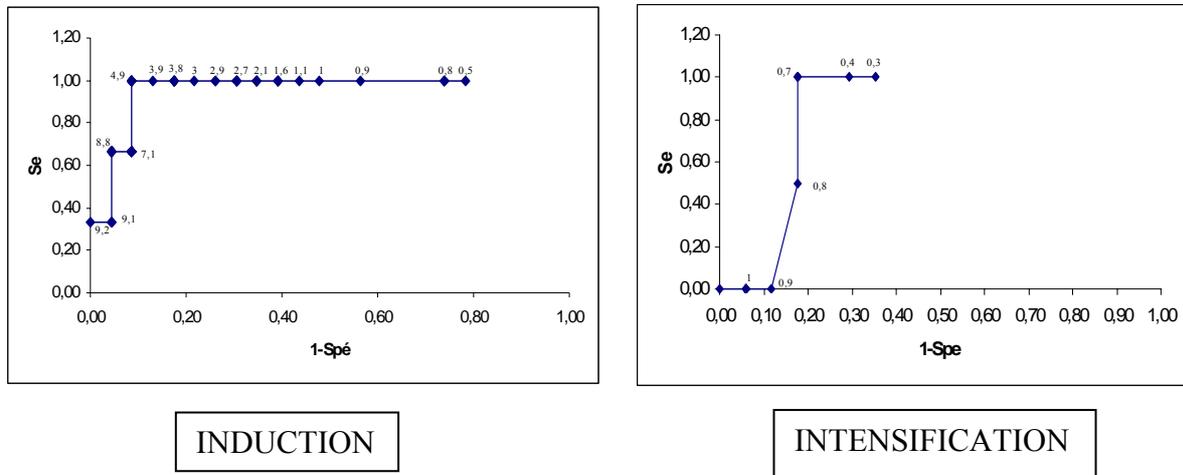
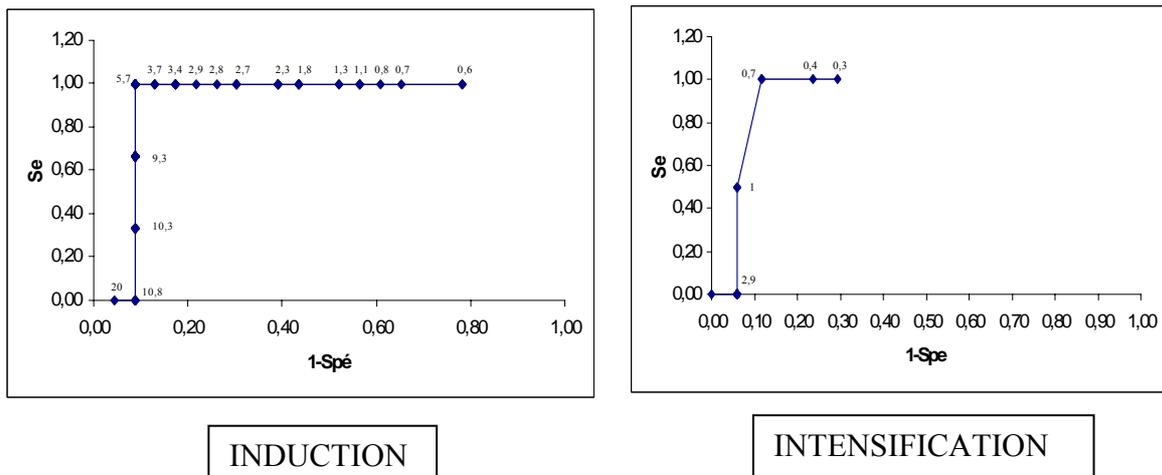


Figure n°21 : Courbes ROC pour la phase d'induction et d'intensification en Liatest®.



Pour le choix du seuil, on privilégie une bonne sensibilité car un faux négatif aurait un enjeu plus grand sur la survie de l'enfant qu'un faux positif.

Pour l'induction, avec la méthode Asserachrom®, le seuil optimal obtenu est **4,9 µg/ml** (Se: **100%**; Sp: **91%** ; VPN: **100%** ; VPP: **60%**). Le Liatest® donne un seuil à **5,7 µg/ml** (Se: **100%** ; Sp: **91%** ; VPN: **100%** ; VPP: **60%**).

Pour les patients ayant présenté des thromboses, VF présente deux résultats consécutifs supérieurs au seuil en Asserachrom®, un résultat en Liatest® ; VJ et CT un seul résultat anormal en Asserachrom® et en Liatest®.

Les patients DS et RM ont également un résultat anormal avec les deux techniques mais n'ont présenté aucun événement thrombotique.

Pour la phase d'intensification, le seuil optimal est de **0,7 µg/ml** en Asserachrom[®] (**Se: 100%**; **Sp: 82%** ; **VPN : 100%** ; **VPP : 40%**) et en Liatest[®] (**Se :100%** ; **Sp : 88%** ; **VPN : 100%** ;**VPP : 50%**). VJ présente un résultat anormal avec les deux techniques, VF un résultat en Asserachrom[®] (2 en Liatest[®]). Un résultat anormal est retrouvé chez les patients RE, MJ et plusieurs résultats pour HA mais aucun ne connaît de thrombose.

Dans la population étudiée, les enfants présentant des valeurs de D-dimères inférieures au seuil en induction et en intensification avec les deux techniques ne connaissent aucune complication thrombotique.

II.2. Interprétation des taux de D-dimères.

II.2.1. En fonction de la clinique :

Nous nous intéresserons plus particulièrement à quelques enfants qui présentent des valeurs supérieures au seuil calculés par $M + 2 ET$ avec les deux méthodes et sur plusieurs injections de L-ASNase (*Tableau 17 et 18*).

Pendant l'induction :

- 7/26 ENFANTS ONT DES TAUX SUPERIEURS AUX SEUILS SUR PLUSIEURS INJECTIONS :

Pour certains enfants (3/26), le syndrome infectieux explique les taux élevés de D-dimères :

-RT a des taux élevés pendant toute l'induction en Asserachrom[®] et en Liatest[®]. Ces taux peuvent être expliqués par sa septicémie à staphylocoque doré.

-DS a des taux élevés aux 2 premières injections en Asserachrom[®] et en Liatest[®] mais présente à ce moment une diarrhée à Rotavirus.

-VJ a des taux élevés aux 3 premières injections en Liatest[®] et en Asserachrom[®]. Au même moment, il présente une fièvre à 40°C avec une septicémie à Streptocoque.

Pour d'autres (4/26), les taux élevés ne peuvent pas être expliqués par un tableau infectieux :

-VF a des taux très élevés de D-dimères aux 4 premières injections de L-ASNase.

-CT a un taux élevé à la 2^{ème} et 5^{ème} injections en Liatest[®] et à la 2^{ème} et 4^{ème} injections en Asserachrom[®].

-GC présente des taux élevés pendant toute l'induction en Asserachrom[®] et en Liatest[®].

-HA présente plusieurs taux hors normes.

Parmi ces enfants, VF a présenté un AVC à la fin de la phase d'intensification et CT un événement thrombotique après la phase d'induction. Mais GC n'a présenté aucune complication et HA a eu une épilepsie en fin de phase d'intensification.

➤ 19/26 ENFANTS ONT DES TAUX INFÉRIEURS AUX SEUILS OU SUPÉRIEURS SUR UNE INJECTION :

- 5/26 enfants comme MJ, VM, LB, BAL ou BV ont des taux **inférieurs aux seuils** avec les deux techniques alors qu'ils présentent un **syndrome infectieux** (MJ : pneumopathie ; VM: gastro-entérite + fièvre + syndrome ORL; LB: gastro-entérite; BAL et BV: hyperthermie + infection KT)

- 8/26 enfants présentent des taux **inférieurs aux seuils** avec les deux techniques pendant toute la phase d'induction et n'ont **aucune complication infectieuse ou thrombotique** : VG, BA, DJ, DE, DL, GF, LM sauf RE qui présente une valeur supérieure au seuil avec une seule technique sans explication.

- 6/26 enfants présentent une ou plusieurs valeurs supérieures aux seuils non consécutives sans explication clinique : PS, MS, RM, PN, BO, BC.

Pendant l'intensification :

La majorité des enfants ont des taux de D-dimères inférieurs aux seuils. A cette phase, tous les enfants sont en rémission complète.

11/19 (Liatest[®]) et 13/19 (Asserachrom[®]) enfants ont leurs taux de D-dimères inférieurs aux seuils tout au long de la phase d'intensification qui se déroule sans complication et avec une très bonne tolérance de la cure.

