



Physiopathologie de la coagulopathie aigüe traumatique

Cédric Gangloff

► To cite this version:

Cédric Gangloff. Physiopathologie de la coagulopathie aigüe traumatique. Physiologie [q-bio.TO]. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2019. Français. NNT : 2019BRES0005 . tel-02280419

HAL Id: tel-02280419

<https://theses.hal.science/tel-02280419>

Submitted on 6 Sep 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : *Physiologie, Physiopathologie, Biologie Systémique Médicale*

Par

Cédric GANGLOFF

Physiopathologie de la coagulopathie aigüe traumatique

Thèse présentée et soutenue à Brest, le 10 janvier 2019

Unité de recherche : Laboratoire ORPHY – EA 4324

Rapporteurs avant soutenance : Composition du Jury :

Pierre BOUZAT

PU-PH, CHU Grenoble

Yonathan FREUND

PU-PH, APHP

Pierre BOUZAT

PU-PH, CHU Grenoble, Président
du Jury

Yonathan FREUND

PU-PH, APHP

Jeannot SCHMIDT

PU-PH, CHU Clermont-Ferrand

Michael THÉRON

MCF, UBO

Karine PICHAVANT-RAFINI

MCF, UBO, Directeur de thèse

Yves OZIER

PU-PH, CHU Brest,
Co-Directeur de thèse

Invité(s)

Olivier GRIMAUT

PH, CHU Brest

Louis SOULAT

Pr attaché, CHU Rennes

REMERCIEMENTS

Aux Professeurs Pierre Bouzat et Yonathan Freund, pour m'avoir fait l'honneur de bien vouloir juger ce travail. Vos publications ont éclairé ma pratique.

Au Pr Christine Moisan qui m'a accueilli dans son laboratoire durant ces trois années de thèse.

Au Dr Karine Pichavant-Rafini qui m'a fait découvrir la recherche en physiologie. Sa rigueur et sa patience m'ont permis de mener à bien ce projet et constitueront pour moi des valeurs de référence pour ceux à venir.

Au Dr Michael Théron pour m'avoir initié à la recherche en physiologie et m'avoir guidé avec intelligence tout au long de la réalisation de cette thèse. Merci pour ces échanges passionnants sur la physiologie et les statistiques.

Au Pr Yves Ozier pour sa bienveillance tout au long de ce long processus et son expertise inestimable sur la coagulopathie traumatique.

Au Dr Ollivier Grimault, pour avoir partagé avec moi son esprit d'innovation et m'avoir accompagné au quotidien tout au long de cette thèse.

Au Pr Louis Soulat, pour m'avoir accordé en tant que chef de service un soutien indispensable à la rédaction de cette thèse.

A Hubert Galinat et Fanny Mingant pour leur inestimable expertise et nos échanges passionnants sur l'hémostase.

Au Pr Ecoffey, pour m'avoir accordé sa confiance et son soutien.

A tous ceux du laboratoire ORPHY, qui m'ont accueilli avec gentillesse et m'ont appris la physiologie : Anthony Guernec, Aline Amerand, Christelle Goanvec, Francois Guerrero, Patrick Calves, Nathalie Guegueniat, Manon Inizan, Jocelyne Peron, Romain Didier.

A ceux qui m'ont appris à aimer la traumatologie : Fabrice Alcouffe, Antoine Pierantoni, Sophie Ducuing, Lionel Bertrand, Pierre Mardegan, Stephane Koita, Denis Arcuset, Gerald Ramboz, Pascal Barbazanges, Frédéric Bruel, Jean Francois Cibien, Dominique Coppin, Michel Plique, Marc Bersou, Stéphanie Sery, Bénédicte Barrau et tous les autres.

A mes collègues hospitaliers Rennais, qui ont continué les soins durant la rédaction de cette thèse.

A Oscar et Luc, chercheurs en devenir.

A Sonia pour tout le reste et bien plus encore : les mots me manquent.

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations	6
Liste des figures	7
Liste des tableaux	9
Liste des communications.....	10
Introduction	12
Partie 1 : Etat de l'art.....	14
<i>Généralités</i>	14
<i>L'ATC</i>	17
Facteurs préexistants.....	18
Facteurs exogènes	19
Déterminants de l'ATC.....	20
<i>Physiopathologie de la coagulopathie aigue traumatique</i>	23
Hypothèse 1 : Dysrégulation de la voie de la protéine C	23
Hypothèse 2 : CIVD fibrinolytique	30
Hypothèse 3 : Rôle du fibrinogène	38
Hypothèse 4 : Altération de la fonction plaquettaire	42
Hypothèse 5 : Dégradation du glycocalyx endothérial.....	47
<i>Conclusion de la première partie.....</i>	50
<i>Objectifs</i>	52
Partie 2 : Matériels et méthodes.....	53
<i>Animaux</i>	53
<i>Préparation</i>	53
Anesthésie	53
Maintien en normothermie	53
Catheterisation, sédation et contrôle des voies aériennes supérieures.....	53
Suivi des paramètres physiologiques.....	53
<i>Procédure expérimentale</i>	55
Groupes d'animaux.....	55
Hémorragie.....	55
Traumatisme.....	55
Temps d'observation	55

Prélèvements sanguins	55
Analyses des prélèvements sanguins	56
Dosages usuels.....	56
Temps de Quick.....	56
Temps de céphaline activée.....	56
Agrégométrie plaquettaire	57
Test de génération de thrombine	59
Partie 3 : Deux études sur l'ATC	61
<i>Etude 1 : Mise au point d'un modèle murin d'ATC.....</i>	<i>61</i>
Introduction	61
Conclusion	71
<i>Etude 2 : Physiopathologie de l'ATC.....</i>	<i>72</i>
Introduction	72
Conclusion	91
Conclusion générale.....	92
Bibliographie	94

Liste des abréviations

AIS : advanced injury score
aPC : protéine C activée
CGR : concentré de globules rouges
CIVD : coagulation intravasculaire disséminée
EPCR : endothelial protein C receptor
F : facteur
FVL : facteur V de Leiden
IL : interleukine
ISS : injury severity score
PAF : platelet activating factor
PAI : plasminogen activator inhibitor
PAR : protease activated receptor
PFC : plasma frais congelé
PT : temps de prothrombine
ROS : reactive oxygen species
ROTEM : rotational thromboelastometry
t-PA : tissue plaminogen activator
TAFI : thrombin activatable fibrinolysis inhibitor
TCA ou aPTT : temps de céphaline activée
TEG : thromboelastography
TF : facteur tissulaire
TFPI : tissue factor pathway inhibitor
TNF- ∞ : tumor necrosis factor alpha
TQ : taux de Quick
wVF : facteur de von Willebrand

Liste des figures

Figure 1: Cascade de la coagulation	15
Figure 2: Conception actuelle de la coagulation.....	16
Figure 3: Activation plaquettaire	17
Figure 4: Facteurs contribuant à la survenue d'une ATC.....	18
Figure 5: Echanges trans-capillaires chez le chien	22
Figure 6: Temps de prothrombine en fonction de l'ISS et du base déficit	23
Figure 7: Activation de la protéine C	24
Figure 8: La voie de la protéine C	25
Figure 9: Insuffisance circulatoire et thrombomoduline soluble.....	26
Figure 10: L'activation de la protéine C est associée à un allongement du TCA et du PT	26
Figure 11: Activation de la fibrinolyse en cas de choc hémorragique traumatique	26
Figure 12: Augmentation des marqueurs de la fibrinolyse en cas d'association de lésions tissulaires à une insuffisance circulatoire	27
Figure 13: Activation post traumatique de la voie de la protéine C et réduction de résistance du caillot sans altération de génération de thrombine	28
Figure 14: L'inactivation de la thrombomoduline et la préservation de fonction du facteur Va réduit les troubles de la coagulation post-traumatiques.....	29
Figure 15: Hypothèse centrée sur la voie de la protéine C	30
Figure 16: Augmentation de l'expression de facteur tissulaire et des concentrations plasmatiques en cytokines de l'inflammation après injection de lipopolysaccharides....	32
Figure 17: L'expression de facteur tissulaire est une étape déterminante dans la survenue d'une CIVD	32
Figure 18: CIVD et sepsis.	33
Figure 19: Le concept de CIVD traumatique	34
Figure 20: La CIVD traumatique.....	34
Figure 21: Activation excessive et persistante de PAI-1 après traumatisme.....	35
Figure 22: Critères de CIVD établis par l'ISTH	36
Figure 23: Schéma illustrant hypothèse selon laquelle l'ATC serait une CIVD	38
Figure 24: Relation dose dépendante entre aPC et fibrinogène.....	39
Figure 25: Le site de liaison FRS	40
Figure 26: Diminution de concentration en fibrinogène en cas d'ATC	41
Figure 27: Hypothèse selon laquelle le fibrinogène serait un élément central dans la physiopathologie de l'ATC.	42

Figure 28: Agrégation plaquettaire en contexte post traumatique.....	44
Figure 29: Dépôts plaquettaires de complément	44
Figure 30: Hypothèse centrée sur une perte de fonction plaquettaire.	46
Figure 31: Composition du glycocalyx endothérial.....	48
Figure 32: Rôle de l'endothélium dans la survenue d'une ATC	50
Figure 33: Schémas de synthèse résumant les principales hypothèses concernant la physiopathologie de l'ATC.	51
Figure 34: Trachéostomie, cathéter artériel carotidien et veineux jugulaire	54
Figure 35: Monitoring des animaux	54
Figure 36: Tests d'activation plaquettaires par agrégométrie	58
Figure 37: Courbes et mesures obtenues lors du test d'agrégation plaquettaire	58
Figure 38: Courbe de régression logarithmique cumulative pour le réactif "Coll".....	59
Figure 39: paramètres mesurés lors d'un test de génération de thrombine.....	60
Figure 40: Mise en perspective des résultats avec les données bibliographiques.....	93

Liste des tableaux

Tableau 1 : Scores AIS et ISS	21
Tableau 3 : Evaluation des pertes sanguines selon des critères cliniques	22
Tableau 6: Profil clinico-biologiques des patients apres traumatisme sévère	37
Tableau 7: Le site de liaison FRS	40
Tableau 8 : Inhibition de fonction plaquettaire post-traumatique	43
Tableau 11: Réponse plaquettaire après traumatisme crânien.....	45
Tableau 12 : EC-50 pour les réactifs multiplate chez le rat.....	59

Liste des communications

Congrès national de la société Française de médecine d'urgence 2015
Les rétrocontrôles dans la coagulation (prix du meilleur orateur).

Congrès national de la société Française de médecine d'urgence 2016
Etat de l'art : Troubles de la coagulation en traumatologie vitale.

Congrès national de la société Française de médecine d'urgence 2017
Etat de l'art : Réversion des anticoagulants oraux directs.

Congrès national de la société Française de médecine d'urgence 2018
Etat de l'art : Prise en charge hémodynamique du patient traumatisé grave en préhospitalier.

Congrès national de la société Française d'anesthésie-réanimation 2018
Session commune SFAR-SFMU : Damage-control préhospitalier.

« Tout problème profane un mystère; à son tour, le problème est profané par sa solution. »

Emil Michel Cioran

Introduction

Les traumatismes graves engendrent plusieurs millions de décès par an dans le monde et environ 50% d'entre eux concerne des patients de moins de 40 ans, expliquant leur impact majeur sur le plan social et économique (1) (2). La moitié de ces décès sont liés à un traumatisme crânien. Environ 35% sont dus à une hémorragie et 15% à une défaillance multiviscérale. Les décès dus à une hémorragie surviennent dans les premières heures, ceux liés à un traumatisme crânien dans les premières 24 heures et ceux dus à une défaillance multiviscérale après plusieurs jours. La présence d'une hémorragie incontrôlée a été identifiée comme cause réversible de décès pour ces patients (3).

Une séquence physiopathologique spécifique particulièrement délétère est susceptible de s'initier lorsqu'un traumatisme majeur est associé à une hémorragie. Cette séquence est caractérisée dans sa phase initiale par une défaillance macrocirculatoire liée aux pertes sanguines. L'insuffisance circulatoire est initialement compensée par des mécanismes liés à l'activation du système nerveux sympathique. Cet état est dénommé « insuffisance circulatoire compensée » (4). Lorsque ces mécanismes sont dépassés, la perfusion tissulaire n'est plus suffisante pour assurer le fonctionnement des organes critiques. Cet état est dénommé « insuffisance circulatoire décompensée » ou choc. Parallèlement à ces mécanismes généraux de régulation, le réseau capillaire régule la distribution du débit sanguin au sein de chaque organe afin d'optimiser la balance entre apports et besoins en oxygène. Lorsque l'ensemble de ces mécanismes adaptatifs est dépassé, la survie du patient est compromise, expliquant la constatation d'un pic de mortalité précoce chez les patients traumatisés graves. Après plusieurs jours, les interactions entre coagulation et immunité sont susceptibles d'induire des troubles similaires à ceux observés en cas de sepsis. Ils sont caractérisés par une dysfonction microcirculatoire responsable d'une défaillance multiviscérale. Ces mécanismes expliquent le pic de mortalité retardée constaté même après restauration d'une pression artérielle optimale (5) (6).

La présence d'une Coagulopathie Aigue Traumatique (ATC) entraîne une aggravation de l'hémorragie survenant à la phase précoce. Ce trouble spécifique de la coagulation se développe dans l'heure suivant le traumatisme. Il est constaté chez environ un tiers des patients atteints d'un traumatisme sévère (7) (8) (9). La présence d'une ATC est corrélée à une augmentation de la mortalité et des besoins transfusionnels (10).

L'ATC est un phénomène endogène lié à la présence d'une hémorragie et de lésions tissulaires. D'autres facteurs, préexistants et exogènes, sont susceptibles d'aggraver l'hémorragie liée à l'ATC. Ces facteurs aspécifiques ont fait l'objet de nombreuses publications et leur prise en charge est intégrée aux recommandations européennes sur la prise en charge des hémorragies traumatiques. Celles-ci préconisent de limiter le remplissage vasculaire, maintenir une normothermie et réverser les traitements antithrombotiques (11).

L'ATC se définit comme une augmentation précoce du temps de prothrombine (PT) et/ou du temps de céphaline activée (TCA) en cas d'association d'un traumatisme majeur et d'une hémorragie. Ce trouble de la coagulation est corrélé à l'importance des lésions tissulaires et à la gravité de l'insuffisance circulatoire (10). L'ATC est un phénomène complexe impliquant les facteurs de la coagulation, les plaquettes, l'endothélium et le système immunitaire. Sa physiopathologie reste encore mal comprise (12) (13). La survenue d'un phénotype hémorragique à la phase aigüe est, pour de nombreux auteurs, liée à un déséquilibre entre la coagulation et la fibrinolyse (14). Une dysrégulation des interactions entre la coagulation et l'immunité serait quant-à-elle impliquée dans la phase tardive, caractérisée par une plus grande sensibilité aux infections et la survenue d'une défaillance multiviscérale (15).

