

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu devant le jury interrégional

Le 01 octobre 2018

Par Anne-Sophie OUTTIER

Conformément aux dispositions du Décret n° 2012-172 du 3 février

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**Hémostase primaire et saignements chez les
patients sous Extracorporeal Membrane
Oxygenation (ECMO) au CHU de Rennes**

Président : Madame le Professeur Berthe-Marie IMBERT

Directrice de Thèse : Madame le Docteur Fabienne NEDELEC

Assesseurs : Monsieur le Professeur Thierry FEST

Madame le Docteur Isabelle GOUIN

Monsieur le Docteur Antoine ROISNE

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le **Professeur Berthe-Marie Imbert**, Professeur des Universités de Pharmacie de Nantes, Chef de service du laboratoire de Virologie du CHU de Nantes, qui me fait l'honneur de se déplacer depuis Nantes pour présider ce jury.

Mes remerciements vont également au **Professeur Thierry Fest**, Professeur des Universités de Médecine de Rennes, Chef de service du laboratoire d'hématologie du CHU Pontchaillou de Rennes. Merci d'avoir accepté de porter votre regard sur ce travail en participant à ce jury.

J'adresse toute ma reconnaissance au **Docteur Fabienne Nedelec**, Praticien hospitalier au laboratoire d'hémostase du CHU de Rennes, qui a accepté de diriger ce travail, pour le temps qu'elle y a consacré, pour le soutien qu'elle m'a apporté, pour sa disponibilité et son engouement. Et qui me fait l'honneur de participer à ce jury.

Au **Docteur Isabelle Guoin**, MCU-PH au laboratoire d'hémostase du CHU de Rennes, Pour son regard pertinent et constructif lors de l'élaboration de ce travail et les connaissances transmises lors de mon passage dans le service d'hémostase.

Je remercie également le **Docteur Antoine Roisne**, Praticien hospitalier dans le service de réanimation CTCV du CHU Pontchaillou de Rennes, pour son dynamisme et son implication, qui me fait l'honneur de participer à ce jury.

Je voudrais remercier les **techniciens du laboratoire d'hémostase** de l'hôpital Pontchaillou pour leur accueil et leur implication dans ce travail.

Merci à **Estelle Le Pabic**, biostatisticienne au CHU de Rennes, pour ses compétences précieuses lors de la réalisation de l'étude statistique, et sa disponibilité.

Cette thèse n'aurait pu aboutir sans l'aide du **service de réanimation CTCV** de l'hôpital Pontchaillou et du **service de réanimation médicale et chirurgicale**.

Merci aux différents laboratoires qui m'ont accueillie tout au long de mon internat, à Nantes et à Rennes, et m'ont fait découvrir les différentes facettes du métier de biologiste.

A l'équipe d'immuno-hématologie de l'EFS de Nantes, pour leur accueil, leur sympathie et leur enseignement lors de mon passage.

A l'équipe du HLA de l'EFS de Rennes, avec lesquels j'ai eu grand plaisir à travailler.

A l'équipe d'hémostase de Rennes, Fabienne Nedelec, Isabelle Gouin, Pierre Guéret, Benoît Guillet, Sophie Bayart.

A l'équipe du laboratoire de Vannes, qui m'ouvre ses portes actuellement et dont j'apprécie au quotidien le dynamisme et la bonne humeur.

Aux différentes équipes lilloises qui m'ont accueillies lors de mon externat et m'ont donné goût à la biologie et à l'hématologie. A Céline, Hélène, Alice pour toutes ces années d'étude et les bons souvenirs de TP, de cours d'anglais ou de pique-niques à la fac passés en votre compagnie.

Et à tous les enseignants, qui depuis le plus jeune âge, m'ont transmis leur passion pour les sciences, tout particulièrement aux professeurs qui m'ont orientée vers la pharmacie.

A mes co-internes et amis, de Nantes et de Rennes, Steve, Emilie, Justine, Julie, Youri, Anna, Bénédicte, Maryam, Coralie, Mathilde, Caroline, Edouard, Marion, les Juliettes, Zahida...et tous ceux que j'ai croisés et appréciés durant ces 4 années.

A mes frères et belles-sœurs préférés et leurs petits.

A mes parents, tout particulièrement, sans qui rien de tout cela n'aurait été possible, merci pour votre aide durant mes études, vos conseils, votre écoute et votre soutien (vos bras aussi pour les déménagements). Toujours présents, jamais pesants...ne changez rien.

Et bien sûr un immense merci à Matthieu, sans qui tout serait différent, merci pour ta confiance, ton soutien, (ton support informatique), merci à toi tout simplement.

Liste des abréviations

AT : Antithrombine

AVWS : Acquired von Willebrand syndrome

CEC : Circulation extra-corporelle

CGR : Concentrés de globules rouges (érythrocytaires)

ECLS : Extracorporeal life support

ECMO : Extracorporeal membrane oxygenation

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

ELSO registry : Extracorporeal Life Support Organization's registry

FT : Facteur tissulaire

HBPM : Héparine de bas poids moléculaire

HNF : Héparine non fractionnée

MHPM : Multimères de haut poids moléculaire

NET : Neutrophil extracellular trap

ROTEM : Rotational thromboelastography

SDRA : Syndrome de détresse respiratoire aigüe

SOFA : Sequential Organ Failure Assessment

TCA : Temps de céphaline avec activateur

TFPI : Tissue factor pathway inhibitor

VV ECMO : ECMO veino-veineuse

VA ECMO : ECMO veino-artérielle

PPP : Plasma pauvre en plaquettes

PRP : Plasma riche en plaquettes

PSL : Produits sanguins labiles

SIRS : systemic inflammatory response syndrome

VAD : Ventricular assist device

VWF : Facteur Von Willebrand

VWF:CB : Capacité de liaison du facteur Willebrand au collagène

VWF:RCO : Activité cofacteur de la ristocétine du Facteur Von Willebrand

Table des matières

Introduction	10
Généralités	12
I- Généralités sur l'ECMO	13
1. Principe de l'ECMO	13
2. Rappels historiques	13
3. Aspects techniques de l'ECMO : circuit et matériel	15
3.1. La pompe centrifuge	15
3.2. L'oxygénateur	17
3.3. Les canules	18
4. Différentes voies d'abord	18
4.1. ECMO veino-artérielle (VA)	19
4.2. ECMO veino-veineuse (VV)	20
5. Epidémiologie et indications de l'ECMO	21
6. Complications de l'ECMO	23
7. Risque thrombotique de l'ECMO	25
8. Stratégies d'anticoagulation sous ECMO	27
II- Complications hémorragiques sous ECMO	29
1. Hémorragies sous ECMO : état des lieux	29
2. Hypothèses étiologiques des hémorragies sous ECMO	31
2.1. Hémorragies liées à des anomalies de l'hémostase primaire	32
a) Rappels physiologiques concernant l'hémostase primaire	32
b) Facteur Von Willebrand (VWF) et ECMO	35
Rappels concernant le Facteur Von Willebrand	35
Diagnostic du syndrome de Willebrand acquis : méthode	39
Dosage antigénique du facteur Willebrand VWF:Ag	39
VWF activité cofacteur de la ristocétine (VWF:RCo)	39
Etude de la capacité de liaison du facteur Willebrand au collagène (VWF :CB)	39
Syndrome de Willebrand acquis sous ECMO	41
c) Anomalies plaquettaires sous ECMO	47
Etude plaquettaire : méthode	47
Thrombopénie sous ECMO	50
Transfusion plaquettaire sous ECMO	51

Thrombopathie sous ECMO	52
2.2. Hémorragies liées à des anomalies de la coagulation	56
a) Rappels physiologiques concernant la coagulation	56
b) Anomalies de la coagulation sous ECMO	57
2.3. Fibrinolyse	61
a) Physiologie de la fibrinolyse	61
b) Hyperfibrinolyse sous ECMO	61
3. Prise en charge des saignements sous ECMO	62
Etude prospective	63
ABSTRACT	64
INTRODUCTION	65
MATERIALS AND METHODS	65
RESULTS	67
DISCUSSION	72
CONCLUSION	75
Conclusion	76
Références bibliographiques	78

Liste des tableaux et figures

Figure 1 : Evolution du nombre de cas d'ECMO rapportés à l'ELSO et du nombre de centres membres au niveau mondial (ELSO report 2016).....	14
Figure 2 : Evolution du nombre de patients placés sous ECMO au CHU de Rennes depuis 2005.....	14
Figure 3 : exemple de circuit d'ECMO. (D'après Mosier et al. (1)).....	15
Figure 4 : Schéma d'une pompe centrifuge (Guide ECLS et ECMO, 2010 (4)).....	16
Figure 5 : Oxygénateur (Guide ECLS et ECMO, 2010) (4).....	17
Figure 6 : Différents types de circuits d'ECMO.	18
Figure 7 : ECMO VA périphériques : différentes voies d'abord (A) fémoral (B) fémoro-axillaire (C) fémoro-carotidienne (d'après Journal of Thoracic Disease, 2015).....	19
Figure 8 : Photographie d'une ECMO périphérique artério-veineuse avec canule de reperfusion artérielle du membre inférieur (JLE, Septembre 2012, Hôpital Européen Georges Pompidou).....	20
Figure 9 : ECMO VV : différentes voies d'abord (A) drainage fémoral et reperfusion jugulaire droite.....	20
Figure 10 : Evolutions des indications d'ECMO (ELSO report 2016).....	22
Figure 11 : Thrombose d'une de la tête d'une pompe centrifuge (B) (Sources of Circuit Thrombosis in Pediatric Extracorporeal Membrane Oxygenation, 2017).....	26
Figure 12 : Composition histologique des thrombi formés lors de l'ECMO.....	26
Figure 13 : Effets potentiels de l'ECMO sur l'activation de la coagulation.....	31
Figure 14 : Schéma récapitulatif de l'hémostase primaire (issu de Molecular mechanisms of platelet activation, Gachet, 2014) (34).....	34
Figure 15 : schéma récapitulatif de l'adhésion et agrégation plaquettaire lors de l'hémostase primaire (adapté de la revue de Demertzis et al, 2016) (35).....	34
Figure 16 : Structure de la sous-unité de VWF mature et ses ligands associés (Fressinaud, 2014, d'après Zhou et al 2012).....	35
Figure 17 : Représentation du clivage des multimères « ultra-larges » du facteur Willebrand par ADAMTS13, issu de « Thrombotic microangiopathies », NEJM, 2002 (38).....	36
Figure 18 : Modifications conformationnelles du Facteur Willebrand par les forces de cisaillement (Microscopie à force atomique), Siedlecki et al, Blood,1996 (39).....	37
Figure 19 : Distribution des multimères de VWF par électrophorèse. Perte des multimères de haut poids moléculaire sous ECMO et normalisation après décharge de l'ECMO. Profil proche du contrôle atteint de VWD de type 2. (Murphy et al. 2015).....	42
Figure 20 : Représentation du flux sanguin physiologique, artériolaire et veineux avec les forces de cisaillement associées (d'après (34)).....	45
Figure 21 : Schéma d'une plaquette activée avec ses différents récepteurs et voies de signalisation (34).....	48
Figure 22 : Représentation schématique de l'étude des glycoprotéines plaquettaires par cytométrie en flux.....	49
Figure 23 : schéma récapitulatif de la coagulation (d'après https://www.levenmethemofilie.be/fr/hemophilie).....	57

Tableau 1 : Comparaison des deux types de pompes utilisées au CHU de Rennes : Rotaflow et Medos	17
Tableau 2 : Survie globale des patients sous ECMO depuis 1989 (d'après ELSO registry, janvier 2017)	23
Tableau 3 : Effets indésirables de l'ECMO chez l'adulte, selon l'indication (respiratoire ou cardiaque) (ELSO international summary, janvier 2017)	24
Tableau 4 : Complications thrombotiques rapportées lors de l'ECMO chez l'adulte, selon l'indication (respiratoire ou cardiaque) (ELSO international summary, janvier 2017)	25
Tableau 5 : Récapitulatif des articles étudiant les anomalies du facteur Willebrand sous ECMO	44

Introduction

L'Extracorporeal Membrane Oxygenation (ECMO) est une technique d'assistance cardio-respiratoire en pleine expansion. Au cours des détresses respiratoires aiguës (SDRA), elle permet, via une oxygénation sanguine extra-pulmonaire, la limitation des lésions barotraumatiques liées à la ventilation mécanique de poumons à la compliance altérée. Dans les chocs cardiogéniques réfractaires aux traitements conventionnels, elle permet le maintien d'une perfusion tissulaire satisfaisante dans l'attente d'une récupération myocardique ou d'une transplantation cardiaque.

Les complications hémorragiques des patients sous ECMO sont les complications les plus fréquentes et sont responsables d'une morbi-mortalité non négligeable. L'origine de ces hémorragies est multifactorielle : hémorragies liées à la chirurgie, mais également propres à l'ECMO et aux phénomènes mécaniques liés au contact du sang avec le matériel. Le développement d'anomalies de l'hémostase primaire et de la coagulation pourrait expliquer en partie l'origine de ces hémorragies.

Cependant, malgré les publications récentes sur l'effet de l'ECMO sur l'hémostase, notamment en pédiatrie et néonatalogie, les anomalies de l'hémostase primaire sont encore imparfaitement connues. Une meilleure connaissance de ces phénomènes pourrait aider les cliniciens dans le choix des traitements à utiliser pour enrayer les saignements.

Le but de cette thèse est d'étudier l'hémostase primaire chez les patients sous ECMO, et plus particulièrement les anomalies du facteur Willebrand et des plaquettes ainsi que les saignements des patients sous différents systèmes d'ECMO.

Dans un premier temps, nous effectuerons un état des lieux bibliographique des hémorragies sous ECMO avec les étiologies déjà explorées et leurs conséquences. Puis, dans un deuxième temps, sera détaillée notre étude prospective monocentrique, menée sur 31 patients de l'hôpital Pontchaillou, placés sous ECMO entre novembre 2016 et juin 2018, pour lesquels a été recherché un syndrome de Willebrand acquis, avec parallèlement une évaluation des fonctions plaquettaires pour 21 d'entre eux et une description des données cliniques relatives aux saignements, afin de comparer deux pompes d'ECMO aux vitesses de rotation différentes.

Généralités

I- Généralités sur l'ECMO

1. Principe de l'ECMO

L'Extracorporeal Membrane Oxygenation (ECMO) est une technique d'assistance cardio-respiratoire, dérivée des circuits de circulation extra-corporelle. Elle est utilisée depuis maintenant une cinquantaine d'années dans les dysfonctions cardiorespiratoires gravissimes où les traitements conventionnels ont échoué. Cette assistance circulatoire mécanique externe est longtemps restée cantonnée au bloc opératoire mais les progrès techniques de ces dernières décennies ont fait s'étendre considérablement son utilisation. Sa durée de pose s'est notamment allongée à plusieurs jours voire plusieurs semaines, en attendant une récupération fonctionnelle ou la mise en place d'une solution plus durable (de type chirurgie réparatrice, greffe pulmonaire ou cardiaque ou assistance ventriculaire de longue durée). Pour mieux refléter la double fonction de suppléance cardiaque et respiratoire, certains préfèrent la nommer extracorporeal life support (ECLS). Par définition, l'ECLS au sens strict est forcément artério-veineuse (cf *infra*).

2. Rappels historiques

L'idée de suppléance cœur-poumon et de la circulation extracorporelle n'est pas nouvelle et l'américain John H. Gibbon s'y attèle dès les années 1930. Le 6 mai 1953, à Philadelphie, Gibbon utilise sa machine cœur-poumon lors de la fermeture d'une communication interauriculaire chez une jeune femme de 18 ans. La première réussite d'ECMO est décrite par l'équipe de Hill en 1972 (1).

En 1976, Bartlett décrit la première utilisation, avec succès, d'une ECMO chez un nouveau-né. Les résultats encourageants chez les nouveau-nés engendrent alors une utilisation grandissante en néonatalogie. Par la suite, plusieurs études rétrospectives, monocentriques, non randomisées, menées dans les années 1990 et au début des années 2000 mettent en évidence le bénéfice clinique de l'ECMO chez l'adulte. Devant la contradiction entre études prospectives et rétrospectives, une grande étude randomisée nommée CESAR est menée en Grande-Bretagne entre 2001 et 2006. Lors de la publication des premiers résultats en 2008, un bénéfice significatif en termes de survie des patients sous ECMO est montré par rapport aux stratégies conventionnelles avec une réduction de l'occurrence du critère combiné

décès ou invalidité sévère à six mois dans le groupe ECMO (risque relatif = 0,69 ; 95 % IC, 0,05—0,97) (2).

Le développement de l'utilisation du procédé se poursuit ensuite avec les améliorations techniques des différents circuits d'ECMO, engendrant une expansion de son utilisation, comme le montrent les données de l'ELSO (3) et du CHU de Rennes (figures 1 et 2).

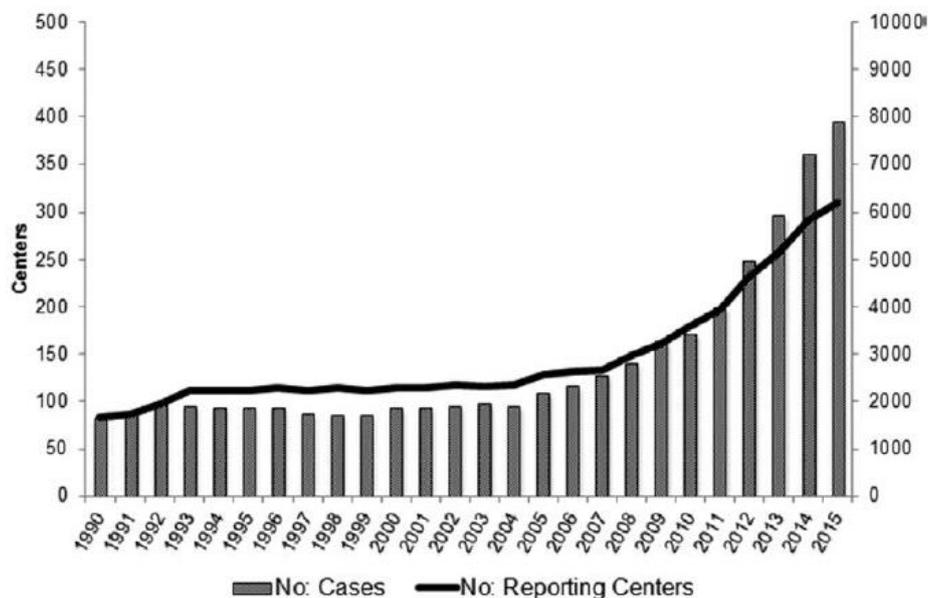


Figure 1 : Evolution du nombre de cas d'ECMO rapportés à l'ELSO et du nombre de centres membres au niveau mondial (ELSO report 2016)

Evolution du nombre de patients sous ECMO au CHU de Rennes

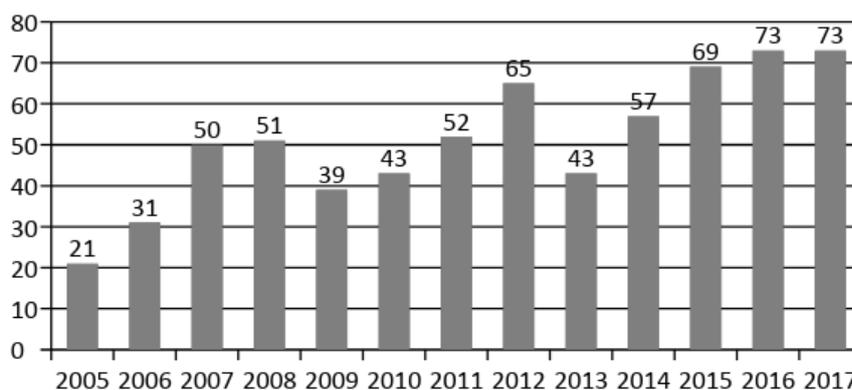


Figure 2 : Evolution du nombre de patients placés sous ECMO au CHU de Rennes depuis 2005

3. Aspects techniques de l'ECMO : circuit et matériel

Dérivée des principes de la circulation extra-corporelle (CEC), l'ECMO intègre une pompe, un oxygénateur et un circuit paracorporel relié au patient par deux canules : une pour le drainage du sang et l'autre pour la réinjection (figure 3).

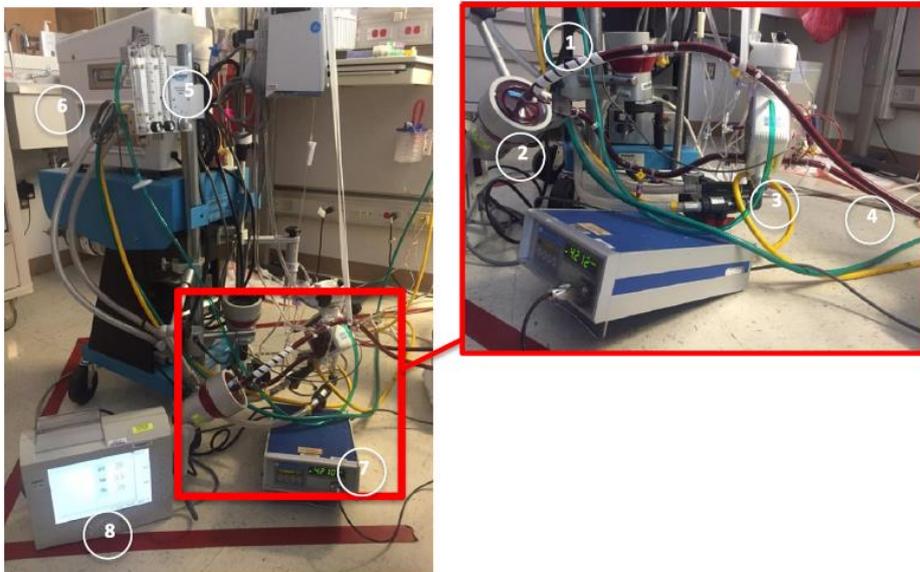


Figure 3 : exemple de circuit d'ECMO. (D'après Mosier et al. (1))

Le circuit débute par la canule de drainage veineux (1). Le sang est propulsé par le gradient de pression généré par la pompe centrifuge (2) et passe à travers l'oxygénateur (3). Le sang retourne, via une canule, dans le système artériel ou veineux selon le type d'ECMO (4). Les échanges gazeux sont régulés par le débit de gaz et la Fi O₂ (5) et le sang est réchauffé par un thermorégulateur (6). Le débit, le taux d'hémoglobine, l'hématocrite et la saturation en oxygène sont contrôlés directement sur le circuit ((7) et (8))

3.1. La pompe centrifuge

La pompe a pour but de suppléer totalement ou d'assister le cœur. Les pompes utilisées dans l'ECMO sont non-occlusives à la différence des pompes à galets utilisées pour les CEC au bloc, posées pour de beaucoup plus courtes durées. Le sang pénètre au centre de la pompe et est accéléré de façon centrifuge par rotation de la turbine (figure 4). Les pompes non occlusives présentent comme avantage une absence de stagnation sanguine, moins de forces de cisaillement donc moins d'hémolyse, et un désamorçage et arrêt immédiat en présence d'air, ce qui diminue le risque d'embolie gazeuse en cas de décanulation veineuse (4).

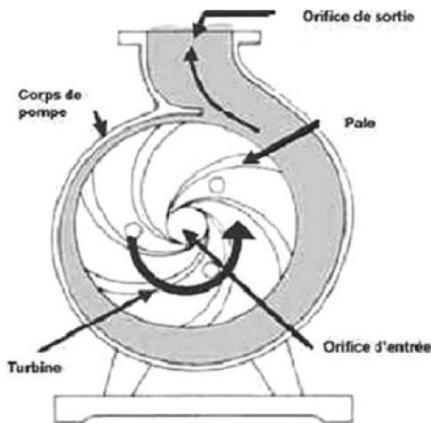


Figure 4 : Schéma d'une pompe centrifuge (Guide ECLS et ECMO, 2010 (4))

La pompe délivre un débit continu entre 4 et 5 L/min. Elle permet de diminuer la précharge des cavités cardiaques droite et gauche, diminue le débit sanguin pulmonaire et donc cardiaque. Elle supplée de façon efficace à la fonction de pompe du cœur défaillant tout en améliorant la perfusion coronarienne, contribuant à la récupération myocardique.

La circulation sanguine est cependant normalement pulsatile, générée par une pompe cardiaque qui présente une systole et une diastole. Les ECMO AV, du fait d'une décharge droite et gauche complète, génèrent un flux circulatoire systémique majoritairement continu. Physiologiquement, les données en cours vont dans le sens d'une meilleure micro-circulation avec un flux pulsatile. Cependant, par extrapolation des données des pompes implantées chez les patients insuffisants cardiaques, les pompes à flux continu étaient connues pour augmenter la survie sans évènement (AVC, remplacement de la pompe) à deux ans, avec une fonction hépatique et rénale comparable (5,6). Dans l'ECMO VV, la perfusion systémique reposant sur la fonction cardiaque native, le flux est pulsatile.

Deux types de pompes pour ECMO sont utilisées au CHU de Rennes, les pompes Rotaflow de chez Maquet® (Getinge®, USA) dont les vitesses de rotation atteignent les 5000 tours/min et les pompes Medos Xenios® (Germany) dont les vitesses de rotation atteignent jusqu'à 10 000 tours/min. Les caractéristiques de ces deux types de pompes sont résumées dans le tableau 1.

	Pompe Rotaflow (Maquet®)	Pompe Medos (Xenios®) DP3
Vitesse de rotation - résolution - précision	0 à 5000 tours/min 1 tours/min ± 20 tours/min	100 à 10000 tours/min
Volume d'écoulement - résolution - précision de 0 à 1 L/min de 1 à 9.99 L/min	0 à 9.99 L/min 0.01L/min 0.07 L/min + dérive 7% + dérive	0 à 8L/min
Conditions environnementales - température - humidité - pression	17 à 40°C 30 à 75% 87 à 106 kPa	NR
Diamètre du rotor	50 mm	NR
Surface	190 cm ²	NR
Volume d'amorçage	32 mL	16 mL
Connecteurs	3 à 8 inch	3 à 8 inch

Tableau 1 : Comparaison des deux types de pompes utilisées au CHU de Rennes : Rotaflow et Medos

3.2. L'oxygénateur

L'oxygénateur (figure 5), placé après la pompe, est composé d'une membrane percée de micropores, reproduisant artificiellement la fonction de la membrane alvéolocapillaire pulmonaire. Il permet les échanges gazeux (oxygénation et décarboxylation) par diffusion. Sa durée de vie optimale se situe autour de 21 jours. La résistance hémodynamique liée à l'oxygénateur est faible et un débit élevé est donc possible.