Quelques uns ont des taux supérieurs aux seuils avec les deux techniques:

- VF a des taux qui restent supérieurs aux seuils jusqu'à la fin de l'intensification.
- VJ a un taux supérieur au seuil 2 jours avant son EP.
- MJ a un taux supérieur au seuil, au moment où il est hospitalisé pour aplasie fébrile.
- RE a un taux supérieur au seuil. Elle a présenté une aplasie fébrile 4 jours avant ce taux.
- HA a présenté une épilepsie et a des taux qui restent supérieurs aux seuils toute la phase.

Parmi les 5 enfants qui ont connu un taux de D-dimères supérieur au seuil pendant l'intensification, un enfant a présenté un tableau d'EP et un autre, un AVC. Les 3 autres enfants ont présenté une aplasie fébrile ou une épilepsie.

II.2.2. En fonction du nombre de blastes au diagnostic :

Les 7 enfants ayant un taux de D-dimères élevés (taux supérieurs aux seuils dans les deux techniques sur plusieurs injections) au début l'induction présentent un taux moyen de blastes au diagnostic plus élevés que les enfants ayant des taux de D-dimères normaux (33 425/mm³ contre 13 338/mm³).

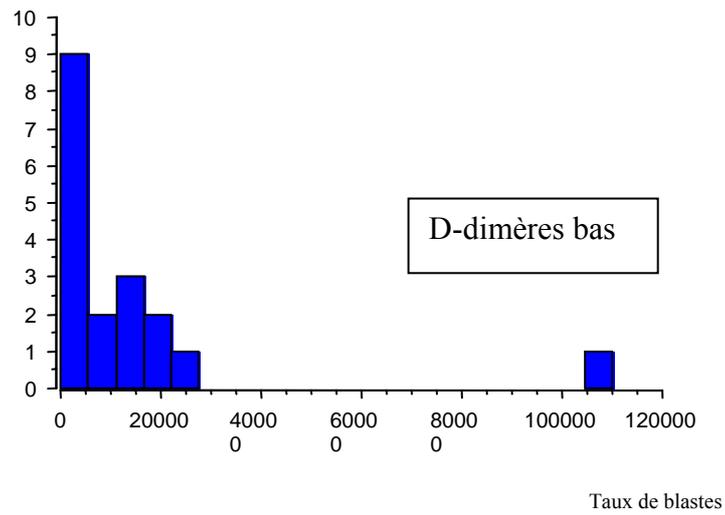
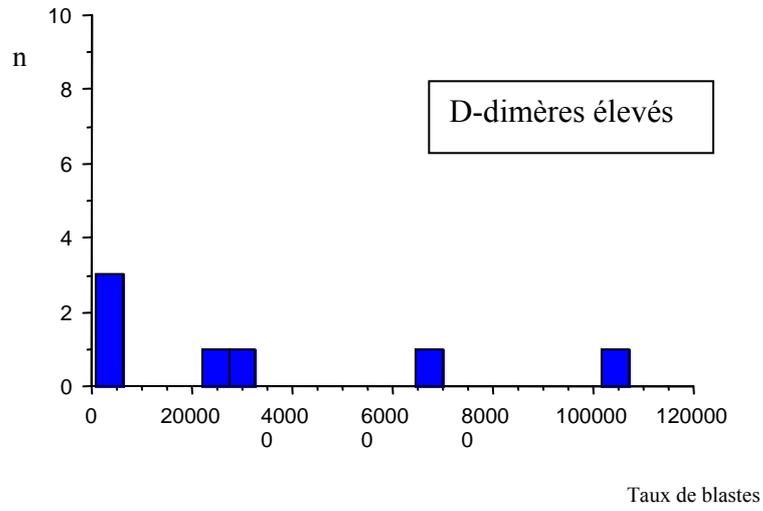
Cependant, l'étude de distribution des valeurs (**Figure 22**) montre que 9/18 (50%) patients avec des D-dimères normaux et 3/7 (42%) des patients avec des D-dimères élevés avaient des taux de blastes inférieurs à 5000/mm³ lors du diagnostic. Enfin, l'analyse statistique par Test de Mann Whitney ne retrouve **pas d'influence significative du taux de blastes** sur le chiffre de D-dimères à l'induction (p = 0,164).

Tableau n°10 : Taux de blastes chez les enfants ayant des D-dimères élevés ou bas.

enfants DD+	GB	Blastes
VJ	39000	31200
DS	114000	107160
RT	3000	840
VF	11000	5500
CT	132000	66000
HA	13000	780
GC	45000	22500
Moyenne		33 425
n		7
ET		39853,0028

enfants DD-	GB	Blastes
PS	4000	520
MS	2000	40
GF	12000	8640
LM	7000	3430
RM	12000	6960
PN	1000	110
DJ	4000	40
BO	6000	2340
DL	24000	18240
DE	3000	60
VM	31000	20150
BC	19000	14630
RE	8000	3120
VG	21000	13230
BA	121000	110110
LB	7000	3570
BAL	17000	11050
BV	27400	23838
Moyenne		13 338
n		18
ET		25325,3822

Figure n°22 : Distribution des taux de blastes pour les 2 groupes d'enfants.



II.2.3. En fonction du taux d'asparaginase :

La **Figure 23** représente les taux moyens de L-ASNase au cours des phases d'induction et d'intensification. Les taux sont disponibles pour seulement 15 enfants. Pour 2 enfants, l'asparaginasémie n'est pas encore dosée pour l'intensification et 2 enfants sont sortis du protocole pour allogreffe après l'induction (donc pas de dosage pour l'intensification).

Figure n°23: Taux moyens d'asparaginase au cours de l'induction et de l'intensification.

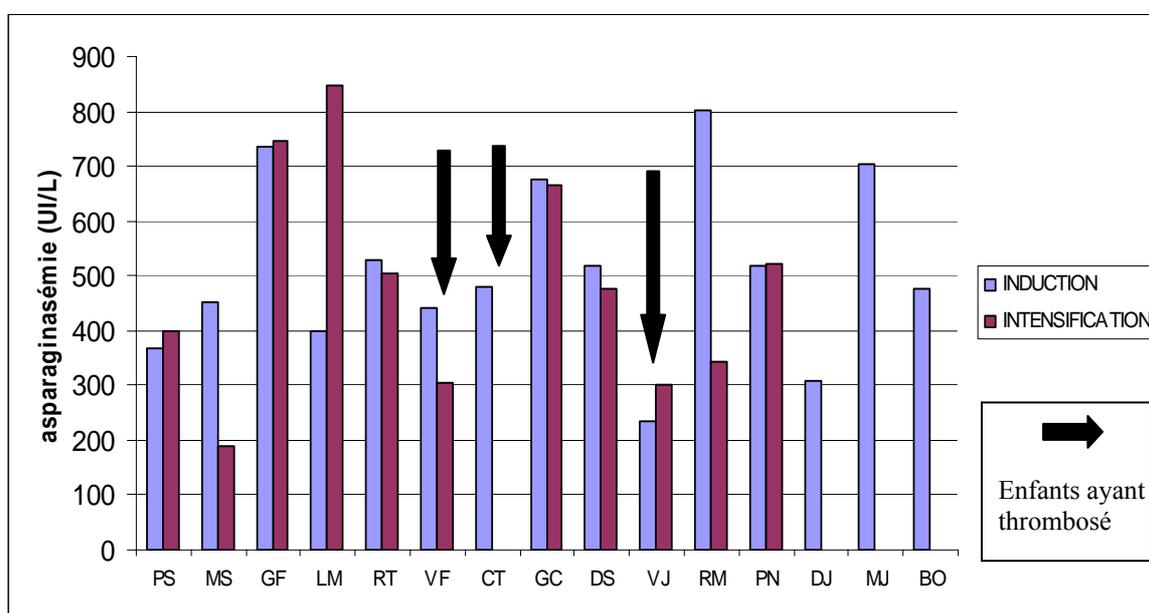


Tableau n°11: Données récapitulatives sur les taux moyens de L-ASNase.