La compréhension des mécanismes impliqués dans la physiopathologie de l'ATC, permettant l'identification de cibles potentielles pour de nouvelles thérapeutiques, constitue un enjeu majeur pour ces patients. Ainsi, deux organisations, la "transagency consortium for trauma-induced coagulopathy" aux Etats-Unis et la "task force for advanced bleeding care in trauma" en Europe ont identifié des pistes de recherche sur ce sujet (16) (11). En parallèle, de nombreux experts internationaux tels que K. Brohi, M.J. Cohen et J.F. Fraser ont souligné l'absence de modèles expérimentaux pertinents pour étudier cette pathologie complexe (17) (18) (19).

Partie 1 : Etat de l'art

Généralités

L'hémostase est un système complexe finement régulé intégrant l'activation des facteurs de la coagulation, l'activation plaquettaire et la réparation vasculaire (20). La conservation inter-espèces de ces processus au cours de l'évolution témoigne de leur intérêt en matière de survie. Les principaux facteurs de la coagulation ont été identifiés dans les années 50. Chaque facteur étant activé par le facteur précédent, la notion de cascade de la coagulation a été développée au décours d'expérimentations réalisées *in vitro* dans les années 60 (figure 1) (21). Cette cascade comporte deux voies, la voie intrinsèque et extrinsèque. **La voie intrinsèque** est activée lorsque le sang est en contact avec des surfaces hydrophiles. Elle est initiée par le clivage de la prékallikréine en kallicréine qui active les FXI et FIX, aboutissant à la formation de thrombine (FIIa), forme activée de la prothrombine (FII). **La voie extrinsèque** est initiée par l'exposition de facteur tissulaire (TF) qui lie le FVII, permettant l'activation du FX et aboutissant également à la formation de thrombine. Le concept de cascade de la coagulation a ensuite été révisé pour intégrer le rôle des cellules dans ce processus.

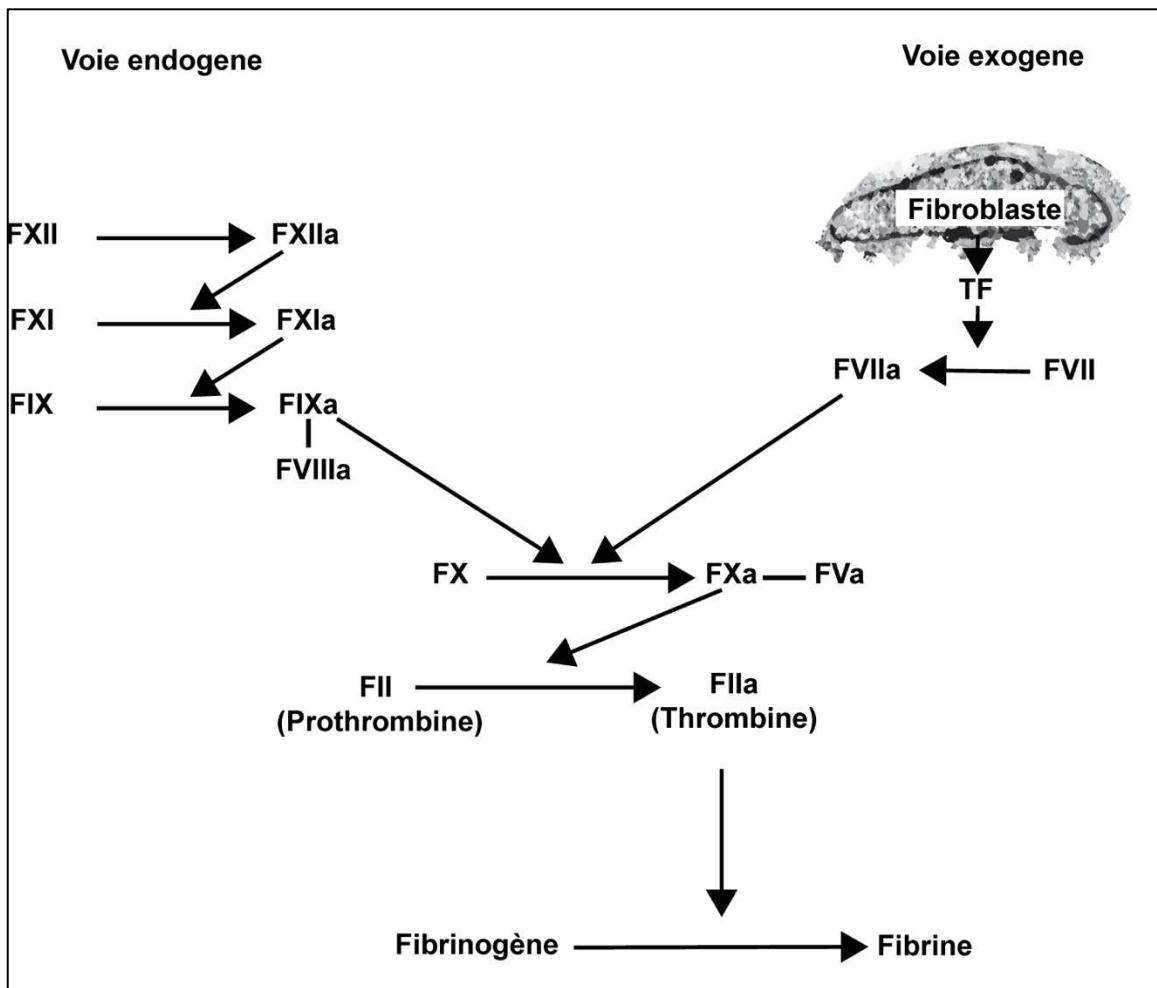


Figure 1: Cascade de la coagulation comprenant une voie endogène et exogène, aboutissant à la formation de thrombine.

Les concepts actuels concernant la coagulation comprennent trois phases : l'initiation, l'amplification et la propagation (figure 2) (22). **La phase d'initiation** est caractérisée par la génération de faibles quantités de thrombine. Elle correspond à l'activation de la voie extrinsèque par l'exposition de facteur tissulaire (TF) à la surface des fibroblastes présents dans l'espace sous-endothélial. Le facteur tissulaire favorise la protéolyse et l'activation du FVII. Le complexe TF/FVIIa active les FIX et FX. Le facteur FXa s'associe au facteur FVa pour former un complexe dénommé prothrombinase sur les cellules exposant du TF. Ce complexe convertit la prothrombine en thrombine. Le FXa peut se détacher des cellules pour former des complexes prothrombinase sur les membranes cellulaires à distance du traumatisme, expliquant la diffusion du processus de coagulation. Cette diffusion est limitée par la présence de « tissue factor protéine inhibitor » (TFPI) et d'antithrombine (AT) dans le plasma. **La phase d'amplification** est caractérisée par une augmentation de génération de thrombine. En effet, la thrombine favorise l'activation des facteurs V et VIII, réalisant une boucle de régulation positive sur sa propre formation. La thrombine active également les plaquettes présentes sur le

site de la lésion. **La phase de propagation** est étroitement liée à l'activation plaquettaire. Les plaquettes expriment des phosphatidylsérines chargées négativement à leur surface. A leur contact, le FXIa convertit le FIX en FIXa, qui s'associe ensuite au FVIIIa pour former le complexe ténase. Celui-ci catalyse la conversion du FX en FXa, participant avec la FVa à la formation du complexe prothrombinase. Ces réactions aboutissent à une formation massive de thrombine qui polymérisé la fibrine, élément indispensable à la formation du caillot (figure 3). D'importantes perturbations du système hémostatique ont lieu après un traumatisme sévère. Certaines d'entre-elles apportent un avantage en terme de survie, d'autres aboutissent à une dysrégulation de la balance entre les processus pro et anticoagulants et ont un effet délétère en terme de morbi-mortalité.

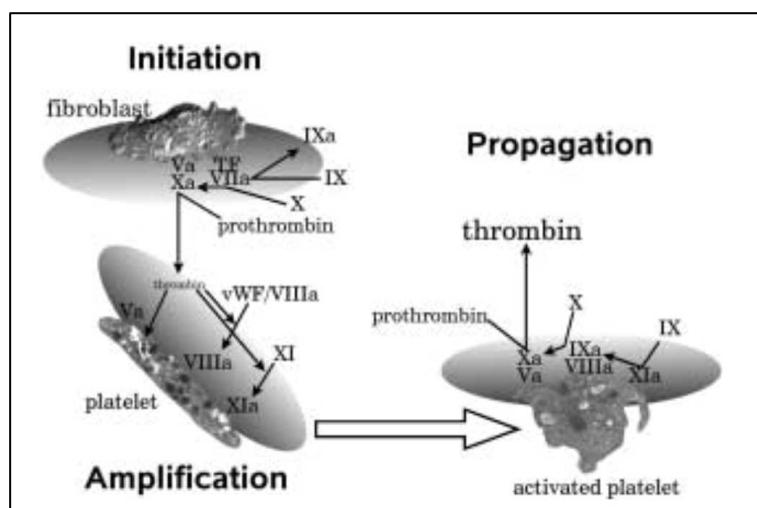


Figure 2: Conception actuelle de la coagulation intégrant le rôle des cellules (42).

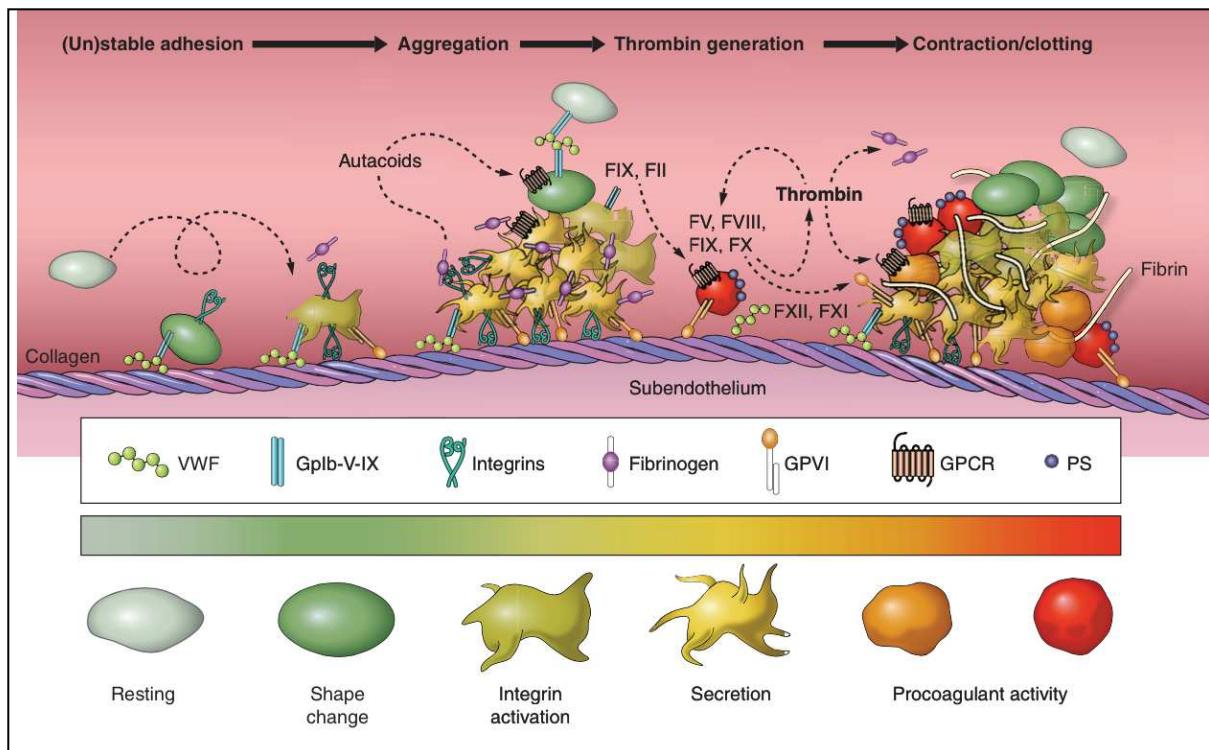


Figure 3: Principales étapes l'activation plaquettaire (43).

L'ATC

L'ATC est une coagulopathie précoce, endogène et spécifique (10). Précoce car son initiation a lieu dans les premières heures suivant le traumatisme. Endogène car sa survenue n'est pas liée à une dilution, une hypothermie ou une acidose. Spécifique car elle n'est observée qu'en cas de traumatisme sévère. L'ATC se traduit cliniquement par un phénotype défini par une tendance accrue au saignement survenant dans les premières heures après le traumatisme (23). Les critères biologiques retenus initialement sont un allongement du temps de prothrombine et/ou un allongement du temps de céphaline activée (16). Par la suite, des tests viscoélastiques ont été utilisés pour diagnostiquer l'ATC et guider en temps réel la stratégie hémostatique des patients (24) (25). Les multiples dénominations utilisées pour ce phénomène témoignent des difficultés liées à la compréhension des mécanismes impliqués dans sa survenue. Ainsi les termes « trauma induced coagulopathy », « trauma associated coagulopathy », « acute coagulopathy of trauma », « coagulopathy after trauma » et « acute coagulopathy of trauma and shock » ont été utilisés dans la littérature internationale pour désigner les troubles de la coagulation endogènes, spécifiques et précoces survenant chez les patients traumatisés sévères (26) (27) (28) (29). Nous avons pris le parti d'utiliser le terme « coagulopathie aigue traumatique », traduction d'« acute traumatic coagulopathy » ou ATC pour désigner cet état physiopathologique particulier. L'ATC peut être aggravée par d'autres facteurs, préexistants ou

exogènes (30). Les facteurs préexistants sont l'âge, la prise de traitements antithrombotiques et les troubles constitutionnels ou acquis de l'hémostase présents avant le traumatisme. Les facteurs exogènes sont l'hypothermie, la dilution et l'acidose. L'association de l'ensemble des facteurs susceptibles d'induire un trouble de la coagulation en contexte traumatique est dénommée « coagulopathie traumatique» (figure 4 et (11)).