Figure 5 : Oxygénateur (Guide ECLS et ECMO, 2010) (4)

3.3. Les canules

Les canules initialement utilisées étaient rigides, peu souples et non implantables en percutané. Elles ont été à l'origine de nombreuses complications mécaniques lors de leur pose et retrait (rupture vasculaire...). Les matériaux utilisés ont évolué et leur biocompatibilité améliorée, simulant un endothélium naturel, ce qui a permis de diminuer l'inflammation et l'anticoagulation. De plus, elles peuvent être recouvertes d'un revêtement hépariné (de type DURAFLO®). Des études actuelles testent des polymères incorporant par exemple de l'oxyde nitrique afin de réduire l'activation plaquettaire et le risque de thrombose. L'extrémité profilée des canules permet un abord en percutané et des spires métalliques évitent leur couture. Le choix des canules dépend du site d'implantation de l'ECMO, le diamètre des canules étant adapté à leur longueur (loi de Poiseuille). Le diamètre minimal des canules est défini de façon à pouvoir assurer un débit proche du débit théorique du patient (250 mL/French) (4).

4. Différentes voies d'abord

On distingue deux types d'ECMO, l'ECMO veino-artérielle (VA) et l'ECMO veino-veineuse (VV) (figure 6) (7).

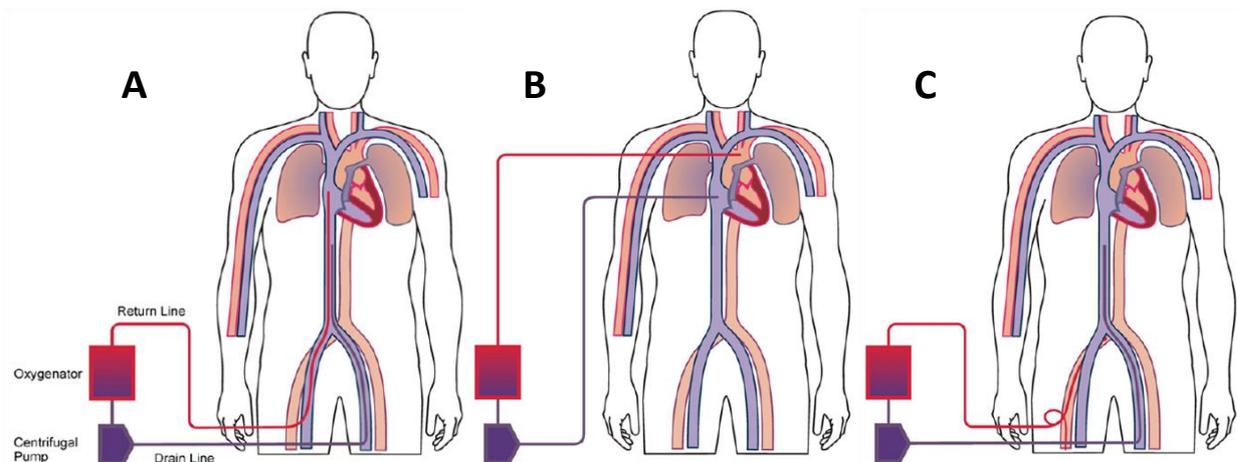


Figure 6 : Différents types de circuits d'ECMO.

A : ECMO VV avec approche bifémorale. **B :** ECMO VA centrale. **C :** ECMO VA périphérique (adapté d'après Murphy et al, 2015)

4.1. ECMO veino-artérielle (VA)

L'ECMO veino-artérielle (VA) est utilisée pour suppléer une défaillance myocardique ou une défaillance cardio-respiratoire combinée. L'ECMO VA peut être soit centrale, soit périphérique. Le choix entre ces deux types d'implantation dépend du patient mais aussi du centre hospitalier.

ECMO VA centrale

Dans l'ECMO VA centrale, les canules sont insérées directement via thoracotomie dans l'oreillette droite pour le drainage et dans l'aorte proximale ascendante pour la perfusion. Cela permet d'obtenir un flux antérograde au niveau des troncs supra-aortiques, et limiter le phénomène de flux compétitif en cas d'amélioration de la fonction myocardique (figure 6).

ECMO VA périphérique

Dans l'ECMO VA périphérique, les canules de drainage sont insérées dans la veine cave via la veine fémorale ou jugulaire et la reperfusion a lieu dans l'aorte distale via l'artère fémorale ou dans l'aorte ascendante via la carotide ou l'artère axillaire (8) (figure 7). Le problème de drainage par voie fémorale est l'obturation de l'artère fémorale par l'important diamètre de la canule utilisée. Il est donc systématiquement inséré un cathéter de reperfusion entre la canule artérielle et la fémorale superficielle du membre inférieur considéré pour maintenir sa perfusion (figure 8). La pression artérielle résulte du débit de l'ECMO, du débit cardiaque résiduel et du tonus vasculaire.

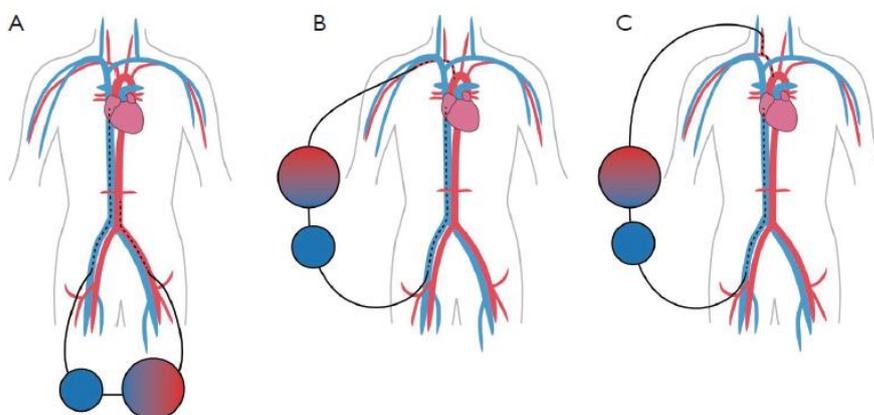


Figure 7 : ECMO VA périphériques : différentes voies d'abord (A) fémoral (B) fémoro-axillaire (C) fémoro-carotidienne (d'après Journal of Thoracic Disease, 2015)

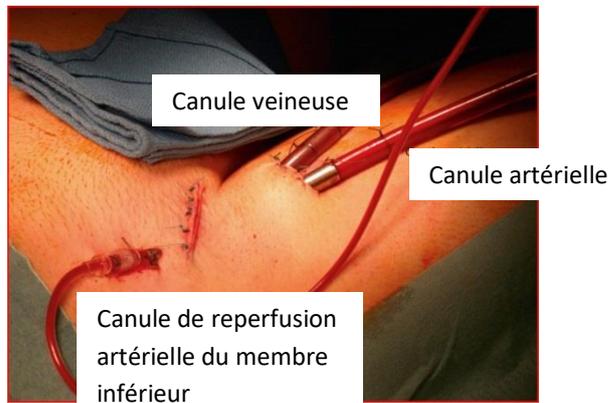


Figure 8 : Photographie d'une ECMO périphérique artério-veineuse avec canule de reperfusion artérielle du membre inférieur (JLE, Septembre 2012, Hôpital Européen Georges Pompidou)

4.2. ECMO veino-veineuse (VV)

L'ECMO veino-veineuse (VV), ou ECMO respiratoire, assure une suppléance uniquement pulmonaire, le cœur assurant toujours son rôle hémodynamique. Elle trouve ses indications dans les syndromes de détresse respiratoire aigüe (SDRA) réfractaire et a connu une recrudescence d'utilisation lors de l'épidémie de grippe AH1N1 (9).

Le drainage s'effectue soit par la veine jugulaire interne droite soit par la veine fémorale. La réinjection veineuse du sang épuré en CO₂ et enrichi en O₂ se fait dans la veine fémorale controlatérale (ou depuis récemment dans la veine jugulaire interne droite grâce aux canules à double courant) (figure 9).

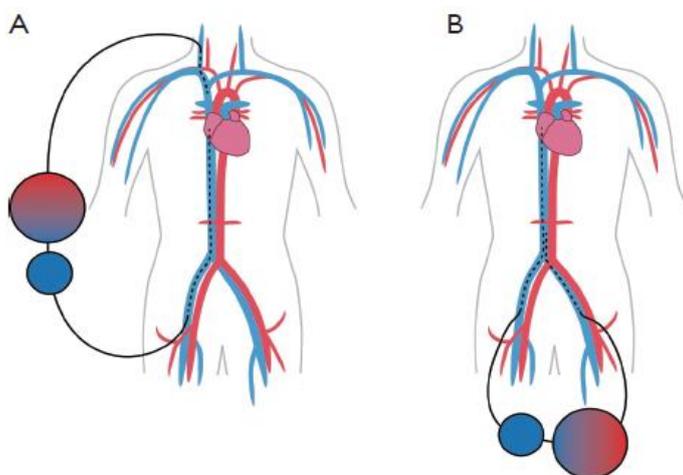


Figure 9 : ECMO VV : différentes voies d'abord (A) drainage fémoral et reperfusion jugulaire droite (B) abord fémoro-fémoral (d'après Journal of Thoracic Disease, 2015)

5. Epidémiologie et indications de l'ECMO

Dès 1989, un registre mondial collectant les données des patients placés sous ECMO a été créé, nommé ELSO registry (Extracorporeal Life Support Organization's registry). L'ELSO publie régulièrement les données collectées pour aider à l'amélioration de la prise en charge et la connaissance de l'ECMO. Le dernier rapport de juillet 2016, publié en janvier 2017 (3), fait état de 78 397 patients placés sous ECMO depuis la création du registre en 1989, avec pour la seule année 2015, 7901 patients dans le monde. Le volume d'ECMO réalisées ainsi que le nombre de centres membres de l'ELSO sont en augmentation (figure 1).

La survie globale lors du retrait d'ECMO est de 70% et chute à 58% à la sortie d'hospitalisation sur l'ensemble de ces données. Les chiffres de survie par tranche d'âge et par indication sont présentés dans le tableau 2. Les indications de pose d'ECMO ont évolué ces dernières années, avec une diminution des indications en néonatalogie (< 30 jours), et une nette augmentation des indications cardiaques et respiratoires chez l'adulte (figure 10).

▪ Néonatalogie

Les indications en néonatalogie sont principalement respiratoires : syndrome d'aspiration méconiale, hypertension pulmonaire persistante, hernie diaphragmatique congénitale, syndrome de détresse respiratoire aiguë du nourrisson.

▪ Pédiatrie

Dans la population pédiatrique, les indications respiratoires sont notamment infectieuses (pneumonies...). Les indications cardiaques incluent les anomalies cardiaques congénitales, chocs cardiogéniques et les cardiomyopathies.

▪ Adultes

Indications cardiaques

Les différentes indications cardiaques sont :

- la dysfonction primaire d'un greffon cardiaque
- un échec de sevrage de la circulation extra-corporelle (CEC) en post opératoire (pontage, transplantation, chirurgie valvulaire)
- un choc cardiogénique réfractaire suite à une insuffisance cardiaque engageant le pronostic vital, secondaire à un infarctus du myocarde ou à une myocardite fulminante, une intoxication aiguë par cardiotoxiques...

Indications respiratoires

Dans la population adulte, les indications respiratoires sont en pleine augmentation (âge > 18 ans) avec une utilisation prépondérante de l'ECMO VV par rapport à l'ECMO VA.

Les défaillances respiratoires à l'origine de l'introduction d'une ECMO VV sont :

- un SDRA (syndrome de détresse respiratoire aigüe) suite à une grippe par exemple
- une pneumopathie d'inhalation, une obstruction des voies aériennes distales
- en attente d'une greffe pulmonaire
- suite à une hémorragie pulmonaire massive

▪ ECPR (extracorporeal cardiopulmonary resuscitation)

L'ECMO est aussi utilisée pour la réanimation de l'arrêt cardio-respiratoire réfractaire, intrahospitalier, si l'évènement a lieu devant témoin, indication qui représente 17% des cas pédiatriques et 14% des cas adultes. La survie sans atteinte neurologique dépend notamment de la qualité de la réanimation mise en place avant l'ECMO. Cependant, l'amélioration des technologies d'ECMO et de leur mobilité ont fait augmenter l'utilisation de l'ECMO dans cette indication.

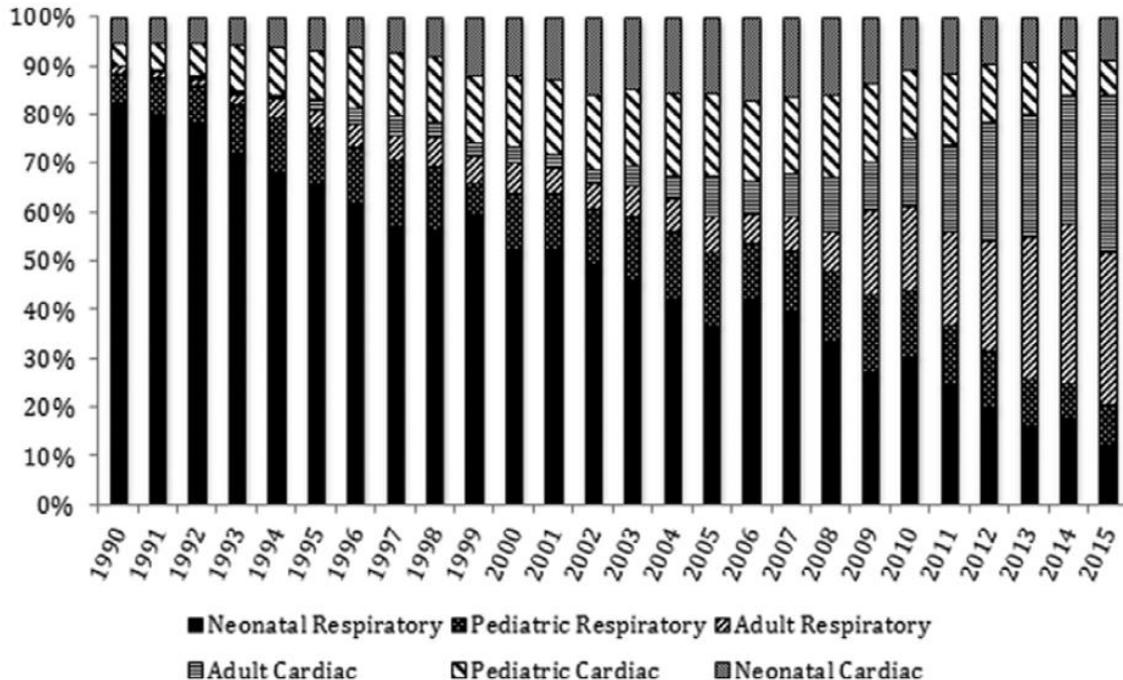


Figure 10 : Evolutions des indications d'ECMO (ELSO report 2016)

Population et indication	Nombre d'ECMO implantées	Survie à la décharge (%)	Survie à la sortie d'hospitalisation ou au transfert
Néonatalogie			
Pulmonaire	29153	84%	74%
Cardiaque	6475	62%	42%
ECPR	1336	64%	41%
Pédiatrie			
Pulmonaire	7552	67%	58%
Cardiaque	8374	67%	51%
ECPR	2996	55%	41%
Adultes			
Pulmonaire	10601	66%	58%
Cardiaque	9025	56%	41%
ECPR	2885	39%	29%
Total	78397	70%	58%

Tableau 2 : Survie globale des patients sous ECMO depuis 1989 (d'après ELSO registry, janvier 2017)

6. Complications de l'ECMO

Les complications liées à une assistance cardio-respiratoire de type ECMO sont encore nombreuses et souvent graves, ce qui implique une prise en charge de ces patients par des équipes expérimentées. Les indications s'étendent à des patients de plus en plus critiques, ce qui engendre une mortalité croissante sous ECMO, non liée au dispositif mais à la population de patients sélectionnés (10).

Les complications lors de la pose de l'ECMO peuvent être liées au patient, de par ses antécédents artéritiques notamment ou son anatomie. Elles peuvent aussi être liées au dispositif d'ECMO, avec par exemple des hémorragies au niveau des sites de canulation.

Au cours de l'assistance sous ECMO, les complications peuvent être :

- **Mécaniques** : présence de caillots ou de dépôts de fibrine dans le circuit, présence d'air dans le circuit, fissure des connecteurs ou rupture de canule, débit insuffisant, dysfonctionnement de la membrane, défaillance de la pompe...
- **Hémorragiques** : au niveau des canules, hémorragies pulmonaires, intracrâniennes, gastro-intestinales... (*cf. partie II*)
- **Thrombotiques** : ischémie du membre inférieur, embolies systémiques... (*cf. infra*)

- **Infectieuses** : L'ECMO peut se compliquer d'infections, liées au dispositif (cellulite autour du site d'implantation des canules périphériques, médiastinite en cas d'ECMO centrale), ou entrant dans le cadre des infections post-opératoires acquises en réanimation (pneumopathies acquises sous ventilation mécanique, infection sur cathéter, infections urinaires...). Ces infections sont facilitées par l'installation d'une immunodépression liée au SIRS. Elles sont souvent difficiles à diagnostiquer, d'autant plus que le circuit est thermostaté ce qui empêche la détection du fébricule. Le diagnostic d'une infection peut être crucial pour établir les critères d'éligibilité à la transplantation.
- **Neurologiques** : Elles sont dominées par les accidents vasculaires cérébraux (AVC) hémorragiques qui sont souvent mortels. Les autres complications neurologiques sont les AVC ischémiques, les embolies gazeuses et les crises d'épilepsie.
- **Rénales** : insuffisance rénale aiguë nécessitant une hémodialyse chez environ 50% des patients. L'état de choc cardiogénique pré-implantation et le SIRS secondaire sont responsables d'une baisse du débit de filtration glomérulaire. Les variations de débit de l'ECMO peuvent aggraver l'insuffisance rénale (11).

Complications	% rapportés dans indications cardiaques	% rapportés dans indications respiratoires
Mécaniques (pompe, thrombus ou air dans le circuit, problème de canule...)	27,9%	40,7%
Hémorragies	60%	48,3%
Gastro-intestinales	4,4%	5,9%
Site de canulation	17,5%	12,5%
Site chirurgical	19,2%	10%
CIVD	3,5%	3,2%
Pulmonaires	2,8%	5,8%
SNC	2,1%	3,7%
Tamponnades par hémopéricarde	5%	1,5%
Neurologiques	11,7%	9,4%
Infarctus SNC	3,8%	2%
Rénales	69,3%	62,5%
Cardiovasculaires (inotropes, arythmie, HTA)	87,1%	62%
Infections	14,2%	19,1%

Tableau 3 : Effets indésirables de l'ECMO chez l'adulte, selon l'indication (respiratoire ou cardiaque) (ELSO international summary, janvier 2017)

7. Risque thrombotique de l'ECMO

Le risque thrombotique sous ECMO est difficilement quantifiable. En effet, les complications thrombotiques déclarées sont le plus souvent celles ayant eu un impact sur la prise en charge du patient. Des autopsies des patients décédés sous ECMO confirment que l'observation clinique des patients sous-estime les thromboses, avec l'observation chez 32% d'entre eux, de thrombose veineuse sans signe clinique associé (12).

L'incidence des thromboses sous ECMO varie donc entre 3,2 et 22% selon les études, qu'elles soient veineuses ou artérielles (13). Leur localisation est variable, mais elles sont majoritairement rapportées au niveau de l'oxygénateur (tableau 4).

Localisations des thrombi	Indications cardiaques	Indications respiratoires
Thombus dans l'oxygénateur	8,2%	13,4%
Thrombus dans le filtre	1,1%	0,8%
Autres localisations	6,3%	6,7%
Total	15,6%	20,9%

Tableau 4 : Complications thrombotiques rapportées lors de l'ECMO chez l'adulte, selon l'indication (respiratoire ou cardiaque) (ELSO international summary, janvier 2017)

L'ECMO entraîne un contact prolongé entre le sang et des surfaces étrangères non-endothéliales aboutissant à un état d'hypercoagulabilité et à une activation fibrinolytique ainsi qu'à une réponse inflammatoire. L'ECMO regroupe donc toutes les conditions de la formation de thrombus de la triade de Virchow : stase sanguine (notamment au niveau des connexions de tubulures, de l'oxygénateur), hypercoagulabilité, et endothélium non physiologique.

Chez les patients sous ECMO VA, avec peu ou pas de fonction cardiaque native, une stase sanguine peut s'installer dans la circulation pulmonaire ainsi que dans le cœur, ce qui peut conduire à la génération de thromboses. Une thrombose intra-cardiaque complique 0,8 à 6,3% des ECMO (14).

Une soudaine diminution de pression post-oxygénateur peut révéler la thrombose. Les thromboses des circuits nécessitent des interventions comme le changement du circuit ou de l'oxygénateur.

Les thromboses de pompe sont rares mais dangereuses et moins facilement détectables. En effet, l'oxygénateur peut être facilement inspecté tandis que la pompe n'est pas accessible (15) (figure 12). Cependant, un thrombus au niveau de la pompe va engendrer une hémolyse intravasculaire franche et une hémoglobinurie repérable cliniquement.

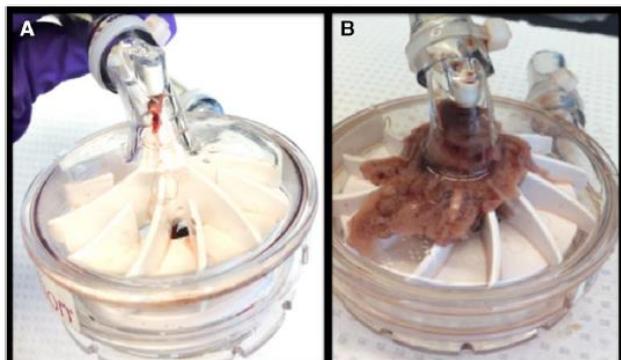


Figure 11 : Thrombose d'une de la tête d'une pompe centrifuge (B) (Sources of Circuit Thrombosis in Pediatric Extracorporeal Membrane Oxygenation, 2017)

Histologiquement, les thrombi formés dans les circuits d'ECMO sont majoritairement composés de fibrine, et remplis de globules rouges (15). Les plaquettes sont très peu présentes (figure 12).

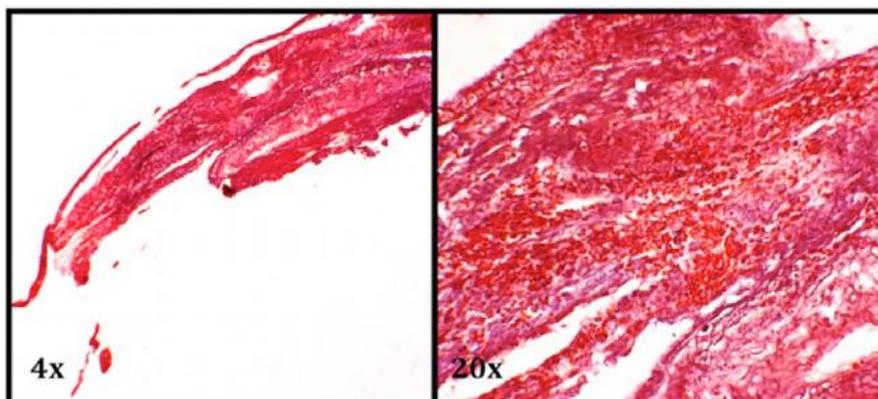


Figure 12 : Composition histologique des thrombi formés lors de l'ECMO.

Coupes colorées par la coloration de Carstairs, qui colore les globules rouges en jaune, la fibrine en rouge et les plaquettes en bleu marine. Ces caillots sont donc majoritairement composés de fibrine et de globules rouges. (Sources of Circuit Thrombosis in Pediatric Extracorporeal Membrane Oxygenation, 2017)

La vitesse du flux et les forces de cisaillement jouent un rôle important dans la formation des caillots. En effet, les zones thrombotiques correspondent à des zones de faible flux, <50/s tandis que des forces de cisaillement supérieures à 450/sec engendrent un risque de thrombinoformation très faible ($p < 0,05$) (15).

Une des limites majeures de l'héparine, dans ce contexte, est son incapacité à inactiver la thrombine liée à la fibrine ou à la surface des biomatériaux et donc à prévenir la propagation du caillot dans le circuit. L'amélioration des circuits d'ECMO, en diminuant le nombre de jonctions et de variations de diamètre des canules, permettrait de diminuer le risque thrombotique. Idéalement, les zones de très hautes forces de cisaillement devraient être limitées puisqu'elles entraînent une hémolyse (>40,000/s) et l'activation des plaquettes (>10,000/s), ce qui majore le risque thrombotique

Une incidence accrue d'évènements thrombo-emboliques veineux, d'ischémies mésentériques ou d'AVC est rapportée après l'explantation du système d'ECMO (16). Une étude allemande suggère une surveillance des paramètres de l'hémostase primaire (VWF:Ag et numération plaquettaire) après explantation et un maintien de l'anticoagulation jusqu'à leur normalisation (17).

8. Stratégies d'anticoagulation sous ECMO

Les thromboses sont rarement fatales, mais nécessitent parfois le remplacement du circuit ou de la membrane de l'oxygénateur, chez des patients souvent très fragiles. Les hémorragies liées à l'ECMO peuvent, quant à elles, être gravissimes. La balance risque thrombotique/risque hémorragique doit donc toujours être évaluée, particulièrement sous ECMO.