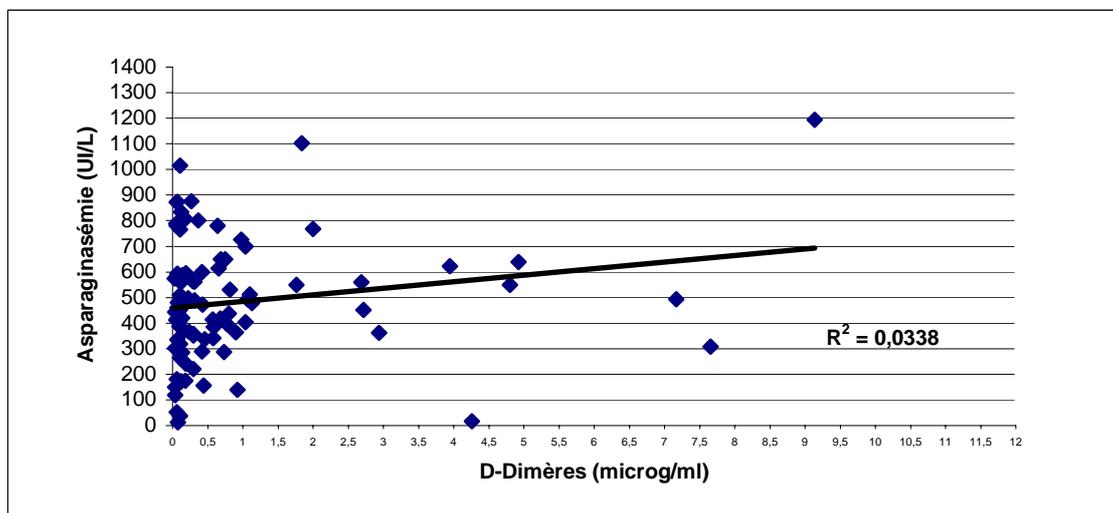
	INDUCTION	INTENSIFICATION
N	15	11
Taux moyen de L-ASNase	509 UI/L	481 UI/L
Ecart-type	160,4	203,0
Minimum	234 UI/L	190 UI/L
Maximum	802 UI/L	847 UI/L

Les patients GF, RT, GC et PN présentent des taux moyens de L-ASNase supérieurs à la moyenne générale pendant les deux phases de traitement.

Les patients DS, RM et MJ ont des taux supérieurs seulement pendant la phase d'induction ; LM seulement pendant la phase d'intensification.

Aucun de ces enfants n'a présenté d'évènement thrombotique au cours de la cure.

Figure n°24: Corrélation entre les taux de D-dimères et les taux d'asparaginase.



Les taux d'asparaginase ne sont pas corrélés aux taux de D-dimères obtenus lors des injections de L-ASNase ($r^2 = 0,0338$) (Figure 24).

L'asparaginasémie ne semble donc pas refléter l'activité de la molécule sur la coagulation et est indépendant des taux de D-dimères obtenus.

DISCUSSION

I. LES TECHNIQUES

I.1. Corrélation des techniques.

Pour réaliser notre travail, nous avons utilisé deux méthodes de dosage des D-dimères : l'Asserachrom[®] et le Liatest[®]. L'Asserachrom[®], technique ELISA sur plaque, est à ce jour considérée comme la technique de référence.

L'étude comparative sur les 245 prélèvements a montré une **bonne corrélation** entre les résultats obtenus en Liatest[®] et ceux obtenus par la méthode de référence Asserachrom[®] ($r^2 = 0,795$; $p < 0.001$) sur une zone de concentration allant de 0 à 12 $\mu\text{g/ml}$. Cette corrélation est retrouvée dans la littérature : $r^2 = 0,96$ [69]; $r^2 = 0,81$ [70].

Cependant, on retrouve une **différence statistiquement significative** entre les deux techniques. En effet, les résultats obtenus par technique Liatest[®] sont significativement plus élevés que les résultats obtenus par technique Asserachrom[®]. Cette différence n'est pas décrite dans les travaux qui évaluent le Liatest[®] par rapport à l'Asserachrom[®]. Le plus souvent, seule la corrélation est testée. En effet, dans la littérature, les différents auteurs évaluent essentiellement, leur capacité respective à pouvoir être utilisées dans la suspicion d'accidents thromboemboliques veineux. Dans ces évaluations, les deux techniques sont comparables (voir plus loin).

Il faut garder à l'esprit que la standardisation de ces méthodes est difficile du fait de l'hétérogénéité des mélanges des produits de dégradation dans les échantillons et la variabilité de réactivité des anticorps monoclonaux vis à vis de ces fragments. Ceci peut expliquer certaines discordances dans les résultats entre les deux méthodes. L'incidence clinique de cette différence de résultats est difficile à apprécier sur ces considérations méthodologiques.

I.2. Comparaison des techniques.

Sur les *Tableaux 8* et *9*, on peut remarquer que certains patients ont des résultats pouvant être considérés comme augmentés (supérieurs au seuil) avec la méthode Liatest[®] et pas avec la méthode Asserachrom[®]. En effet, avec la méthode Liatest[®] 54/212 (25,5%) valeurs sont supérieures au seuil, contre 44/212 (20,7%) pour la méthode Asserachrom[®]. D'autre part, pour 21 résultats (9,9%), l'Asserachrom[®] donne des valeurs négatives et le Liatest[®] donne des valeurs positives. Le contraire ne se retrouve que pour 7 résultats (3,3%) (*Tableau 12*).

Tableau n°12: Comparaison des résultats observés avec les deux méthodes.

	TEST ASSERACHROM[®] +	TEST ASSERACHROM[®] -
TEST LIATEST[®] +	37 (17,4%)	21 (9,9%)
TEST LIATEST[®] -	7 (3,3%)	147 (69,3%)

Grâce aux *Tableaux 8* et *9*, il est possible d'analyser certains patients au profil biologique particulier. En effet, alors que l'enfant PS ne rencontre aucune complication thrombotique et infectieuse, cet enfant a 3/8 valeurs qui sont au dessus du seuil avec la méthode Liatest[®] au cours de l'induction, alors qu'une seule valeur est supérieure au seuil avec la méthode Asserachrom[®].

On retrouve le même phénomène pour d'autres enfants (MS, PN, BS, HA, VG, BAL). Ces enfants ont tous présenté des valeurs supérieures aux seuils avec la méthode Liatest[®], mais considérées comme normales avec la méthode Asserachrom[®]. Chez ces patients, aucune complication thrombotique ou infectieuse n'est survenue (à noter que toutes les valeurs supérieures au seuil en Asserachrom[®] sont aussi supérieures au seuil en Liatest[®]).

Notre étude semble donc montrer plus de valeurs positives avec le Liatest[®] qu'avec l'Asserachrom[®] en l'absence de thrombose.

Selon nos critères, la méthode Liatest[®] donnerait donc plus de faux positifs.

I.3. Avantages- Inconvénients.

Le Liatest[®] est une technique quantitative qui permet de doser rapidement (**7 minutes**) et de façon unitaire les D-dimères sur l'automate STA-R. Le dosage est entièrement automatisé et s'effectue sur plasma pur sans prédilution de l'échantillon. C'est une technique simple, rapide et fiable, parfaitement adaptée à l'urgence. Cependant, la technique est limitée pour les valeurs faibles, ne pouvant doser les valeurs de D-dimères inférieurs à **0,22 µg/ml**.

La technique Asserachrom[®] est une technique longue (**4 heures**) qui demande un traitement des échantillons en série et nécessite une prédilution des plasmas. Cette technique ne peut être utilisée en routine, pour un diagnostic d'urgence.

Elle reste cependant la technique de référence et semble donner moins de résultats faussement positifs par rapport au Liatest[®].

II. L'ETUDE

II.1. Prévalence des thromboses, moment de survenue.

- Prévalence des thromboses :

Durant le suivi des patients de notre étude 3/26 (**11,1%**) ont présenté des accidents thrombotiques (**7,7%** pour les thromboses veineuses et **3,8%** pour les thromboses artérielles). Cette prévalence est comparable à celle décrite dans la littérature (5 à 15%) [18, 21, 23-25].

Une étude multicentrique dans le cadre du protocole BFM a retrouvé une prévalence de 20% d'au moins un facteur de risque thrombotique (facteur V Leiden, mutation du facteur II mutation MTHFR (méthylenetetrahydrofolate réductase), déficit en protéine C, déficit en protéine S, déficit en AT, Lp(a) élevé) dans la population étudiée. Dans cette étude, 46,5% des enfants avec un facteur de risque ont développé une thrombose veineuse contre 2,2% des enfants sans facteur de risque [26].

Dans une autre étude, 3 enfants sur 108 ont développé une thrombose et aucun n'avait de facteur de risque prothrombotique [28].