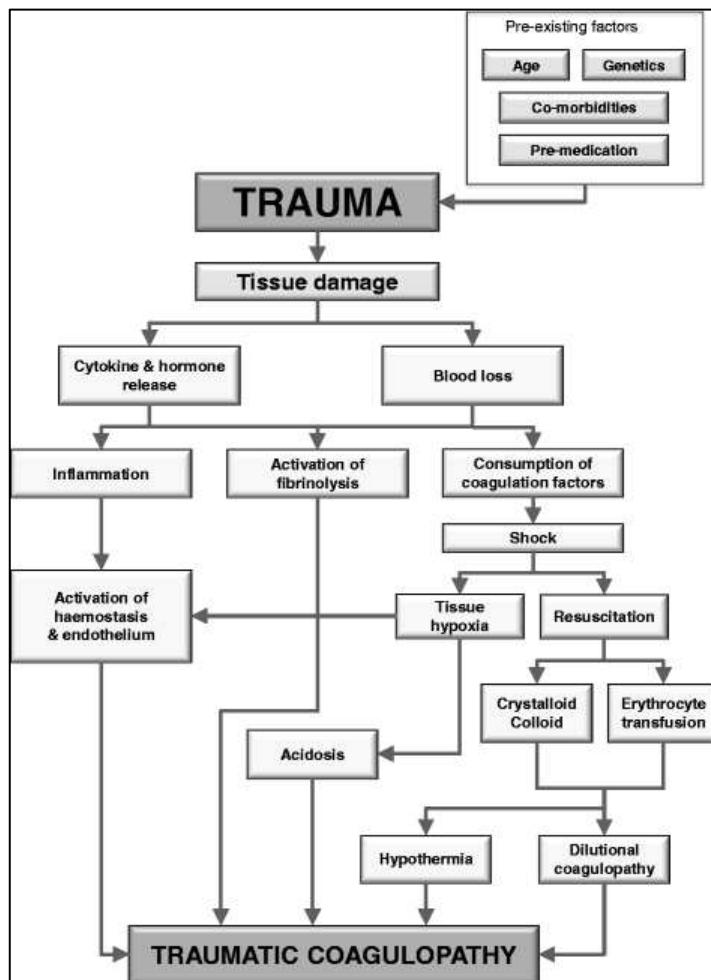


Figure 4:Schémas des facteurs contribuant à la survenue d'une ATC (11).

Facteurs préexistants

Il s'agit de facteurs favorisant l'hémorragie et liés à un statut particulier du patient. Ils sont responsables de troubles de la coagulation présents avant le traumatisme. L'âge a été identifié dans de nombreuses études comme facteur de risque d'hémorragie après traumatisme (31) (32). Des troubles constitutionnels (hémophilie) ou acquis de la coagulation (insuffisance hépatique) constituent également des facteurs préexistants susceptibles de majorer le saignement (33). Par ailleurs, de nombreux patients sont actuellement traités au moyen de molécules antithrombotiques (34). L'action délétère de ces traitements en contexte hémorragique peut être inversée. A titre d'exemple, l'idarucizumab, une immunoglobuline

spécifique permettant la réversion de l'effet anticoagulant du dabigatran a récemment obtenu une autorisation de mise sur le marché en France (35). De même, l'administration de desmopressine est à présent recommandée dans la prise en charge des hémorragies graves sous antiagrégants plaquettaires (36). A ces traitements spécifiques s'ajoutent l'administration de vitamine K et de facteurs de la coagulation contenus dans le plasma ou les concentrés de complexes prothrombiniques (11).

Facteurs exogènes

Ces facteurs sont l'hypothermie, la dilution et l'acidose et leur association est dénommée « triade létale ». Ceux-ci ne sont pas spécifiques aux patients traumatisés graves et sont susceptibles de survenir au décours de multiples mécanismes lésionnels comme par exemple lors d'un choc hémorragique isolé ou de brûlures étendues.

La présence d'une hypothermie, comme cela est fréquent en cas de traumatisme sévère (station au sol, accident en extérieur) constitue un facteur exogène susceptible d'induire ou d'aggraver une coagulopathie préexistante (37) (38). En effet, les facteurs de coagulation sont pour la plupart des serine-protéases et la cinétique de ces enzymes est liée à la température selon la loi d'Arrhenius (39). L'hypothermie constitue un facteur de coagulopathie réversible par l'utilisation de méthodes de réchauffement externe telles que les couvertures à air pulsé, le réchauffement des gaz inspirés et l'administration de fluides réchauffés. Des méthodes invasives telles que l'hémodialyse et l'hémofiltration ont été décrites dans cette indication mais la complexité de leur mise en œuvre les rend peu compatibles avec la prise en charge d'un patient traumatisé grave (40).

En cas d'hypovolémie extrême et en l'absence de produits dérivés du sang immédiatement disponibles, un remplissage vasculaire peut être initié afin de maintenir un débit cardiaque compatible avec la survie. Celui-ci comporte un effet délétère en induisant une dilution des éléments nécessaires à la coagulation, diminuant ainsi l'occurrence de leurs interactions. Ce mécanisme est dénommé « coagulopathie de dilution » (41).

Chez les patients traumatisés sévères, il existe une acidose d'origine multifactorielle (42). Celle-ci survient secondairement à une insuffisance circulatoire, à l'administration de solutés chlorés et à la présence de citrate dans les produits sanguins labiles. L'effet inhibiteur de l'acidose sur la coagulation a été démontré de manière expérimentale (43). En effet, une diminution du pH modifie la structure des sites de liaison des facteurs de la coagulation au

calcium (44). Ainsi, il a été démontré qu'une diminution de pH à 7,0 abaisse les concentrations plasmatiques en facteur VIIa, en complexe FIIa/facteur tissulaire et en complexe FXa/FVa. Ces modifications se traduisent par une diminution de génération de thrombine et de stabilité du caillot (45).

Déterminants de l'ATC

Les lésions tissulaires et l'hémorragie sont les deux déterminants de l'ATC. L'association de ces deux paramètres est nécessaire à sa survenue. Les lésions tissulaires peuvent intéresser l'ensemble des organes mais celles qui sont associées à une mortalité élevée sont par ordre décroissant les lésions du système nerveux central, de l'abdomen, du thorax et des membres inférieurs (46). Une hémorragie grave, nécessitant une transfusion massive, est constatée chez environ 15% des patients inclus dans les registres de traumatologie.

Différents scores ont été proposés pour mesurer la sévérité des lésions tissulaires. Les traumatismes sont catégorisés en France par les critères dits « de Vittel » proposés par Riou *et al.* en 2002. Ceux-ci sont utilisés en pratique courante pour déterminer la gravité avérée ou potentielle des patients traumatisés dès la phase pré-hospitalière (47). Dans la littérature internationale, les scores AIS et ISS, scores historiques définissant la gravité des patients traumatisés selon des critères topographiques font l'objet de nombreuses publications et sont considérés comme des scores de référence (48) . Les scores AIS et ISS ne sont pas calculés lors du premier bilan lésionnel mais *a posteriori*, d'après les comptes rendus d'imagerie et post-opératoires. Le score AIS répertorie des territoires anatomiques, pour lesquels une cotation est attribuée en fonction des lésions. Leur gravité est cotée sur une échelle allant de 1 (lésions mineures) à 6 (lésions létales) en se référant à un index répertoriant plusieurs milliers d'atteintes traumatiques. Le score ISS se base sur la réalisation préalable du score AIS. Il est calculé en additionnant la somme des carrés des scores AIS des 3 régions les plus touchées. Ce score varie de 1 à 75 points. Un score ISS supérieur à 15 définit un traumatisme sévère (tableau 1).

The ISS is the sum of the squares of the highest AIS code in each of the three most severely injured ISS Body Regions.

The following example demonstrates an ISS calculation:

ISS Body Region*	Injury	AIS Code	Highest AIS	AIS²
HEAD/NECK	Cerebral contusion NFS Internal carotid artery transection (neck)	140602.3 320212.4	4	16
FACE	Closed fractured nose	251000.1	1	
CHEST	Rib fractures left side, ribs 3 – 4	450202.2	2	
ABDOMEN	Retroperitoneal Haematoma	543800.2	2	4
EXTREMITIES	Fractured femur (NFS)	853000.3	3	9
EXTERNAL	Abrasions (NFS)	910200.1	1	
				ISS = 29

Tableau 1 : Exemple de réalisation des scores AIS et ISS pour un patient traumatisé (49).

La quantification d'une hémorragie ne peut se faire de manière exacte au décours d'un traumatisme. En effet, en cas d'hémorragie extériorisée, le sang n'est pas collecté comme il peut l'être dans le cadre du bloc opératoire *via* l'utilisation de dispositifs d'autotransfusion (50). De même, dans l'hypothèse d'un traumatisme fermé, l'hémorragie n'est pas précisément quantifiable en l'absence d'imagerie. De plus, les dosages biologiques visant à évaluer l'hémorragie par la mesure de la concentration en hémoglobine comportent un degré d'imprécision à la phase précoce. En effet, les échanges osmotiques entre le secteur interstitiel et intravasculaire conduisant à une diminution de concentration en hémoglobine ne sont cliniquement significatifs qu'après la première heure. Ce phénomène a été démontré en 1994 par Prist *et al.* sur modèle animal (figure 5 et (51)). L'hémorragie est par conséquent appréhendée de manière indirecte par la mesure de son retentissement sur la fonction circulatoire. Cette évaluation peut être réalisée selon des paramètres cliniques et biologiques. Le collège des chirurgiens américains a ainsi défini des critères permettant d'évaluer de manière semi quantitative la gravité d'une hémorragie selon la fréquence cardiaque, la pression artérielle, la fréquence respiratoire, la vigilance et la diurèse (tableau 2). Sur le plan biologique, la concentration sérique en lactates et le déficit en bases sont des marqueurs universellement reconnus d'insuffisance circulatoire. Ils sont utilisés dans de nombreuses études portant sur l'état de choc hémorragique (52) (53).

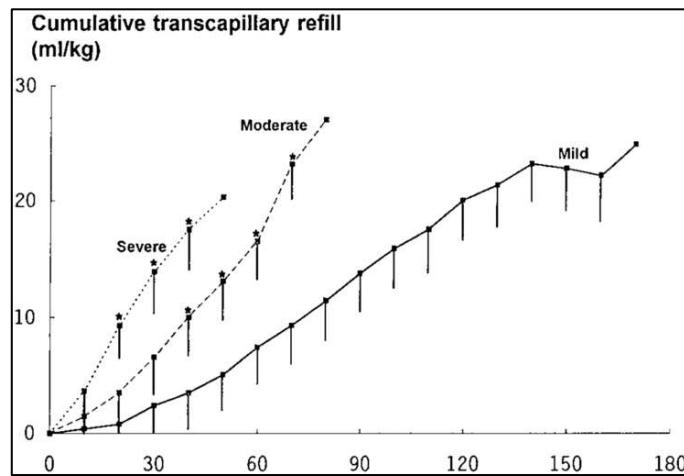


Figure 5: Echanges trans-capillaire pour trois niveaux d'hémorragie chez le chien (moyennes et erreurs standard [51]).

	Class I	Class II	Class III	Class IV
Blood loss (ml)	Up to 750	750 to 1,500	1,500 to 2,000	>2,000
Blood loss (% blood volume)	Up to 15%	15% to 30%	30% to 40%	>40%
Pulse rate (bpm)	<100	100 to 120	120 to 140	>140
Systolic blood pressure	Normal	Normal	Decreased	Decreased
Pulse pressure (mmHg)	Normal or increased	Decreased	Decreased	Decreased
Respiratory rate	14 to 20	20 to 30	30 to 40	>35
Urine output (ml/h)	>30	20 to 30	5 to 15	Negligible
CNS/mental status	Slightly anxious	Mildly anxious	Anxious, confused	Confused, lethargic
Initial fluid replacement	Crystallloid	Crystallloid	Crystallloid and blood	Crystallloid and blood

Table reprinted with permission from the American College of Surgeons [57]. *for a 70 kg man.

Tableau 2 : Classification des pertes sanguines basée sur la présentation initiale du patient [54].

Une étude multicentrique de Frith *et al.* ayant pour objectif d'identifier les déterminants de l'ATC a été réalisée en 2010 sur 3646 patients (10). Dans cette étude, la coagulopathie était évaluée par la mesure du PT ratio. En l'absence de déficit en base, le PT ratio était inférieur à 1,2 quelle que soit l'ISS. En l'absence de lésions tissulaires significatives, le PT ratio était inférieur à 1,2 quelle que soit le déficit en base. Une analyse multivariée a établi l'association entre l'ISS, le déficit en base et l'augmentation du PT ratio. Une potentialisation délétère des lésions tissulaires et de l'insuffisance circulatoire sur les troubles de la coagulation a ainsi été rapportée par ces auteurs (figure 6). Cette étude a permis d'identifier les lésions tissulaires et l'hémorragie comme étant les deux déterminants de l'ATC.

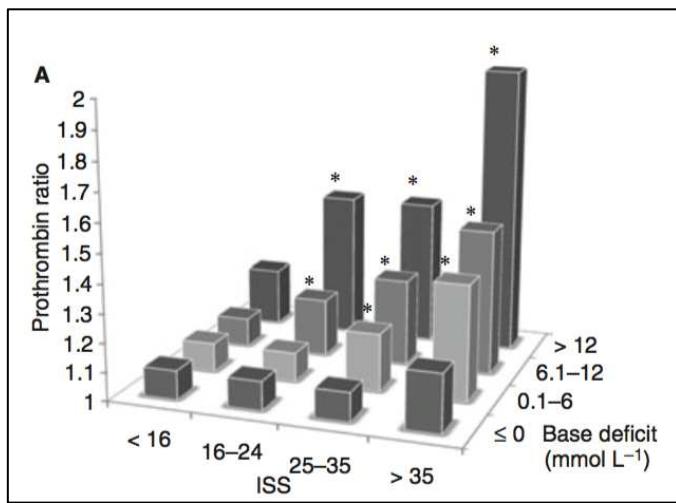


Figure 6: Ratio du temps de prothrombine en fonction de l'ISS et du base déficit. Les lésions tissulaires et l'insuffisance circulatoire potentialisent leurs effets sur l'hémostase (10).

Physiopathologie de la coagulopathie aigue traumatique

L'analyse de la littérature scientifique nous a permis de dégager cinq hypothèses permettant d'appréhender la physiopathologie de l'ATC. Nous présenterons dans cette partie les hypothèses d'une dysrégulation de la voie de la protéine C, d'une CIVD fibrinolytique, d'une diminution des stocks en fibrinogène, d'une diminution de fonction plaquettaire et de lésions endothéliales pour expliquer la survenue d'une ATC. Ces hypothèses ne s'excluent pas toutes mais proposent un éclairage différent concernant les voies impliquées dans la physiopathologie de cette coagulopathie précoce, endogène et spécifique que constitue l'ATC. Elles nous permettront de mettre en lumière les résultats des études présentées dans ce travail de thèse.