L'anticoagulation couramment employée est l'héparine non fractionnée (HNF). Une enquête auprès de 166 centres d'ECMO montre qu'une anticoagulation autre que l'HNF n'est employée que 9% du temps (18). L'HNF est accessible dans tous les centres, dosable par l'activité anti-Xa et son effet est réversible grâce à la protamine. Cependant aucune standardisation des protocoles n'est actuellement déployée à l'échelle internationale et le monitoring de l'anticoagulation est également variable d'un centre à l'autre. L'Extracorporeal Life Support Organisation a publié en 2014 des recommandations spécifiques (19).

Afin de minimiser le risque hémorragique sous ECMO, des études ont été menées chez des patients placés sous ECMO sans anticoagulation. Dans une étude de 32 patients sous ECMO VA, aucune complication hémorragique ou neurologique n'est retrouvée, avec seulement deux patients présentant une thrombose veineuse profonde et deux patients présentant des thrombi intracardiaques détectés à l'échocardiographie (20).

Parallèlement à l'anticoagulation systémique, l'amélioration des circuits d'ECMO a permis le développement de circuits coatés par héparine, phosphocholine, polyméthacrylate, ce qui permet de diminuer l'inflammation et l'activation de la coagulation (21).

Le monitoring de l'anticoagulation est majoritairement basé sur l'activité anti-Xa et l'activated clotting time. L'utilité de la thromboélastographie et du ROTEM (rotational thromboelastography) chez les patients sous ECMO n'a pas encore été clairement démontrée (22,23).

L'activité de l'héparine variant en fonction du taux d'antithrombine, une mesure de ce facteur est parfois nécessaire afin de ne pas méconnaître un déficit qui compromettrait l'anticoagulation. Certains centres ont même initiés des protocoles d'injection d'antithrombine systématiquement, avec maintien d'un taux à 100% avant l'introduction de l'héparine, avec des résultats probants en termes de diminution des complications aussi bien thrombotiques qu'hémorragiques (24). La supplémentation en antithrombine s'est alors largement répandue (25). Son usage est maintenant remis en cause par certains centres devant le manque de preuve d'efficacité et d'innocuité et son coût important (26).

D'autres anticoagulants (danaparoiide, argatroban et lepirudine) agissant directement sur la thrombine sont disponibles et ont été testés chez des patients sous ECMO présentant une thrombopénie induite par l'héparine (TIH) (27). Le principal inconvénient de ces molécules est l'absence d'antidote, rendant tout surdosage ou toute hémorragie difficile à gérer.

II- Complications hémorragiques sous ECMO

1. Hémorragies sous ECMO : état des lieux

Les saignements sont une complication majeure sous ECMO et sont responsables d'une importante morbi-mortalité. Selon l'ELSO, les complications hémorragiques de tous types représentent 48,3% des complications de l'ECMO dans ses indications respiratoires, et 60% des complications de l'ECMO dans ses indications cardiaques (tableau 3)(28).

Une méta-analyse de 2016 de l'ECLS Working Group on Thrombosis and Hemostasis (29) retrouve 56,1% d'évènements hémorragiques graves sur une cohorte de 132 patients, avec une incidence des saignements très supérieure dans les ECMO VA (68,5%) par rapport aux ECMO VV (39,1%). Il est également montré une nette augmentation de l'incidence des évènements hémorragiques en post-cardiotomie par rapport aux autres indications (74.4% vs 48.4%). Cela peut s'expliquer par le risque de saignements liés à la chirurgie.

Les saignements sous ECMO sont majoritairement retrouvés au niveau du site chirurgical et des canules selon l'ELSO. Dans une étude brestoise sur 149 ECMO, 37% des saignements se situent au niveau des canules, 17% de saignements sous la forme d'hémothorax, et 16% au niveau de la sphère ORL (30). Dans cette étude, comme dans le registre ELSO, les hémorragies cérébrales sont rares (2,2%), mais toujours fatales.

Dans les séries australiennes et néo-zélandaises de grippe H1N1 avec ECMO VV, les saignements représentaient la première cause de mortalité sous ECMO (71% des décès). Les hémorragies intracrâniennes étaient la cause de 6 décès sur 10 (9).

Les patients présentant un saignement sous ECMO montrent également une diminution de survie de 40% en pédiatrie (RR = 0,59 [95% IC (0,53-0,66)] (31).

Les patients présentant des hémorragies graves sous ECMO semblent être plus souvent des hommes (68,9% vs 51,7%), plus âgés (52 ans vs 43 ans en moyenne) présentant une hypertension artérielle chronique (58,1% vs 37,9%), en choc post cardiotomie (39,2% vs 15,5%), avec une ECMO centrale (35,1% vs 12,1%) et veino-artérielle (50,0 vs 29,3%) ($p < 0,05$) (29). Ces patients ont un nadir plaquettaire durant l'ECMO inférieur aux patients non hémorragiques et une durée d'ECMO statistiquement plus longue (moyenne de 9 jours

vs 5 jours) (29). Il semble aussi que les patients hémodialysés ou avec un score SOFA élevé aient un risque hémorragique augmenté (30)

Dans l'étude brestoise, l'occurrence d'un évènement hémorragique sévère n'est pas corrélée à la mortalité sous ECMO mais l'association « transfusion de CGR et mortalité » est bien démontrée (OR 1,03) (29). La transfusion de CGR chez les patients sous ECMO VA et la transfusion plaquettaire sous ECMO VV ont été identifiés comme facteur de risque indépendant de mortalité hospitalière (32).

Les saignements représentent également la cause la plus fréquente d'explantation prématurée d'ECMO, et sont donc un frein majeur à son efficacité (33).

2. Hypothèses étiologiques des hémorragies sous ECMO

Les causes des saignements des patients sous ECMO ne sont pas parfaitement connues et probablement multifactorielles. Les patients sous ECMO sont en effet à haut risque de saignement. Ils sont dans la plupart des cas anticoagulés et un traitement antiplaquettaire est très fréquemment associé à l'héparinothérapie. Ces traitements majorent le risque hémorragique déjà inhérent à l'ECMO, lié à l'hémodilution et au contact du sang avec des surfaces non-endothéliales ainsi qu'aux anomalies de l'hémostase observées (cf infra).

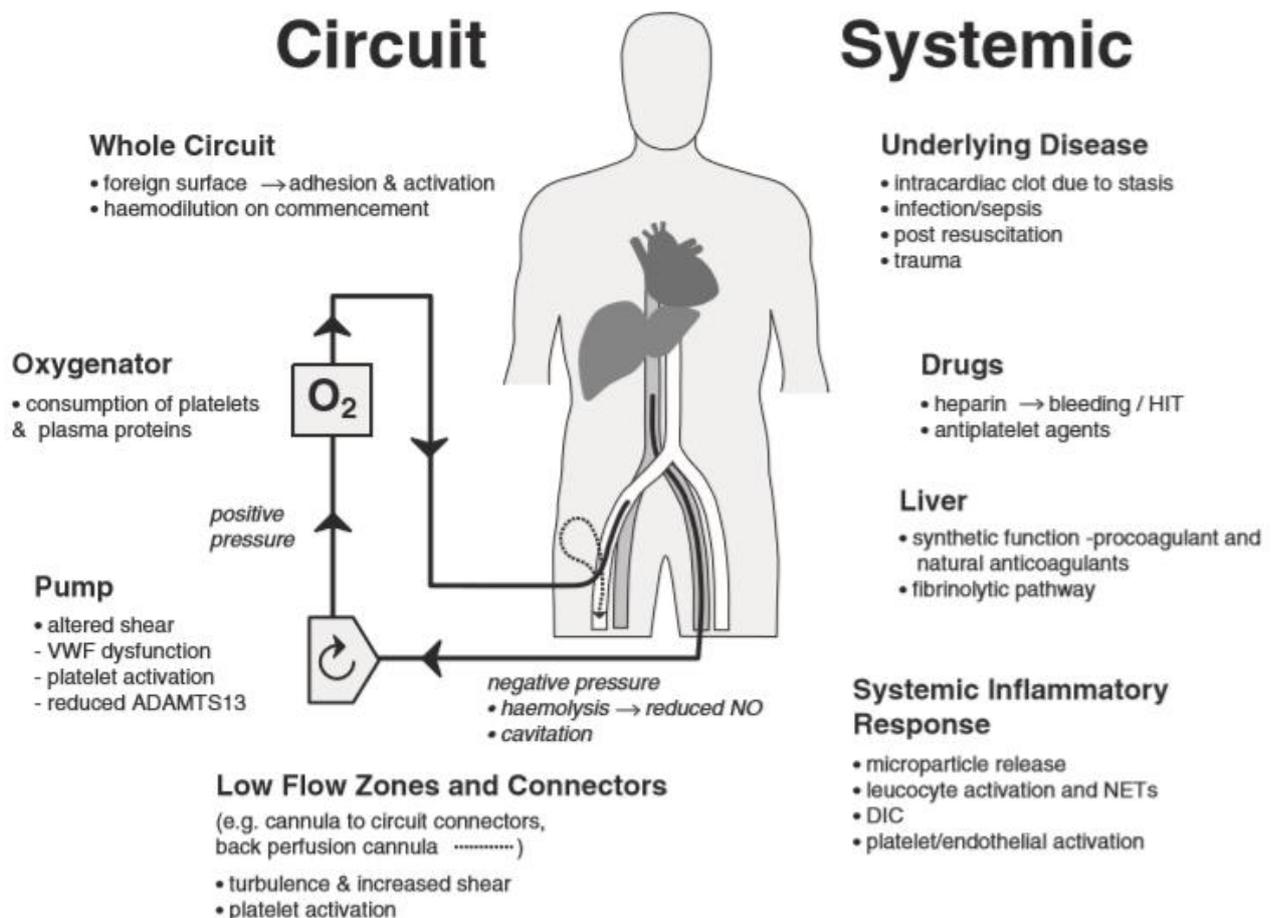


Figure 13 : Effets potentiels de l'ECMO sur l'activation de la coagulation.

Les conséquences de l'ECMO sur la coagulation peuvent être liées au circuit (facteurs mécaniques) ou au patient. Les causes peuvent être multiples et selon le facteur dominant, la résultante sera hémorragique ou thrombotique. NO, nitric oxide, NETs, neutrophil extracellular traps, DIC = CIVD = Coagulation intra-vasculaire disséminée. (Murphy et al, Transfusion medicine Reviews, 2015)

2.1. Hémorragies liées à des anomalies de l'hémostase primaire

a) Rappels physiologiques concernant l'hémostase primaire

L'hémostase primaire est la première étape visant à arrêter le saignement après une brèche vasculaire. Son but est d'obturer cette brèche en formant le clou plaquettaire. Elle fait intervenir trois acteurs majeurs : l'endothélium vasculaire, les plaquettes et le facteur von Willebrand (VWF) aussi appelé facteur Willebrand. On peut diviser chronologiquement les étapes de l'hémostase primaire en un temps vasculaire et un temps plaquettaire.

Temps vasculaire

L'endothélium des vaisseaux, lorsqu'il est intact, n'est pas thrombogène. La cellule endothéliale synthétise de la prostacycline (PGI₂), via la voie de la COX2 inducible, et du monoxyde d'azote (NO), tous deux vasodilatateurs et inhibiteurs plaquettaires via la production intraplaquettaire d'AMPc et de GMPc respectivement.

Adhérence plaquettaire

En cas de brèche vasculaire, une vasoconstriction réflexe immédiate du vaisseau lésé favorise l'interaction des plaquettes avec le sous-endothélium vasculaire. Le facteur Willebrand se lie au collagène du sous-endothélium et subit un changement de conformation, notamment sous l'action des forces de cisaillement élevées. Il expose alors ses sites de liaison à la GPIb plaquettaire. Les plaquettes vont donc venir se lier au VWF grâce à leur glycoprotéine GPIb-IX-V et au collagène grâce à leur GPVI associée au FcγR (et dans une moindre mesure via la GPIa-IIa). C'est l'adhérence plaquettaire.

Activation plaquettaire

L'activation plaquettaire se manifeste par un changement de forme des plaquettes qui deviennent sphériques et émettent des pseudopodes et par une dégranulation des plaquettes. Elles libèrent dans le plasma le contenu de leurs granules plaquettaires (granules denses avec libération d'ADP, ATP, sérotonine notamment, et granules alpha avec libération de VWF, de fibrinogène et du facteur 4 plaquettaire entre autres).

De nombreux agonistes solubles sont capables d'activer les plaquettes sanguines, parmi lesquels l'adénosine 5'-diphosphate (ADP), le thromboxane A₂ (TxA₂), la thrombine et la sérotonine. La thrombine est l'activateur le plus puissant des plaquettes sanguines via les récepteurs PAR1 et PAR4 (Protease Activated Receptor). Ces médiateurs agissent par

l'intermédiaire de récepteurs couplés à des protéines G (RCGP). L'ADP, contenu en très fortes concentrations dans les granules denses des plaquettes, est sécrété lors de l'activation plaquettaire. Les plaquettes possèdent des récepteurs P2Y1 et P2Y12 à leur surface, qui respectivement aboutissent par leur stimulation, à une mobilisation du calcium intraplaquettaire et une inhibition de formation d'AMPc, ce qui amplifie l'activation plaquettaire.

Les plaquettes vont également contribuer à la vasoconstriction du vaisseau, grâce à la libération d'adrénaline, de noradrénaline et de sérotonine. D'autre part, lors de l'activation plaquettaire, les phospholipides de la membrane plasmique des plaquettes sont clivés par des phospholipases, libérant de l'acide arachidonique. Ce dernier, sous l'action de cyclo-oxygénases constitutives de type COX1, forme des endopéroxydes, substrats de la thromboxane synthétase. Le TXA2 généré est un puissant activateur plaquettaire et également vasoconstricteur, via les récepteurs TP.

Agrégation plaquettaire

L'agrégation des plaquettes entre elles est possible grâce à l'interaction entre le fibrinogène et le complexe glycoprotéique IIb/IIIa de la surface plaquettaire. Cette intégrine $\alpha\text{IIb}\beta_3$ est un complexe inactif au repos, qui change de conformation lors de l'activation plaquettaire, grâce au phénomène d'« inside-out signaling ». La fixation des molécules de fibrinogène sur le récepteur GPIIb-IIIa engendre ensuite des signaux intracellulaires appelés « *outside-in* », qui contrôlent les réponses tardives de la plaquette telles que l'agrégation irréversible ou la rétraction du clou plaquettaire.

En cas de forces de cisaillement élevées dans le vaisseau, le VWF prend le relai pour permettre l'agrégation des plaquettes via la GPIIb/IIIa.

Action procoagulante des plaquettes

L'activation plaquettaire et la coagulation sanguine sont des phénomènes dynamiques étroitement liés. Les plaquettes, fortement stimulées par les premières traces de thrombine et par le collagène du sous-endothélium, vont exposer lors d'une étape de « flip-flop » leurs phospholipides anioniques à l'extérieur de leur membrane, grâce à une activité « scramblase », entraînant une rupture de l'asymétrie de distribution des phospholipides de la membrane plasmique, ces phospholipides chargés négativement étant le support indispensable à l'activation des différents facteurs plasmatiques de la coagulation.

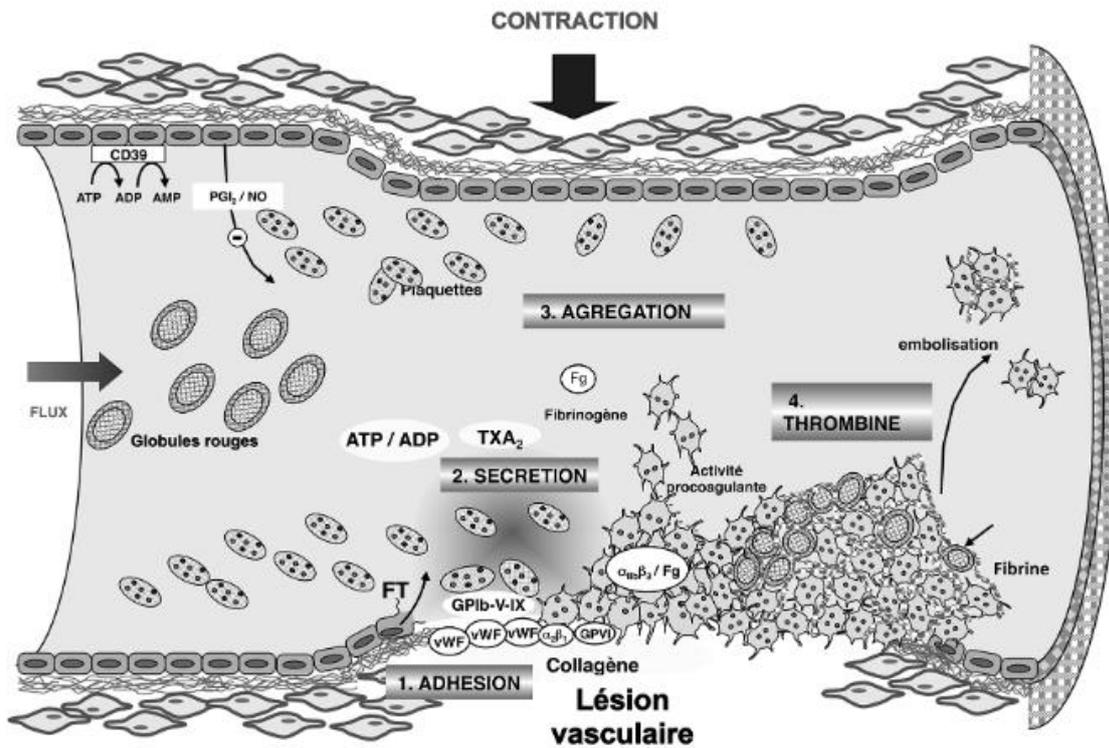


Figure 14 : Schéma récapitulatif de l'hémostase primaire (issu de Molecular mechanisms of platelet activation, Gachet, 2014) (34)

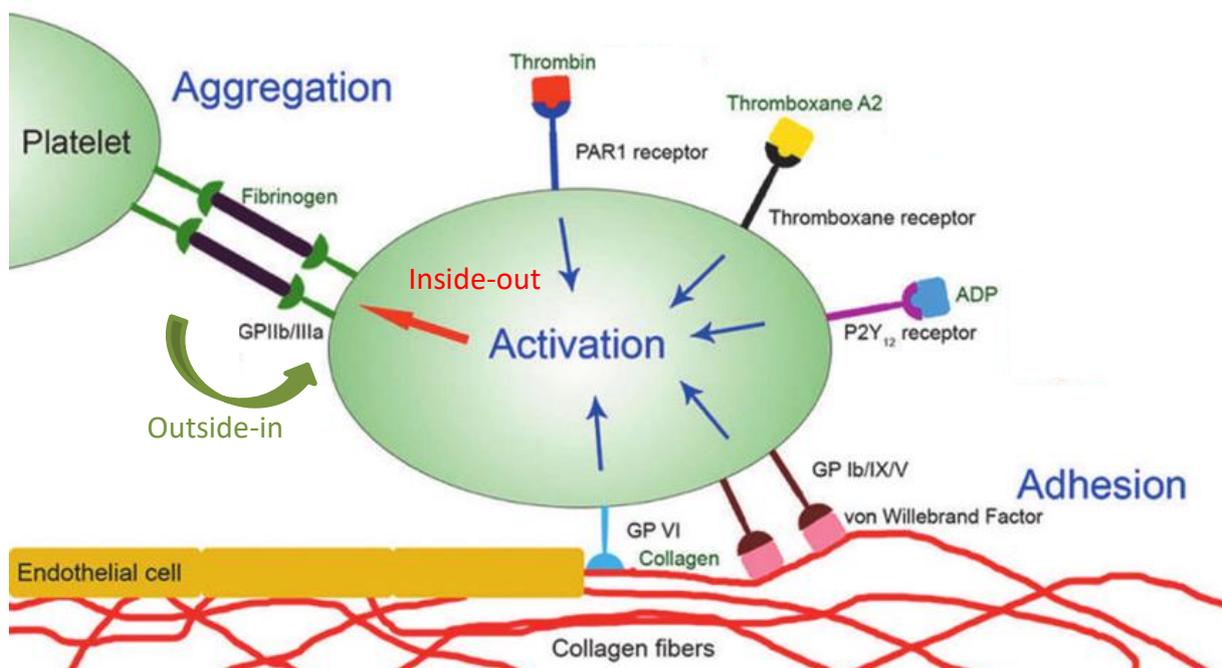


Figure 15 : schéma récapitulatif de l'adhésion et agrégation plaquettaire lors de l'hémostase primaire (adapté de la revue de Demertzis et al, 2016) (35)

b) Facteur Von Willebrand (VWF) et ECMO

Rappels concernant le Facteur Von Willebrand

Structure et biosynthèse

Le facteur von Willebrand (VWF) est une glycoprotéine multimérique synthétisée par les mégacaryocytes et les cellules endothéliales à partir d'un gène comprenant 52 exons, situé sur le bras court du chromosome 12 (36). Après clivage du peptide signal, le pro-VWF (propeptide et sous-unité mature) est constitué de la répétition de quatre types de domaines (A, C, D et CK). Les domaines A forment des structures globulaires, tandis que la série de six domaines C (C1 à C6) séparant les domaines D4 et CK procure à la protéine une flexibilité qui facilite la transition vers une conformation « active » dans des conditions hémorragiques de taux de cisaillement élevés (figure 16).

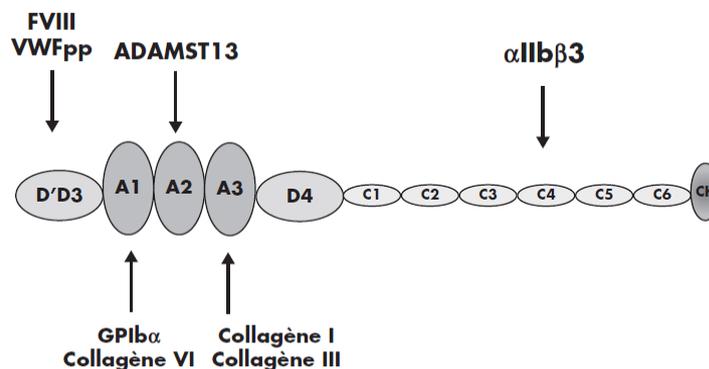


Figure 16 : Structure de la sous-unité de VWF mature et ses ligands associés (Fressinaud, 2014, d'après Zhou et al 2012)

Dans le réticulum endoplasmique, la formation d'un pont disulfure entre les extrémités C-terminales (CK) de deux molécules engendre des dimères de VWF. Ces dimères sont ensuite soumis à des étapes de glycosylation dans l'appareil de Golgi.

Les domaines D1, D2, D'et D3 sont impliqués dans le processus de multimérisation de la protéine, grâce à leurs cystéines engagées dans des ponts disulfures. Le propeptide (domaines D1 et D2) agit comme une protéine chaperon indispensable à la multimérisation et au stockage du VWF. Des ponts disulfures intramolécules engendrent une structure tertiaire du VWF assez complexe.

Le propeptide et les multimères de haut poids moléculaire de VWF sont stockés dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales et les granules α plaquettaires, avant

d'être sécrétés, tandis que les multimères de faible poids moléculaire quittent la cellule constitutivement.

Elimination

Le VWF circule dans le sang circulant, sous la forme de multimères dont la taille varie de 540 KD à 10 000 KD. La concentration plasmatique de VWF est d'environ 5 à 10 mg/L.

Clairance :

Dans la circulation, les multimères ont une demi-vie de 12 à 20h. La clairance du VWF est principalement réalisée par les macrophages dans le foie et la rate. Elle est indépendante de la taille des multimères, mais dépend du profil de glycosylation spécifique du groupe sanguin ABO. Les multimères de plus grandes tailles, encore appelés « ultralarges », se fixent également à la surface des cellules endothéliales, entre autres à une protéine membranaire des corps de Weibel-Palade, la P-sélectine (37).

Protéolyse :

Les multimères de VWF soumis à des forces de cisaillement élevées vont également subir une réduction physiologique de leur taille par une métalloprotéase spécifique, ADAMTS13 (A Disintegrin And Metalloprotease with Thrombospondin type 1 repeats, member 13), qui clive le site de protéolyse situé dans le domaine A2 du VWF. Par ce mécanisme, ADAMTS13 remodèle la distribution initiale des multimères, réduisant la taille des multimères « ultralarges » et prévenant ainsi leur interaction spontanée avec les plaquettes.

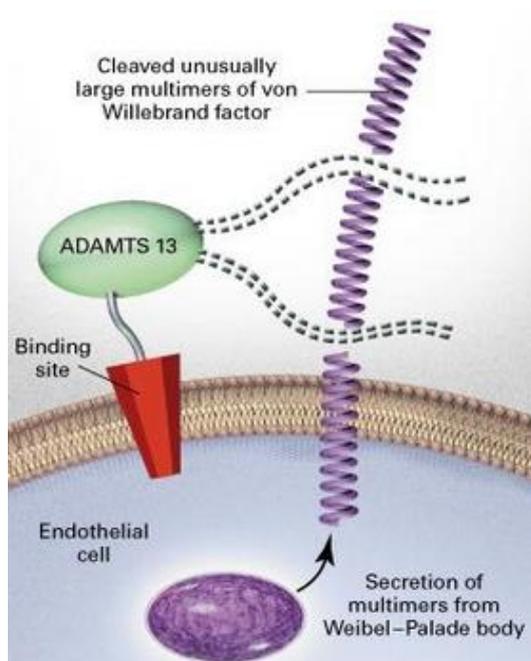


Figure 17 : Représentation du clivage des multimères « ultra-larges » du facteur Willebrand par ADAMTS13, issu de « Thrombotic microangiopathies », NEJM, 2002 (38)

Fonctions

Le VWF a deux fonctions principales dans l'hémostase primaire :

- il permet l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium grâce à ses sites de liaison pour la GPIb plaquettaire et pour le collagène
- et permet l'agrégation plaquettaire via la GPIIb/IIIa dans des conditions hémorrhéologiques où les forces de cisaillement sont élevées comme dans la microcirculation.

La taille des multimères joue un rôle important : lorsque les multimères de haut poids moléculaire sont absents, la liaison du VWF à la GPIb est diminuée. La force du flux sanguin influence aussi fortement la capacité du VWF à promouvoir l'adhésion des plaquettes, car le changement de conformation du VWF immobilisé se produit à taux de cisaillement élevés. En l'absence de flux, le VWF reste sous forme globulaire, « inactive » tandis que dans des conditions de taux de cisaillement élevés, le VWF s'étire permettant l'exposition des sites d'interaction avec la GPIb mais aussi l'exposition du site de protéolyse par ADAMST13.