Malheureusement, dans notre étude, les bilans de thrombophilie pour VJ et CT ne sont pas disponibles. Quant à VF, il ne présente qu'une mutation MTHFR à l'état hétérozygote, ce qui ne doit pas être considérée comme pathologique (40-50% de la population)

Parmi les inhibiteurs physiologiques de la coagulation qui sont classiquement explorés dans le bilan de thrombophilie, l'antithrombine joue un rôle prédominant. Comme nous l'avons déjà rapporté (Cf. Généralités), l'effet de la L-ASNase sur l'AT circulante est prédominant et certains auteurs ont étudié l'importance des taux d'AT dans la survenue des accidents thrombotiques chez les patients atteints de LAL [4, 71].

Ainsi, dans la population étudiée, les déficits acquis en antithrombine sont substitués par administration de concentrés d'antithrombine plasmatique dès que le taux d'AT est inférieur à 50%. Nowak-Göttl a mené une étude sur 27 enfants atteints de LAL et traités par L-ASNase dont 55% ont reçu de l'AT quand leur taux était inférieur à 50%. Aucun événement thrombotique n'est survenu [71]. Cependant, dans une autre étude, la supplémentation en AT n'a pas montré de bénéfice dans la diminution de l'incidence des thromboses [72].

Dans la population que nous avons étudiée, 11/26 (**42%**) enfants ont reçu des injections d'**Aclotine**[®]. Ce traitement n'a pas empêché la survenue de thrombose chez un patient (CT). Cependant, son taux d'AT est descendu en dessous de 50%. Pour VJ qui a fait une EP, le taux d'AT est toujours resté au dessus de 70% (sans injection d'Aclotine[®]).

Certains travaux montrent que les injections d'Aclotine[®] entraînent une diminution du taux de D-dimères [71, 72]. Cependant dans notre travail, mêmes les enfants qui n'ont pas reçu d'Aclotine[®] voient leur taux de D-dimères diminuer à la fin de la phase d'induction.

L'analyse de ces différentes études met bien en évidence la complexité de la physiopathologie des manifestations thrombotiques et le fait que les facteurs propres aux patients (comme l'existence d'une thrombophilie) ne sont pas des facteurs de risque indépendants mais agissent en concert avec la pathologie et la chimiothérapie (et ses effets, comme le déficit en AT) dans le développement de la thrombose.

- **Moment de survenue :**

Il est intéressant de connaître le moment le plus à risque de survenue des thromboses chez ces enfants atteints de LAL pour intensifier leur suivi biologique et clinique.

La plupart des travaux corroborent l'idée que les thromboses surviennent au moment des administrations de L-ASNase [73]. Or, dans notre étude, un seul événement thrombotique sur trois est concomitant aux injections de L-ASNase. Les deux autres ont lieu 7 jours et 24 jours après la dernière injection de L-ASNase de l'induction et de l'intensification respectivement.

Dans notre expérience, le risque de thrombose existe donc aussi en dehors de ces phases d'administrations de L-ASNase.

II.2. Place des D-dimères dans le diagnostic de thrombose.

II.2.1. D-dimères dans les thromboses veineuses et artérielles :

- **Thromboses veineuses :**

Depuis les années 1990, le dosage plasmatique des D-dimères s'est imposé comme un auxiliaire diagnostique utile en présence d'une suspicion de MTEV. D'autant plus que ce test peut être réalisé en urgence grâce à des techniques fiables, rapides, unitaires, automatisées, offrant des sensibilités au moins équivalentes à celles des tests ELISA classiques apparus en 1985 et qui servent de référence à de nombreux travaux.

Le Liatest[®] a été évalué dans une étude multicentrique sur 112 patients admis en ambulatoire au service d'urgence suspectés de TVP et/ou EP [69]. En retenant un seuil de 0,5 µg/ml, le Liatest[®] présente les mêmes performances que l'ELISA pour exclure la MTEV. Diverses études concernant le Liatest[®] ont ainsi montré qu'avec une valeur seuil de 0,5 µg/ml, la valeur prédictive négative (VPN) d'exclusion de la thrombose variait de 93,3 à 100% [52, 53, 74, 75].

Dans une étude sur les EP, (146 EP confirmées par scintigraphie ventilation-perfusion ou angiographie sur 386 suspicions), le Liatest[®] a montré une sensibilité de 100% et une VPN de 100% [53]. Dans une étude sur les TVP (224 TVP pour 537 patients suspectés), la sensibilité de la méthode Liatest[®] est de 98% et la VPN de 95%.[57].

Concernant l'Asserachrom[®], la VPN d'exclusion de la thrombose varie de 91 à 100% avec une valeur seuil à 0,5 µg/ml [76]. Pour les TVP, 21 patients sur 53 sont diagnostiqués par phlébographie. La méthode Asserachrom[®] donne une sensibilité à 95%, une VPN à 94% et une spécificité à 47%[77]. Pour les EP, 10 sur 46 sont diagnostiqués par scintigraphie. La méthode donne une sensibilité à 100%, une VPN à 100% et une spécificité à 81%[55].

Les seuils actuellement utilisés pour l'utilisation des D-dimères dans l'exclusion de la MTEV (<0,5 µg/ml) n'ont été validés que pour une population ambulatoire. C'est pourquoi toute demande de D-dimères dans cette indication ne peut être recommandée dans d'autres populations (post-opératoires, cancers, syndrome infectieux...).

- **Thromboses artérielles :**

Depuis quelques années, plusieurs études ont démontré que les D-dimères pouvaient également constituer un élément prédictif des complications thrombotiques athéromateuses. En effet, les données disponibles suggèrent une association significative des D-dimères avec le risque de maladie coronarienne indépendante des facteurs de risque classiques [78].

Une étude menée chez 257 patients entrant aux urgences pour une douleur dans la poitrine a montré que les D-dimères étaient significativement plus élevés (> 0,5 µg/ml) chez les patients présentant un syndrome coronaire aigu et que ce marqueur pouvait apporter une information supplémentaire au diagnostic [79].

Une autre étude a montré que les patients atteints d'athérosclérose avaient un risque plus élevé d'évènements ischémiques thrombotiques si les D-dimères étaient élevés [80].

Cependant, **ces études n'établissent pas de seuil** utilisable dans ce contexte et garde le seuil 0,5 µg/ml établi chez le sujet sain sans pathologie artérielle. L'élévation des D-dimères reflète peut-être seulement **l'état inflammatoire** démontré comme étant fortement associé à un risque cardiovasculaire accru (la CRP reflète la progression de l'athérosclérose et ses complications).

II.2.2. D-dimères dans la grossesse :

La grossesse constitue une situation à risque de thrombose. Cependant, sans que la raison en soit parfaitement connue, il existe une augmentation continue tout au long de la grossesse des marqueurs d'hypercoagulabilité. Il a été suggéré que ces marqueurs seraient issus des espaces intervillositaires du placenta et que leur augmentation serait proportionnelle à la croissance placentaire [81, 82].

L'intérêt du dosage des D-dimères pour prédire la survenue d'une thrombose chez la femme enceinte n'a, à ce jour, pu être démontré. Ainsi, Bombelli et al ont défini des valeurs normales ($m \pm 2 DS$) en fonction de l'âge gestationnel augmentant linéairement de 0,5 $\mu g/ml$ en début de grossesse à environ 1 $\mu g/ml$ en fin de grossesse [83]. Le suivi de 305 grossesses a montré que ce dosage ne peut prédire la survenue d'un accident thrombotique. Les patientes avec ou sans risque ont des taux équivalents de D-dimères. Dans leur travail, les D-dimères n'étaient élevés qu'au moment de la thrombose [83]. Une autre étude, concernant plus précisément les grossesses de femmes atteintes d'un syndrome des antiphospholipides a également montré l'absence d'intérêt des D-dimères dans cette indication [84].

II.2.3. D-dimères appliqués aux LAL traitées par L-ASNase:

Au moment du diagnostic, les enfants atteints de LAL présentent une augmentation de génération de thrombine (F1+2 ; TAT augmentés) due à la masse de cellules leucémiques. Le système fibrinolytique est aussi activé (t-PA augmenté) ce qui se manifeste par des D-dimères élevés. Ces D-dimères élevés ne paraissent pas traduire un risque thrombotique. En effet, contrairement à ce qu'on observe dans le syndrome paranéoplasique chez l'adulte, il n'a curieusement pas été décrit de thrombose au diagnostic de la LAL. Ces accidents ne surviennent qu'à l'instauration du traitement par L-ASNase [85].