Hypothèse 1 : Dysrégulation de la voie de la protéine C

Cette hypothèse suppose une production accrue de protéine C activée en cas de traumatisme grave. Celle-ci entraînerait une fibrinolyse excessive et une répression de la coagulation se traduisant par l'expression d'un phénotype hémorragique.

La protéine C est un polypeptide de 419 acides aminés sécrété sous une forme bicaténaire. Ses deux chaînes sont reliées par un pont disulfure. La chaîne légère comporte 155 acides aminés, la chaîne lourde 262. La chaîne lourde comporte un domaine d'activation de 12 acides aminés. Son clivage par la thrombine entraîne l'activation de la protéine C. La vitesse de cette réaction enzymatique est multipliée par 20000 lorsque la thrombine est fixée à la thrombomoduline. La

thrombomoduline est un récepteur de la thrombine présent sur l'endothélium vasculaire. La fixation de la protéine C à un second récepteur endothérial, l'EPCR, multiplie à nouveau par 20 la vitesse de cette réaction (figure 7).

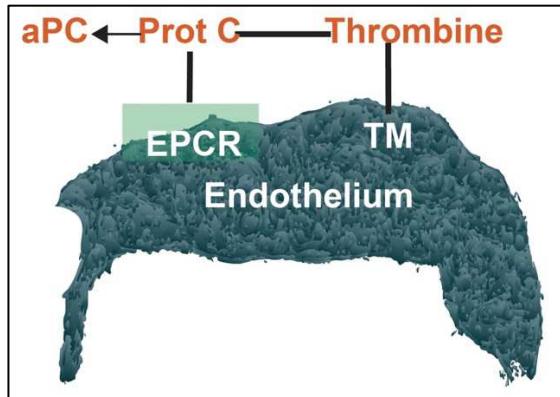


Figure 7: Activation de la protéine C par le complexe EPCR/Thrombine /Thrombomoduline.

La protéine C activée (aPC) régule la coagulation selon deux mécanismes : l'inhibition de la coagulation et l'activation de la fibrinolyse. En effet, l'aPC inhibe les facteurs VIIIa et Va qui jouent un rôle clé dans la coagulation en favorisant la génération de thrombine. La thrombine réalise par cet intermédiaire une boucle de rétrocontrôle négatif sur sa propre formation (20). Par ailleurs, l'aPC exerce une action fibrinolytique en inhibant PAI-1, protéine exerçant un effet répresseur sur t-PA. En effet, t-PA active la formation de plasmine, enzyme essentielle à la fibrinolyse. Une deuxième voie d'activation de la fibrinolyse est initiée par l'aPC. En effet, la thrombine, exerce une fonction d'activation sur le « thrombin activatable fibrinolysis inhibitor » (TAFI), enzyme inhibant la fibrinolyse. La répression de la thrombine par l'aPC entraîne par conséquent une dé-répression de la fibrinolyse. En synthèse, l'aPC régule négativement la coagulation en réprimant les facteurs Va et VIIIa et exerce une activité fibrinolytique par son action combinée sur le t-PA et le TAFI. La voie de la protéine C est schématisée figure 8.

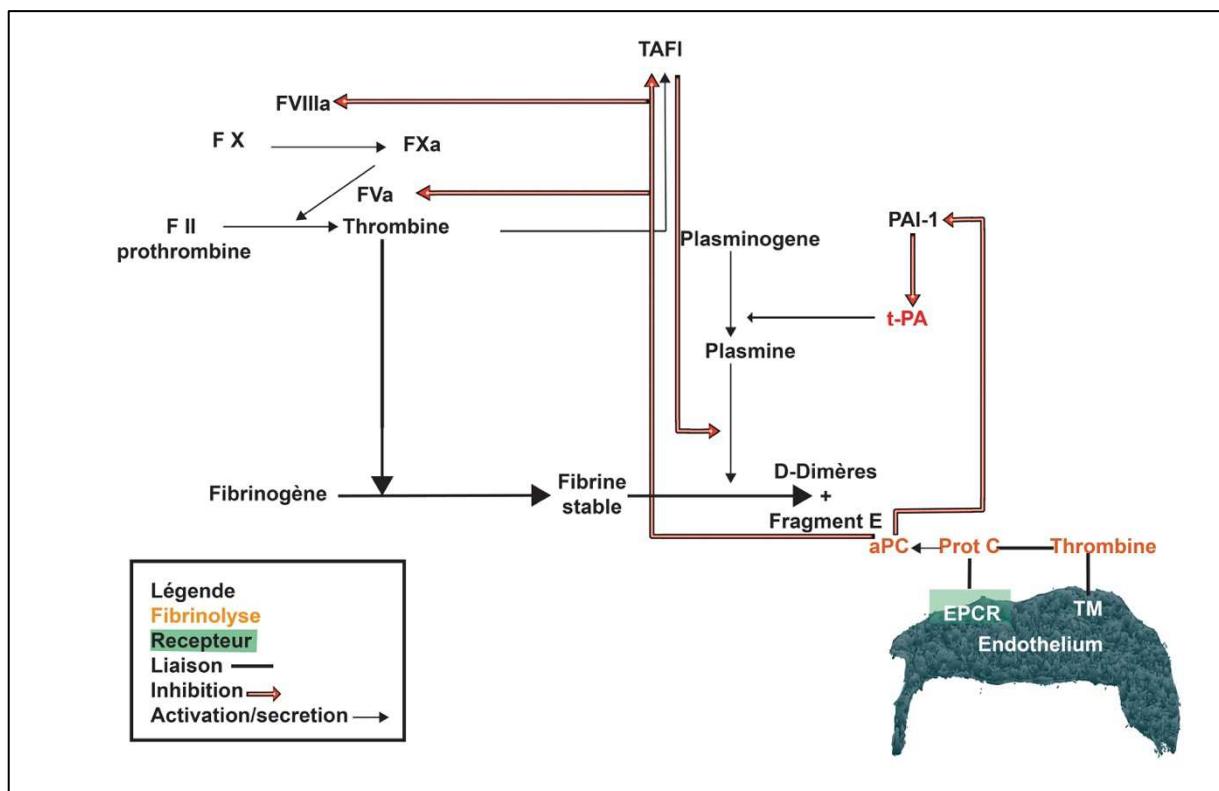


Figure 8: La voie de la protéine C. La protéine C activée inhibe les facteurs Va et VIIIa, réprimant ainsi la coagulation. Par ailleurs, l'aPC active la fibrinolyse selon deux voies : la répression de PAI-1 et l'inhibition de TAFI.

L'hypothèse d'une activation excessive de la protéine C dans les tissus hypoperfusés en contexte traumatique a été développée par Brohi *et al.* lors d'une étude réalisée en 2007 chez des patients traumatisés sévères (29). Dans cette étude, la production de protéine C activée a été mesurée de manière indirecte en mesurant la diminution de concentration plasmatique en protéine C. Une production accrue de protéine C a été observée en cas d'insuffisance circulatoire (figure 9B). Celle-ci était associée à un allongement du PT et du TCA, démontrant une association entre l'activation de la voie de la protéine C et la survenue d'une ATC. La production de protéine C activée était associée à une augmentation des concentrations en PAI-1 et en D-dimères traduisant une activation de la fibrinolyse (figure 10 C et D). De manière intéressante, la présence d'une insuffisance circulatoire était associée à une augmentation des concentrations plasmatiques en thrombomoduline soluble. La thrombomoduline soluble étant un marqueur de lésion endothéliale, les résultats de cette étude suggèrent par conséquent l'hypothèse d'une agression endothéliale associée à l'activation de la voie de la protéine C en cas d'ATC (figure 9A). Une autre étude menée par les mêmes auteurs en 2008 a mis en évidence une activation de la fibrinolyse induisant une augmentation des concentrations plasmatiques en t-PA et D-dimères en cas d'ATC (figure 11,12 et (28)).

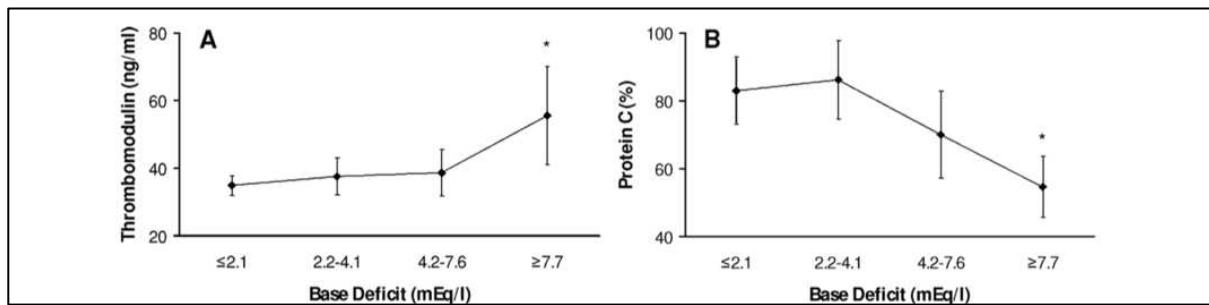


Figure 9: L'insuffisance circulatoire est associée à une élévation des concentrations plasmatiques en thrombomoduline soluble traduisant une agression endothéliale (A) et une diminution des concentrations plasmatiques en protéine C traduisant la formation d'aPC (29).

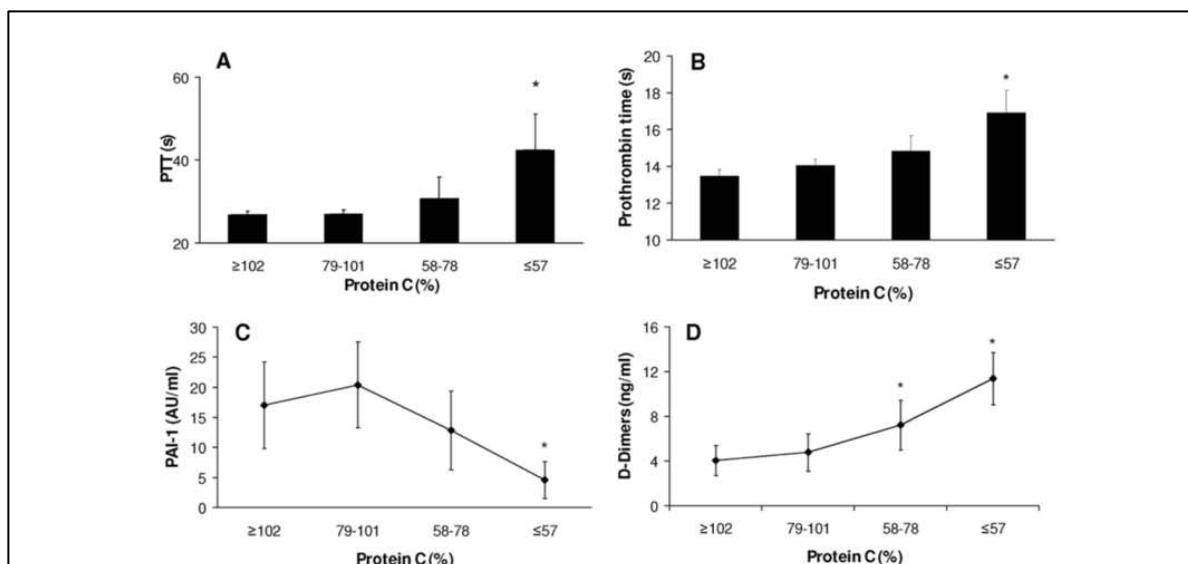


Figure 10: l'activation de la protéine C est associée à un allongement du temps de céphaline activée et du temps de prothrombine (A et B) et à une augmentation des marqueurs de la fibrinolyse (C et D) (29).

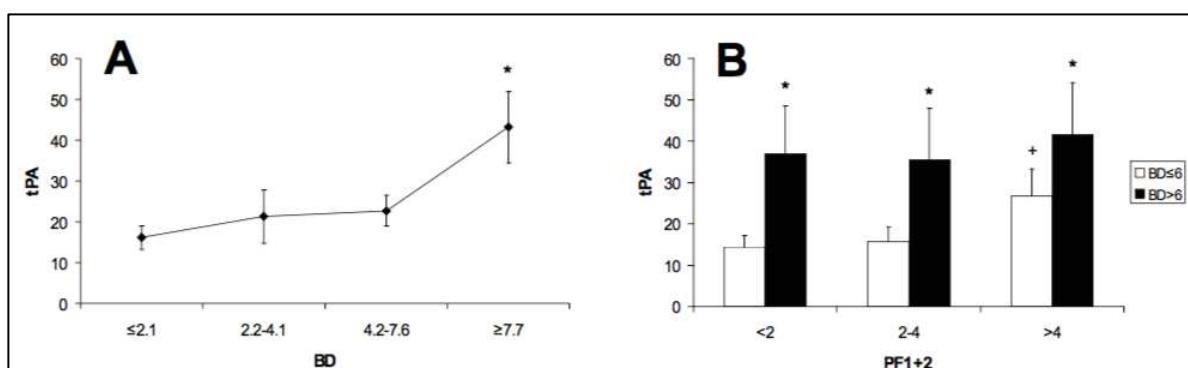


Figure 11: Activation de la fibrinolyse en cas de choc hémorragique d'origine traumatique (29).

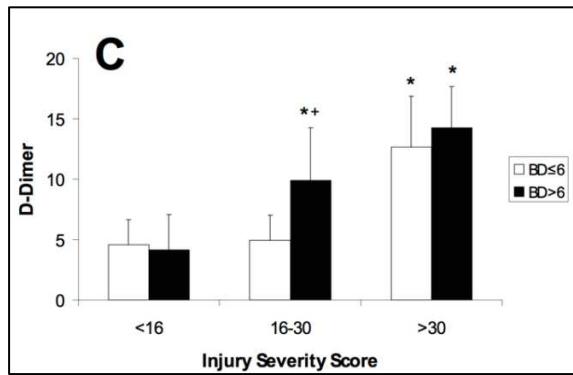


Figure 12: Augmentation des marqueurs de la fibrinolyse en cas d'association de lésions tissulaires (score ISS) à une insuffisance circulatoire (base déficit) (28).