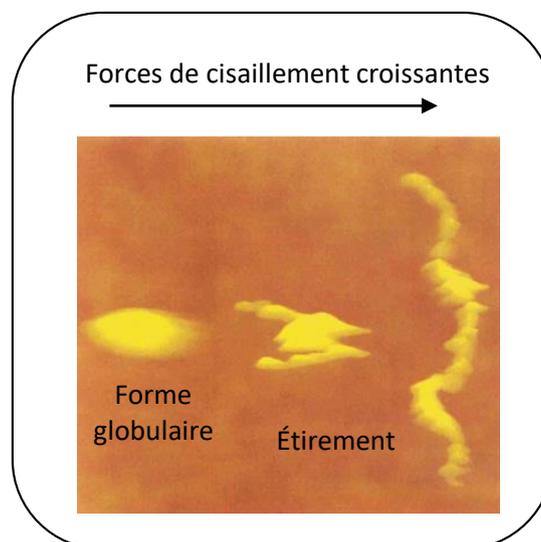


Figure 18 : Modifications conformationnelles du Facteur Willebrand par les forces de cisaillement (Microscopie à force atomique), Siedlecki et al, Blood,1996 (39)

Les domaines D' et D3 comportent des sites de liaison du VWF au facteur VIII (FVIII). Cette interaction entre le VWF et le FVIII permet de protéger le facteur VIII de la protéolyse, lui assurant une demi-vie entre 12 et 20h, et permettant la localisation du FVIII au niveau du site vasculaire lésé.

D'autres rôles du VWF ont également été démontrés (40) et notamment son implication potentielle dans les événements thrombotiques veineux. Il était admis que l'implication du VWF dans la thrombose veineuse était due à son activité de transport du FVIII mais des travaux récents ont montré son implication par des mécanismes encore imparfaitement compris, dans le recrutement des plaquettes au niveau veineux et l'immunohistochimie de thrombi retrouvés chez des patients décédés de complications de thromboses veineuses profondes, montre la présence de VWF au sein des thrombi (41,42).

Le VWF joue également un rôle dans l'inflammation. Il présente la même localisation dans les corps de Weibel-Palade et les granules α des plaquettes, que la P-sélectine (CD62P, GMP-140). Des déficits en VWF empêchent ainsi l'exposition de la P-sélectine à la surface des cellules endothéliales, la P-sélectine étant un ligand essentiel impliqué dans le recrutement des leucocytes sur le site inflammatoire. Mais le VWF intervient également directement dans l'inflammation, en tant que surface adhésive pour les leucocytes, via des interactions avec la P-selectin GP ligand-1 et les β 2-intégrines (43). Le VWF peut également être piégé par les NETs (neutrophil extracellular traps), fibres extracellulaires d'ADN, d'élastases et d'histones, induisant un recrutement des plaquettes et la formation d'un thrombus.

Un autre rôle du VWF est un rôle anti-angiogénique. Une augmentation de la prolifération des cellules endothéliales a été démontrée en l'absence de VWF *in vitro* et une augmentation de la vascularisation chez la souris déficiente en VWF. Une angiodyplasie est également décrite chez les patients atteints de maladie de Willebrand, de types 2A ou 3 ou de type acquis (syndrome de Heyde ou patients porteurs de dispositifs d'assistance cardiaque de longue durée type LVAD) (43–46).

Le VWF semble également jouer un rôle dans la prolifération cellulaire et l'apoptose. Il a été rapporté récemment que l'apoptose des plaquettes pouvait être induite par l'interaction du VWF avec la GPIb plaquettaire, par la voie d'activation impliquant la caspase-3, Bak et Bax (47). Ce mécanisme pourrait être impliqué dans la thrombopénie observée dans les VWD2 où l'interaction VWF-GPIb est fortement augmentée. Cet effet apoptotique ne serait pas limité aux plaquettes et des études suggèrent que le VWF réduirait les métastases en induisant la mort cellulaire des cellules tumorales.

Diagnostic du syndrome de Willebrand acquis : méthode

Dosage antigénique du facteur Willebrand VWF:Ag

Ce dosage est réalisé à Rennes par méthode immuno-turbidimétrique STA-LIATEST® sur STA-R® (Stago). Le principe du test repose sur l'utilisation de microparticules de latex sur lesquelles sont fixés par liaison covalente des anticorps spécifiques du VWF humain. La mise en présence du plasma du patient avec ces microparticules engendre la liaison des molécules de VWF du plasma à tester avec les anticorps, entraînant une agglutination des microparticules et une augmentation de la turbidité du mélange réactionnel, mesurée par photométrie. L'amplitude de l'augmentation d'absorbance du milieu est fonction de la quantité de VWF contenu dans le plasma testé. La méthode sur STA-R® est linéaire jusqu'à 105%.

VWF activité cofacteur de la ristocétine (VWF:RCo)

Ce test, effectué à Rennes sur CS 2500® (Siemens), consiste à utiliser la liaison du VWF à son récepteur, la glycoprotéine Ib (GPIb). La GPIb est le principal récepteur du VWF sur les plaquettes. Des particules de polystyrène sont recouvertes d'un anticorps anti-GPIb. De la GPIb recombinante (2 mutations gain de fonction incluses) est ajoutée et se lie à l'anticorps ainsi qu'au VWF de l'échantillon à tester. Grâce aux mutations gain de fonction, la liaison du VWF à la GPIb ne nécessite pas de ristocétine. Cette liaison du VWF induit une agglutination de particules qui peut faire l'objet d'une mesure par turbidimétrie.

Le ratio VWF:RCo/VWF:Ag est ensuite calculé.

Etude de la capacité de liaison du facteur Willebrand au collagène (VWF :CB)

L'étude de la capacité de liaison du facteur Willebrand au collagène (VWF collagen binding test = VWF:CB) est effectuée par méthode ELISA (Asserachrom®). Le principe du test repose sur la fixation des multimères de haut poids moléculaire (MHPM) du plasma à tester sur une plaque recouverte de collagène humain. Le VWF fixé est ensuite révélé à l'aide d'anticorps de lapin anti-VWF couplés à la peroxydase. L'activité peroxydasique sur son substrat TMB (tétraméthylbenzidine) permet une mesure spectrophotométrique de l'intensité de coloration du produit obtenu, après arrêt de la réaction par un acide fort.

Seuls les multimères de haut poids moléculaire sont capables de se lier au collagène. Un taux de VWF:CB diminué traduit un défaut quantitatif ou qualitatif de ces multimères. Le calcul du rapport VWF:CB/VWF:Ag est intéressant pour distinguer parmi les sous-types de maladie

de Willebrand, les sous-types où existe une perte des MHPM. Parmi les maladies de Willebrand de type 2, ce dosage permet de distinguer les types 2A (rapport VWF:CB/VWF:Ag très diminué) des types 2M (rapport VWF:CB/VWF:Ag normal ou faiblement diminué).

Electrophorèse des multimères du facteur Willebrand

Cette analyse est l'étude de la distribution des multimères du facteur Willebrand par séparation des multimères par SDS électrophorèse sur gel d'agarose, électrotransfection sur membrane et identification par réaction immunologique avec des anticorps couplés au système d'amplification biotin-avidin.

Syndrome de Willebrand acquis sous ECMO

Définition du syndrome de Willebrand acquis (AVWS)

Le syndrome de Willebrand acquis (AVWS) est caractérisé par une anomalie structurale ou fonctionnelle du facteur Willebrand, secondaire à différentes causes cliniques telles que les maladies cardiovasculaires comme le rétrécissement aortique, les syndromes lymphoprolifératifs et myéloprolifératifs ou certaines maladies auto-immunes. Il a d'abord été décrit en 1958 comme une entité clinique, le syndrome de Heyde, chez des patients présentant une sténose aortique, associée à des saignements gastro-intestinaux liés à des angiodysplasies. Cliniquement, le AVWS ressemble à la maladie de Willebrand de type 2, où le déficit en facteur Willebrand est qualitatif. Il se manifeste par des saignements cutanéomuqueux ainsi que des saignements excessifs lors d'une chirurgie ou d'un traumatisme relativement mineur.

Le syndrome de Willebrand acquis est caractérisé par une diminution ou une perte totale des multimères de haut poids moléculaire du VWF.

En cardiologie

Un syndrome de Willebrand acquis (AVWS) a été décrit chez les patients présentant des anomalies cardiaques congénitales dès 1986 par Gill et al. (48). En cardiologie, la sténose aortique, responsable de forces de cisaillement élevées, a été largement décrite comme responsable d'un AVWS (45,49). Les patients porteurs de dispositifs d'assistance ventriculaire gauche (LVAD) développent également un AVWS (50–52). Les saignements les plus fréquemment décrits sont des épistaxis, des saignements des gencives, des saignements gastro-intestinaux ou post-opératoires. Ce syndrome de Willebrand acquis semble disparaître immédiatement après l'explantation du dispositif d'assistance (53).

Sous ECMO

L'hypothèse d'une perte des multimères de haut poids moléculaire du facteur Willebrand, sous ECMO, a été posée dès 2012. Une étude allemande (54) montre la présence d'un syndrome de Willebrand acquis chez 31 sur 32 patients sous ECMO. La perte des multimères de haut poids moléculaire est objectivée sur 31 des 32 patients. D'autres études pédiatriques et adultes ont également objectivé ce syndrome de Willebrand acquis. Les résultats de ces études sont résumés dans le tableau 5.

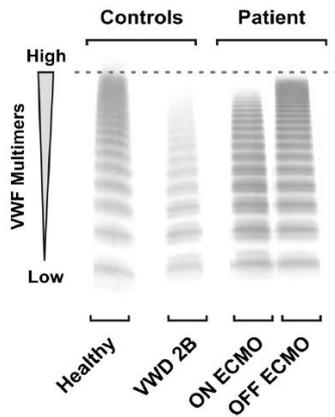


Figure 19 : Distribution des multimères de VWF par électrophorèse. Perte des multimères de haut poids moléculaire sous ECMO et normalisation après décharge de l'ECMO. Profil proche du contrôle atteint de VWD de type 2. (Murphy et al. 2015)

L'étude allemande de Kalbhenn de 2018 (17) montre qu'après explantation de l'ECMO, le ratio VWF:CB/VWF:Ag retrouve des valeurs normales dans les 3h chez 60% des patients, dans les 6h chez 86% d'entre eux et chez tous les patients à 24h. Parallèlement, la perte des multimères de haut poids moléculaire du VWF persiste chez 14% des patients à 3h post-ECMO mais est totalement récupérée chez 57% d'entre eux. A 6h post-ECMO, tous les patients ont récupéré leurs multimères de haut poids moléculaire (17).

Groupe sanguin et Facteur Willebrand

Les patients de groupe sanguin O ont statistiquement des taux de VWF et de facteur VIII plus bas que les patients des autres groupes ABO. L'hypothèse peut ainsi être émise que ces patients seront plus à risque de saignement sous ECMO.

Une étude rétrospective américaine s'est intéressée à ce sujet (55) et a comparé l'incidence des saignements majeurs et le nombre de CGR transfusés, chez les patients de groupe O et chez ceux de groupe non O (n =111 patients placés sous ECMO). L'incidence des saignements majeurs n'est pas significativement différente entre les deux groupes mais le nombre de CGR transfusés est nettement plus important chez les sujets de groupe O (ratio ajusté selon l'âge, le nombre de jours sous ECMO, la numération plaquettaire, l'INR, et le nombre de jours passés au-dessus de l'objectif d'anticoagulation, $p < 0.0001$).

Le phénotype « sécréteur » est aussi associé à des taux de VWF plus importants chez les individus homozygotes SeSe, comparés aux hétérozygotes Sese. Aucune étude à ce jour ne s'est penchée sur l'association entre le phénotype sécréteur et les saignements sous ECMO,

le phénotype n'étant le plus souvent pas connu. 68% de la population générale est de phénotype sécréteur.

Tableau 5 : Récapitulatif des articles étudiant les anomalies du facteur Willebrand sous ECMO

Titre	Acquired von Willebrand syndrome in patients with extracorporeal life support (ECLS) (54)	Von Willebrand Factor Multimers in Pediatric Extracorporeal Membrane Oxygenation Support (56)	Early Diagnosis of Acquired von Willebrand Syndrome (AVWS) is Elementary for Clinical Practice in Patients Treated with ECMO Therapy (57)	Extracorporeal membrane oxygenation induces short-term loss of high-molecular-weight von Willebrand factor multimers (58)	Mechanical circulatory support is associated with loss of platelet receptors glycoprotein Iba and glycoprotein VI (59)	Acquired von Willebrand syndrome and impaired platelet function during venovenous extracorporeal membrane oxygenation: Rapid onset and fast recovery (17)
journal	Intensive Care Medicine	ASAIO Journal	Journal of Atherosclerosis and Thrombosis	Anesthesia and analgesia	Journal of Thrombosis and Haemostasis	Journal of Heart and Lung Transplantation
année	2012	2014	2015	2015	2016	2018
Nombre patients	32 ECMO	6 ECMO pédiatriques	18 (2 avant implantation, 8 sous ECMO, 7 après explantation)	40 ECMO (27 VA, 13 VV), 2 exclus pour décès dans les 24h	20 ECMO (14 VA et 6 VV)	59 ECMO
Pompe	26 Revolution® Sorin Group, 3 Deltastream DP2® Medos, 3 Centrimag® Levitronix	NR	Revolution® Sorin Group	12 Centrimag® Levitronix, 20 Rotaflow Maquet, 8 Biomedicus Medtronic	Medtronic centrifugal pump	Revolution® Sorin Group
Recueil données	20 en rétrospectif 12 en prospectif	Prospectif	rétrospectif	prospectif	prospectif	prospectif
contrôles	9 patients rétrospectifs analysés avant implantation 10 après explantation	Prélèvements avant pose d'ECMO, après pose, H+6, H+12, H+24 et quotidiennement jusque J7	18 patients sans ECMO	Prélèvements 24h avant pose d'ECMO, H+24, H+48 et 24h après le retrait de l'ECMO	Groupe donneurs sains et groupe avec comorbidités cardiaques (insuffisance cardiaque congestive ou sténose aortique)	Prélèvements avant ECMO, à J1, J3 et J7 sous ECMO puis à 3h, 6h, 1j et 3j après explantation
Electrophorèse Willebrand	Multimères de haut poids moléculaire absents chez 31/32 patients	Multimères de haut poids moléculaire diminués chez tous les patients, absents chez 1 patient	Multimères de haut poids moléculaire absents chez 17/18 patients	Multimères de haut poids moléculaire diminués chez tous les patients	Multimères de haut poids moléculaire absents chez 14/20 patients	Multimères de haut poids moléculaire absents chez tous les patients et récupération complète après 6h post-ECMO
VWF :Ag	Moy 2.7 (normes 0.5-1.6 U/mL)	Moy 223 UI/dL à 48h (décroissance initiale puis ré-ascension à 48h)	NR	265±128 % à 48h (normes 58-174%) diminution sous ECMO	413% (range 127-592)	NR
VWF :Rco/ VWF :Ag	Diminué chez 28/ 32 patients (moy 0.5 ± 0.1)	Moy 0.58 à 48h < 0.7 chez 4/6 patients	NR	0.63±0.18 à 48h	0.6 (range 0.36-0.80)	NR
VWF :CB/ VWF :Ag	Diminué chez 31/ 32 patients (moy 0.3 ± 0.2)	Moy 0.63 (<0.7 chez 2 patients/6)	Diminué chez 18/18 patients	NR	0.42 (range 0.26-1.02)	Diminué chez tous les patients à J1 de la pose (moy 0.326±0.147)

Mécanismes physiopathologiques

La perte des multimères de haut poids moléculaire du VWF et le syndrome de Willebrand acquis qui en résulte sont largement imputés aux forces de cisaillement élevées retrouvées sous ECMO (mais également sous LVAD et dans la sténose aortique).

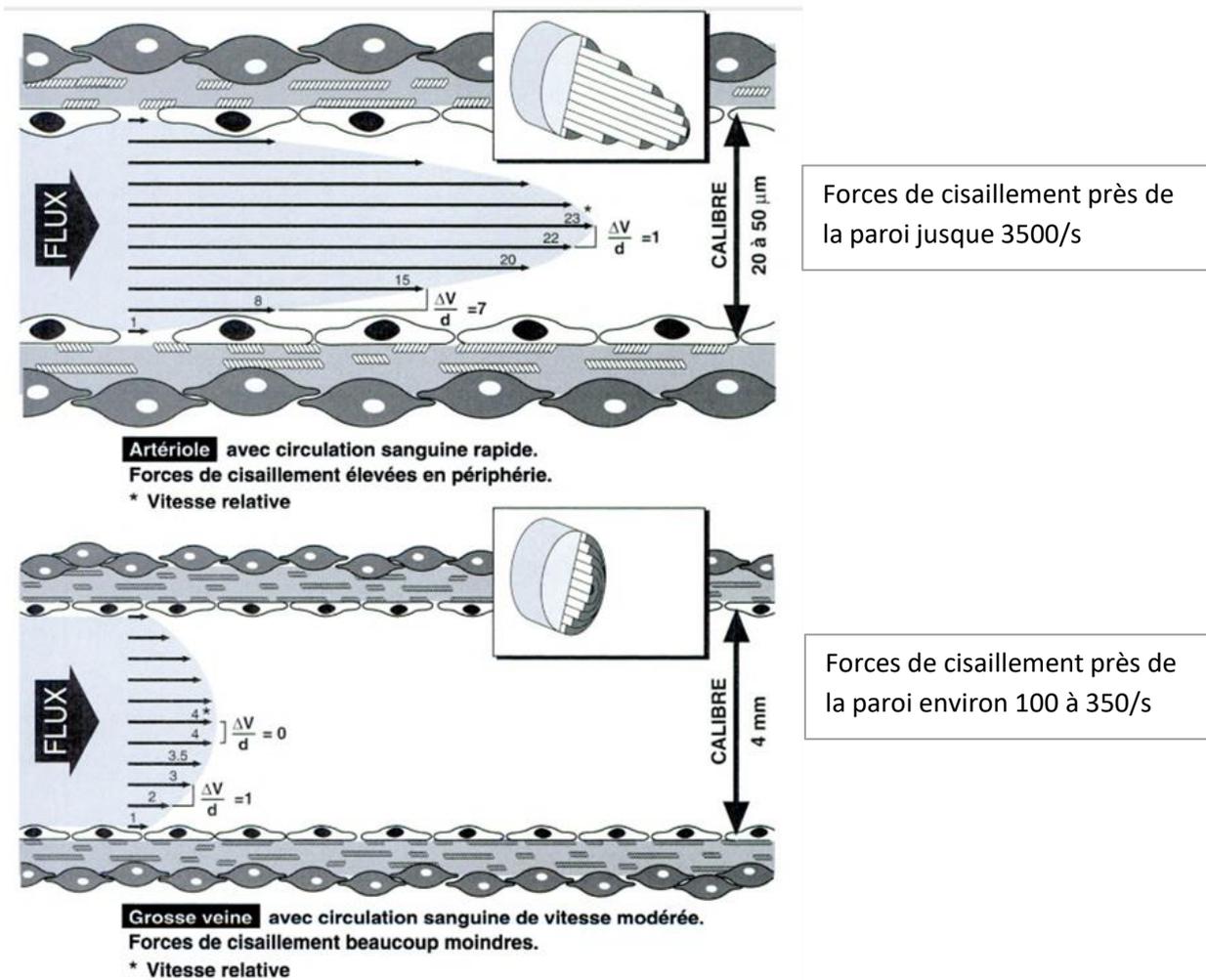


Figure 20 : Représentation du flux sanguin physiologique, artériolaire et veineux avec les forces de cisaillement associées (d'après (34))

Les effets des forces de cisaillement sur la perte des multimères de haut poids moléculaire ont pu être démontrée *in vitro*, et la répercussion sur l'agrégation plaquettaire également, avec des forces de cisaillement de 4000 à 8000/s alors que les forces lors de l'ECMO sont présumées être encore plus importantes (60).

Deux équipes ont simultanément rapporté un rôle des forces de cisaillement dans la clairance du VWF. L'exposition du VWF à des forces de cisaillement élevées permet au VWF de devenir un

ligand pour le récepteur du LDL, ce qui augmente l'incorporation du VWF dans les macrophages, cellules prédominant dans la clairance du VWF (61,62).

Quand le VWF est exposé à des hautes forces de cisaillement ($> 50\,000/s$), comme lors du passage à travers certaines zones de l'ECMO, le VWF est étiré et son domaine A2 expose alors son site de clivage par la métalloprotéase ADAMTS-13, site normalement enfoui en profondeur au sein de la protéine (63,64). Le dosage de la protéine ADAMTS13 sous ECMO montre des taux d'ADAMTS13 stables malgré l'ECMO. Ce n'est donc pas une augmentation de l'activité ADAMTS13 qui est responsable de la perte des multimères de haut poids moléculaire (58) mais bien la modification conformationnelle du VWF.

Les forces de cisaillement varient également en fonction des canules utilisées, les canules de drainage avec orifices latéraux entraînent d'importantes forces de cisaillement (65–67).

De plus, les forces de cisaillement semblent être proportionnelles à la vitesse de rotation de la pompe. Ces forces peuvent excéder 300 Pa à la vitesse de rotation de la pompe de 3000 tours/minute. Quand la vitesse de rotation de la pompe passe de 1500 tours/minute à 3000 tours/minute, les forces de cisaillement sont multipliées par 4 (68).

c) Anomalies plaquettaires sous ECMO

Etude plaquettaire : méthode

Numération plaquettaire

La numération des plaquettes est réalisée sur un échantillon de sang total recueilli sur EDTA par impédancemétrie. Les cellules sont guidées par un flux de gainage et lors du passage des plaquettes ou des hématies entre les deux électrodes de la cellule de comptage, la modification de l'impédance génère une impulsion électrique, proportionnelle à la taille de la cellule. Plaquettes et hématies sont différenciées sur la base de leurs volumes respectifs.

Agrégations plaquettaires standards

Cette technique mesure l'agrégation d'un plasma riche en plaquettes (PRP), obtenu après centrifugation à faible vitesse de l'échantillon sanguin du patient, prélevé sur citrate de sodium. L'agrégation est mesurée par une technique photométrique, après addition de différents inducteurs (ou agonistes). Le 0 % de transmission optique correspond au PRP et le 100 % correspond à un plasma pauvre en plaquettes PPP.

La réponse plaquettaire à chaque agoniste est suivie selon la cinétique d'agrégation plaquettaire et différents paramètres peuvent être étudiés : le temps de latence, la vitesse de la pente initiale, la présence des deux vagues successives d'agrégation primaire réversible et d'agrégation secondaire irréversible, le pourcentage maximal d'agrégation et le pourcentage final d'agrégation après 6 min le plus souvent.

3 inducteurs principaux sont utilisés en première intention :

- L'acide arachidonique à 1.5 mM : exploration de la voie de la cyclooxygénase et thromboxane synthétase
- Le collagène à 5 et 2 µg/L : agoniste fort, exploration de l'adhésion et de l'agrégation par le collagène
- L'ADP à 10, 5 et 2 µM : Etude de la sécrétion plaquettaire et de la boucle d'amplification par l'ADP

Une diminution de l'amplitude d'agrégation plaquettaire, l'absence de double vague ou une désagrégation secondaire, induite par un ou plusieurs des agonistes permet d'évoquer une anomalie fonctionnelle plaquettaire (69).

Etude des glycoprotéines plaquettaires par cytométrie en flux

La membrane plaquettaire est riche en glycoprotéines qui constituent les récepteurs d'adhésion, d'activation, d'agrégation et d'inhibition des plaquettes. Plus de 40 molécules protéiques ont été identifiées à la surface plaquettaire, mais les plus importantes quantitativement sont la GP IIb-IIIa et la GP Ib-IX-V.

Deux molécules de GP Ib (CD42b) interagissent avec deux molécules de GP IX et une molécule V, formant un complexe qui fixe le VWF fixé au sous endothélium, aboutissant à l'adhésion de la plaquette au sous-endothélium. La plaquette au repos compte environ 25000 complexes GP Ib-IX-V à sa surface.

Les GP IIb (CD41) et GP IIIa (CD61) forment le complexe majeur GP IIb-IIIa (CD41a) de la membrane plaquettaire. La plaquette au repos compte environ 50 000 complexes IIb-IIIa à sa surface, auxquelles s'ajoutent environ 30 000 complexes contenus dans les granules alpha (qui apparaîtront en surface lors de l'activation plaquettaire). La GPIIb-IIIa reconnaît diverses protéines ayant une structure particulière RGD (arginine, glycine, aspartique) dont le fibrinogène, mais aussi le VWF et d'autres molécules comme la fibronectine ou la thrombospondine.