Les études sur les LAL utilisent en particulier les D-dimères pour montrer l'effet de la L-ASNase sur l'hémostase et pour expliquer le mécanisme de survenue des thromboses.

Certaines études montrent que les D-dimères diminuent au cours du traitement des LAL par la L-ASNase [29, 86]. C'est également ce que nous retrouvons dans nos résultats. Cependant, d'autres travaux montrent une augmentation entre le taux avant la 1^{ère} injection de

L-ASNase et le taux à 14 jours de traitement en rapport avec une augmentation de l'activité procoagulante des cellules mononucléaires sous L-ASNase [19].

Une seule étude a montré l'éventuelle utilité des D-dimères dans la prédiction d'une thrombose au cours d'un traitement par la L-ASNase. Les D-dimères étaient suivis pendant le traitement tous les 3 jours. Les enfants ont présenté des D-dimères élevés juste avant leur événement thrombotique [87].

Dans notre travail, les taux de D-dimères sont très élevés pour certains enfants au début de l'induction puis les taux de D-dimères diminuent jusqu'à la fin de cette phase.

Si le **seuil 0,5 µg/ml** était utilisé dans la population d'enfants atteints de LAL que nous avons étudiée, seuls 5/26 (19%) auraient des valeurs inférieures à 0,5 µg/ml pendant leur traitement en Liatest[®] et 4/26 (15%) en Asserachrom[®]. Ces patients avec des D-dimères particulièrement bas n'ont présenté aucun accident thrombotique symptomatique.

Cependant, ce seuil n'est pas applicable à cette population car **plus de 80% des patients auraient des résultats anormaux** alors que seulement 7% des patients ont présenté des accidents thrombotiques veineux. Nous confirmons qu'avec cette définition des valeurs normales, les D-dimères ont une très mauvaise spécificité.

A la phase d'induction, l'élévation des D-dimères est **multifactorielle**.

Dans notre travail, les taux élevés de D-dimères peuvent être dus à un **syndrome infectieux** (3 enfants sur 7 ayant des taux élevés).

Il est tentant de penser qu'un taux élevé de blastes entraîne des troubles de la coagulation plus importants. Mais, dans notre travail, les **taux élevés de blastes** au diagnostic ne semblent pas influencer sur l'élévation de D-dimères au début de l'induction.

Par ailleurs, les événements thrombotiques ne surviennent pas que chez les enfants aux taux de blastes les plus élevés (31200/mm³ pour VJ, 66000/mm³ pour CT contre 107 160/mm³ pour DS qui n'a pas eu de thrombose)

D'autre part, nous avons montré que les **taux de D-dimères ne sont pas corrélés aux taux de L-ASNase ($r^2 = 0,0338$)**.

De plus, pendant la phase d'induction, les taux de L-ASNase sont les mêmes que pendant la phase d'intensification où la plupart des taux de D-dimères sont très bas ; ce qui confirme l'absence de relation entre les taux de D-dimères et le taux de L-ASNase.

Enfin, les enfants qui ont présenté des taux moyens de L-ASNase élevés ne sont pas ceux qui ont connu des accidents thrombotiques.

Les taux de L-ASNase ne semble donc pas refléter son effet sur la coagulation et est indépendante des taux de D-dimères obtenus. Nos résultats contredisent les résultats de Nowak-Göttl et al qui retrouvaient que les plus hautes activités de L-ASNase étaient clairement associées à des D-dimères augmentés [18].

Ne pouvant donc pas utiliser les seuils de D-dimères calculés pour la MTEV chez les patients ambulatoires et comme cela a été proposé dans la grossesse, nous avons défini des seuils spécifiques à cette population en fonction de la phase de traitement. Nous avons d'une part établi des **seuils à chaque injection de L-ASNase par le calcul de M+2ET** et d'autre part, établi des seuils à partir de la construction des **courbes ROC à chaque phase de traitement**.

II.3. Utilisation des D-dimères dans les LAL de l'enfant traitée par asparaginase.

II.3.1. D-dimères comme marqueur prédictif :

Dans diverses situations cliniques (en particulier en post opératoire de chirurgie de hanche), il a été démontré que l'élévation des marqueurs d'activation de la coagulation tels que les D-dimères (ou TAT ou F1+2) peut indiquer un risque plus élevé de développer un accident thrombotique [83].

Dans cet esprit, le seuil optimal obtenu avec les courbes ROC en Asserachrom[®] (**4,9 µg/ml**) et en Liatest[®] (**5,7 µg/ml**) pour la phase d'induction représente la valeur au dessus de laquelle il existerait un **risque plus élevé de développer une thrombose**.

Les patients VF, CT, DS, VJ, et RM dépassent ce seuil sur une ou plusieurs injections avec les deux techniques. Trois d'entre eux vont présenter une thrombose ultérieurement. Cependant, ces taux élevés se situent dès les premières injections de L-ASNase ; ensuite ces taux baissent pour devenir très bas en fin d'induction (0,9 µg/ml pour VF ; 0,14 µg/ml pour VJ ; 0,11 µg/ml pour CT en Asserachrom[®] par exemple) comme pour d'autres enfants (en Asserachrom[®] : 0,19 µg/ml pour BO ; 0,06 µg/ml pour MJ...)

Le fait que ces D-dimères baissent au même niveau que les enfants n'ayant pas eu de thrombose va à l'encontre de leur utilisation comme reflet d'une hypercoagulabilité et donc comme facteur de risque de développer une thrombose.

Par ailleurs, l'intervalle de temps entre les valeurs élevées de D-dimères et la survenue des accidents thrombotiques peut être considérable : 20 jours pour CT ; 4 mois pour VJ et 5 mois pour VF.

Compte tenu de cette **élévation transitoire des D-dimères au début du traitement** et du **délai important** dans la survenue de la thrombose, on peut s'interroger sur la réalité de cette association entre D-dimères élevés et survenue de thrombose.

Par contre, il est important de noter que tous les enfants qui ont des **D-dimères inférieurs au seuil** établi par ROC (21/26) sont **indemnes de thrombose** pendant tout le traitement.

Malheureusement, les courbes ROC de notre étude ne sont construites qu'à partir de trois accidents thrombotiques. Il faudrait une population beaucoup plus importante et surtout plus d'événements pour obtenir une belle courbe comme *Figure 19* et donc un seuil plus fiable.

II.3.2. D-dimères comme marqueur d'exclusion de thrombose :

Dans notre étude, il est difficile d'évaluer la pertinence de ces seuils calculés à chaque injection de L-ASNase car deux événements thrombotiques sont survenus en dehors des phases d'induction et d'intensification.

Pendant la phase d'induction, étant donné qu'on ne relève aucun événement thrombotique, la sensibilité et la spécificité n'ont pu être évalués. Cependant, plus de la moitié des enfants ont des D-dimères supérieurs aux seuils à un moment de la phase et aucun ne présente de thrombose.

En revanche, pour un enfant (BV), une **suspicion d'embolie pulmonaire** en fin d'induction aurait pu être écartée au vu des résultats de D-dimères (0,35 µg/ml pour 1,003 µg/ml en Liatest[®] ; 0,2 µg/ml pour 0,454 µg/ml en Asserachrom[®]).

Pendant la phase d'intensification, les caractéristiques du test sont déterminées à partir d'un seul événement thrombotique qui, de plus, n'est pas contemporain du dosage des D-dimères (dosage 2 jours avant l'événement).

On peut noter cependant qu'il n'y a **aucun faux négatif avec les deux techniques**. La sensibilité, spécificité, VPN, VPP sont respectivement de **100%, 82%, 100%, 10%** pour l'Asserachrom[®] et de **100%, 74%, 100%, 7 %** respectivement pour le Liatest[®].

Bien que ces résultats semblent encourageants, ils ne sont basés que sur **trop peu d'accident thrombotique**. Il est nécessaire d'avoir un nombre de thromboses beaucoup plus important pour valider ces seuils.

De plus, on observe une **grande variation des seuils** d'une injection à l'autre (de 0,5 µg/ml à 1,5 µg/ml) avec une valeur très élevée (2,98 µg/ml en Asserachrom[®] ; 3,85 µg/ml en Liatest[®]) qui n'est pas expliquée.

II.3.3. Limites de l'étude:

➤ Événements thrombotiques insuffisants

Nous avons recensé **3 événements thrombotiques** dont 2 ont eu lieu **en dehors des phases** d'induction et d'intensification. Un seul accident est survenu pendant l'intensification, aucun pendant l'induction.