Afin de préciser cette hypothèse, une étude de Davenport *et al.* réalisée en 2017 (55) a rapporté chez des patients traumatisés graves une augmentation de concentration sérique en aPC logiquement associée à une répression des facteur VIIIa et Va (figure 13 C). Celle-ci était associée à une diminution de résistance du caillot, faisant ainsi un lien avec l'expression d'un phénotype hémorragique (figure 13B). De manière intéressante, une préservation paradoxale de la capacité du plasma à générer de la thrombine a été observée, suggérant l'existence d'un mécanisme protecteur contre la répression de la coagulation exercée par l'aPC. Une expérimentation animale a également été réalisée lors de cette étude. Un groupe de rats porteurs d'une mutation de la thrombomoduline empêchant la formation d'aPC et un groupe porteur d'une mutation empêchant l'inactivation du FVa par l'aPC ont été soumis à un traumatisme sévère. Ces deux groupes présentaient des troubles de la coagulation de moins grande ampleur que les rats non mutés, confirmant le rôle central de l'activation de la voie de la protéine C dans l'ATC (figure 14). Une étude de Letson *et al.* réalisée en 2018 sur modèle murin a observé une activation de la fibrinolyse après traumatisme sévère, suggérant une fibrinolyse médiée par une production accrue d'aPC. Les troubles de la coagulation étaient réversibles après administration d'une solution contenant de l'adénosine, de la lidocaïne et du magnésium (56).

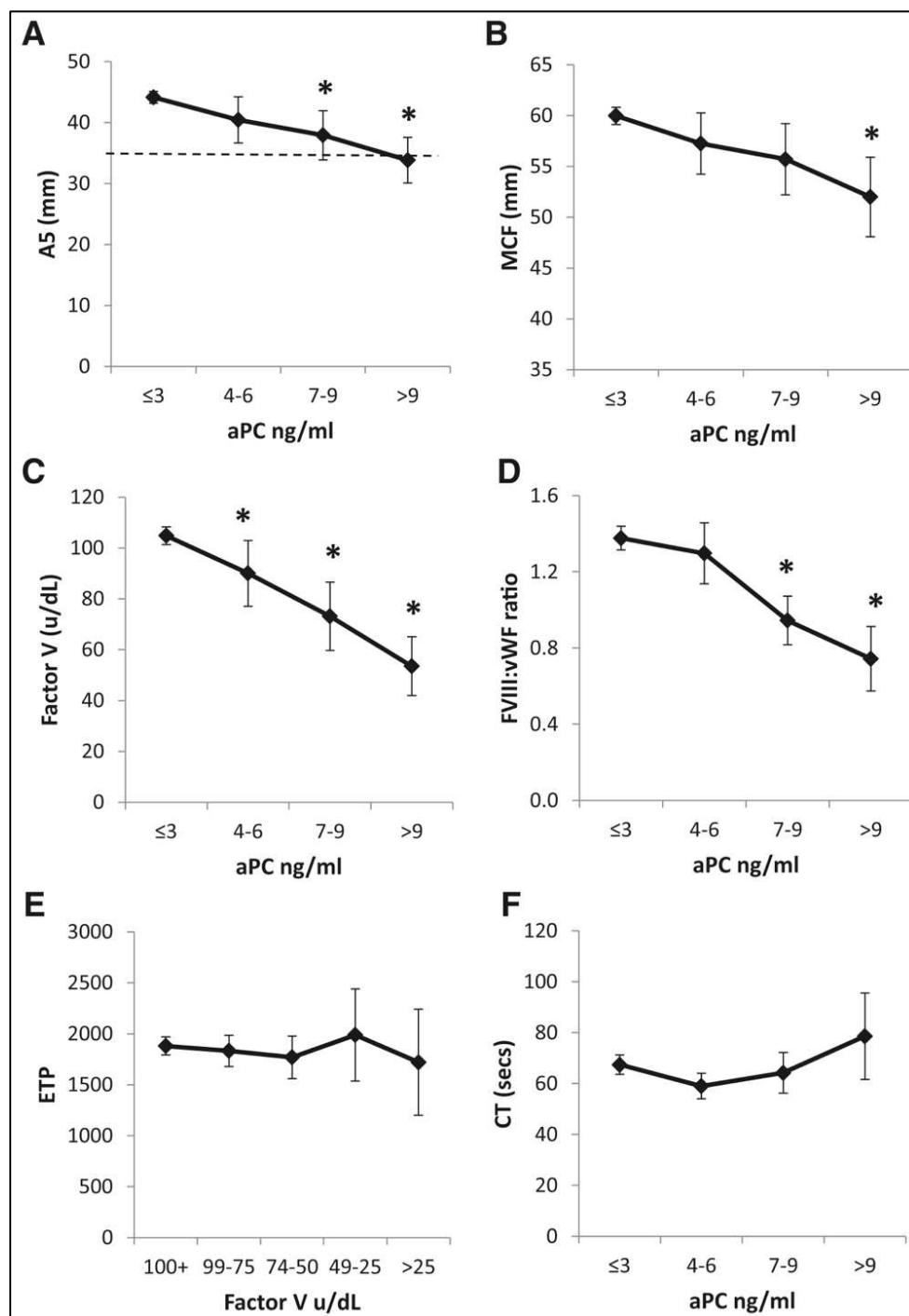


Figure 13: Activation de la voie de la protéine C chez des patients traumatisés graves associée à une réduction de résistance du caillot (B). Répression sélective des FVa et VIIIa par l'aPC (C et D) sans altération de génération de thrombine (E) (55).

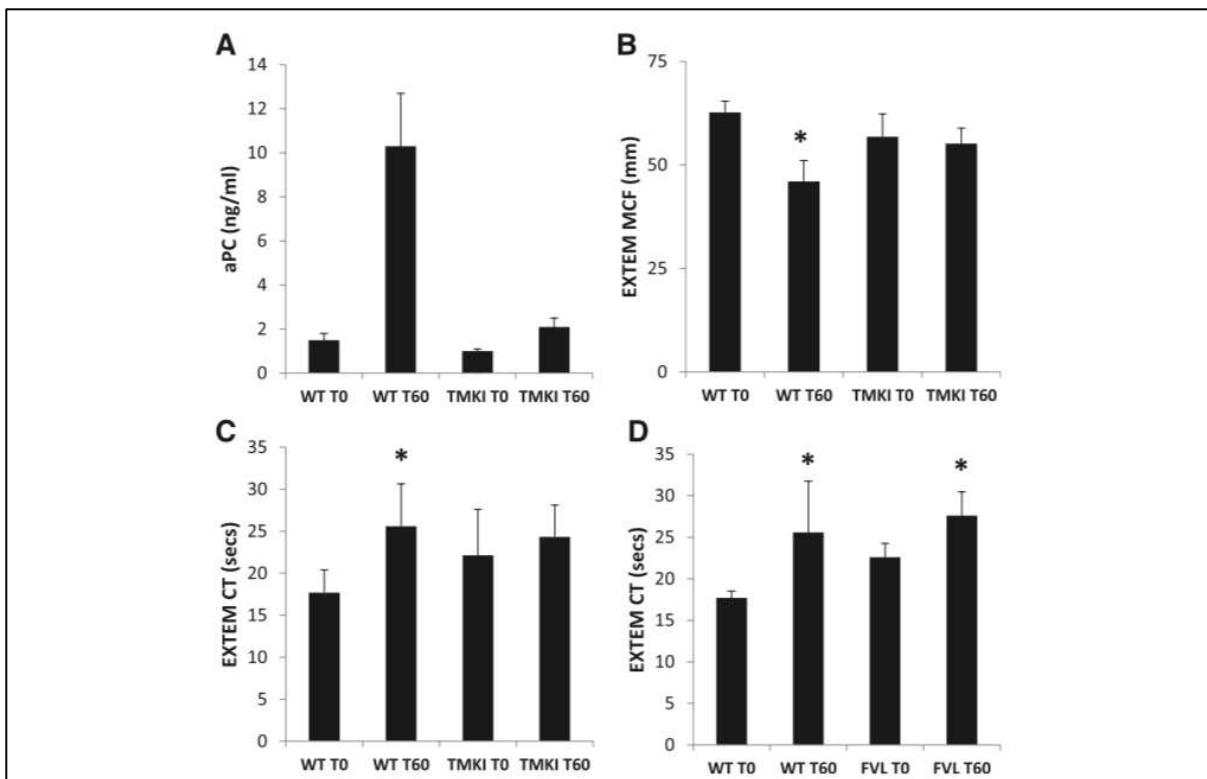


Figure 14: L'inactivation de la thrombomoduline (TMKI) et la préservation de fonction du facteur Va (FVL) réduit fortement les troubles de la coagulation post-traumatiques, confirmant le rôle central de l'aPC dans la survenue d'une ATC (55).

Ces études démontrent par conséquent une association entre une production accrue d'aPC et la survenue d'une fibrinolyse en cas de traumatisme sévère. Cette hypothèse est cependant contestée par Gando, qui a publié en 2018 une revue de la littérature relevant l'absence de lien de causalité entre l'activation de la voie de la protéine C et la survenue d'une ATC (57). En effet, plusieurs auteurs rapportent une préservation ou une augmentation de génération de thrombine en cas d'ATC (58) (55) (59). Or, la génération de thrombine devrait être réprimée par l'action inhibitrice de l'aPC sur les FVa et VIIIa. De plus, deux expérimentations *in vitro* réalisées par Campbell *et al* et Howard *et al* en 2014 et en 2016 suggèrent que les concentrations en aPC observées en cas d'ATC sont insuffisantes pour prolonger le PT et le TCA, éléments clés du diagnostic d'ATC (60) (61). En dépit de ces arguments, le niveau de preuve a été jugé suffisant pour conduire les sociétés savantes à préconiser l'administration de thérapeutiques antifibrinolytique en cas de choc hémorragique traumatique (62) (63) (11). En effet, une méta-analyse de Gayet-Ageron *et al.* publiée en 2018 et portant sur plus de 40000 patients atteints d'hémorragie sévère a relevé une diminution de mortalité en cas d'administration précoce d'acide tranexamique, traitement antifibrinolytique dont le mécanisme d'action reste encore mal compris (64).

La figure 15 résume le rôle de la protéine C dans la physiopathologie de l'ATC.

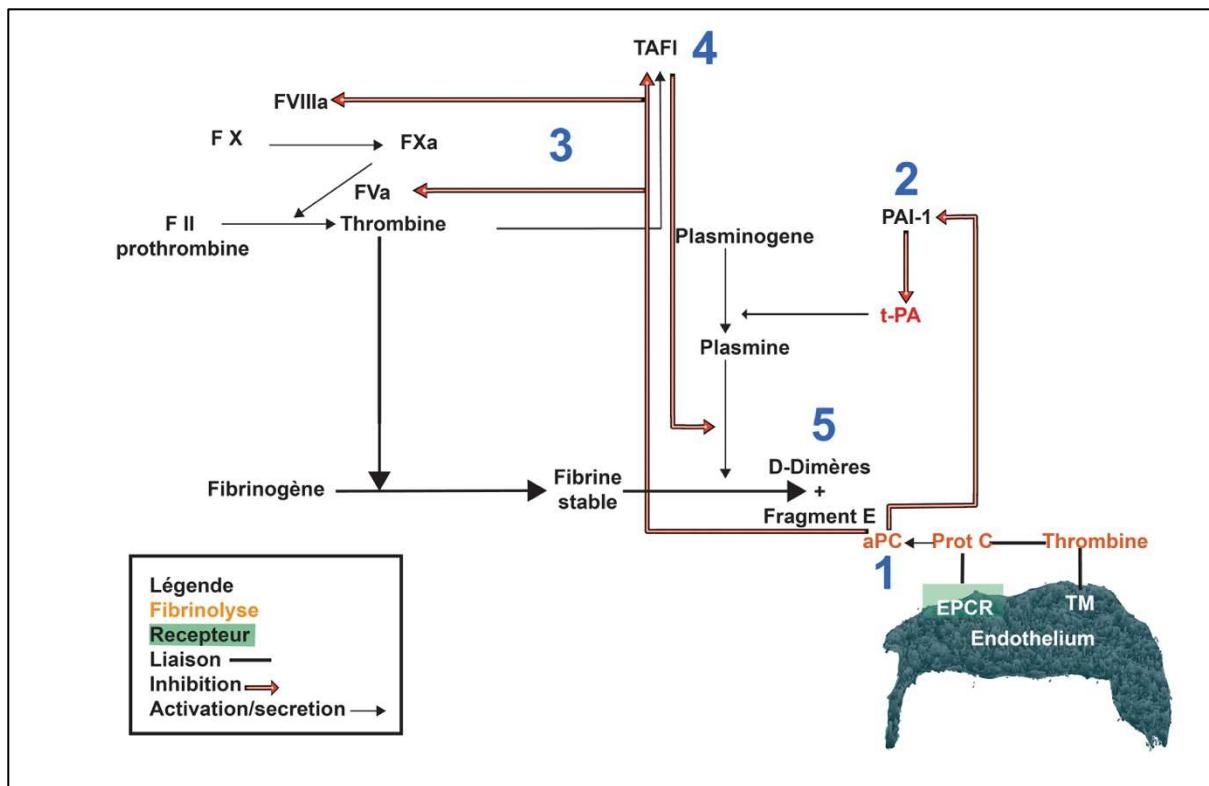


Figure 15: Hypothèse centrée sur la voie de la protéine C. Production accrue d'aPC (1) entraînant une inhibition de PAI-1 et une dérépression de t-PA. La protéine C régule négativement la génération de thrombine en inhibant les facteurs Va et VIIIa (3), dé-réprimant TAFI (4). La dérépression conjointe de TAFI et de t-PA entraîne une activation excessive de la fibrinolyse traduite par l'expression d'un phénotype hémorragique.

Hypothèse 2 : CIVD fibrinolytique

Certains auteurs dont Gando *et al.* ont soutenu, en 2011, l’hypothèse selon laquelle l’ATC ne serait pas une entité physiopathologique spécifique, mais qu’il s’agirait en réalité d’une CIVD fibrinolytique secondaire à un état pro-inflammatoire (65). En effet, de multiples agressions (traumatisme, infections, hypoxie, brûlures) sont susceptibles d’induire une inflammation systémique favorisant l’apparition de troubles de la coagulation. Ce phénomène médié par le système immunitaire est susceptible de survenir en l’absence de lésion tissulaire ou d’hémorragie, comme par exemple lors d’un arrêt cardiaque ou d’un sepsis (66). La coagulopathie du sepsis a fait l’objet de nombreuses études et la littérature scientifique sur ce thème est abondante. Les voies d’activation impliquées dans sa survenue sont à présent connues. Les anomalies de l’hémostase mises en évidence dans ce cadre sont par conséquent susceptibles de servir de modèle pour éclairer l’hypothèse selon laquelle l’ATC serait en réalité une CIVD. Le chapitre suivant résume les principales caractéristiques des troubles de la coagulation observée en contexte infectieux.