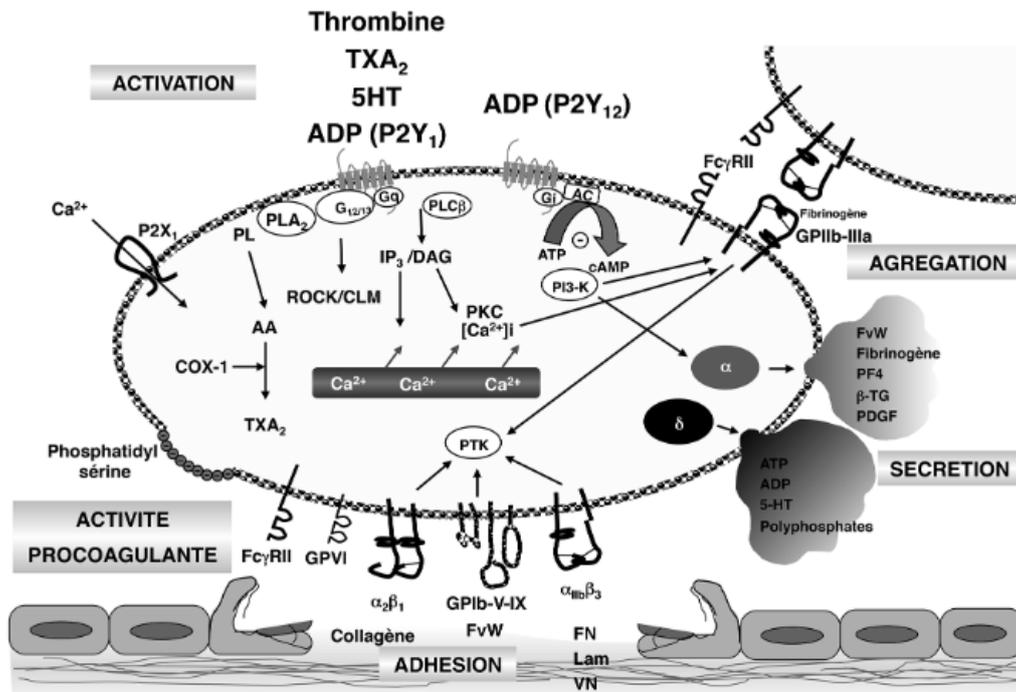


Figure 21 : Schéma d'une plaquette activée avec ses différents récepteurs et voies de signalisation (34)

La sélectine P, également connue sous le nom de GMP-140 (granule membrane protein 140 kD), PADGEM (platelet activation-dependent granule-external membrane) ou CD62P, est exprimée par les plaquettes et les cellules endothéliales activées. Cette protéine, membre de la famille des

sélectines, est une glycoprotéine de la membrane des granules alpha, exprimée à la surface des plaquettes lors de leur activation par la thrombine ou l'histamine, pour une période d'environ 60 minutes. Elle serait aussi exprimée par les granules denses plaquettaires.

La quantification des glycoprotéines GPIIb (CD41), GPIb α (CD42b) et GMP140 (CD62P = P-selectine) à la surface des plaquettes, à l'état natif et après activation par le TRAP (Thrombin Receptor Agonist Peptide), peut être réalisée par cytométrie en flux. Les plaquettes sont prélevées sur tube citraté (citrate de sodium 0.109M ou 0.129M, 1 volume de citrate pour 9 volumes de sang). La technique peut être réalisée sur sang total ou sur PRP (plasma riche en plaquettes) après centrifugation 10 minutes à 150g en cas de thrombopénie (ce qui est souvent le cas sous ECMO). L'échantillon est tout d'abord dilué en présence ou non de TRAP (activateur plaquettaire). Il est ensuite immunomarqué à l'aide d'anticorps monoclonaux (AcM) de souris, dirigés contre les GPIIb, GPIb α et GMP140 humaines. Après ajout d'un réactif de révélation, de type anticorps polyclonal anti-IgG de souris couplé au FITC, l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) est mesurée par cytométrie en flux, dans les tubes échantillon et le tube calibrant. Grâce au calibrant contenant une suspension de billes recouvertes de quantités croissantes et définies d'IgG, les MFI sont converties en nombre de molécules de glycoprotéines exprimées par plaquettes.

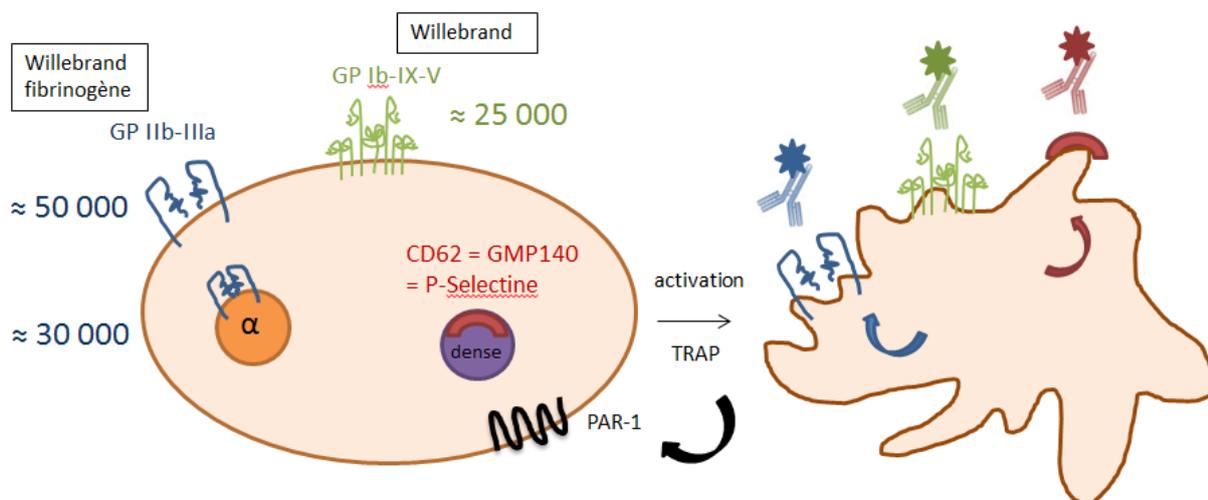


Figure 22 : Représentation schématique de l'étude des glycoprotéines plaquettaires par cytométrie en flux

Thrombopénie sous ECMO

La thrombopénie, définie par une numération plaquettaire inférieure à 150 G/L, est très fréquente sous ECMO. Une étude américaine menée sur 119 patients placés sous ECMO, montre que 60% des patients présentent une thrombopénie <50% de leur numération basale à J4 (70).

Après J4, l'incidence des thrombopénies sévères sous ECMO décroît chez les patients de bon pronostic. Le nadir plaquettaire après 8 jours d'ECMO semble même plus prédictif de la mortalité à J90 que le score SOFA durant le séjour en réanimation (71). Cependant la thrombopénie ne serait pas pour autant responsable des décès, plus souvent imputés à des défaillances multi-organes ou des sepsis (71).

Le rôle de l'ECMO dans l'apparition de la thrombopénie n'est pas démontré. 20% à 50% des patients tout venant de réanimation vont présenter une thrombopénie, constamment associée à une augmentation des saignements et de la mortalité (72–74). Une étude de 2016 menée sur 85 patients avec ou sans ECMO, atteints de syndrome de détresse respiratoire aiguë, ne démontre pas l'impact de l'ECMO sur l'incidence des thrombopénies < 50 G/L (75).

Par ailleurs, la durée de mise sous ECMO ne semble pas associée à la sévérité de la thrombopénie. La thrombopénie sous ECMO serait plus vraisemblablement associée à la sévérité de la pathologie sous-jacente. Une numération plaquettaire basale plus faible ainsi que le développement d'une insuffisance rénale ou hépatique sont aussi impliqués dans les thrombopénies observées (76).

Cette thrombopénie semble apparaître quasiment immédiatement à l'implantation de l'ECMO ; une diminution de 26% de la numération plaquettaire moyenne est retrouvée à 15 min de la pose d'ECMO, dans une étude en néonatalogie, avec une diminution supplémentaire de 16% à 1h (77).

54% des patients présentent une diminution plaquettaire > 20% à 24h d'ECMO dans une autre étude chez l'adulte (78).

Causes et conséquences

Les causes de cette thrombopénie sont très probablement multifactorielles : hémodilution, activation plaquettaire, séquestration et destruction, consommation par le circuit. La thrombopénie peut aussi être le résultat des pertes liées aux saignements. Le sepsis est aussi responsable de thrombopénies. La thrombopénie peut être liée aux effets suppressifs de l'inflammation sur la moelle osseuse et à la coagulation intravasculaire disséminée de bas bruit retrouvée sous ECMO (D-Dimères augmentés, hypofibrinogénémié...) (79).

Les thrombopénies peuvent cependant conduire à des symptômes hémorragiques cutanéomuqueux de type purpura pétéchial ou ecchymotique, saignements buccaux, gingivaux, méno-métrorragies...notamment pour des numérations plaquettaires < 50 G/L.

L'identification de facteurs prédictifs de thrombopénie sévère peut être très utile au clinicien pour anticiper une éventuelle transfusion plaquettaire et un risque de saignement augmenté. Des études complémentaires seraient nécessaires afin d'identifier ces critères.

Transfusion plaquettaire sous ECMO

La transfusion de plaquettes sous ECMO n'est pas standardisée. L'objectif d'une numération plaquettaire >100 000 plaquettes/ μ L est souvent évoqué (80), mais aucun seuil transfusionnel n'est véritablement établi.

Dans une étude rétrospective menée sur 300 patients sous ECMO (71), la numération plaquettaire observée avant chaque première transfusion plaquettaire était de 48 G/L en moyenne, suggérant un risque hémorragique augmenté quand la numération plaquettaire passe en dessous de la limite des 50G/L. Mais les fonctions plaquettaires étant vraisemblablement altérées sous ECMO, la numération plaquettaire ne serait peut-être pas réellement le reflet du risque hémorragique. Une dysfonction plaquettaire chez un patient présentant un saignement clinique, quelle que soit la numération plaquettaire, pourrait justifier une transfusion plaquettaire (81).

Le risque de saignement dépend également de l'hématocrite. Ainsi, une correction de l'anémie par la transfusion de CGR améliore les fonctions plaquettaires (82,83).

De plus, l'efficacité de la transfusion plaquettaire semble limitée. Dans une étude en néonatalogie, 15 min après la transfusion plaquettaire, la numération plaquettaire augmente de 17% en moyenne. Mais 1h après la transfusion, la numération plaquettaire est revenue à sa valeur pré-transfusionnelle (77).

Thrombopathie sous ECMO

Antiplaquettaires sous ECMO

Les patients placés sous ECMO reçoivent le plus souvent un traitement antiplaquettaire à dose antiagrégante, sous forme d'aspirine (75-100 mg/j). L'acide acétylsalicylique, aspirine, induit une inhibition irréversible de la COX1 plaquettaire, bloquant ainsi la synthèse du Thromboxane A2. Les tests des fonctions plaquettaires sont donc le plus souvent perturbés sous ECMO, notamment ceux impliquant la voie de l'acide arachidonique et de la synthèse du thromboxane A2, en dehors de tout effet intrinsèque de l'ECMO sur les plaquettes. Les tests utilisant le collagène comme agoniste plaquettaire seront également perturbés, mais dans une moindre mesure. En effet, une activation plaquettaire correcte en présence de collagène nécessite le relargage d'acide arachidonique plaquettaire et sa transformation en Thromboxane A2.

Les inhibiteurs du récepteur P2Y12 à l'ADP peuvent parfois être utilisés (le clopidogrel notamment ou le ticagrélor) par les urgentistes lors d'un syndrome coronarien aigu par exemple, avant la mise sous ECMO. Leur durée d'action étant relativement courte, ils ne doivent pas impacter les fonctions plaquettaires par la suite.

Tandis que les cliniciens mesurent quotidiennement l'effet de l'héparine avec l'anti-Xa, l'effet des antiplaquettaires sur les fonctions plaquettaires n'est le plus souvent pas mesuré. Quelques centres ont incorporé dans leurs algorithmes des tests fonctionnels comme le thromboélastogramme (TEG) ou la thromboélastométrie rotative (ROTEM) et certains étudient les fonctions plaquettaires par agrégation plaquettaire ou TEG-platelet mapping (TEG®- PM) (80).

Parallèle des anomalies sous ECMO avec la thrombopathie sous LVAD

Outre le syndrome de Willebrand acquis, les études de l'hémostase sous assistance ventriculaire gauche (LVAD) montrent également des dysfonctions plaquettaires (PFA-100 allongé, quel que soit l'agoniste, épinéphrine ou ADP, agrégations plaquettaires diminuées à l'acide arachidonique et au collagène mais également à la ristocétine) (84).

Dans une étude menée sur 16 patients sous Heartmate II, l'agrégation plaquettaire à l'ADP est diminuée chez 7 patients (2 seulement ont reçu de l'aspirine). La mise en place de tests d'agrégation croisée en mélangeant le plasma de patients avec des plaquettes témoins et inversement, retrouve chez 11 patients sur 16, un défaut d'agrégation plaquettaire à la ristocétine, aussi bien d'origine plasmatique que plaquettaire (85). 2 patients présentent un défaut d'origine uniquement plasmatique et 2 patients présentent un défaut d'origine uniquement plaquettaire.

L'accumulation de fragments de facteur Willebrand, issus de la destruction des multimères « ultra-larges », est avancée comme hypothèse à l'origine d'un facteur plasmatique de perturbation de l'agrégation plaquettaire par la voie de la GPIb (85).

Mais peu d'études se sont intéressées aux dysfonctions plaquettaires aussi bien sous LVAD que sous ECMO.

Description des anomalies fonctionnelles des plaquettes sous ECMO

La description d'anomalies des fonctions plaquettaires sous ECMO n'est pas récente. Dès les années 1970, des études *in vitro* et *in vivo* montrent une réduction de l'amplitude d'agrégation à l'ADP des plaquettes passant à travers une membrane d'oxygénation (86,87).

L'agrégation à l'acide arachidonique et au peptide TRAP (thrombin receptor activating peptide) restent inchangées sous ECMO dans une série de 5 patients, tandis que l'agrégation à l'ADP chute dès 90min d'implantation de l'ECMO (69). Une étude allemande de 2018 montre également une hypoagrégation après stimulation par l'ADP mais aussi avec la ristocétine, le collagène et l'épinéphrine, cette fois en technique Multiplate en sang total (17).

L'étude des plaquettes par thromboélastographie (TEG-platelet mapping) en pédiatrie montre une dysfonction plaquettaire sur la voie de l'ADP chez 92% des patients sous ECMO et sur la voie de l'acide arachidonique dans 75% des cas. La dysfonction plaquettaire est alors définie par une agrégation < 50% en réponse à un agoniste donné. L'étude ne permet pas de démontrer une corrélation entre ces anomalies et les saignements et la mortalité sous ECMO (88).

Cinétique d'apparition/disparition des dysfonctions plaquettaires sous ECMO

L'apparition des anomalies d'agrégation plaquettaires sous ECMO semble assez précoce. En néonatalogie, une diminution de 46% d'agrégation en réponse au collagène est retrouvée à 15 min de l'implantation de l'ECMO. Les réponses à la ristocétine et à l'ADP sont également significativement diminuées par rapport aux valeurs de départ ($p < 0.05$) (77).

Cette observation est nuancée chez l'animal où une absence de dysfonction plaquettaire est observée pendant les 24 premières heures sous ECMO. La diminution d'agrégation à l'ADP apparaîtrait après 24h (89).

La disparition des anomalies à l'explantation de l'ECMO suit également une cinétique variable selon les études, de 8h post-explantation en néonatalogie (77) à une récupération toujours incomplète à 3 jours chez l'adulte dans une étude allemande de 2018 (17).

Mécanismes physiopathologiques

Les mécanismes physiopathologiques responsables des anomalies fonctionnelles plaquettaires sous ECMO sont encore peu compris.

Les forces de cisaillement, élevées dans les circuits d'ECMO, sont majoritairement incriminées. Leurs effets sur les plaquettes sont multiples. Elles peuvent engendrer une activation plaquettaire mais également la perte de glycoprotéines membranaires des plaquettes (cf infra). Leur effet sur le facteur Willebrand peut en retour engendrer une liaison accrue du facteur Willebrand à la GPIb plaquettaire et donc une activation plaquettaire (90,91).

Une étude en néonatalogie montre une activation plaquettaire sous ECMO, avec augmentation de la P-sélectine soluble (92). Parallèlement à l'activation des plaquettes, une augmentation des matrix metalloproteinase (MMP)-2 plasmatiques est observée. Leur implication dans une nouvelle voie d'agrégation plaquettaire a été démontrée (93). Cette nouvelle voie serait potentiellement impliquée dans les dysfonctions plaquettaires sous ECMO.

Glycoprotéines plaquettaires sous ECMO

Dans des conditions de forces de cisaillement élevées, comme dans les circuits d'ECMO ou dans la sténose aortique, les plaquettes semblent perdre leur GPVI membranaire (59,94). Cette perte de GPVI est accompagnée d'une augmentation de la GPVI soluble, qui peut être dosée dans le plasma. La perte de la GPVI apparaît dans la minute qui suit l'exposition des plaquettes à des forces de cisaillement de 7500-10000/s. Elle est liée à l'action de la métalloprotéinase ADAM10 et indépendamment de la liaison du VWF à la GPIb plaquettaire. Ce phénomène physiologique de perte de la GPVI permettrait de diminuer l'agrégation plaquettaire médiée par le collagène dans des conditions athéromotiques. L'utilisation de GPVI soluble comme agent thérapeutique bloquant l'accès des plaquettes au collagène des plaques athéromotiques érodées est en cours d'évaluation.

Dans l'ECMO, ce phénomène pourrait être impliqué dans la dysfonction plaquettaire observée.

La perte de la GPVI sous ECMO est associée à une perte de la GPIb plaquettaire, visualisée en cytométrie en flux. La GPIIb-IIIa plaquettaire ne semble pas être impactée par des forces de cisaillement élevées (59).

La corrélation entre la perte des glycoprotéines GPIb et GPVI et la dysfonction plaquettaire a été démontrée (95).

Des taux augmentés de GPIb plasmatique retrouvés chez des patients implantés par LVAD au cours d'une insuffisance cardiaque corroborent l'hypothèse d'une perte de la GPIb plaquettaire dépendante de l'action des métalloprotéinases (96). La métalloprotéinase ADAM17 serait particulièrement impliquée (97).

Les taux de GPIb plasmatique, plus élevés chez les patients hémorragiques que chez les patients sans saignement, permettent l'établissement d'une courbe ROC pour la concentration en GPIb plasmatique avec une aire sous la courbe à 0.873 (96). La mesure de la concentration plasmatique en GPIb pourrait permettre de prédire les saignements sous LVAD et donc potentiellement sous ECMO.

La perte de la GP Ib plaquettaire semble liée à l'interaction des plaquettes avec le VWF immobilisé, sous des forces de cisaillement élevées. Ce phénomène serait en réalité un rétrocontrôle permettant de diminuer l'agrégation plaquettaire lors de hautes forces de cisaillement. Ainsi, le nombre de plaquettes adhérant à du VWF immobilisé diminue avec l'augmentation des forces de cisaillement (98).

Dans l'étude allemande de Kalbhenn de 2018 menée sur 59 patients sous ECMO, l'analyse des plaquettes en cytométrie en flux montre une importante diminution d'expression de CD62 (donc une diminution de sécrétion des granules α) et de CD63 (diminution de sécrétion des granules denses) sous ECMO chez tous les patients ($p < 0,001$). Les plaquettes présentent une agrégation au VWF induite par la ristocétine diminuée. A l'inverse, l'expression des CD41 (GPIIb-IIIa), CD42a (GPIX) et CD42b (GPIb) reste normale (17).

Par ailleurs, la liaison des GPIb et GPVI à leurs ligands respectifs entraîne une rapide élévation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) intracellulaires, grâce à l'interaction directe des séquences intracytoplasmiques de la GPIb et de la GPVI avec un effecteur TRAF4 (tumor necrosis factor receptor associated factor 4) qui active les complexes enzymatiques producteurs de ROS (99).

L'interaction entre ces différents phénomènes et leur association avec les saignements sous ECMO nécessite de plus amples études.

2.2. Hémorragies liées à des anomalies de la coagulation

a) Rappels physiologiques concernant la coagulation

La coagulation doit être appréhendée de manière dynamique avec une phase d'initiation puis d'amplification. Le facteur tissulaire (FT) mis à nu au niveau du sous-endothélium lors de la brèche vasculaire est le facteur déclenchant de la voie extrinsèque de la coagulation. Il peut également être exprimé à la surface des macrophages ou des monocytes activés et des cellules cancéreuses. La formation d'un complexe FT-Facteur VIIa est responsable de l'initiation de la génération de thrombine. L'apparition des premières traces de thrombine est nécessaire à l'activation du FV en FVa, du FVIII en FVIIIa et permet l'amplification du processus de coagulation. Le complexe FT-Facteur VIIa active également le facteur X en Xa et le facteur IX en IXa. Tout cela à la membrane plaquettaire.

Par ailleurs, la voie intrinsèque de la coagulation fait intervenir le facteur XII, activé en XIIa, qui lui-même active le facteur XI. Une boucle d'amplification via la prékallicréine et son cofacteur le kininogène de haut poids moléculaire active également le facteur XII. S'en suit une activation du facteur XI puis du facteur X via le complexe tenase. Le complexe pro-thrombinase aboutit à la génération de grandes quantités de thrombine, qui transforme le fibrinogène en fibrine, stabilisant ainsi le thrombus. L'intervention du facteur XIII permet la stabilisation de la fibrine qui devient insoluble.

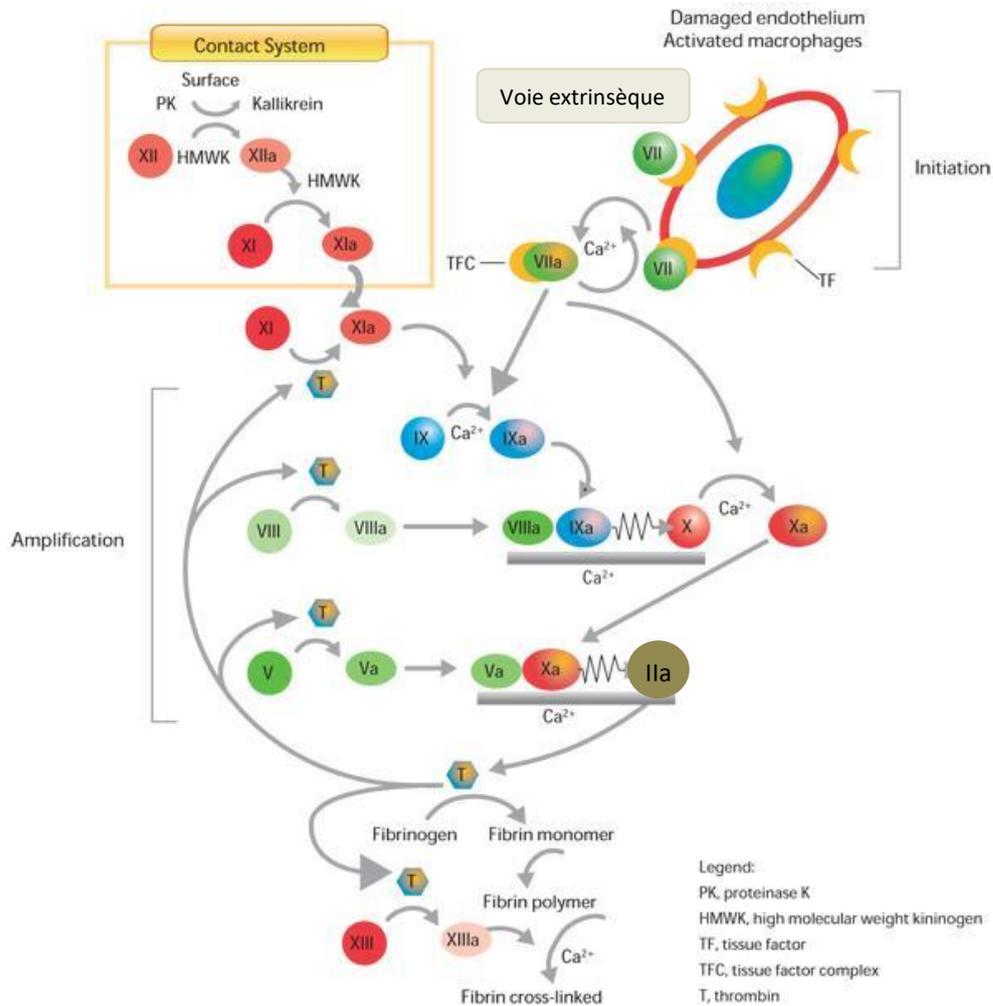


Figure 23 : schéma récapitulatif de la coagulation (d'après <https://www.levenmethemophilie.be/fr/hemophilie>)

b) Anomalies de la coagulation sous ECMO

L'exposition du sang à une surface non biologique provoque une réponse inflammatoire et un processus thrombotique tous deux interdépendants.

Dans les 2h qui suivent la pose de l'ECMO, les plaquettes activées entraînent une formation accrue de thrombine, mise en évidence par une rapide augmentation des fragments 1+2 de la thrombine et des complexes TAT (thrombine-antithrombine) (100).

Durant cette phase précoce d'activation de la coagulation, le complément est également activé, avec une augmentation de la fraction C3a, une diminution du compte de leucocytes et la production de TNF α (Tumor necrosis factor). Cette activation initiale persiste 24h (101).

Les fragments 1+2 de la thrombine et des complexes TAT présentent une décroissance tandis que les D-Dimères restent élevés durant les 48 premières heures (100).

Une seconde période d'activation de la coagulation est observée 72h après la pose d'ECMO. Elle est caractérisée par une activité coagulante et fibrinolytique exacerbée sans activation du complément.

La liaison des monocytes activés avec la surface étrangère entraîne la libération de facteur tissulaire qui peut stimuler la voie extrinsèque de la coagulation (102). Du FT soluble peut également être produit par les cellules endothéliales sous l'action de cytokines inflammatoires telles que l'IL-6 ou le TNF- α (103).

Les patients sous ECMO présentent également une diminution de leur taux de facteur XIII, non détectable avec les tests classiques de coagulation (TP, TCA). La stabilisation du thrombus est alors déficiente, ce qui peut être détecté grâce au ROTEM ou par TEG. Cette diminution du facteur XIII est retrouvée chez des patients de réanimation sans ECMO, et le rôle de l'ECMO dans cette diminution n'est pas démontré (78).

Les facteurs de la coagulation, plus généralement, sont couramment abaissés sous ECMO, et diminuent dès les 24 premières heures après implantation. La part de l'hémodilution et d'une réelle consommation des facteurs par activation de la cascade de coagulation est difficile à apprécier. La diminution du facteur V semble la plus marquée, tandis que le taux de facteur VIII diminue puis augmente rapidement (104). L'inflammation compense ce phénomène par une production accrue des facteurs.

Les plaquettes activées peuvent générer des microparticules à l'origine de thromboses. Ces microparticules sont des petites vésicules issues de la membrane des cellules, de 0.1 à 1 μm de diamètre, qui peuvent médier une réponse inflammatoire et prothrombotique. Différentes études ont montré un accroissement de la génération de microparticules sous ECMO (105,106).

c) Inflammation

Inflammation et coagulation étant intimement liées, l'inflammation sous ECMO pourrait être associée aux saignements ou thromboses observées (107,108).