Nos calculs de seuil et l'interprétation des résultats ne sont basés que sur 3 événements ce qui est largement insuffisant pour obtenir des conclusions satisfaisantes.

➤ Thromboses asymptomatiques

L'étude PARKAA [30] a évalué la prévalence des thromboses en effectuant à tous les enfants des phlébographies, IRM à la fin de leur traitement par L-ASNase. La prévalence des thromboses obtenue est de 36,7% (seulement 5% de thromboses symptomatiques) ce qui est nettement supérieure aux taux fournis par les autres études (5 à 10%)

Dans notre étude, seules les thromboses symptomatiques ont pu être évaluées, ce qui pourrait constituer un **biais** à notre travail puisque nous avons établi les seuils sur une population d'enfants sans diagnostic de thrombose.

Ceci pourrait expliquer certains seuils aberrants, obtenus au cours de l'induction et liés à des taux élevés de D-dimères obtenus chez certains enfants (GC, HA) sans explication clinique. Une thrombose asymptomatique ne peut être éliminée chez ces patients.

➤ Thrombose artérielle

Nous avons inclus la thrombose artérielle dans le nombre d'accident thrombotique.

Les D-dimères ne font pas partie des facteurs de risque pour développer une thrombose artérielle bien que certains travaux tentent de les utiliser comme marqueur prédictif d'un événement ischémique chez des patients à risque.

Dans notre étude, l'enfant ayant présenté un AVC a présenté des D-dimères élevés au cours des deux phases mais les données ne sont pas suffisantes pour établir un lien entre ces D-dimères élevés et la survenue de cet événement thrombotique.

CONCLUSION

La chimiothérapie combinée pour le traitement des LAL de l'enfant incluant la L-ASNase a permis d'augmenter le taux de survie sans événement à 5 ans à 70%. Parmi les effets secondaires liés au traitement, les événements thrombotiques associés à la L-ASNase occupent une place importante. Des marqueurs biologiques sont nécessaires pour aider au diagnostic ou pour déterminer des patients à risque afin d'initier un traitement prophylactique. Les D-dimères sont actuellement utilisés avec la valeur seuil de 0,5 µg/ml pour l'exclusion de thrombose chez le sujet ambulatoire. Par ailleurs, de nombreuses études sont menées dans diverses situations cliniques pour utiliser ce marqueur qui semble susciter beaucoup d'espoir.

Nous avons mené cette étude pour évaluer l'intérêt des D-dimères dans le diagnostic de thrombose des enfants atteints de LAL et traités par L-ASNase.

Compte tenu des taux élevés de D-dimères pour la plupart des enfants, il est nécessaire de réévaluer des seuils adaptés à ce contexte précis.

Même avec de nouveaux seuils dans ce contexte de LAL, l'utilisation des D-dimères comme marqueur d'exclusion de thrombose veineuse semble illusoire du fait de sa trop mauvaise spécificité. En effet, plus de la moitié des enfants ont au moins un dosage supérieur aux seuils pendant l'induction sans qu'aucun événement thrombotique ne soit survenu.

En outre, ceux-ci sont calculés à partir d'enfants n'ayant pas présenté de thrombose symptomatique ; or, une étude a montré la part non négligeable de thromboses asymptomatiques ce qui apporte un biais important à la valeur de ces seuils.

Un marqueur prédictif permettant de déterminer des groupes d'enfants à risque est plus intéressant dans ce contexte puisque notre étude montrent que les thromboses ont lieu même en dehors des injections de L-ASNase (c'est à dire en dehors d'un suivi clinique et biologique plus rapproché). L'établissement de courbes ROC a permis l'obtention d'une valeur seuil avec une bonne sensibilité et une bonne spécificité. Les résultats semblent encourageants puisque 3/5 enfants ayant eu des D-dimères supérieurs à ce seuil au début de l'induction ont présenté une thrombose. En revanche, le délai dans lequel surviennent ces thromboses n'est pas maîtrisé (20 jours, 4 mois, 5 mois). De plus, une évaluation plus précise de ce seuil est nécessaire : avec seulement 3 accidents, la détermination avec certitude d'une valeur seuil est impossible.

Au total, les D-dimères représentaient un espoir dans la prédiction d'une thrombose chez les enfants atteints de LAL et traités par L-ASNase, mais compte tenu des résultats de l'étude, leur utilisation apporte peu car ce contexte clinique contribue par trop de facteurs (hémopathie, chimiothérapie, syndrome infectieux) à leur élévation.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

1. Ettinger, L., A. Ettinger, and V. Avramis, *Acute lymphoblastic leukemia - a guide to asparaginase and pegaspargase therapy*. Biopharmaceuticals, 1997. **7(1)**: p. 30-9.
2. Harrousseau, J. and M. Leporrier, *Aspects cliniques et thérapeutiques des leucémies aiguës*. Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, 1991.
3. Athale., U.H. and A.K. Chan., *Thrombosis in children with acute lymphoblastic leukemia. Part II. Pathogenesis of thrombosis in children with acute lymphoblastic leukemia: effects of the disease and therapy*. Thrombosis Research, 2003.
4. Mitchell, L., et al., *Increased endogenous thrombin generation in children with acute lymphoblastic leukemia: risk of thrombotic complications in L-asparaginase-induced antithrombin III deficiency*. Blood, 1994. **83**: p. 386-91.
5. Andrew, M., L. Brooker, and L. Mitchell, *Acquired antithrombin III deficiency secondary to asparaginase therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Blood Coagul Fibrinolysis, 1994. **5(1)**: p. S24-36.
6. Sutherland, D.E., I.C. Weit, and H.A. Liebman, *Thromboembolic complications of cancer: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment*. Am J Hematol, 2003. **72**: p. 43-52.
7. Mitchell, L., A. Sutor, and M. Andrew, *Hemostasis in childhood acute lymphoblastic leukemia: coagulopathy induced by disease and treatment*. Semin. Thromb. Haemostas., 1995. **21**: p. 390-401.
8. Broome, J., *Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects*. Nature, 1961. **191**: p. 1114-1115.
9. Müller, H., R. Beier, and J. Casimiro da Palma, *PEG-asparaginase (Oncaspar) 2500 U/m² BSA in reinduction and relapse treatment in the ALL/NHL-BFM protocols*. Springer-Verlag, 2001. **49(2)**: p. 149-54.
10. Killander, D., A. Dohlwitz, and L. Engstedt, *Hypersensitivity reactions and antibody formation during L-asparaginase treatment of children and adults with acute leukemia*. Cancer, 1976. **37**: p. 220.
11. Campbell, H. and L. Mashburn, *L-asparaginase EC-2 from Escherichia coli. Some substrate specificity characteristics*. Biochemistry, 1969. **9**: p. 3768-3775.
12. Mashburn, L. and J. Wriston, *Tumor inhibitory effect of L-asparaginase from Escherichia coli*. Arch Biochem Biophys, 1964. **105**: p. 451.
13. Müller, H. and J. Boos, *Use of L-asparaginase in childhood ALL*. Oncology Hematology, 1998. **28**: p. 97-113.

14. Nowak-Göttl, U., E. Ahlke, and K. Klösel, *Changes in coagulation and fibrinolysis in childhood acute lymphoblastic leukemia re-induction therapy using three different asparaginase preparations*. Eur J Pediatr, 1997. **156**: p. 848-850.
15. Albertsen, B., H. Schröder, and J. Ingerslev, *Comparison of intramuscular therapy with Erwinia asparaginase and asparaginase Medas: pharmacokinetics, pharmacodynamics, formation of antibodies and influence on the coagulation system*. Br J Haematol, 2001. **115**: p. 983-990.
16. Mitchell, L., J. Halton, and P. Vegh, *Effect of disease and chemotherapy on hemostasis in children with acute lymphoid leukemia*. Am J Pediatr Hematol/Oncol, 1993. **16(2)**: p. 120-6.
17. Nowak-Göttl, U., E. Ahlke, and P. Scgulze-Westhoff, *Changes in coagulation and fibrinolysis in childhood ALL: a two-step dose reduction of one E coli asparaginase preparation*. Br J Haematol, 1996. **95**: p. 123-6.
18. Nowak-Göttl, U., et al., *Influence of two different E coli asparaginase preparations on fibrinolytic proteins in childhood ALL*. Haematologica, 1996. **81**: p. 127-31.
19. Semeraro, N., et al., *Unbalanced coagulation-fibrinolysis potential during L-asparaginase therapy in children with acute lymphoblastic leukaemia*. Thromb. Haemost., 1990. **64(1)**: p. 38-40.
20. Jane, S., L. Hau, and H. Salem, *Extracts from malignant tissue reduce thrombomodulin expression on cultured human endothelial cells*. Haematol Rev, 1991. **5**: p. 85-95.
21. Nowak-Göttl, U., et al., *Thromboembolic events in children with acute lymphoblastic leukemia (BFM protocols): prednisone versus dexamethasone administration*. Blood, 2003. **101**: p. 2529-33.
22. Pui, C., et al., *Altered von Willebrand factor molecule in children with thrombosis following asparaginase-prednisone-vincristine therapy for leukemia*. J. Clin. Oncol., 1985. **3(9)**: p. 1266-72.
23. Miniero, R., et al., *L-asparaginase-induced coagulopathy in children with acute lymphoblastic leukaemia*. Drugs Exp. Clin. Res., 1987. **13(6)**: p. 377-9.
24. Leone, G., et al., *Evidence of a hypercoagulable state in patients with acute lymphoblastic leukemia treated with low dose of E. coli L-asparaginase: a GIMEMA study*. Thromb. Haemost., 1993. **69(1)**: p. 12-15.