La coagulopathie du sepsis est décrite comme évoluant en deux temps. La phase initiale est une CIVD thrombotique résultant d'une répression des substances anticoagulantes endogènes, d'une résistance à la fibrinolyse et de lésions endothéliales (67). La seconde phase est une CIVD fibrinolytique secondaire à un épuisement progressif des stocks en protéines impliquées dans la coagulation et l'inhibition de la fibrinolyse. La phase thrombotique implique une activation de la coagulation et une répression des substances anticoagulantes endogènes. L'activation de la coagulation est initiée par le facteur tissulaire et médiée par les cytokines de l'inflammation. Une étude de Lupu *et al.* a ainsi démontré en 2013 une augmentation d'expression de facteur tissulaire et de cytokines de l'inflammation après injection de lipopolysaccharides simulant la survenue d'un sepsis (68) et figure 16. Le facteur tissulaire est présent sur les cellules endothéliales, les monocytes et les macrophages. Il initie la voie exogène de la coagulation en activant le FVII (figure 17). Le facteur tissulaire entretient lui-même l'activation de l'inflammation en régulant positivement l'expression de trois cytokines: TNF α , IL-1 et IL-6. Celles-ci favorisent l'activation plaquettaire *via* le relargage de « platelet activating factor » (PAF) (69) (22) (20). En parallèle de cette activation de la coagulation, le sepsis induit une répression des anticoagulants endogènes que sont le TFPI, la protéine C et l'antithrombine. L'activité du TFPI est diminuée en cas d'infection (70) (68). La protéine C activée est également réprimée en contexte infectieux en raison d'une répression conjointe de thrombomoduline et de l'EPCR, expliquant une diminution d'activité de la fibrinolyse (42). En effet, l'expression de thrombomoduline est réprimée par les cytokines de l'inflammation TNF α , l'IL-1 et l'IL-6 (71). De plus, la synthèse d'antithrombine est diminuée en contexte septique (72). Le mécanisme de cette inhibition implique une dégradation du glycocalyx endothéial. Les glycosaminoglycans du glycocalyx favorisent l'activité de l'antithrombine et sont dégradés en cas d'inflammation (73). Ces mécanismes pro-thrombotiques conservés au cours de l'évolution confèrent un avantage en matière de survie car ils limitent la dissémination systémique des micro-organismes. Ce phénomène est dénommé « immuno-thrombose ». Cependant la CIVD est un phénomène évolutif : la CIVD thrombotique est suivie d'une CIVD fibrinolytique. Cette deuxième phase se traduit cliniquement par des saignements diffus. Elle associe une activation de la voie de la protéine C, une consommation des plaquettes et de l'ensemble des facteurs de la coagulation (74). Elle est caractérisée par une diminution des concentrations plasmatiques en fibrinogène et en protéine C et une élévation des D-dimères. Ainsi, lorsqu'un « orage inflammatoire » survient, la présence diffuse et excessive de cytokines pro-inflammatoires entraîne une génération systémique de thrombine dont la probabilité de survenue est corrélée avec l'importance de l'inflammation. Cette CIVD, évolutive dans le temps, peut revêtir un profil thrombotique ou fibrinolytique en fonction des stocks d'enzyme

disponibles et des mécanismes de régulation activés. L'évolution des concentrations sériques des principales protéines impliquées dans la survenue d'une CIVD en contexte septique est résumée figure 18.

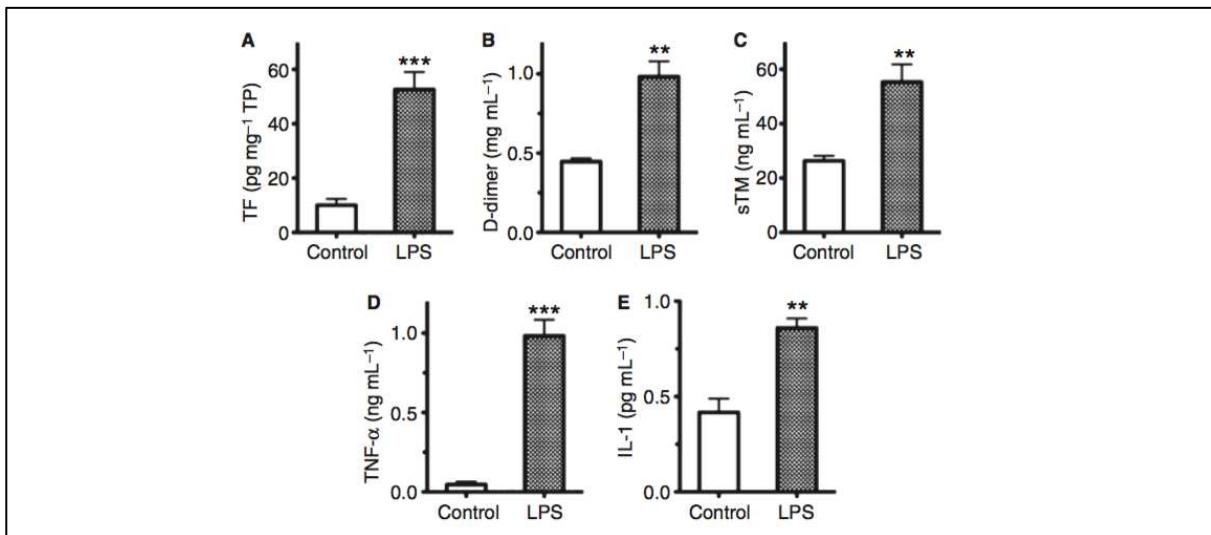


Figure 16: Augmentation de l'expression de facteur tissulaire (A) et des concentrations plasmatiques en cytokines de l'inflammation (D, E) après injection de lipopolysaccharides simulant un sepsis (68).

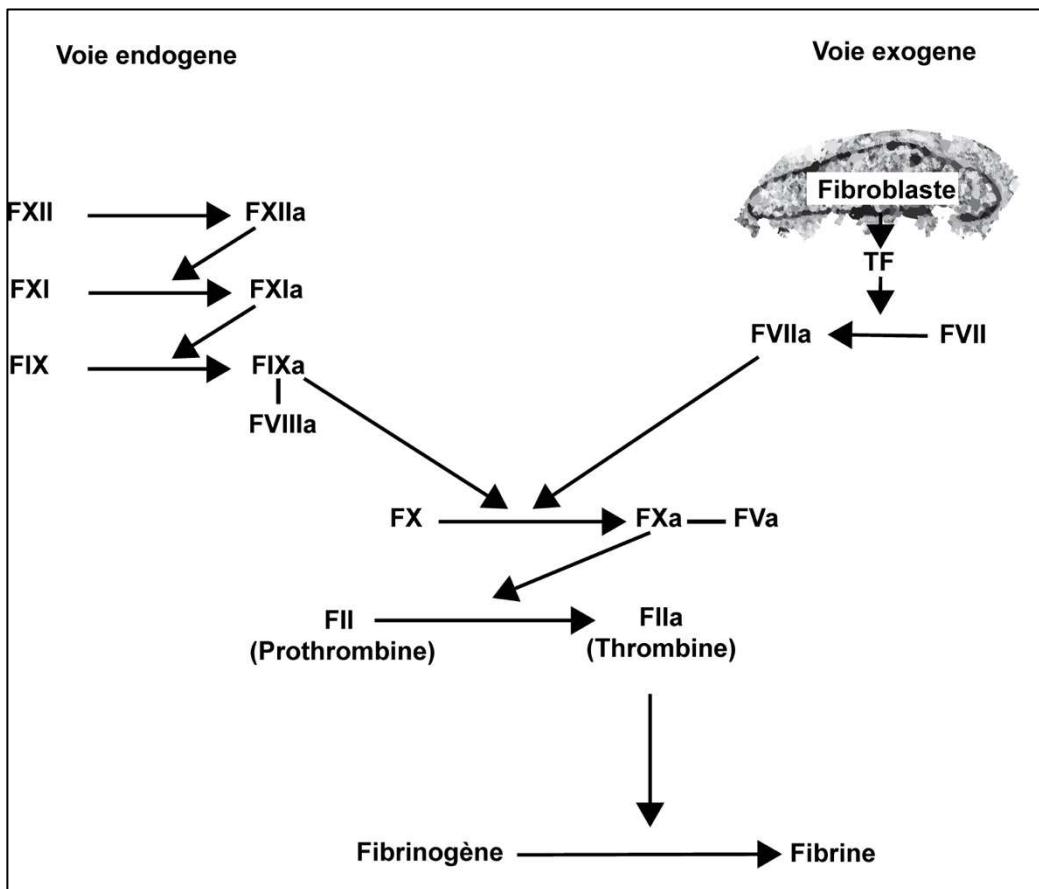


Figure 17: L'expression de facteur tissulaire (TF) constitue une étape déterminante dans la survenue d'une CIVD. Celui-ci active la voie exogène de la coagulation en activant le FVII.

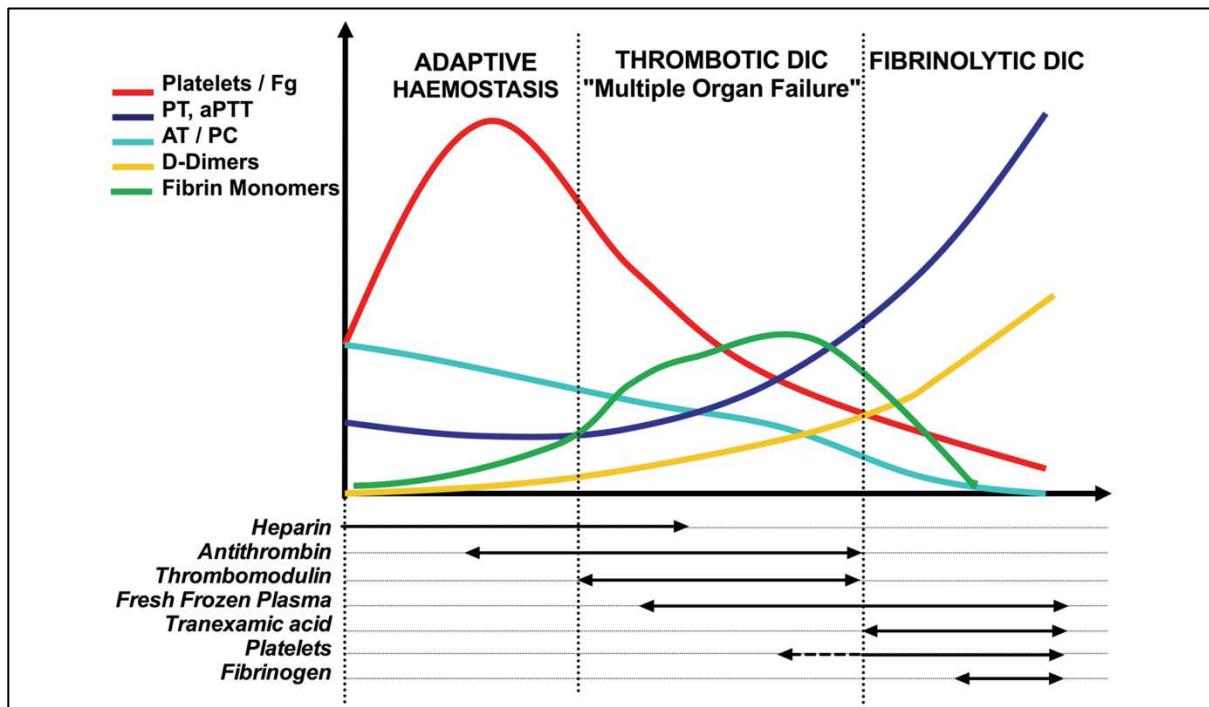


Figure 18: CIVD associée au sepsis. La phase initiale est une CIVD thrombotique. Celle-ci survient en raison d'une expression excessive de facteur tissulaire induisant une production systémique de thrombine. Une inhibition de la fibrinolyse médiee par la répression de l'antithrombine et de la voie de la protéine C est observée durant cette première phase. Une CIVD fibrinolytique survient secondairement en raison d'un épuisement des facteurs de la coagulation, des plaquettes et du fibrinogène (74).

Certains auteurs soutiennent l'hypothèse que ces concepts aspécifiques liant l'inflammation et l'hémostase et expliquant la survenue d'un phénotype hémorragique ou d'une défaillance multiviscérale dans le cadre du sepsis présentent des similarités avec la coagulopathie constatée après un traumatisme (26) (27) (75). Tout comme pour le sepsis, la conservation de ces mécanismes au cours de l'évolution serait liée à un avantage en matière de survie. En effet, une activation conjointe de l'hémostase et de l'inflammation aurait pour fonction de limiter l'hémorragie tout en activant la réparation tissulaire à l'échelle locale. En revanche, en cas d'activation diffuse, une dysrégulation de ces processus les rendraient délétères. Les auteurs défendant l'hypothèse selon laquelle l'ATC serait en réalité une CIVD proposent des mécanismes similaires mais une séquence légèrement différente de celle décrite dans le sepsis. En effet, selon ces auteurs, la CIVD traumatique comporterait initialement une phase fibrinolytique évoluant secondairement vers l'expression d'un phénotype thrombotique (65). Les mécanismes impliqués seraient les suivants : le traumatisme induirait une activation de la coagulation initiée par une expression excessive et diffuse de facteur tissulaire aboutissant à une génération systémique de thrombine. Ce mécanisme, identique en tous points à la CIVD décrite dans le sepsis, se traduirait par une augmentation majeure de génération de thrombine

associée à une diminution globale des facteurs de la coagulation en raison de leur consommation. La différence avec le sepsis résiderait dans un relargage massif de t-PA en raison d'une agression endothéliale, expliquant l'observation précoce d'un phénotype hémorragique (76). Cette fibrinolyse initiale médiée par l'endothélium serait soutenue par la production d'aPC secondaire au « burst » de thrombine (27). L'hyper-fibrinolyse entraînerait une consommation et un épuisement progressif des stocks de protéine C, responsables *in fine* d'un état pro-thrombotique survenant après plusieurs jours d'évolution. Il se traduirait par une élévation anormale et prolongée de concentration plasmatique en PAI-1. Le phénotype observé chez les patients serait par conséquent une défaillance multiviscérale liée à la présence de microthrombi diffus. Ce modèle est illustré figures 19 et 20.