L'initiation de l'ECMO est en effet associée à une réaction inflammatoire quasi immédiate et assez complexe, similaire à celle observée dans les syndromes de réponse inflammatoire systémique (SIRS). Ce syndrome est caractérisé par un « orage cytokinique », une activation leucocytaire massive et une dysfonction multi-organes. Ce syndrome se manifeste généralement dans les premières heures de la mise sous ECMO, par une hypotension, une oligurie, une compliance pulmonaire diminuée, une insuffisance hépatique et persiste plusieurs jours.

L'inflammation liée à l'ECMO est plus fréquente chez les nouveau-nés et jeunes enfants, du fait de la différence plus importante entre le volume circulant du patient et le volume de l'ECMO (augmentant de 200 à 300%), ce qui génère une activation des composants cellulaires sanguins (109).

Les données concernant l'inflammation sous ECMO sont majoritairement issues des données sous CEC, les procédures sont pourtant assez différentes. Contrairement à la CEC, l'absence d'interface sang-air durant l'ECMO réduit la réponse inflammatoire par exemple.

La circulation pulsatile sous ECMO VV, reposant sur la fonction cardiaque native, serait responsable d'une moindre activation de la réponse inflammatoire, en comparaison au flux continu de l'ECMO VA (110).

Au niveau de la coagulation, dans les 10 minutes après initiation de l'ECMO, l'activité du facteur XII est maximale. Le facteur XIIa convertit la prékallitréine en kallitréine, connue pour activer les polynucléaires neutrophiles sous ECMO. Récemment, l'utilisation d'un anticorps anti-XIIa a montré son efficacité pour diminuer l'inflammation sous ECMO ex-vivo et chez l'animal (111). Ce nouvel anticoagulant, en plus de ses effets anti-inflammatoires, pourrait permettre de diminuer le risque thrombotique de l'ECMO, sans augmenter le risque hémorragique. Des études complémentaires sont nécessaires.

Les plaquettes sont aussi des médiateurs de l'inflammation sous ECMO. Les plaquettes activées sont capables de se fixer au fibrinogène adsorbé sur le circuit d'ECMO et de relarguer le contenu de leurs granules, contenant des cytokines pro-inflammatoires. Les plaquettes fixées sont aussi capables de se lier aux leucocytes (monocytes et PNN), induisant l'activation leucocytaire et leur sécrétion de cytokines (et de facteur tissulaire pour les monocytes) (92).

L'activation du complément liée à la détection par le système immunitaire de matériel relevant du « non-soi » se fait notamment via la voie alterne du complément sous ECMO (112). L'utilisation de

pompes centrifuges et de circuits coatés à l'héparine a permis de diminuer l'activation du complément (113,114).

La génération de médiateurs de l'inflammation sous ECMO est également responsable d'une activation étendue de l'endothélium vasculaire avec altération de l'expression des gènes des cellules endothéliales, démontrée en chirurgie cardiaque (115). L'activation des cellules endothéliales induit leur expression accrue de récepteurs leucocytaires, responsable d'une augmentation de la transmigration leucocytaire. L'infiltration par des PNN est responsable d'altérations d'organes (dégranulation, libération d'élastase, myéloperoxydase, lysozyme, ROS) (116,117). L'activation des neutrophiles semble être corrélée à la détérioration de la fonction pulmonaire et l'oxygénateur semble jouer un rôle majeur dans l'activation leucocytaire (118).

Les NETs (neutrophil extracellular traps) fibres extracellulaires d'ADN, d'élastases et d'histones, pourraient aussi être impliqués dans la capture du VWF, induisant le recrutement des plaquettes, et la formation de thrombi.

La rupture de la barrière intestinale sous ECMO engendrerait une perméabilité augmentée avec translocation de bactéries endoluminales à travers la muqueuse, responsables de dysfonctions d'organes à distance. L'augmentation rapide des cytokines inflammatoires sous ECMO lors du SIRS serait liée à un relargage de cytokines pré-formées et stockées dans l'intestin (119). La dialyse rénale semblerait augmenter la survie sous ECMO, potentiellement en éliminant les médiateurs inflammatoires relargués lors d'un SIRS ou sepsis sous ECMO.

Ainsi, le contrôle de l'inflammation pourrait faciliter l'équilibre hémostatique précaire sous ECMO.

2.3. Fibrinolyse

a) Physiologie de la fibrinolyse

La fibrinolyse intervient de façon physiologique pour assurer la réperméabilisation d'un vaisseau, après formation d'un thrombus. Dans le plasma normal circule une glycoprotéine, le plasminogène, qui est activé en plasmine grâce à l'action d'activateurs plasmatiques ou tissulaires (t-PA, u-PA). La plasmine, enzyme protéolytique, agit ainsi sur la fibrine, mais aussi sur le fibrinogène et les facteurs V et VIII de la coagulation, pour lyser le caillot et former des produits de dégradation de la fibrine (D-dimères) et du fibrinogène. Des inhibiteurs de la fibrinolyse (PAI-1, α_2 antiplasmine...) empêchent la dissémination du phénomène au-delà du thrombus.

b) Hyperfibrinolyse sous ECMO

Le fibrinogène étant essentiel à la formation du coagulum, une fibrinolyse excessive peut conduire à des saignements. L'activation de la fibrinolyse peut être primaire, liée à l'activation de la plasmine, mais également secondaire à l'activation de la thrombine. Ces deux phénomènes sont possibles sous ECMO (7). Le dépôt de fibrine et la formation de thrombi au sein du circuit d'ECMO peuvent être responsables d'une hyperfibrinolyse, engendrant des phénomènes hémorragiques plus généralisés avec par exemple des saignements des muqueuses.

Les saignements liés à l'hyperfibrinolyse devraient répondre aux anti-fibrinolytiques. Des essais avec l'acide tranexamique et l'acide aminocaproïque en pédiatrie et néonatalogie sont en cours pour limiter la part de l'hyperfibrinolyse dans le saignement (120–122).

La thromboélastographie et le ROTEM peuvent présenter un intérêt dans la détection de cette hyperfibrinolyse (22).

3. Prise en charge des saignements sous ECMO

Les interventions thérapeutiques mises en place pour juguler les saignements sont diverses :

- Compression mécanique : pansements compressifs, méchage nasal
- Reprise au bloc opératoire pour saignements, décrite pour 34% des ECMO VA et 17% des EMCO VV (32), pour remplacement des canules par exemple ou chirurgie hémostatique
- Ajustement de l'anticoagulation
- Administration d'anti-fibrinolytiques
- Transfusions de PFC/CGR/plaquettes avec un ratio PFC/CGR de 1 pour 1 ou 1 pour 2, avec une transfusion plaquettaire précoce selon les recommandations HAS 2012 pour la prise en charge des chocs hémorragiques ou situations à risque de transfusion massive (123)
- Utilisation de concentrés de facteurs (PPSB, facteur VIIa, fibrinogène, facteur XIII)
- Remplacement de l'oxygénateur ou du système d'ECMO
- Explantation de l'ECMO

Dans une étude rétrospective menée sur 59 patients (122), l'explantation de l'ECMO est logiquement associée au taux de succès le plus élevé pour juguler le saignement (93%), suivi par l'administration d'acide tranexamique (88%), le remplacement de l'oxygénateur ou du système d'ECMO (83%), l'administration de facteur VIIa (75%), le repositionnement d'une canule (75%). L'administration de 36µg de desmopressine est aussi intéressante avec un taux de succès de 50%, de même que la transfusion plaquettaire (50%).

De façon assez surprenante, si aucune intervention n'est mise en place, l'évènement hémorragique s'arrête avec un succès de 31% (sur 84 évènements hémorragiques de tout type, chez 59 patients). L'ajustement de l'anticoagulation avec réduction des doses d'héparine arrête 37% des saignements (122).

Concernant la transfusion de CGR, alors que l'ELSO recommande des seuils transfusionnels de 12 à 14 g/L d'hémoglobine, la concentration d'hémoglobine cible pourrait être abaissée à 7.0 g/dL, sans pour autant diminuer les taux de survie (124) ; il faut cependant rester prudent, les avancées concernant les ECMO VV n'étant pas forcément applicables aux ECMO AV.

L'administration de facteur VII recombinant se révèle très efficace ; néanmoins, son utilisation est limitée à l'hémorragie réfractaire mettant la vie en danger, où le facteur VII recombinant fournit alors un profil d'innocuité acceptable (78,125).

Etude prospective

Primary hemostasis imbalance during Extracorporeal Membrane Oxygenation therapy: a pilot study

ABSTRACT

Background

Severe hemorrhages are the most frequent complications of extracorporeal membrane oxygenation (ECMO). They occur in about 50-60% of ECMO supports and are a major cause of mortality. They require frequent transfusions and may lead to surgical revision. Heparinization and anti-platelet therapy, surgery, inflammation and hemodilution: the causes of hemorrhages on ECMO therapy are multifactorial but not yet clearly identified. Hemostasis balance is disturbed with ECMO and an Acquired von Willebrand Syndrome (AVWS) has been described. Yet different ECMO pumps with different rotational speeds currently exist and their effects on primary hemostasis need comparison.

Aims

The main objective of this study was to evaluate and characterize Von Willebrand factor activity in patients on different pumps systems of ECMO with different rotational speeds. The secondary objectives were to evaluate bleeding and platelet functions.

Methods

We performed a monocentric prospective study on 31 adult patients benefiting from ECMO between November 2016 and June 2018. Patients received a Rotaflow centrifugal pump (n=24, Maquet®) or with a Medos pump (n=7, Xenios®, Germany). Screening for AVWS included Willebrand antigen levels (VWF:Ag) and Willebrand activity assay (VWF:RCO, with the ratio VWF:RCO/VWF:Ag calculated) and electrophoresis to assess the loss of Willebrand high molecular weight (HMW) multimers. Willebrand factor analysis also included a Willebrand-collagen binding assay (VWF:CB). Platelet functions were assessed by light transmission aggregometry following stimulation with different agonists as well as surface expression of platelet adhesive receptors (GPIb, GPIIb-IIIa) and activation markers with flow cytometry. Platelet counts were measured concomitantly. Bleeding and clinical outcome was assessed.

Results

This study confirmed the presence of an AVWS in all ECMO patients. A relationship between VWF:RCO/VWF:Ag ratio (>0.5 vs ≤ 0.5) and platelet transfusion amounts ($p=0.0325$) could be identified. Clinical and biological data did not show any significant statistical differences between the Medos and Rotaflow groups. Still a trend towards more bleeding on Medos pump at high rotational speed could be observed with more transfusion requirements, as well as a deeper loss of HMW VWF multimers ($p=0.001$). We highlighted altered platelet functions with no specific profile, while expression of platelet adhesive receptors (GPI and GPIIb-IIIa) and activation marker were within normal range.

Conclusion

Comparison of the two ECMO pumps did not show any significant differences neither biological nor clinical. Still a tendency to more bleeding on Medos pump at high rotational speed could be identified. Further investigations on larger series would help in define the pumps rotational speed threshold associated with total loss of HMW VWF multimers.

INTRODUCTION

Extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) is an expanding cardiorespiratory support technique. During acute respiratory distress syndrome (ARDS), ECMO is a rescue therapy that limits secondary lesions due to mechanical ventilation. ECMO is also used in cardiogenic shocks refractory to conventional treatments to maintain a satisfactory tissue perfusion pending myocardial recovery or heart transplantation. Either used as a venovenous (VV) or venoarterial (VA) cannula configuration, it can facilitate oxygenation and removal of carbon dioxide or provide both respiratory and hemodynamic support (8). ECMO has become an increasingly used tool in critical care and its indications have broadened recently. However bleeding and thrombotic complications remain a major impediment to its expansion (7). Severe hemorrhages are identified in many registries as the most important cause of mortality in ECMO patients (28,29). The origin of these hemorrhages is multifactorial, including post-surgical bleeding after cardiectomy or hemodilution due to the system. Hemostatic changes related to blood contact with the material is also incriminated. The multimeric protein Von Willebrand Factor (VWF) is a key actor of primary hemostasis and its functionality is crucial in platelet adhesion and aggregation for clot formation. Acquired Von Willebrand syndrome (AVWS) is characterized by a loss of the high molecular weight multimers of VWF. An AVWS has been described on ECMO (17,54,56–59). Yet different ECMO pumps with different characteristics and rotational speeds exist. Only few studies have evaluated the impact of different ECMO systems on hemostasis (68,126). The primary objective of the present study was to evaluate and characterize the impact of two different ECMO pumps systems, a Rotaflow centrifugal pump (Maquet®) and a Medos pump (Xenios®) on VWF functions. The secondary objectives were to evaluate bleeding and clinical outcome along with platelet functions.

MATERIALS AND METHODS

Study design and patients

This trial was a prospective, monocenter pilot study conducted at Pontchaillou Rennes Hospital France. Adult patients with ECMO implantation were enrolled from November 2016 to June 2018 in the cardiothoracic surgery care unit. Adult patients on ECMO from other intensive care units were enrolled from January 2018 to June 2018. Patients gave informed consent. Exclusion criteria were age < 18, participation in another clinical trial or Willebrand factor infusion within the last 48 hours. 111 ECMO therapy were received in our hospital during the study period. Non-inclusion often occurred for practical reasons such as laboratory technical constrains or too short ECMO duration.

Patients were equipped with a Rotaflow centrifugal pump (n=24, Maquet®) or with a Medos pump (n=7, Xenios®, Germany). The choice between the two pump systems was based on availability at the time of ECMO implantation. All patients received standard anticoagulation therapy with a bolus of unfractionated heparin administered immediately before cannulation and continued via a central venous line with a daily monitoring of anti-Xa levels. All patients except one received aspirin 100 mg/day.

Data collection

Patients were included at a minimum of 24 hours post-ECMO initiation (mean 3.6 day ± 3.0 days). Data during ECMO support were collected anonymously and patients were registered in a CNIL

(French national data protection authority) data base consent registry. As part of standard care, blood samples were collected for laboratory analysis. At the time of blood sampling, following demographic, clinical and biological data were reported: age, sex, body mass index (BMI), ABO blood type, ECMO indication (post-surgical or not), type of cannulation (VA or VV), rotational pumps speed, fibrinogen levels, hemoglobin. Apache II score was calculated. The nadir platelet count during ECMO therapy and the day it occurred were documented retrospectively. Bleeding related data were examined retrospectively as well: number of red blood cell concentrates (RBC), platelet units and fresh frozen plasma units transfused during ECMO therapy and for the first 48 hours of ECMO, surgery requirement for bleeding during ECMO therapy and 30-days and 90-days mortality. Existence of a hepatic impairment and a renal failure at ECMO initiation was also examined.

Laboratory tests

VWF antigen (VWF:Ag ; STA-LIATEST® on Sta-R, normal 50-150%) and VWF ristocetin cofactor activity (VWF:RCO ; CS-2500® Siemens, normal 50-150%) were measured with immunoturbidimetric methods while collagen binding capacity (VWF:CB) was determined photometrically with ELISA (Asserachrom®, normal 64-155%).

VWF multimers were separated by a home-developed technique of SDS agarose gel electrophoresis in the Caen hospital laboratory France (Dr REPESE).

AVWS was defined as a decrease or loss of High Molecular Weight (HMW) multimers of VWF and/or a VWF:RCO/VWF:Ag ratio ≤ 0.7 .

All these laboratory tests were done on sodium citrate plasmas after centrifugation. Plasma was analyzed within four hours after blood collection or stored at -20°C for batch analysis.

Platelet blood count was determined by automated cell counter (DxH 800 Analyzer, Beckman Coulter). Thrombocytopenia was defined as a platelet count $< 150 \text{ G/L}$.

Platelet functions were tested by light transmission aggregometry (LTA) on PAP & Aggregometer with different agonists : arachidonic acid 1.5 mM, collagen 2 and 5 mg/L, ADP 2, 5 and 10 μM and ristocetin 0.5 and 1.5 g/L. Platelet aggregation was expressed as percent of the maximal aggregation obtained 6 min after the addition of agonists. A maximum aggregation $>50\%$ was considered as normal.

Surface expression of platelet adhesive receptors (GPIb, GPIIb-IIIa) and activation marker (GMP140) was assessed by flow cytometry analysis (BD FACSLyric®), before and after platelet activation with TRAP (Thrombin Receptor Agonist Peptide). Mean fluorescence intensity were converted in receptor quantities thanks to calibration.

Statistics

Comparison between groups was done with the Student test or Mann-Whitney Wilcoxon test for quantitative values. Chi-2 test or Fischer test was used for comparison of qualitative values. ANOVA tests were realized. Values normal distribution was verified. Logistic regression needed log-linear assumptions to be verified. If it was not the case, quantitative variables were assigned to classes. A probability value of less than 0.05 was considered significant. Data are either presented as absolute values or means (\pm standard deviation). Statistical analysis was performed with SAS, v.9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

RESULTS

Patients

31 patients with a mean age of 53.4 ± 13.4 years were included. 24 of them were connected to a Rotaflow centrifugal pump (Maquet®) and 7 with a Medos pump (Xenios®). Patients included were more often men (71%) with excess BMI (mean 27.5 ± 5.0 Kg/m²) and were supported with ECMO for 11.6 ± 9.0 days. They were more often on VA cannula configuration because of a large recruitment among the cardiac surgery department with 32.3% post-surgery patients, mainly post-cardiotomy. Demographic characteristics are summarized in table 1. They did not differ significantly between the two ECMO systems, except for the pump's rotation speed which is higher with the Medos system compared to the Rotaflow pump (7571.4 ± 1528.3 rpm vs 3575.8 ± 498.8 ; $p < 0.0001$). This is consistent with pumps provider's data.

	Total population	ECMO Rotaflow (Maquet®)	ECMO Medos (Xenios®)	p-value ($\alpha=0.05$)
n	31	24	7	
Age (years)	53.4 ± 13.4	54.3 ± 13.6	50.0 ± 13.1	$p = 0.3320$
Sex (% male)	71.0	75.0	57.1	$p = 0.3841$
BMI (Kg/m²)	27.5 ± 5.0	27.4 ± 5.2	27.9 ± 4.3	$p = 0.7588$
ABO blood type (n, (%))				
A	11 (35.5)	11 (45.8)	0 (0.0)	NA
B	2 (6.5)	2 (8.3)	0 (0.0)	
AB	1 (3.2)	1 (4.2)	0 (0.0)	
O	17 (54.8)	10 (41.7)	7 (100.0)	
ECMO duration (days)	11.6 ± 9.0	11.3 ± 9.5	12.9 ± 7.3	$p = 0.4347$
Indication (n, (%))				
Cardiac	25 (80.6)	18 (75.0)	7 (100.0)	
Respiratory	6 (19.4)	6 (25.0)	0 (0.0)	
Post-surgery indication (n, (%))	10 (32.3)	7 (29.2)	3 (42.9)	$p = 0.6518$
VA ECMO (n,(%))	26 (83.9)	19 (79.2)	7 (100.0)	$p = 0.6498$
VV ECMO (n, (%))	4 (12.9)	4 (16.7)	0 (0.0)	
Rotational speed, Rate per minute (rpm)	4478.1 ± 1882.0	3575.8 ± 498.8	7571.4 ± 1528.3	$p < 0.0001$
Hepatic impairment at ECMO initiation (AST, ALT > 2 normal) (%)	16 (72.7)	12 (75.0)	4 (66.7)	$p = 1.0000$
Renal failure at ECMO initiation (CKD-EPI < 60 mL/min) (%)	15 (48.4)	13 (54.2)	2 (28.6)	$p = 0.3944$
Mortality prediction by APACHE II Score (%)	23.7 ± 11.4	25.3 ± 12.1	18.4 ± 6.8	$p = 0.0887$

Table 1: Patient characteristics. NA = non applicable ; BMI = body mass index ; VA = veno-arterial ; VV = veno-venous

VWF analysis

An AVWS was found in all 31 patients included (table 2) with reduced VWF:RCO/VWF:Ag ratios ≤ 0.7 (mean 0.5 ± 0.2). High molecular weight (HMW) multimers of VWF were diminished or missing in all 31 patients. There was no significant difference in the cumulate ratio of HMW and very high molecular weight (VHMW) multimers of VWF between the Rotaflow and Medos groups (0.3 ± 0.2 vs 0.2 ± 0.2 respectively, $p = 0.0689$). However, in the Medos group ($N=7$), we discerned 2 patients with a significantly lower mean pump rotational speed (5550 ± 50 vs 8380 ± 552 rpm). When we excluded those 2 patients, we observed a much deeper loss of HMW and VHMW of VWF in the Medos group, with a ratio $\%HMW+VHMW/control$ of 0.05 ± 0.05 . The loss of VWF multimers became significantly more important in the Medos than in the Rotaflow group ($p=0.001$). VWF:CB/VWF:Ag ratios were also decreased in 17 out of 26 patients tested (65.4%).

	Total population	ECMO Rotaflow (Maquet®)	ECMO Medos (Xenios®)	p-value
n	31	24	7	
VWF:Ag (%)	425.6 ± 114.5	422.2 ± 122.7	437.3 ± 87.5	$p = 0.9811$
VWF:RCO (%)	223.7 ± 117.3	220.5 ± 120.3	236.8 ± 113.9	$p = 0.7557$
Ratio VWF:RCO/VWF:Ag	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.2	$p = 0.9751$
Ratio $\%HMW+VHMW/control$	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.2	$p = 0.0689$
VWF:CB (%)	273.5 ± 96.4	269.6 ± 98.9	287.1 ± 93.2	$p = 0.7408$
Ratio VWF:CB/VWF:Ag	0.7 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.6 ± 0.2	$p = 0.9717$
F VIII (%)	263.1 ± 99.8	270.6 ± 100.7	227.0 ± 97.1	$p = 0.2360$
Fibrinogen (g/L)	5.8 ± 2.1	5.9 ± 2.2	4.7 ± 0.7	$p = 0.2589$
Hemoglobin (g/dL)	9.3 ± 1.6	9.2 ± 1.7	9.7 ± 1.4	$p = 0.2190$

Table 2: Willebrand and coagulation tests

HMW = High Molecular Weigh multimers of VWF ; VWMW = Very High Molecular Weigh multimers

Clinical outcome

Total transfusion requirements were high and did not differ statistically between the Medos and Rotaflow groups (RBC concentrates 17.1 ± 12.4 vs 11.7 ± 10.5 ; platelet units 4.6 ± 5.0 vs 3.2 ± 4.2 and FFP 7.9 ± 8.1 vs 4.3 ± 7.3 respectively) (table 3).

We specifically evaluated post-surgery patients: we assessed 48 first hours post-implantation transfusion volumes, because post-surgery patients present an increased bleeding risk the first 48 hours post-surgery. Indeed, first 48 hours transfusion requirements were much higher in the post-surgery group than in non-surgical group (RBC concentrates 7.9 ± 6.1 vs 1.4 ± 2.0 $p= 0.00005$; platelet units 2.0 ± 2.2 vs 0.3 ± 0.6 $p=0.00842$ and 7.0 ± 6.3 vs 0.8 ± 1.3 FFP $p=0.00347$ respectively). In such surgical and non-surgical subgroups, transfusion and mortality parameters did not differ between Medos and Rotaflow groups (data not shown).

During the period of ECMO, 22.2% patients underwent surgery to stop bleeding (2/6 on Medos vs 4/21 on Rotaflow), for instance to reposition the cannulas.

30 days and 90 days mortality post ECMO implantation was assessed (respectively 29% and 50%) and was higher on Rotaflow system at 90 days than Medos (60.9% vs 14.3%) but the difference was not statistically significant ($p=0.6395$ and 0.0801 respectively).

	Total population	ECMO Rotaflow (Maquet®)	ECMO Medos (Xenios®)	p-value ($\alpha=0.05$)
n	31	24	7	
RBC concentrates transfusion (n)	12.9 ± 11.0	11.7 ± 10.5	17.1 ± 12.4	p = 0.2558
Platelet transfusion units (n)	3.5 ± 4.3	3.2 ± 4.2	4.6 ± 5.0	p = 0.4865
FFP transfusion units (n)	5.1 ± 7.5	4.3 ± 7.3	7.9 ± 8.1	p = 0.1572
First 48h RBC transfusion (n)	3.5 ± 3.3	3.0 ± 3.2	6.0 ± 8.3	p = 0.2724
First 48h platelet transfusion (n)	0.9 ± 1.0	1.0 ± 1.1	1.0 ± 2.6	p = 0.9788
First 48h FFP transfusion (n)	2.8 ± 3.4	2.0 ± 3.1	6.0 ± 7.7	p = 0.2462
Surgery for bleeding (n, (%))	6 (22.2)	4 (19)	2 (33.3)	p = 0.5875
30 days mortality post implantation (n,(%))	9 (29.0)	8 (33.3)	1 (14.3)	p = 0.6395
90 days mortality post implantation (n,(%))	15 (50.0)	14 (60.9)	1 (14.3)	p = 0.0801

Table 3: Clinical data on bleeding ; RBC = Red blood cells ; FFP = Fresh Frozen Plasma

Platelet count and platelet functions in ECMO patients

At time of blood sampling (3.6 day ± 3.0 days after ECMO implantation), only 4 out of the 31 patients did not present with thrombocytopenia. Nadir platelet counts were on average 61.3 ± 50.2 G/L and occurred at day 5.1 ± 3.6. LTA was impaired in 80% with arachidonic acid. Aggregation with collagen was abnormal in 60% of patients. Platelet aggregation with ADP and ristocetin were also altered (results in table 4).

On the contrary, flow cytometry assessment of platelet adhesive receptors expression (GPIb, GPIIb-IIIa) and activation marker was found within normal range.

ANOVA and logistic regressions analysis of mortality and transfusion requirements

We sought for biological explanatory variables for mortality and transfusion requirements among Willebrand and platelet analysis (tables 5 and 6). The nadir platelet count on ECMO was found associated with greater RBC (p=0.0008) and platelet transfusion amounts (p=0.0004). The day of nadir platelet count was also associated with larger RBC requirements (p=0.0144).

ANOVA analysis also found a significant relationship between VWF:RCO/VWF:Ag ratio (>0.5 vs ≤0.5) and platelet transfusion amounts (p=0.0325).