25. Nowak-Göttl, U., J. Boos, and J. Wolff, *Influence of two different E. coli asparaginase preparations on coagulation and fibrinolysis: a randomised trial*. Fibrinolysis, 1994. **8**: p. S66-8.
26. Nowak-Göttl, U., et al., *Prospective evaluation of the thrombotic risk in children with acute lymphoblastic leukemia carrying the MTHFR TT 677 genotype, the prothrombin G20210A variant, and further prothrombotic risk factors*. Blood, 1999. **5**: p. 1595-99.
27. Sutor, A., V. Mall, and K. Thomas, *Bleeding and thrombosis in children with acute lymphoblastic leukemia, treated according to the ALL-BFM-90 protocol*. Klin. Padiatr., 1999. **211(4)**: p. 201-4.
28. Mauz-Körlhoz, C., et al., *Prothrombotic risk factors in children with acute lymphoblastic leukemia treated with delayed E.coli asparaginase (COALL-92 and 97 protocols)*. Thromb. Haemost., 2000. **83**: p. 840-3.
29. Attarbaschi, A., et al., *Effects of dose-reduced Medac L-asparaginase on coagulation in trial ALL-BFM 2000*. Klin. Padiatr., 2003. **215**: p. 321-326.
30. Mitchell, M., *A prospective cohort study determining the prevalence of thrombotic events in children with acute lymphoblastic leukemia and a central venous line who are treated with L-asparaginase*. Cancer, 2003. **97(2)**: p. 508-516.
31. Athale, U. and A. Chan, *Thrombosis in children with acute lymphoblastic leukemia. Part I. Epidemiology of thrombosis in children with acute lymphoblastic leukemia*. Thrombosis Research, 2003: p. 125-131.
32. Trzeciak, M. and M. Denninger, *L'Hémostase en question*, ed. Biomérieux. 2004.
33. Mossesson, M., *Fibrin polymerization and its regulatory role in haemostasis*. J. Lab. Clin. Med, 1990. **116**: p. 8-17.
34. Kimura, S. and N. Aoki, *Cross-linking site in fibrinogen for alpha2 antiplasmin inhibitor*. Journal. Biol. Chem., 1979. **261**: p. 15591-95.
35. Hogg, P. and C. Jackson, *Fibrin monomer protects thrombin from inactivation by heparin-antithrombin III: implications for heparin efficacy*. Proc. Natl. Acad. Sci., 1989. **86**: p. 3619-23.
36. Porte, R., et al., *Systemic effect of tissue plasminogen activator associated fibrinolysis and the relation with thrombin generation in orthopic liver transplantation*. Transplant., 1989. **47**: p. 978-984.
37. Tagnon, H., W. Whitmore, and N.R. Shulman, *Fibrinolysis in metastatic cancer of the prostate*. Cancer, 1952. **5**: p. 9-12.

38. Collen, D. and H. Lijnen, *Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis*. Blood, 1991. **78**: p. 3114-24.
39. Francis, C. and V. Marder, *Physiologic regulation and pathologic disorders of fibrinolysis*. Haemostasis and Thrombosis, 1994. **18(3)**: p. 263-74.
40. Francis, C., V.J. Marder, and G.H. Barlow, *Plasmic degradation of cross-link fibrin. Characterization of new macromoleculaire soluble complexes and a model of their structure*. J. Clin. Invest., 1980. **66**: p. 1033-43.
41. Marder, V., A. Budzynski, and G. Barlow, *Comparaison of the physicochemical properties of fragment D derivatives of fibrinogen and fragment D-D of cross-link fibrin*. Biochim. Biophys. Acta., 1976. **427**: p. 1-14.
42. Laaban, J., A. Achkar, and M. Horellou, *Intérêt du dosage des D-dimères plasmatiques dans le diagnostic des accidents thrombo-emboliques veineux*. Rev. Mal. Resp., 1997. **14**: p. 119-127.
43. Sampol, J., D. Arnoux, and B. Boutière, *Manuel d'Hémostase*. Collection Option Bio, ed. Elsevier. 1995.
44. Gaffney, P. and M. Brasher, *Subunit structure of the plasmin-induced degradation products of cross-linked fibrin*. Biochim. Biophys. Acta., 1973. **295**: p. 308-13.
45. Lecourvoisier, C. and P. Toulon, *Intérêt des dosages des D-dimères dans le diagnostic d'exclusion de l'embolie pulmonaire*. Ann. Biol. Clin., 2001: p. 693-700.
46. Reber, G., F. Boehlen, and P. de Moerloose, *D-Dimères et diagnostic d'exclusion de la maladie thromboembolique veineuse*. Hématologie, 1996. **2**: p. 479-84.
47. Bioforma, ed. *Hémostase et Thrombose*. ed. C.d.F.B. Médicale. Vol. 20. 2000.
48. de Moerloose, P., et al., *Contribution of a new, rapid, individual and quantitative automated D-dimer ELISA to exclude pulmonary embolism*. Thromb. Haemost., 1996. **75(1)**: p. 11-3.
49. Dale, S., et al., *Comparison of three D-Dimer assays for the diagnostics of DVT: ELISA, latex and an immunofiltration assay (Nycocard D-Dimer)*. Thromb. Haemost., 1994. **71(3)**: p. 270-4.
50. Hein-Rasmussen, R., C. Tuxen, and N. Wiinberg, *Diagnostic value of the Nycocard, Nycomed D-Dimer assay for the diagnosis of deep venous thrombosis and pulmonary embolism: a retrospective study*. Thromb. Res., 2000. **100(4)**: p. 287-92.
51. Freyburger, G., et al., *D-dimer strategy in thrombosis exclusion--a gold standard study in 100 patients suspected of deep venous thrombosis or pulmonary embolism: 8 DD methods compared*. Thromb. Haemost., 1998. **79(1)**: p. 32-7.

52. Houbouyan-Reveillard, L., et al., *Preliminary evaluation of two new rapid immunoturbidimetric D-dimer assays in patients with clinically suspected venous thromboembolism*. *Thromb. Haemost.*, 2000. **84(5)**: p. 770-4.
53. Oger, E., et al., *Evaluation of a new, rapid, and quantitative D-Dimer test in patients with suspected pulmonary embolism*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998. **158**: p. 65-70.
54. Reber, G., et al., *Performances of a new, rapid and automated microlatex D-dimer assay for the exclusion of pulmonary embolism in symptomatic outpatients*. *Thromb. Haemost.*, 1998. **80(4)**: p. 719-20.
55. Bounameaux, H., et al., *Diagnostic value of plasma D-Dimer in suspected pulmonary embolism*. *Lancet*, 1988. **II**: p. 628-9.
56. Quinn, D., et al., *D-Dimers in the diagnosis of pulmonary embolism*. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1999. **159**: p. 1445-49.
57. Schutgens, R.E., et al., *The usefulness of five D-dimer assays in the exclusion of deep venous thrombosis*. *J Thromb Haemost*, 2003. **1(5)**: p. 976-81.
58. Gosselin, R., et al., *Comparison of six D-dimer methods in patients suspected of deep vein thrombosis*. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2003. **14(6)**: p. 545-550.
59. D'Angelo, A., et al., *Evaluation of a new rapid quantitative D-dimer assay in patients with clinically suspected deep vein thrombosis*. *Thromb. Haemost.*, 1996. **75(3)**: p. 412-6.
60. Larsen, T.B., et al., *Validity of D-dimer tests in the diagnosis of deep vein thrombosis: a prospective comparative study of three quantitative assays*. *J Intern Med*, 2002. **252(1)**: p. 36-40.
61. Boneu, B., et al., *D-dimers, thrombin-anti-thrombin III complexes and prothrombin fragments 1+2: Diagnostic value in clinically suspected deep vein thrombosis*. *Thromb. Haemost.*, 1991. **65**: p. 28-31.
62. Siragusa, S., et al., *A rapid D-dimer assay in patients presenting at the emergency room with suspected acute venous thrombosis: accuracy and relation to clinical variables*. *Haematologica*, 2001. **86(8)**: p. 856-61.
63. van Beek, E., et al., *A comparative analysis of D-dimer assays in patients with clinically suspected pulmonary embolism*. *Thromb. Haemost.*, 1993. **70**: p. 408-13.
64. Villa, P., et al., *Quantification of D-dimer using a new fully automated assay: its application for the diagnosis of deep vein thrombosis*. *Haematologica*, 2000. **85(5)**: p. 520-4.