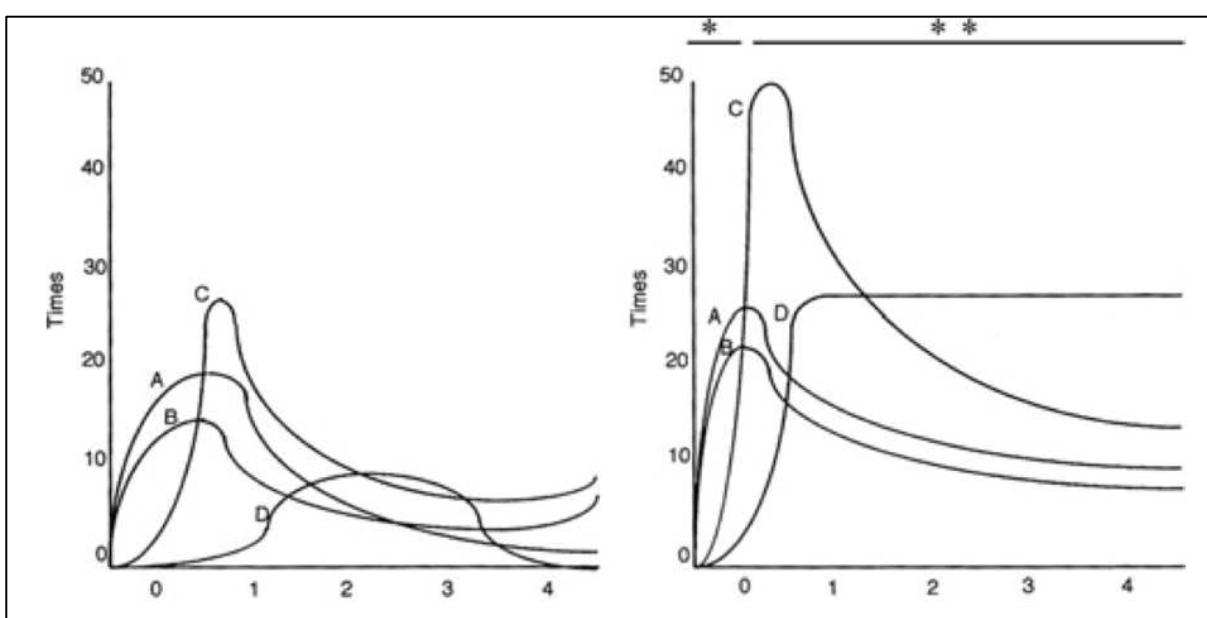
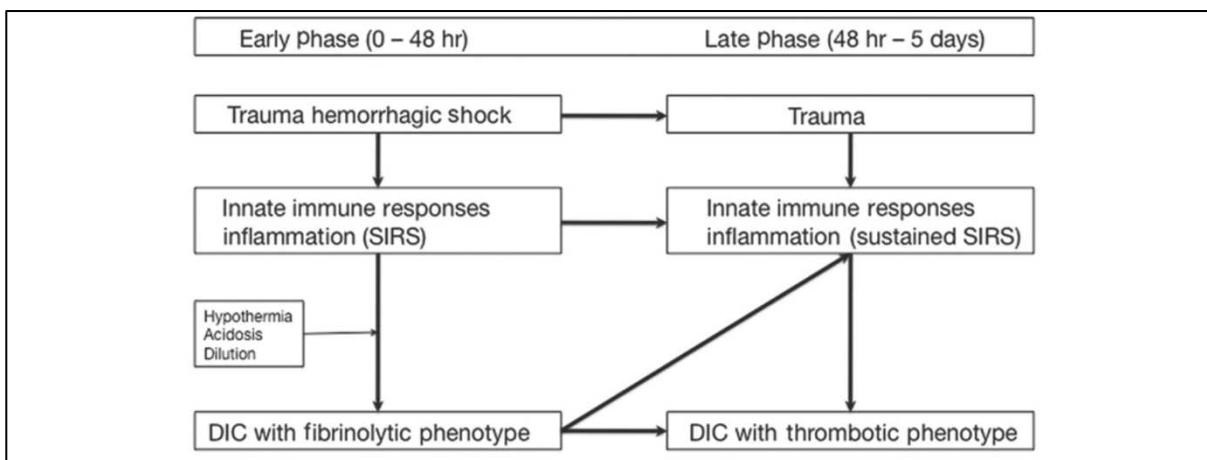


Figure 20: Figure de gauche: situation normale, figure de droite: CIVD traumatique. A : thrombine, B : plasmine, C : D-dimères, D : PAI-1. La phase initiale est une CIVD fibrinolytique caractérisée par un pic de thrombine responsable d'une activation excessive de la voie de la protéine C. La seconde phase est une CIVD thrombotique. L'épuisement progressif des

stocks en protéine C entraîne une dé-répression de PAI-1 et une répression de la fibrinolyse. Cette seconde phase est caractérisée par la formation diffuse de microthrombi entraînant une défaillance multiviscérale (65).

Selon l'hypothèse d'une CIVD fibrinolytique, les concentrations plasmatiques en facteurs de la coagulation et en plaquettes devraient décroître rapidement (75). Un profil biologique compatible, associant un allongement du TCA et une diminution des facteurs de la coagulation a en effet été observé par Johansson *et al.* en 2011 (58). De plus, une étude de Fröhlich *et al.* réalisée en 2018 chez l'homme a observé une association entre l'augmentation des microparticules endothéliales et la survenue d'une fibrinolyse après traumatisme sévère (77). Ces résultats sont concordants avec l'hypothèse de lésions endothéliales responsables d'un relargage de t-PA pour expliquer l'observation d'un profil fibrinolytique précoce (76). De plus, une élévation de concentration plasmatique en PAI-1 a été observée dans une étude reportée par Gando *et al.* en 2011 portant sur des patients traumatisés sévères (65). L'élévation de PAI-1 persistait 3 jours après le traumatisme, renforçant l'hypothèse d'une CIVD thrombotique de survenue tardive (figure 21).

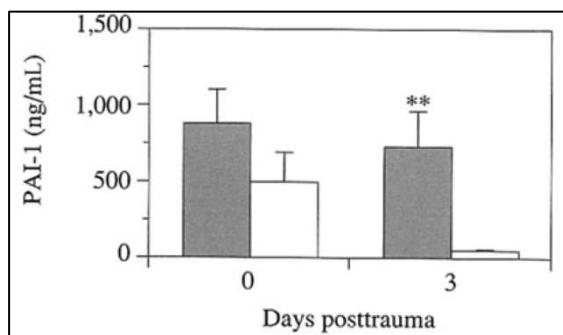


Figure 21: Activation excessive et persistante de PAI-1 trois jours après le traumatisme dans le groupe des patients présentant une coagulopathie traumatique (rectangles grisés). Les patients traumatisés ne présentant pas de trouble de la coagulation figurent en blanc (65).

Cependant, certains auteurs tels que Harr *et al.* affirment que l'ATC est une entité physiopathologique distincte de la CIVD. Ces auteurs ont observé lors d'une étude animale réalisée en 2011 une diminution de génération de thrombine liée à une baisse des stocks en facteurs de la coagulation (78). Ces résultats sont cependant discordants avec les observations de Dunbar et Chandler réalisées en 2009 et 2010 chez l'Homme, qui relevaient une augmentation de génération de thrombine après traumatisme sévère (79) (80). Johannsen *et al.* ont recherché la présence de critères de CIVD (figure 22 et (81)) lors d'une étude réalisée en 2011 portant sur 80 patients traumatisés (58). Ces critères ont été reproduits. Aucun des patients ne présentait les critères diagnostiques d'une CIVD mais les patients présentant une ATC avaient un profil clinico-biologique compatible avec l'hypothèse publiée par Gando *et al.* en 2013 (27)

associant une consommation des facteurs de la coagulation, des lésions endothéliales, une augmentation des marqueurs de la fibrinolyse et une augmentation des marqueurs de l'inflammation (tableau 3). Cette étude a par conséquent remis en cause l'hypothèse selon laquelle les troubles de la coagulation observés chez l'Homme en contexte traumatique correspondraient *stricto sensu* à une CIVD tout en supposant l'existence de mécanismes physiopathologiques compatibles.

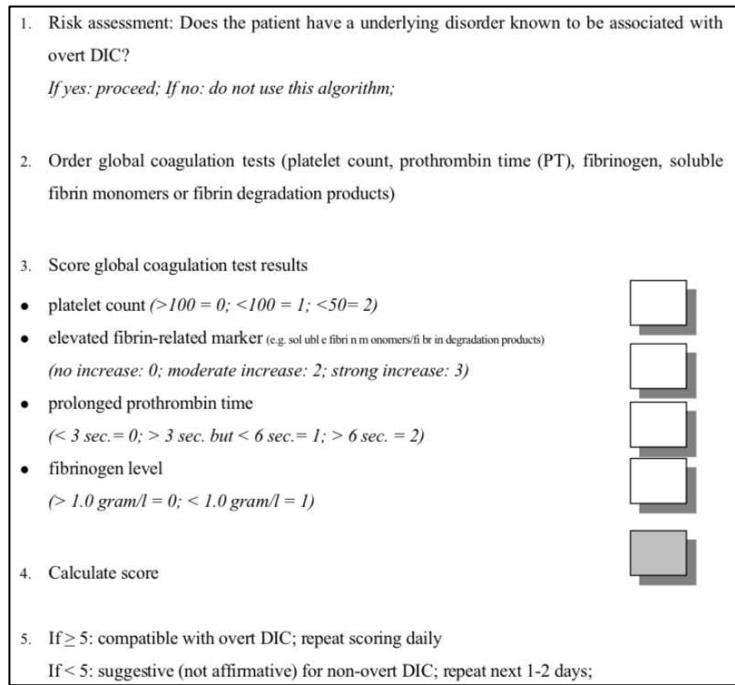


Figure 22: Critères de CIVD établis par l'ISTH (81).

Table 2 Demography, injury severity, transfusions, mortality, hemostasis and biomarkers of coagulopathy in ACoTS and non-ACoTS patients

		ACoTS	Normal (no ACoTS)	p to value
Demography				
N		12	68	
Age	yrs	42 (26 to 74)	46 (34 to 63)	NS
Gender	m% (n)	75% (9)	66% (45)	NS
Blunt trauma	% (n)	92% (11)	91% (62)	NS
ISS	score	34 (30 to 43)	17 (10 to 25)	< 0.001
sTBI	% (n)	25% (3)	32% (19)	NS
GCS (PH)	score	3 (3 to 7)	13 (7 to 15)	< 0.001
Shockindex (PH)	HR/SBP	0.68 (0.56 to 0.78)	0.61 (0.48 to 0.75)	NS
RBC 1 h	n	5 (0 to 9)	0 (0 to 0)	< 0.001
MT (> 10 RBC in 24 h)	% (n)	50% (6)	7% (5)	< 0.001
Mortality	% (n)	50% (6)	12% (8)	0.001
Shock, biochemistry and coagulopathy				
pH		7.27 (7.13 to 7.31)	7.36 (7.31 to 7.40)	0.001
SBE	mmol/l	-5.1 (-8.2 to -2.35)	-1.8 (-34 to 0.0)	0.009
Hemoglobin	mmol/l	6.8 (5.8 to 8.8)	8.5 (7.6 to 9.0)	0.055
Platelet count	10 ⁹ /l	197 (173 to 238)	208 (176 to 259)	NS
Fibrinogen	g/l	1.53 (1.25 to 2.02)	2.45 (2.18 to 2.89)	0.001
FXIII	microg/ml	23 (17 to 29)	30 (24 to 39)	0.004
vWF	%	143 (100 to 209)	201 (140 to 226)	0.117
APTT	sec	33 (27 to 42)	25 (23 to 26)	NA
INR	ratio	1.3 (1.3 to 1.5)	1.1 (1.1 to 1.1)	NA
Tissue, endothelial cell and glycocalyx injury				
Histone-complexed DNA	%	15.4 (8.5 to 58.2)	4.8 (0.1 to 11.8)	0.003
Annexin V	ng/ml	45 (40 to 61)	24 (21 to 35)	0.001
sTM	ng/ml	2.90 (2.27 to 4.09)	1.43 (0.92 to 3.34)	0.015
Syndecan-1	ng/ml	62 (34 to 107)	31 (18 to 48)	0.013
Thrombin generation				
PF1.2	nmol/l	3.17 (0.61 to 16.03)	6.71 (2.08 to 18.79)	0.120
TAT	ng/ml	38 (36 to 41)	36 (30 to 43)	NS
Natural anticoagulation				
AT	10 ³ U/l	0.68 (0.62 to 0.85)	0.95 (0.87 to 1.03)	< 0.001
PC	%	72 (60 to 89)	114 (99 to 129)	< 0.001
APC	ng/ml	9.98 (8.59 to 11.96)	9.78 (7.72 to 12.15)	NS
sEPCR	ng/ml	174 (141 to 242)	230 (175 to 398)	0.087
PS	%	57 (50 to 69)	66 (61 to 71)	0.078
TFPI	ng/ml	63 (43 to 74)	60 (47 to 80)	NS
Fibrinolysis				
D-dimer	ng/ml	174 (173 to 176)	158 (122 to 173)	0.001
tPA	ng/ml	7.2 (5.5 to 11.8)	6.9 (3.5 to 12.6)	NS
PAI	ng/ml	26 (11 to 37)	22 (14 to 40)	NS
Inflammation				
sC5b-9	ng/ml	1, 014 (701 to 1, 173)	1, 027 (905 to 1, 232)	NS
IL-6	pg/ml	110 (98 to 128)	61 (18 to 118)	0.024

Tableau 3: En cas de traumatisme sévère, le profil clinico-biologique des patients qui présentent une ATC associe une consommation des facteurs de la coagulation, des lésions endothéliales, une augmentation des marqueurs de la fibrinolyse et une augmentation des marqueurs de l'inflammation. Ce profil est similaire à celui d'une CIVD mais aucun de ces patients n'en présentait les critères diagnostiques. De plus, l'ATC n'est pas associée à une augmentation significative de génération de thrombine (58).

La figure 23 résume l'hypothèse selon laquelle l'ATC serait une CIVD fibrinolytique.