	Total population	ECMO Rotaflow (Maquet®)	ECMO Medos (Xenios®)	p-value
n	31	24	7	
Platelet Count (G/L)	101.7 ± 55.0	109.4 ± 59.5	75.3 ± 23.1	
Nadir platelet count (G/L)	61.3 ± 50.2	66.1 ± 55.4	44.9 ± 20.6	p = 0.3817
Day of nadir platelet count	5.1 ± 3.6	5.1 ± 4.1	5.3 ± 1.4	p = 0.3271
Platelet aggregometry, arachidonic acid				
Normal	4	4	0	
< 50%	3	3	0	
nul	13	12	1	
Platelet aggregometry, collagen				
Normal	8	8	0	
< 50%	8	7	1	
nul	4	4	0	
Platelet aggregometry, ADP				
Normal	14	13	1	
< 50%	2	2	0	
nul	4	4	0	
Platelet aggregometry, ristocetin				
Normal	6	6	0	
< 50%	3	2	1	
nul	4	4	0	
Quantification of platelet GP				
CD41a [37000–65000]	57453.6 ± 10454.6	56177.2 ± 9996.6	69579.5 ± 36233.0	
CD42b [27000–49000]	37290.3 ± 6442.0	37401.6 ± 6979.5	26233.0 ± 682.0	
CD62 [<1000]	365.1 ± 186.0	333.2 ± 161.9	668.5 ± 3.5	
After TRAP stimulation				
CD41a [58000–112000]	78049.7 ± 15510.9	76016.4 ± 15003.3	97366.0 ± 2341.0	
CD42b [9000–29000]	28751.3 ± 5643.2	29149.5 ± 5734.2	24968.5 ± 3357.5	
CD62 [>1000]	8676.7 ± 2311.0	8541.5 ± 2414.5	9961.0 ± 1642.0	

Table 4: Platelet analysis. Normal ranges are given into brackets.

Clinical case report

We report here a severe case of hemorrhage under ECMO in our hospital (figure 1). This case led us to conduct the present comparison between the two pumps available in our institution.

After a severe myocarditis, a 17-year-old young woman received 12 days of Medos pump VA ECMO therapy, with 14 RBC and 5 platelet units transfused. Her low hemoglobin and platelet levels and the persistence of bleeding made the physicians decide to switch from Medos to Rotaflow pump. Then she required only 2 RBC transfusions during the 26 remaining days before a heart transplantation. Imputability of pump change can be discussed but raise the problematic studied here.

Variable to be explained	n	Explanatory variable	p-value
RBC transfusion (N)	27	Ratio VWF:RCO/VWF:Ag (>0.5 vs ≤0.5)	0.4194
	26	Ratio VWF:CB/VWF:Ag (>0.7 vs ≤0.7)	0.7087
	18	Ratio %HMW+VHMW/control (>0.3 vs ≤0.3)	0.4062
	31	Nadir platelet count (G/L) (ref ≤50)	0.0008
		After adjustment (confounder variable = pump)	0.4925
	31	Day of nadir platelet count	0.0144
		After adjustment (confounder variable = pump)	0.5681
		Platelet aggregometry, arachidonic acid	0.9607
	collagen	0.4635	
	ADP	0.5742	
Platelet transfusion (N)	27	Ratio VWF:RCO/VWF:Ag (>0.5 vs ≤0.5)	0.0325
		After adjustment (confounder variable = pump)	0.6477
	26	Ratio VWF:CB/VWF:Ag (>0.7 vs ≤0.7)	0.5505
	18	Ratio %HMW+VHMW/control (>0.3 vs ≤0.3)	0.7362
	31	Nadir platelet count (G/L) (ref ≤50)	0.0004
		After adjustment (confounder variable = pump)	0.8884
	31	Day of nadir platelet count	0.1470
		Platelet aggregometry, arachidonic acid	0.9424
	collagen	0.6781	
	ADP	0.8840	

Table 5: ANOVA analysis of transfusion requirements and Willebrand and Platelet tests

Variable to be explained	N	Explanatory variable	OR [IC95%]	p-value
30 days mortality post implantation	27	Ratio VWF:RCO/VWF:Ag (>0.5 vs ≤0.5)	0.65 [0.12 ; 3.57]	0.6209
	26	Ratio VWF:CB/VWF:Ag (>0.7 vs ≤0.7)	1.25 [0.22 ; 7.21]	0.8054
	17	Ratio %HMW+VHMW/control (>0.3 vs ≤0.3)	0.68 [0.01 ; 37.20]	0.8503
	31	Nadir platelet count (G/L) (ref ≤50)	5.87 [0.51 ; 67.44]	0.1552
	31	Day of nadir platelet count	4.77 [0.43 ; 53.00]	0.2034
90 days mortality post implantation	26	Ratio VWF:RCO/VWF:Ag (>0.5 vs ≤0.5)	0.93 [0.18 ; 4.65]	0.9250
	25	Ratio VWF:CB/VWF:Ag (>0.7 vs ≤0.7)	1.46 [0.26 ; 8.20]	0.6654
	17	Ratio %HMW+VHMW/control (>0.3 vs ≤0.3)	0.34 [0.00 ; 43.40]	0.6659
	30	Nadir platelet count (G/L) (ref ≤50)	0.25 [0.05 ; 1.42]	0.1188
	30	Day of nadir platelet count	5.06 [0.79 ; 32.24]	0.0864

Table 6: Mortality-analysis by logistic regressions

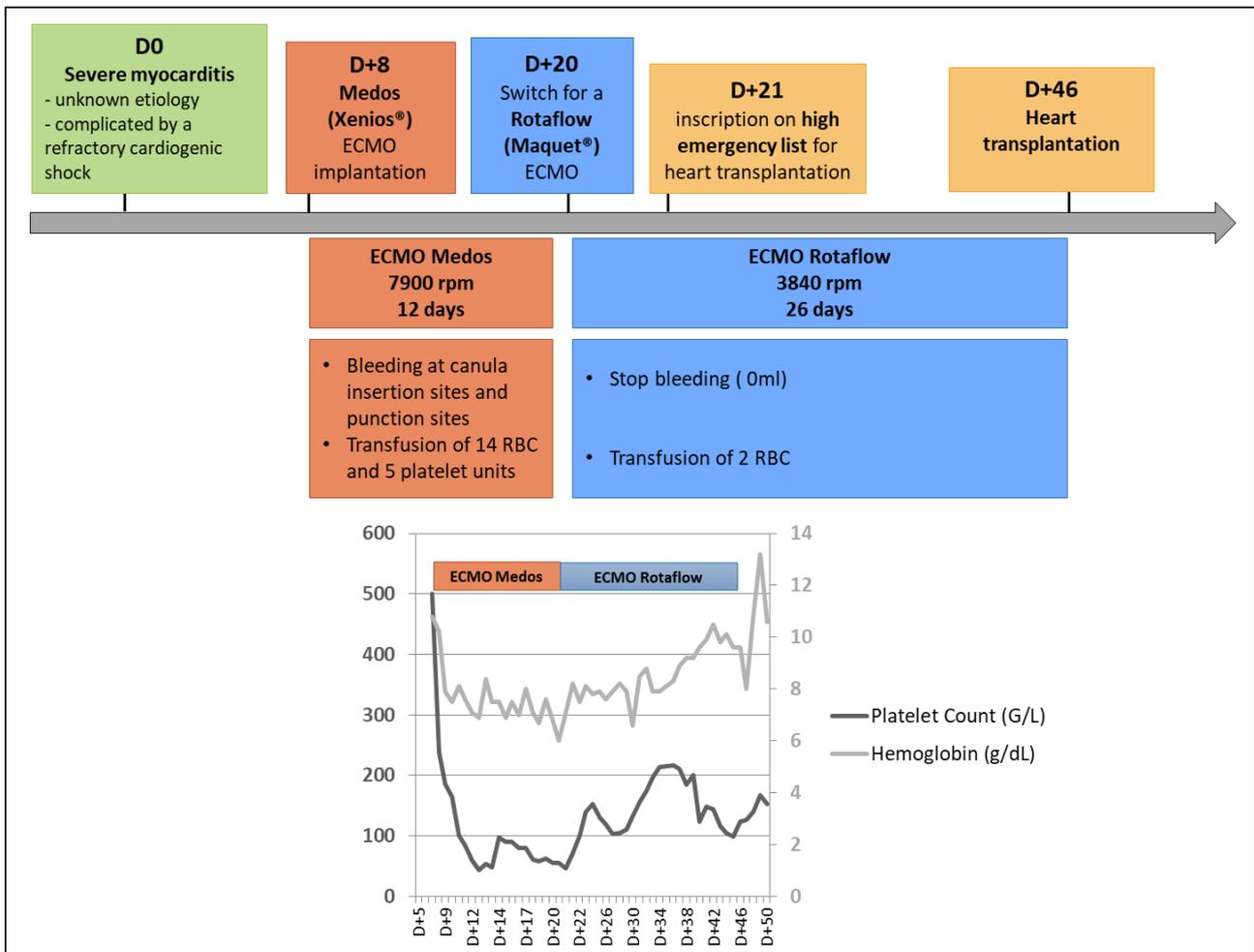


Figure 1: Description of a case of a decrease in blood products use in a switch between Medos and Rotaflow pump.

DISCUSSION

Acquired Von Willebrand Syndrome

In this study, we compared two ECMO pumps regarding Willebrand factor, bleeding and platelet functions. All 31 patients included developed an AVWS with VWF:RCo/VWF:Ag ratios ≤ 0.7 and diminished or missing HMW multimers. The development of AVWS with ECMO had been described earlier (17,54,56–59) and was attributed to high shear forces in ECMO.

The enhanced shear stress which occurs in ECMO may result in mechanical destruction of the large multimers of VWF or in disintegration of the tertiary structure of the large multimers which makes them susceptible for proteolytic ADAMTS13 cleaving (58). Exposure of VWF to high shear forces also allows VWF to become a ligand for the LDL receptor, increasing the incorporation of VWF into macrophages, the predominant cells involved in VWF clearance (61,62). The shear forces appear to be proportional to the rotational ECMO pump speed. When the pump speed increases from 1500 rpm to 3000 rpm, the shear forces are multiplied by 4 (68).

We examined here Willebrand factor functionality in patients with ECMO pumps of different rotational speeds. Interestingly, no statistical differences were found between the two systems regarding VWF tests. However when we excluded 2 patients from the Medos group, with significantly lower pump rotational speeds (5550 ± 50 vs 8380 ± 552 rpm), the loss of VWF

multimers became significantly more important in the Medos than in the Rotaflow group ($p=0.001$). A recent German randomized study (127) comparing three different ECMO systems (Cardiohelp system Maquet®, Dideco ECC.O5 Sorin® and Deltastream Medos®) suggested that various available ECMO systems (with different biocompatible coatings, oxygenator surface area, and pump speed) equally affected the coagulation system and inflammation response. But primary hemostasis was not taken into account and rotational speeds of the pumps were not compared.

VWF:CB/VWF:Ag ratios were also decreased in 17 out of 26 patients tested (65.4%). But VWF:CB/VWF:Ag ratios results are heterogeneous in ECMO literature (17,54,56,57,59), even if generally decreased. Different laboratory kit providers exist and those are often not mentioned in pre-cited articles.

Clinical outcome

Without statistical significance, a tendency to higher transfusion requirements in the Medos group can be observed in our study compared with the Rotaflow group (RBC concentrates 17.1 ± 12.4 vs 11.7 ± 10.5 ; platelet units 4.6 ± 5.0 vs 3.2 ± 4.2 and FFP 7.9 ± 8.1 vs 4.3 ± 7.3 respectively). Moreover, in the post-surgery subgroup, in which patients have increased bleeding risk for the first 48 hours, 2/3 patients had surgery for bleeding in the Medos group compared with 0/7 in the Rotaflow group. But larger series would be required to accurately examine bleeding data differences between patients treated with a Medos or a Rotaflow pump.

ECMO therapy duration varies widely among patients (2 to 42 days). It was interesting to analyze average daily transfusion requirements rather than total amounts of RBC, platelet and FFP transfused, above all in non-surgical patients (for which 48 first hours are not at increased bleeding risk). We found an average of 0.9 ± 0.7 RBC, 0.2 ± 0.2 platelet and 0.6 ± 0.6 FFP transfused daily with no statistical difference between Medos and Rotaflow groups.

Correlation between bleeding and biological analysis encountered difficulties for a precise reason: patients' blood sampling were not concomitant with bleeding events. Then, our 2 Medos patients with lower rotational pumps speeds (5500 and 5600) had seen their rotational speeds reduced because of bleeding events. So they presented with higher total transfusion requirements during ECMO and both required surgery for bleeding reasons. But their ratio %HMW+VHMW/control was much higher than other Medos patients (0.5 ± 0.1 vs 0.05 ± 0.05).

A result to be highlighted was the significant relationship between VWF:RCO/VWF:Ag ratio (>0.5 vs ≤ 0.5) and platelet transfusion amounts ($p=0.0325$). Several studies objectivized AVWS in ECMO patients but to our knowledge, none of them showed that a deeper AVWS would be associated with greater platelet transfusion requirements.

90-days mortality is higher in the Rotaflow group (60.9% vs 14.3%), even though not statistically significant. This had to be analyzed in parallel with higher mortality prediction by Apache II score in the Rotaflow group at inclusion (25.3 ± 12.1 vs 18.4 ± 6.8 ; $p = 0.0887$).

Thrombocytopenia and Platelet dysfunctions

Thrombocytopenia, defined as a platelet count of less than 150 G/L, is very common on ECMO (70,77,78). An American study conducted on 119 patients placed on ECMO showed that 60% of patients had thrombocytopenia $<50\%$ of their basal count at D4 (70). After D4, the incidence of

severe thrombocytopenia on ECMO decreases in patients with a good prognosis. Platelet nadir after 8 days of ECMO even seems more predictive of mortality at D90 than the SOFA score during the resuscitation stay (71). The present study did not find the correlation between platelet nadir count on ECMO and 30-day or 90-day mortality. The role of ECMO in the development of thrombocytopenia has not been demonstrated. 20% to 50% of all critically-ill patients in intensive care units will develop thrombocytopenia, constantly associated with increased bleeding and mortality (72–74). The causes of thrombocytopenia in ECMO patients are most probably multifactorial: hemodilution, platelet activation, sequestration and destruction, consumption by the circuit. Thrombocytopenia may also result from bleeding losses. Sepsis can also be responsible for thrombocytopenia. Thrombocytopenia may be related to the suppressive effects of inflammation on the bone marrow and to insidious disseminated intravascular coagulation found under ECMO (79). As for platelet transfusion on ECMO, it is not yet standardized. The goal of a platelet count $>100,000$ platelets/ μL is often mentioned (80), but no real transfusion threshold is established. But since platelet function seems to be impaired on ECMO, platelet counts may not really reflect the risk of bleeding. Platelet dysfunction in a patient with clinical bleeding, regardless of platelet count, may warrant platelet transfusion (81). The risk of bleeding also depends on the hematocrit. Thus, correction of anemia by CGR transfusion improves platelet function (82,83).

Impaired platelet aggregation with ECMO has been described (17,69,88) and seems heterogeneous in results and tests employed. In our study, all patients except one received aspirin, which blocks arachidonic acid way. 65% of patients presented no aggregation with this agonist. We could therefore have been surprised to see 20% (4 patients) with normal response to arachidonic acid in our population. There is no evidence described for a diminished response to aspirin in ECMO patients. One patient of those 4 retrospectively did not have aspirin that day. We could not explain the normal aggregation for the other 3 patients.

In the collagen aggregation test, platelets are activated by means of the collagen receptor. For appropriate platelet activation, release of endogenous arachidonic acid is necessary, which is then transformed in thromboxane A₂ by cyclooxygenase and binds to TXA₂ receptor. As cyclooxygenase is blocked by aspirin, the collagen test is sensitive to the action of aspirin, but less than arachidonic acid test. 20% patients presented here with no aggregation to collagen.

14 out of 20 patients had normal aggregation with ADP. Ristocetin-induced platelet aggregation was normal in only 46.2%. Kalbhenn 2018 study also reported this decreased platelet aggregation with ristocetin (17).

No typical aggregation profiles of ECMO patients was found and further studies would be required to fully understand alterations in platelet functions with ECMO. Standardization in the tests used to assess platelet functions would also help in accurately compare the results reported from different teams.

A loss of platelet receptors glycoprotein Ib has been described under ECMO (59,95). Our study did not confirm this loss, as GpIb expression on platelet membrane, measured by flow cytometry, was not reduced below normal values. This phenomenon would need further investigations as similar normal levels of GPIb were found in patients on LVAD in another study (84).

CONCLUSION

The present study confirmed the presence of an acquired von Willebrand syndrome in all ECMO patients. Comparison of the two ECMO pumps did not show any significant differences neither biological nor clinical. Still a trend towards more bleeding on Medos pump at high rotational speed could be observed with more transfusion requirements. Loss of HMW multimers of VWF was also significantly more important with the Medos pump compared to the Rotaflow one. Further investigations on larger series would help in define the pumps rotational speed threshold associated with total loss of HMW VWF multimers. Correlation between bleeding events and severity of AVWS would need concomitant patient blood sampling with bleeding episodes.

Conclusion

L'extracorporel membrane oxygenation (ECMO) est une technique en pleine expansion, dont les indications se sont étendues à des patients de plus en plus critiques. Les hémorragies sous ECMO sont une cause majeure de morbi-mortalité et engendrent un recours transfusionnel important.

Sous l'effet des forces de cisaillement élevées, un véritable syndrome de Willebrand acquis se développe sous ECMO. La thrombopénie observée est d'origine multifactorielle. Elle est associée le plus souvent à des perturbations des fonctions plaquettaires, qui peuvent être imputées à l'usage d'aspirine mais qui disparaissent rapidement après explantation de l'ECMO.

Des études complémentaires seraient nécessaires pour définir le seuil à partir duquel la vitesse de rotation de la pompe d'ECMO est associée à une perte totale des multimères de haut poids moléculaire du facteur Willebrand.

Les besoins transfusionnels sous ECMO sont importants mais des solutions alternatives permettent d'enrayer efficacement les saignements. Le retrait du système d'ECMO reste le meilleur moyen d'arrêter le saignement, quand il est possible. Mais l'utilisation de desmopressine ou l'injection de concentrés de facteur Willebrand pourraient diminuer les recours transfusionnels.

De nombreux défis techniques subsistent, notamment sur l'amélioration de la biocompatibilité des matériaux et la miniaturisation des circuits d'ECMO, avec une diminution des zones de jonction des tubulures, afin de diminuer la turbulence du flux sanguin.

Références bibliographiques

1. Mosier JM, Kelsey M, Raz Y, Gunnerson KJ, Meyer R, Hypes CD, et al. Extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) for critically ill adults in the emergency department: history, current applications, and future directions. *Crit Care* [Internet]. déc 2015;19(1). Disponible sur: <http://ccforum.com/content/19/1/431>
2. Peek GJ, Mugford M, Tiruvoipati R. Efficacy and economic assessment of conventional ventilatory support versus extracorporeal membrane oxygenation for severe adult respiratory failure (CESAR): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet*. oct 2009;1351-63.
3. Thiagarajan RR, Barbaro RP, Rycus PT, McMullan DM, Conrad SA, Fortenberry JD, et al. Extracorporeal Life Support Organization Registry International Report 2016: ASAIO J. 2017;63(1):60-7.
4. Flécher E, Seguin P, Verhoye J-P. ECLS et ECMO : guide pratique. Springer. 2010.
5. Slaughter MS, Rogers JG, Milano CA, Russell SD, Conte JV, Feldman D, et al. Advanced heart failure treated with continuous-flow left ventricular assist device. *N Engl J Med*. 2009;361(23):2241–2251.
6. Boyle A, Liao K, Colvin-adams M, Joyce L, John R. Effects of centrifugal, axial, and pulsatile left ventricular assist device support on end-organ function in heart failure patients. *J Heart Lung Transplant*. 2009;28(4):352–359.
7. Murphy DA, Hockings LE, Andrews RK, Aubron C, Gardiner EE, Pellegrino VA, et al. Extracorporeal Membrane Oxygenation—Hemostatic Complications. *Transfus Med Rev*. avr 2015;29(2):90-101.
8. Makdisi G, Wang I. Extra Corporeal Membrane Oxygenation (ECMO) review of a lifesaving technology. *Journal of Thoracic Disease*. juill 2015;166-76.
9. APRIL I. Extracorporeal membrane oxygenation for 2009 influenza A (H1N1) acute respiratory distress syndrome. *Jama*. 2009;302(17):1888–1895.
10. Zangrillo A, Landoni G, Biondi-Zoccai G, Greco M, Greco T, Frati G, et al. A meta-analysis of complications and mortality of extracorporeal membrane oxygenation. *Crit Care Resusc*. 2013;15(3):172.
11. Chen Y-C, Tsai F-C, Fang J-T, Yang C-W. Acute kidney injury in adults receiving extracorporeal membrane oxygenation. *J Formos Med Assoc*. nov 2014;113(11):778-85.
12. Rastan AJ, Lachmann N, Walther T, Doll N, Gradistanac T, Gommert JF, et al. Autopsy findings in patients on postcardiotomy extracorporeal membrane oxygenation (ECMO). *Int J Artif Organs*. déc 2006;29(12):1121-31.
13. Sidebotham david, McGeorge A, McGuinness S. Extracorporeal membrane oxygenation for treating severe cardiac and respiratory failure in adults : Part 2-Technical considerations. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*. févr 2010;164-72.
14. Cheng R, Hachamovitch R, Kittleson M, Patel J, Arabia F, Moriguchi J, et al. Complications of Extracorporeal Membrane Oxygenation for Treatment of Cardiogenic Shock and Cardiac Arrest: A Meta-Analysis of 1,866 Adult Patients. *Ann Thorac Surg*. févr 2014;97(2):610-6.
15. Hastings SM, Ku DN, Wagoner S, Maher KO, Deshpande S. Sources of Circuit Thrombosis in Pediatric Extracorporeal Membrane Oxygenation: ASAIO J. 2017;63(1):86-92.
16. Zwischenberger JB, Pitcher HT. Extracorporeal Membrane Oxygenation Management. *Crit Care Clin*. oct 2017;33(4):843-53.

17. Kalbhenn J, Schlagenhaut A, Rosenfelder S, Schmutz A, Zieger B. Acquired von Willebrand syndrome and impaired platelet function during venovenous extracorporeal membrane oxygenation: Rapid onset and fast recovery. *J Heart Lung Transplant* [Internet]. mars 2018; Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1053249818313986>
18. Esper SA, Welsby IJ, Subramaniam K, John Wallisch W, Levy JH, Waters JH, et al. Adult extracorporeal membrane oxygenation: an international survey of transfusion and anticoagulation techniques. *Vox Sang.* juill 2017;112(5):443-52.
19. ELSO Anticoagulation Guideline [Internet]. 2014. Disponible sur: <https://www.else.org/Resources/Guidelines.aspx>
20. Lamarche Y, Chow B, Bédard A, Johal N, Kaan A, Humphries KH, et al. Thromboembolic events in patients on extracorporeal membrane oxygenation without anticoagulation. *Innov Technol Tech Cardiothorac Vasc Surg.* 2010;5(6):424–429.
21. Maul TM, Massicotte MP, Wearden PD. ECMO Biocompatibility: Surface Coatings, Anticoagulation, and Coagulation Monitoring. In: Firstenberg MS, éditeur. *Extracorporeal Membrane Oxygenation: Advances in Therapy* [Internet]. InTech; 2016. Disponible sur: <http://www.intechopen.com/books/extracorporeal-membrane-oxygenation-advances-in-therapy/ecmo-biocompatibility-surface-coatings-anticoagulation-and-coagulation-monitoring>
22. BOLLIGER D, ZENKLUSEN U, TANAKA KA. Point-of-care coagulation management algorithms during ECMO support: are we there yet? *Minerva Anesthesiol.* 2016;82(9):10.
23. Hellmann C, Schmutz A, Kalbhenn J. Bleeding during veno-venous ECMO cannot reliably be predicted by rotational thrombelastometry (ROTEM™). *Perfusion.* mai 2018;33(4):289-96.
24. AGATI S, CICCARELLO G, SALVO D, TURLA G, NDAR AU, MIGNOSA C. Use of a Novel Anticoagulation Strategy During ECMO in a Pediatric Population: Single-Center Experience. 2006;4.
25. Wong TE, Huang Y-S, Weiser J, Brogan TV, Shah SS, Witmer CM. Antithrombin Concentrate Use in Children: A Multicenter Cohort Study. *J Pediatr.* nov 2013;163(5):1329-1334.e1.
26. MacLaren G, Monagle P. Antithrombin Administration in Extracorporeal Membrane Oxygenation Patients: Putting the Cart Before the Horse*. *Pediatr Crit Care Med.* déc 2016;17(12):1188-9.
27. Pollak U, Yacobovich J, Tamary H, Dagan O, Manor-Shulman O. Heparin-Induced Thrombocytopenia and Extracorporeal Membrane Oxygenation: A Case Report and Review of the Literature. 2011;8.
28. ECLS Registry Report International Summary [Internet]. 2017. Disponible sur: <https://www.else.org>
29. Mazzeffi M, Greenwood J, Tanaka K, Menaker J, Rector R, Herr D, et al. Bleeding, Transfusion, and Mortality on Extracorporeal Life Support: ECLS Working Group on Thrombosis and Hemostasis. *Ann Thorac Surg.* févr 2016;101(2):682-9.
30. Aubron C, DePuydt J, Belon F, Bailey M, Schmidt M, Sheldrake J, et al. Predictive factors of bleeding events in adults undergoing extracorporeal membrane oxygenation. *Ann Intensive Care* [Internet]. déc 2016;6(1). Disponible sur: <http://annalsintensivecare.springeropen.com/articles/10.1186/s13613-016-0196-7>
31. Dalton HJ, Garcia-Filion P, Holubkov R, Moler FW, Shanley T, Heidemann S, et al. Association of Bleeding and Thrombosis With Outcome in Extracorporeal Life Support*: *Pediatr Crit Care Med.* févr 2015;16(2):167-74.