65. Meyer, G., et al., *Diagnostic value of two rapid and individual D-dimer assays in patients with clinically suspected pulmonary embolism: comparison with microplate enzymz-linked immunosorbent assay*. Blood Coagul Fibrinolysis, 1998. **9**: p. 603-8.
66. Werber, G., et al., *Asparaginase activities in vitro are highly sensitive to different buffer conditions*. Acute Leukemias, 1997. **VI**: p. 512-16.
67. Perrier, A., et al., *D-dimer testing for suspected pulmonary embolism in outpatients*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **156**: p. 492-96.
68. Carrat, F., *Décider entre plusieurs méthodes diagnostiques: sensibilité, valeurs prédictives, rapport de vraisemblance et courbes ROC*. Sang Thrombose Vaisseaux, 1998. **10**: p. 50-5.
69. Girardel, J., *Nouveautés en hémostase: D-Dimères automatisés. Premiers résultats d'une étude multicentrique du collège d'hématologie des hôpitaux*. Revue Française de Laboratoires, 1999(312): p. 109-112.
70. Duet, M., et al., *A new quantitative D-Dimer assay appropriate in emergency: reliability of assay for pulmonary embolism exclusion diagnosis*. Thrombosis Research, 1998. **91**: p. 1-5.
71. Nowak-Göttl, U., et al., *Inhibition of hypercoagulation by antithrombin substitution in E.coli L-asparaginase-treated children*. Eur J Hematol, 1996. **56**: p. 35-38.
72. Gugliotta, L. and A. D'Angelo, *Hypercoagulability during L-asparaginase treatment: the effect of antithrombin III supplementation in vivo*. British Journal of Haematology, 1990. **74**: p. 465-470.
73. Lesley, G., A. Mitchell, and A. Sutor, *Hemostasis in childhood acute lymphoblastic leukemia: coagulopathy induced by disease and treatment*. Semin. Thromb. Haemostas., 1995. **21**: p. 390-401.
74. Escoffre-Barbe, M., et al., *Evaluation of a new rapid D-Dimer assay for clinically suspected deep venous thrombosis (Liatest D-Dimer)*. Coagulation, 1997. **109**: p. 748-53.
75. Bucek, R., et al., *Algorithms for the diagnosis of deep-vein thrombosis in patients with low clinical pretest probability*. Thromb. Res., 2002. **105**: p. 43-47.
76. Bounameaux, H., et al., *Plasma measurement of D-Dimer as diagnostic aid in suspected venous thromboembolism: an overview*. Thromb. Haemost., 1994. **71**: p. 1-6.
77. Bounameaux, H., et al., *Measurement of plasma D-Dimer for diagnosis of deep venous thrombosis*. Am J Clin Pathol, 1989. **91**: p. 82-5.

78. Prisco, D., et al., *D-dimer in the year 2000: current data and new perspectives*. Ann. Ital. Med. Int., 2000. **15(4)**: p. 267-72.
79. Bayes-Genis, A., et al., *D-Dimer is an early diagnostic marker of coronary ischemia in patients with chest pain*. Am Heart J., 2000. **140(3)**: p. 379-84.
80. Cortellaro, M., et al., *Increased fibrin turnover and high PAI-1 activity as predictors of ischemic events in atherosclerotic patients. A case-control study. The PLAT Group*. Arterioscler Thromb, 1993. **13(10)**: p. 1412-7.
81. Bombeli, T., P. Raddatz-Mueller, and J. Fehr, *Evaluation of an optimal dose of low-molecular-weight heparin for thromboprophylaxis in pregnant women at risk of thrombosis using coagulation activation markers*. Haemostasis, 2001. **31**: p. 90-98.
82. Bellart, J., et al., *Fibrinolysis changes in normal pregnancy*. J Perinat Med., 1997. **25(4)**: p. 368-72.
83. Bombeli, T., P. Raddatz-Mueller, and J. Fehr, *Coagulation activation markers do not correlate with the clinical risk of thrombosis in pregnant women*. Am J Obstet Gynecol., 2001. **184(3)**: p. 382-9.
84. Stone, S., et al., *Longitudinal evaluation of markers of endothelial cell dysfunction and hemostasis in treated antiphospholipid syndrome in healthy pregnancy*. Am J Obstet Gynecol., 2003. **188(2)**: p. 454-60.
85. Athale, U. and A. Chan, *Thrombosis in children with acute lymphoblastic leukemia. Part II. Pathogenesis of thrombosis in children with acute lymphoblastic leukemia: effects of the disease and therapy*. Thrombosis Research, 2003. **111(4-5)**: p. 199-212.
86. Toksöz, H., et al., *The effect of short course high dose methylprednisolon therapy on fibrinogen level in children with acute lymphoblastic leukemia. A preliminary study*. Leukemia Research, 2003.
87. Nowak-Göttl, U., et al., *Enhanced thrombin generation, P-Von Willebrand, P-Fibrin D-Dimer and P-Plasminogen activator Inhibitor 1: Predictive for venous thrombosis in asparaginase-treated children*. Fibrinolysis, 1994. **8**: p. 63-65.

Nom – Prénom : LE BOLZER Hélène

Titre de la thèse : Intérêt du suivi des D-dimères pour le diagnostic de thrombose au cours du traitement par L-asparaginase des LAL de l'enfant.

Résumé de la Thèse:

La chimiothérapie des LAL de l'enfant incluant la L-asparaginase, associée aux effets de la maladie, aux infections et éventuellement aux facteurs héréditaires entraîne un état d'hypercoagulabilité. Chez ces enfants à risque thromboembolique élevé, il n'existe à l'heure actuelle aucun marqueur biologique capable de prédire ou d'aider au diagnostic de thrombose.

Dans le cadre du protocole FRALLE 2000, les D-dimères ont été dosés chez 26 enfants au cours de leur phase d'induction et d'intensification. Trois événements thrombotiques sont survenus chez trois enfants: deux thromboses veineuses et une thrombose artérielle. Nous avons évalué les D-dimères soit comme marqueur d'exclusion en déterminant des seuils à chaque injection de L-asparaginase, soit comme marqueur prédictif de survenue de thrombose en calculant un seuil pour chaque phase. Mais notre étude reste limitée par le nombre insuffisant d'événement thrombotique et comporte des biais comme l'existence possible de thromboses infra-cliniques.

En pratique, les D-dimères ne peuvent être utilisés comme marqueur d'exclusion du fait de leur mauvaise spécificité, ni comme marqueur prédictif du fait de leur élévation transitoire en début de traitement et du délai non maîtrisé de survenue de l'accident.

MOTS CLES :

D-DIMERES THROMBOSE LAL L-ASPARAGINASE

JURY :

**PRESIDENT : Mme le Professeur Berthe-Marie IMBERT
Faculté de Pharmacie de Nantes**

**ASSESEURS : M. le Docteur Marc TROSSAËRT
Laboratoire d'Hémostase/ CRTH, CHU de Nantes
Mme le Docteur Françoise MECHINAUD
Service d'Oncologie Pédiatrique, CHU de Nantes
M. le Professeur Hervé AVET-LOISEAU,
Faculté de Médecine de Nantes**

Adresse de l'auteur : 101, av De Gaulle , 44380 PORNICHE