32. Aubron C, Cheng AC, Pilcher D, Leong T, Magrin G, Cooper DJ, et al. Factors associated with outcomes of patients on extracorporeal membrane oxygenation support: a 5-year cohort study. *Crit Care*. 2013;17(2):R73.
33. Lamb K, Cowan S, Evans N, Pitcher H, Moritz T, Lazar M, et al. Successful management of bleeding complications in patients supported with extracorporeal membrane oxygenation with primary respiratory failure. *Perfusion*. mars 2013;28(2):125-31.
34. Gachet C. Molecular mechanisms of platelet activation. *Bulletin de l'Académie nationale de Médecine, France*. Vol. 197(2):361-73. 2014.
35. Demertzis S, Cassina T, Casso G. Antiplatelet therapy before cardiac surgery. *Cardiovasc Med*. :10.
36. Fréssinaud E. Facteur Willebrand et maladie de Willebrand : prérequis au diagnostic. *Hématologie*. mars 2014;20(supplément 2).
37. Casari C, Lenting PJ, Wohner N, Christophe OD, Denis CV. Clearance of von Willebrand factor. *J Thromb Haemost*. juin 2013;11:202-11.
38. Moake JL. Thrombotic microangiopathies. *NEJM*. 2002;
39. Siedlecki CA, Lestini BJ, Kottke-Marchant K. Shear-Dependant Changes in the Three-Dimensional Structure of Human von Willebrand Factor. *Blood*; 1996.
40. Lenting PJ, Casari C, Christophe OD, Denis CV. von Willebrand factor: the old, the new and the unknown: *VWF: the old, the new and the unknown*. *J Thromb Haemost*. déc 2012;10(12):2428-37.
41. Smith NL, Rice KM, Bovill EG, Cushman M, Bis JC, McKnight B, et al. Genetic variation associated with plasma von Willebrand factor levels and the risk of incident venous thrombosis. 2011;117(22):6.
42. Takahashi M, Yamashita A, Moriguchi-Goto S, Marutsuka K, Sato Y, Yamamoto H, et al. Critical role of von Willebrand factor and platelet interaction in venous thromboembolism. 2009;8.
43. Pendu R, Terraube V, Christophe OD, Gahmberg CG, de Groot PG, Lenting PJ, et al. P-selectin glycoprotein ligand 1 and beta2-integrins cooperate in the adhesion of leukocytes to von Willebrand factor. *Blood*. 1 déc 2006;108(12):3746-52.
44. Starke RD, Ferraro F, Paschalaki KE, Dryden NH, McKinnon TA, Sutton RE, et al. Endothelial von Willebrand factor regulates angiogenesis. *Blood*. 2011;117(3):1071–1080.
45. Vincentelli A, Susen S, Le Tourneau T, Six I, Fabre O, Juthier F, et al. Acquired von Willebrand Syndrome in Aortic Stenosis. *N Engl J Med*. 24 juill 2003;349(4):343-9.
46. Slaughter MS. Hematologic Effects of Continuous Flow Left Ventricular Assist Devices. *J Cardiovasc Transl Res*. déc 2010;3(6):618-24.
47. Li S, Wang Z, Liao Y, Zhang W, Shi Q, Yan R, et al. The glycoprotein Iba-von Willebrand factor interaction induces platelet apoptosis. *J Thromb Haemost*. févr 2010;8(2):341-50.
48. Gill JC, Wilson AD. loss of the largest von willebrand factor multimers from the plasma of patients with congenital cardiac defect. *Blood*. 1986;
49. Warkentin T. Aortic stenosis and bleeding gastrointestinal angiodysplasia: is acquired von Willebrand's disease the link? *The Lancet*. juill 1992;340(8810):35-7.

50. Crow S, John R, Boyle A, Shumway S, Liao K, Colvin-Adams M, et al. Gastrointestinal bleeding rates in recipients of nonpulsatile and pulsatile left ventricular assist devices. *J Thorac Cardiovasc Surg.* janv 2009;137(1):208-15.
51. Miller LW. The Development of the von Willebrand Syndrome With the Use of Continuous Flow Left Ventricular Assist Devices. *J Am Coll Cardiol.* oct 2010;56(15):1214-5.
52. Geisen U, Heilmann C, Beyersdorf F, Benk C, Berchtold-Herz M, Schlensak C, et al. Non-surgical bleeding in patients with ventricular assist devices could be explained by acquired von Willebrand disease☆. *Eur J Cardiothorac Surg.* avr 2008;33(4):679-84.
53. Davis ME, Haglund NA, Tricarico NM, Matafonov A, Gailani D, Maltais S. Immediate Recovery of Acquired von Willebrand Syndrome After Left Ventricular Assist Device Explantation: Implications for Heart Transplantation. *ASAIO J.* 2015;61(1):e1-4.
54. Heilmann C, Geisen U, Beyersdorf F, Nakamura L, Benk C, Trummer G, et al. Acquired von Willebrand syndrome in patients with extracorporeal life support (ECLS). *Intensive Care Med.* janv 2012;38(1):62-8.
55. Franchini M, Capra F, Targher G, Montagnana M, Lippi G. Relationship between ABO blood group and von Willebrand factor levels: from biology to clinical implications. *Thromb J.* 2007;5(1):14.
56. Pasala S, Fiser RT, Stine KC, Swearingen CJ, Prodhon P. von Willebrand Factor Multimers in Pediatric Extracorporeal Membrane Oxygenation Support: *ASAIO J.* 2014;60(4):419-23.
57. Kalbhenn J, Schmidt R, Nakamura L, Schelling J. Early Diagnosis of Acquired von Willebrand Syndrome (AVWS) is Elementary for Clinical Practice in Patients Treated with ECMO Therapy. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis.* 2015;265-71.
58. Tauber H, Ott H, Streif W, Weigel G, Loacker L, Fritz J, et al. Extracorporeal Membrane Oxygenation Induces Short-Term Loss of High-Molecular-Weight von Willebrand Factor Multimers: *Anesth Analg.* avr 2015;120(4):730-6.
59. Lukito P, Wong A, Jing J, Arthur JF, Marasco SF, Murphy DA, et al. Mechanical circulatory support is associated with loss of platelet receptors glycoprotein Iba and glycoprotein VI. *J Thromb Haemost.* nov 2016;14(11):2253-60.
60. Chan CHH, Pieper IL, Fleming S, Friedmann Y, Foster G, Hawkins K, et al. The Effect of Shear Stress on the Size, Structure, and Function of Human von Willebrand Factor: Von Willebrand factor and shear stress. *Artif Organs.* sept 2014;38(9):741-50.
61. Rastegarlarlari G, Pegon JN, Casari C, Odouard S, Navarrete A-M, Saint-Lu N, et al. Macrophage LRP1 contributes to the clearance of von Willebrand factor. *Blood.* 1 mars 2012;119(9):2126-34.
62. Castro-Núñez L, Dienava-Verdoold I, Herczenik E, Mertens K, Meijer AB. Shear stress is required for the endocytic uptake of the factor VIII-von Willebrand factor complex by macrophages: Endocytosis of FVIII and VWF by macrophages. *J Thromb Haemost.* sept 2012;10(9):1929-37.
63. Baldauf C, Schneppenheim R, Stacklies W, Obser T, Pieconka A, Schneppenheim S, et al. Shear-induced unfolding activates von Willebrand factor A2 domain for proteolysis. *J Thromb Haemost.* déc 2009;7(12):2096-105.
64. Dong J-F. Cleavage of ultra-large von Willebrand factor by ADAMTS-13 under flow conditions. *J Thromb Haemost.* août 2005;3(8):1710-6.

65. De Bartolo C, Nigro A, Fragomeni G, Colacino FM, Wang D, Jones CC, et al. Numerical and Experimental Flow Analysis of the Wang-Zwische Double-Lumen Cannula: ASAIO J. juill 2011;57(4):318-27.
66. Park JY, Park CY, Min BG. A numerical study on the effect of side hole number and arrangement in venous cannulae. J Biomech. janv 2007;40(5):1153-7.
67. Grigioni M, Daniele C. Computational model of the fluid dynamics of a cannula inserted in a vessel: incidence of the presence of side holes in blood flow. PlumX Metrics. déc 2002;vol 35, issue 12.
68. Mizunuma H, Nakajima R. Experimental Study on Shear Stress Distributions in a Centrifugal Blood Pump. Artif Organs. juill 2007;31(7):550-9.
69. Mutlak H, Reyher C, Meybohm P, Papadopoulos N, Hanke A, Zacharowski K, et al. Multiple Electrode Aggregometry for the Assessment of Acquired Platelet Dysfunctions during Extracorporeal Circulation. Thorac Cardiovasc Surg. 1 août 2014;63(01):021-7.
70. Glick D, Dzierba AL, Abrams D, Muir J, Eisenberger A, Diuguid D, et al. Clinically suspected heparin-induced thrombocytopenia during extracorporeal membrane oxygenation. J Crit Care. déc 2015;30(6):1190-4.
71. Opfermann P, Bevilacqua M, Felli A, Mouhieddine M, Bachleda T, Pichler T, et al. Prognostic Impact of Persistent Thrombocytopenia During Extracorporeal Membrane Oxygenation: A Retrospective Analysis of Prospectively Collected Data From a Cohort of Patients With Left Ventricular Dysfunction After Cardiac Surgery. Crit Care Med. déc 2016;44(12):e1208-18.
72. Vanderschueren S, De Weerd A, Malbrain M, Vankersschaever D, Frans E, Wilmer A, et al. Thrombocytopenia and prognosis in intensive care: Crit Care Med. juin 2000;28(6):1871-6.
73. Crowther MA, Cook DJ, Meade MO, Griffith LE, Guyatt GH, Arnold DM, et al. Thrombocytopenia in medical-surgical critically ill patients: prevalence, incidence, and risk factors. J Crit Care. déc 2005;20(4):348-53.
74. Hui P, Cook DJ, Lim W, Fraser GA, Arnold DM. The Frequency and Clinical Significance of Thrombocytopenia Complicating Critical Illness. Chest. févr 2011;139(2):271-8.
75. Dzierba AL, Roberts R, Muir J, Alhammad A, Schumaker G, Clark J, et al. Severe Thrombocytopenia in Adults with Severe Acute Respiratory Distress Syndrome: Impact of Extracorporeal Membrane Oxygenation Use. ASAIO J. 2016;62(6):710-4.
76. Abrams D, Baldwin MR, Champion M, Agerstrand C, Eisenberger A, Bacchetta M, et al. Thrombocytopenia and extracorporeal membrane oxygenation in adults with acute respiratory failure: a cohort study. Intensive Care Med. mai 2016;42(5):844-52.
77. Robinson T, Kickler T, Ness P. Effect of extracorporeal membrane oxygenation on platelets in newborns. Crit Care Medicine. juill 1993;
78. Kalbhenn J, Wittau N. Identification of acquired coagulation disorders and effects of target-controlled coagulation factor substitution on the incidence and severity of spontaneous intracranial bleeding during veno-venous ECMO therapy. Perfusion; 2015.
79. Lubnow M, Philipp A, Dornia C, Schroll S, Bein T, Creutzenberg M, et al. d-dimers as an early marker for oxygenator exchange in extracorporeal membrane oxygenation. J Crit Care. juin 2014;29(3):473.e1-473.e5.

80. Bembea MM, Annich G, Rycus P, Oldenburg G, Berkowitz I, Pronovost P. Variability in Anticoagulation Management of Patients on Extracorporeal Membrane Oxygenation: An International Survey*. *Pediatr Crit Care Med*. févr 2013;14(2):e77-84.
81. Greinacher A, Selleng K. Thrombocytopenia in the Intensive Care Unit Patient. *Hematology*. 1 déc 2010;2010(1):135-43.
82. Robert Valeri C, Cassidy G, Pivacek LE. Anemia-induced increase in the bleeding time: implications for treatment of nonsurgical blood loss. *Transfusion*. 24 nov 2002;
83. Chevuru S, Sola M, Theriaque. Multicenter analysis of platelet transfusion usage among neonates on extracorporeal membrane oxygenation. *Pediatrics*. juin 2002;
84. Steinlechner B, Dworschak M, Birkenberg B, Duris M, Zeidler P, Fischer H, et al. Platelet Dysfunction in Outpatients With Left Ventricular Assist Devices. *Ann Thorac Surg*. janv 2009;87(1):131-7.
85. Klovaite J, Gustafsson F, Mortensen SA, Sander K, Nielsen LB. Severely Impaired von Willebrand Factor-Dependent Platelet Aggregation in Patients With a Continuous-Flow Left Ventricular Assist Device (HeartMate II). *J Am Coll Cardiol*. juin 2009;53(23):2162-7.
86. Tamari Y, Aledort L, Puszkin E, Degnan TJ, Wagner N, Kaplitt MJ, et al. Functional Changes in Platelets During Extracorporeal Circulation. *Ann Thorac Surg*. juin 1975;19(6):639-47.
87. Fong S, Burns N, Williams G. Changes in coagulation and platelet function during prolonged extracorporeal circulation (ECC) in sheep and man. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*. 1974;
88. Saini A, Hartman ME, Gage BF, Said A, Gazit AZ, Eghtesady P, et al. Incidence of Platelet Dysfunction by Thromboelastography–Platelet Mapping in Children Supported with ECMO: A Pilot Retrospective Study. *Front Pediatr [Internet]*. 6 janv 2016;3. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fped.2015.00116/abstract>
89. Hayes R, Foley S, Shekar K. Ovine platelet function is unaffected by extracorporeal membrane oxygenation within the first 24h. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. oct 2015;
90. Casan J, Andrews R, Gardiner E, Davis A. Mechanisms of Platelet Dysfunction in Patients with Implantable Devices. *Semin Thromb Hemost*. févr 2018;44(01):012-9.
91. Kroll MH, Harris TS, Moake JL, Handin RI, Schafer AI. von Willebrand factor binding to platelet GpIb initiates signals for platelet activation. *J Clin Invest*. 1 nov 1991;88(5):1568-73.
92. Cheung P-YM, Sawicki G. The mechanisms of platelet dysfunction during extracorporeal membrane oxygenation in critically ill neonates. *Critical Care Medicine*. juill 2000;
93. Choi W-S, Jeon O-H, Kim H-H, Kim D-S. MMP-2 regulates human platelet activation by interacting with integrin $\alpha_{IIb} \beta_3$. *J Thromb Haemost*. mars 2008;6(3):517-23.
94. Al-Tamimi M, Tan CW, Qiao J, Pennings GJ, Javadzadegan A, Yong ASC, et al. Pathologic shear triggers shedding of vascular receptors: a novel mechanism for down-regulation of platelet glycoprotein VI in stenosed coronary vessels. *Blood*. 3 mai 2012;119(18):4311-20.
95. Chen Z, Mondal NK, Ding J, Gao J, Griffith BP, Wu ZJ. Shear-induced platelet receptor shedding by non-physiological high shear stress with short exposure time: Glycoprotein Iba and glycoprotein VI. *Thromb Res*. avr 2015;135(4):692-8.

96. Hu J, Mondal NK, Sorensen EN, Cai L, Fang H-B, Griffith BP, et al. Platelet glycoprotein Iba α ectodomain shedding and non-surgical bleeding in heart failure patients supported by continuous-flow left ventricular assist devices. *J Heart Lung Transplant.* janv 2014;33(1):71-9.
97. Bergmeier W. Tumor Necrosis Factor- α -Converting Enzyme (ADAM17) Mediates GPIb Shedding From Platelets In Vitro and In Vivo. *Circ Res.* 2 sept 2004;95(7):677-83.
98. Cheng H, Yan R, Li S, Yuan Y, Liu J, Ruan C, et al. Shear-induced interaction of platelets with von Willebrand factor results in glycoprotein Iba α shedding. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol.* déc 2009;297(6):H2128-35.
99. Arthur JF, Shen Y, Gardiner EE, Coleman L, Kenny D, Andrews RK, et al. TNF receptor-associated factor 4 (TRAF4) is a novel binding partner of glycoprotein Ib and glycoprotein VI in human platelets: TRAF4 binds platelet GPIb and GPVI. *J Thromb Haemost.* janv 2011;9(1):163-72.
100. Urlsberger B, Zobel G, Zenz W. Activation of the clotting system during extracorporeal membrane oxygenation in term newborn infants. *The Journal of Pediatrics.* août 1996;
101. Plötz F, Van Oeveren W, Bartlett R, Wildevuur C. Blood activation during neonatal extracorporeal life support. *Journal of thoracic surgery.* mai 1993;
102. Gorbet MB, Sefton MV. Review: Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. In: *The Biomaterials: Silver Jubilee Compendium* [Internet]. Elsevier; 2004. p. 219-41. Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780080451541500253>
103. Szotowski B. Procoagulant Soluble Tissue Factor Is Released From Endothelial Cells in Response to Inflammatory Cytokines. *Circ Res.* 24 juin 2005;96(12):1233-9.
104. Arnold P, Jackson S, Wallis J, Smith J, Bolton D, Haynes S. Coagulation factor activity during neonatal extra-corporeal membrane oxygenation. *Intensive Care Med.* août 2001;27(8):1395-400.
105. Meyer AD, Gelfond JAL, Wiles AA, Freishtat RJ, Rais-Bahrami K. Platelet-Derived Microparticles Generated by Neonatal Extracorporeal Membrane Oxygenation Systems: *ASAIO J.* 2015;61(1):37-42.
106. Nieuwland R, Berckmans RJ, Rotteveel-Eijkman RC, Maquelin KN, Roozendaal KJ, Jansen PGM, et al. Cell-Derived Microparticles Generated in Patients During Cardiopulmonary Bypass Are Highly Procoagulant. *Circulation.* 18 nov 1997;96(10):3534-41.
107. Esmon CT. The impact of the inflammatory response on coagulation. *Thromb Res.* janv 2004;114(5-6):321-7.
108. Levi M, van der Poll T. Inflammation and coagulation: *Crit Care Med.* févr 2010;38:S26-34.
109. Butler J, Pathi V, Paton R. Acute-phase responses to cardiopulmonary bypass in children weighing less than 10 kilograms. *The Annals of thoracic surgery.* août 1996;
110. Orime Y, Shiono M, Hata H. Cytokine and Endothelial Damage in Pulsatile and Nonpulsatile Cardiopulmonary Bypass. *Artificial Organs.* 24 déc 2001;
111. Larsson M, Rayzman V, Nolte MW, Nickel KF, Bjorkqvist J, Jamsa A, et al. A Factor XIIa Inhibitory Antibody Provides Thromboprotection in Extracorporeal Circulation Without Increasing Bleeding Risk. *Sci Transl Med.* 5 févr 2014;6(222):222ra17-222ra17.

112. Nilsson B, Ekdahl KN, Mollnes TE, Lambris JD. The role of complement in biomaterial-induced inflammation. *Mol Immunol.* janv 2007;44(1-3):82-94.
113. Lindholm L, Westerberg M, Bengtsson A, Ekroth R, Jensen E, Jeppsson A. A Closed Perfusion System With Heparin Coating and Centrifugal Pump Improves Cardiopulmonary Bypass Biocompatibility in Elderly Patients. *Ann Thorac Surg.* déc 2004;78(6):2131-8.
114. Hein E, Munthe-Fog L, Thiara AS, Fiane AE, Mollnes TE, Garred P. Heparin-coated cardiopulmonary bypass circuits selectively deplete the pattern recognition molecule ficolin-2 of the lectin complement pathway *in vivo*: Cardiopulmonary bypass and the lectin pathway. *Clin Exp Immunol.* févr 2015;179(2):294-9.
115. Boyle EM, Verrier ED. Endothelial Cell Injury in Cardiovascular Surgery: The Systemic Inflammatory Response. *Ann Thorac Surg.* 1997;8.
116. McLwain RB, Timpa JG, Kurundkar AR, Holt DW, Kelly DR, Hartman YE, et al. Plasma concentrations of inflammatory cytokines rise rapidly during ECMO-related SIRS due to the release of preformed stores in the intestine. *Lab Invest.* janv 2010;90(1):128-39.
117. Fortenberry JD, Bhardwaj V, Niemer P, Cornish JD, Wright JA, Bland L. Neutrophil and cytokine activation with neonatal extracorporeal membrane oxygenation. *J Pediatr.* mai 1996;128(5):670-8.
118. Rungtischer A, Tessari M, Stranieri C, Solani E, Linardi D, Milani E, et al. Oxygenator Is the Main Responsible for Leukocyte Activation in Experimental Model of Extracorporeal Circulation: A Cautionary Tale. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:1-7.
119. He C, Yang S, Yu W, Chen Q, Shen J, Hu Y, et al. Effects of continuous renal replacement therapy on intestinal mucosal barrier function during extracorporeal membrane oxygenation in a porcine model. *J Cardiothorac Surg [Internet].* déc 2014;9(1). Disponible sur: <http://cardiothoracicsurgery.biomedcentral.com/articles/10.1186/1749-8090-9-72>
120. Downard CD, Betit P, Chang RW, Garza JJ, Arnold JH, Wilson JM. Impact of Amicar on hemorrhagic complications of ECMO: a ten-year review. *J Pediatr Surg.* août 2003;38(8):1212-6.
121. Buckley LF, Reardon DP, Camp PC, Weinhouse GL, Silver DA, Couper GS, et al. Aminocaproic acid for the management of bleeding in patients on extracorporeal membrane oxygenation: Four adult case reports and a review of the literature. *Heart Lung J Acute Crit Care.* mai 2016;45(3):232-6.
122. Lotz C, Streiber N, Roewer N, Lepper PM, Muellenbach RM, Kredel M. Therapeutic Interventions and Risk Factors of Bleeding During Extracorporeal Membrane Oxygenation: *ASAIO J.* 2017;63(5):624-30.
123. Transfusion de plasma thérapeutique - recommandations ANSM, HAS [Internet]. 2012. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1264081/fr/transfusion-de-plasma-therapeutique-produits-indications
124. Agerstrand CL, Burkart KM, Abrams DC, Bacchetta MD, Brodie D. Blood Conservation in Extracorporeal Membrane Oxygenation for Acute Respiratory Distress Syndrome. *Ann Thorac Surg.* févr 2015;99(2):590-5.
125. Anselmi A, Guinet P, Ruggieri VG, Aymami M, Lelong B, Granry S, et al. Safety of recombinant factor VIIa in patients under extracorporeal membrane oxygenation. *Eur J Cardiothorac Surg.* janv 2016;49(1):78-84.

126. Malfertheiner MV, Philipp A, Lubnow M, Zeman F, Enger TB, Bein T, et al. Hemostatic Changes During Extracorporeal Membrane Oxygenation: A Prospective Randomized Clinical Trial Comparing Three Different Extracorporeal Membrane Oxygenation Systems. *Crit Care Med.* déc 2015;1.
127. Malfertheiner MV, Philipp A, Lubnow M, Zeman F, Enger TB, Bein T, et al. Hemostatic Changes During Extracorporeal Membrane Oxygenation: A Prospective Randomized Clinical Trial Comparing Three Different Extracorporeal Membrane Oxygenation Systems. *Crit Care Med.* déc 2015;1.

Vu, le Président du jury,

Berthe-Marie Imbert

Vu, le Directeur de thèse,

Fabienne Nedelec

Vu, le Directeur de l'UFR,

Nom – Prénoms : OUTTIER Anne-Sophie

Titre de la thèse : Hémostase primaire et saignements chez les patients sous Extracorporeal Membrane Oxygenation (ECMO) au CHU de Rennes

Résumé de la thèse :

Les hémorragies sévères sont les complications les plus fréquentes sous ECMO. Elles sont une cause majeure de mortalité. Héparinothérapie, traitements anti-plaquettaires, inflammation, hémodilution...les causes de ces hémorragies sont multiples et ne sont pas clairement identifiées. La balance hémostatique est perturbée sous ECMO, avec l'apparition d'un Syndrome de Willebrand Acquis (AVWS). Cependant, différentes pompes d'ECMO existent, avec des vitesses de rotation différentes. L'objectif de cette thèse est de comparer la fonctionnalité du facteur Willebrand, les saignements ainsi que les fonctions plaquettaires, sous 2 pompes d'ECMO différentes (Rotaflow Maquet® et Medos Xenios®). Pour cela, nous avons réalisé une étude prospective monocentrique sur 31 patients placés sous ECMO entre novembre 2016 et juin 2018 au CHU de Rennes.

Cette étude confirme la présence d'un AVWS chez tous les patients sous ECMO. Une association est retrouvée entre le ratio VWF:RCO/VWF:Ag ($>0,5$ vs $\leq 0,5$) et le nombre d'unités plaquettaires transfusées ($p=0,0325$). Les données cliniques et biologiques ne révèlent aucune différence statistique significative entre les groupes Medos et Rotaflow. Cependant une tendance est observée en faveur de saignements plus importants avec la pompe Medos à pleine vitesse de rotation. Les besoins transfusionnels semblent en effet alors plus importants. De plus, la perte des multimères de haut poids moléculaire du VWF est significativement plus profonde sous Medos à haute vitesse ($p=0.001$). Nous mettons en évidence des fonctions plaquettaires altérées sous ECMO, sans profil spécifique, alors que l'expression des glycoprotéines plaquettaires (GPIb et GPIIb-IIIa) et des marqueurs d'activation sont normaux.

Des études complémentaires avec de plus amples effectifs seraient à envisager afin de définir la vitesse seuil de rotation de la pompe, associée à une perte totale des multimères de haut poids moléculaire du VWF.

MOTS CLÉS ECMO, WILLEBRAND, PLAQUETTES, SAIGNEMENTS, HEMORRAGIES, HEMOSTASE

JURY

PRÉSIDENT : Mme Berthe-Marie IMBERT, Professeur de Virologie, Faculté de Pharmacie de Nantes

ASSESEURS :

Madame le Docteur Fabienne NEDELEC, Laboratoire d'hémostase, CHU de Rennes

Monsieur le Professeur Thierry FEST, Professeur en Hématologie, Faculté de Médecine de Rennes

Madame le Docteur Isabelle GOUIN, Laboratoire d'hémostase, CHU de Rennes, faculté de Médecine de Rennes

Monsieur le Docteur Antoine ROISNE, Service de réanimation et de chirurgie thoracique et cardiovasculaire

Adresse de l'auteur : annesophieouttier@gmail.com