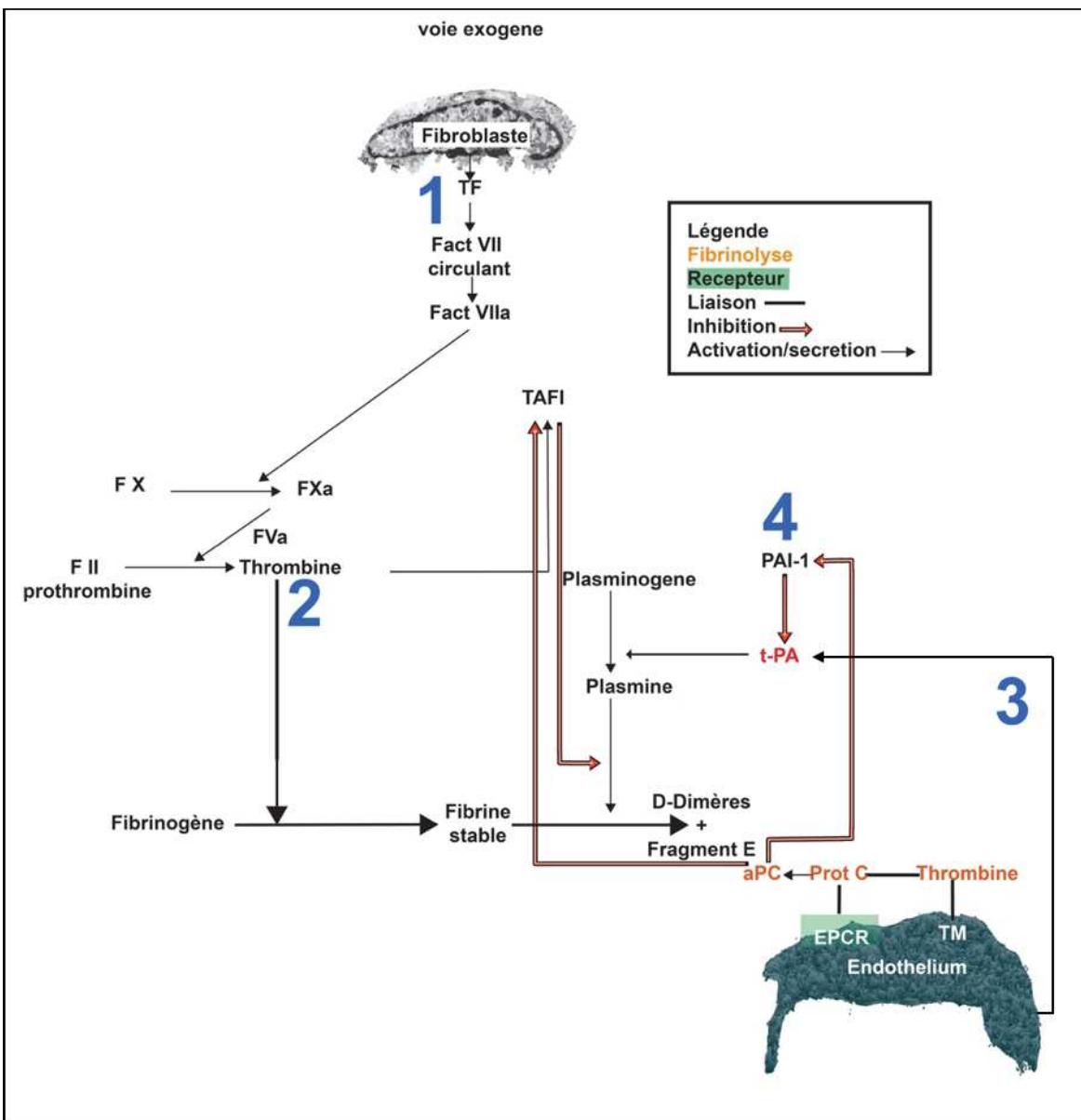


Figure 23: Schéma illustrant hypothèse selon laquelle l'ATC serait une CIVD fibrinolytique. (1) exposition excessive de facteur tissulaire secondaire au traumatisme. (2) génération systémique et excessive de thrombine. (3) Pic de plasmine lié à une agression endothéiale expliquant l'expression précoce d'un phénotype fibrinolytique. (4) Dé-répression de PAI-1 liée à un épuisement des stocks de protéine C entraînant l'expression d'un phénotype thrombotique plusieurs jours après le traumatisme.

Hypothèse 3 : Rôle du fibrinogène

Selon cette hypothèse, l'ATC serait caractérisée par une diminution de concentration en fibrinogène favorisant la survenue d'une fibrinolyse excessive. En effet, une étude de Diez *et al.* réalisée en 2006 a démontré chez des sujets sains une corrélation négative entre la concentration plasmatique en fibrinogène et la concentration plasmatique en aPC (82). Cette corrélation a été confirmée *in vitro* puisqu'il a été observé une relation dose-dépendante entre

les concentrations en fibrinogène et en aPC en présence de cellules endothéliales (figure 24). Le fibrinogène aurait une action inhibitrice sur le complexe formé par la thrombine et thrombomoduline endothéliale. Par conséquent, une diminution de concentration sérique en fibrinogène est susceptible d'activer la voie de la protéine C et de la fibrinolyse. Le mécanisme de cette inhibition serait expliqué par la configuration des sites de liaison entre ces protéines. En effet, le fibrinogène et la thrombomoduline disposent du même site de liaison à la thrombine, le site FRS (figure 25 et tableau 7). Ce site de liaison commun suggère un mécanisme d'inhibition compétitive du fibrinogène sur les interactions entre la thrombine et la thrombomoduline (83). L'hypothèse selon laquelle la diminution des stocks en fibrinogène aurait un rôle primordial dans la genèse d'un phénotype hémorragique en cas de traumatisme sévère est cohérente avec les résultats d'une étude clinique de Rourke *et al* réalisée en 2012 (84). Ces auteurs ont observé une association négative entre l'importance des lésions tissulaires, la gravité de l'état de choc, le volume de remplissage vasculaire et la concentration en fibrinogène (figure 26). La diminution de la concentration plasmatique en fibrinogène a été identifiée comme facteur prédictif de mortalité à 24 heures dans cette étude. La résistance du caillot était corrélée à la concentration en fibrinogène et la correction ex-vivo d'une hypofibrinogénémie reversait la coagulopathie.

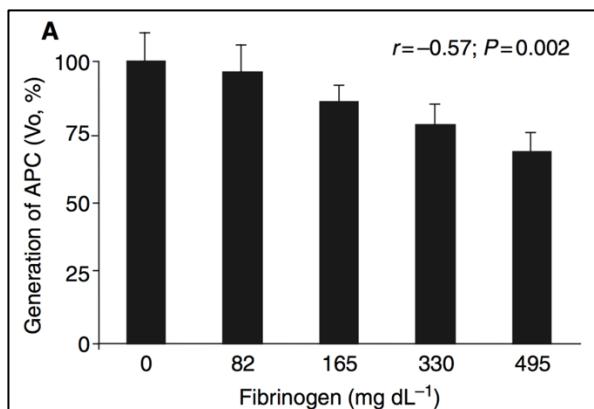


Figure 24: Relation dose dépendante entre aPC et fibrinogène testée *in vitro* sur cellules endothéliales évoquant un effet répresseur du fibrinogène sur la voie de la protéine C (82).

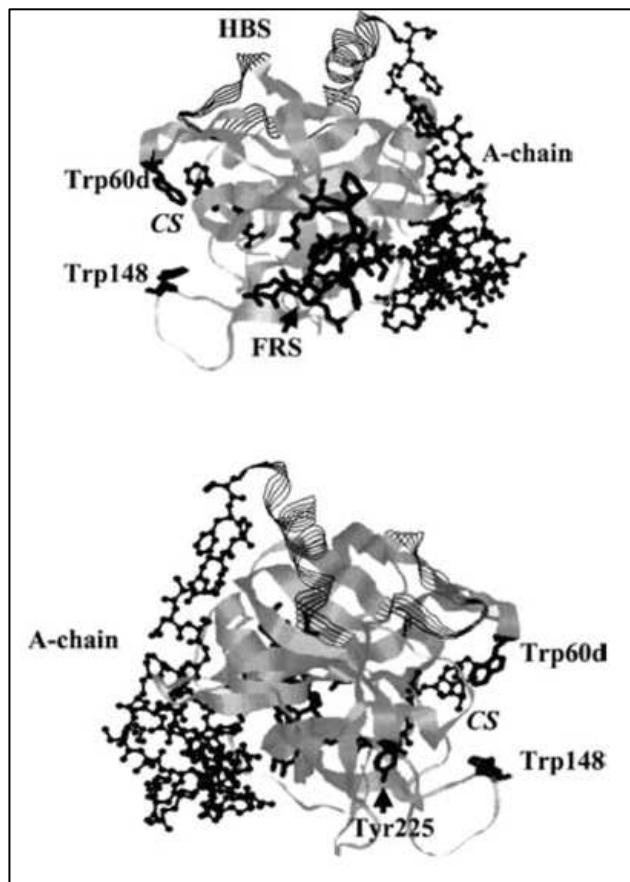


Figure 25: site de liaison FRS de la thrombine (83).

Table 1. Thrombin Residues of the FRS Domain (R67-I82) Involved in Binding to Several Thrombin Ligands

Thrombin residue	FRS ligands								
	Fibr-A α	Fibr-B β	TM	PAR1	Hir	HC II	FV	FVIII ^a	FXIII ^b
R67	D49 ^[29,32]		Y413 ^[22,92,118,119]	F55 ^[20,27,32,98]	ND ^[20,27]	ND ^[24,32]	ND ^[32,26]	ND ^[8]	ND ^[84]
K70	ND ^[25,117]		ND ^[22]						
H71	ND ^[25]		ND ^[22]						
R73	ND ^[25]		ND ^[22]	Y52,D50 ^[20,98]	F56 ^[20,27]	ND ^[24,120,121]	ND ^[26]	ND ^[8]	ND ^[84]
T74			D416 ^[22,92,118,119]		F56 ^[27]			ND ^[8]	ND ^[84]
R75			D416, D423 ^[92,118,119]	E57 ^[11]		ND ^[121]	ND ^[26]		
Y76	W52, P53, F54 ^[25,29]	P64, P65 ^[34]	Y413, I414, L415, I424 ^[22,92,118,119]	P54, F55 ^[27]	E57, P60 ^[27]		ND ^[26]	ND ^[8]	ND ^[84]
R77A	ND ^[25]		D416-417, T422 ^[22,92,118,119]	E57 ^[27]	ND ^[24]		ND ^[8]	ND ^[84]	ND ^[84]
K81	S56 ^[29]	S67 ^[34]	ND ^[22]	Y63(SO ₄) ^[27]	ND ^[24]		ND ^[8]	ND ^[84]	ND ^[84]
I82			Y413 ^[92,118,119]	I59, P60 ^[27]			ND ^[8]		

The relative references are reported as superscripts. ND: not determined.

^aThe attribution of the interacting thrombin residues was done on the basis of the competitive inhibition of FVIII C2 domain hydrolysis by thrombin in the presence of the sulphated-hirudin 54–65 peptide [8].

^bThe attribution of the interacting thrombin residues was done on the basis of the competitive inhibition of FXIII hydrolysis by thrombin in the presence of hirugen [84].

Tableau 4: le site de liaison FRS de la thrombine lie de nombreux ligands, dont le fibrinogène et la thrombomoduline (83).

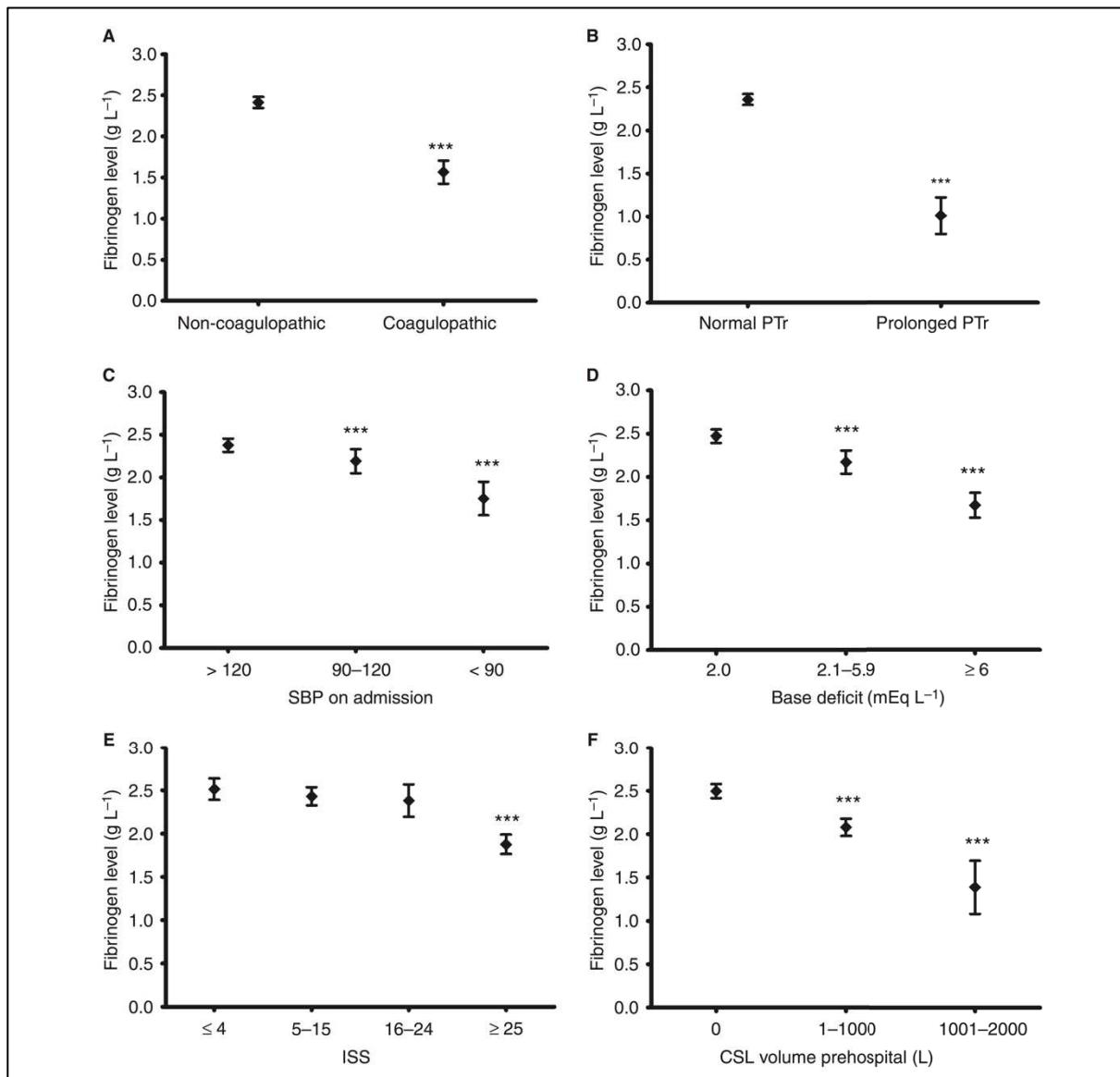


Figure 26: Diminution de concentration en fibrinogène dans les sous-groupes de patients présentant une ATC, un ISS élevé, un remplissage vasculaire et un état de choc (84).

Une diminution de concentration plasmatique en fibrinogène semble par conséquent associée à la présence d'une ATC. C'est pourquoi les thérapies de supplémentation en fibrinogène font l'objet d'une attention particulière de la part des cliniciens qui les considèrent désormais comme faisant partie intégrante d'une réanimation hémostatique bien conduite (85) (11) (86).

La figure 27 résume l'hypothèse selon laquelle le fibrinogène jouerait un rôle central dans la survenue d'une ATC.

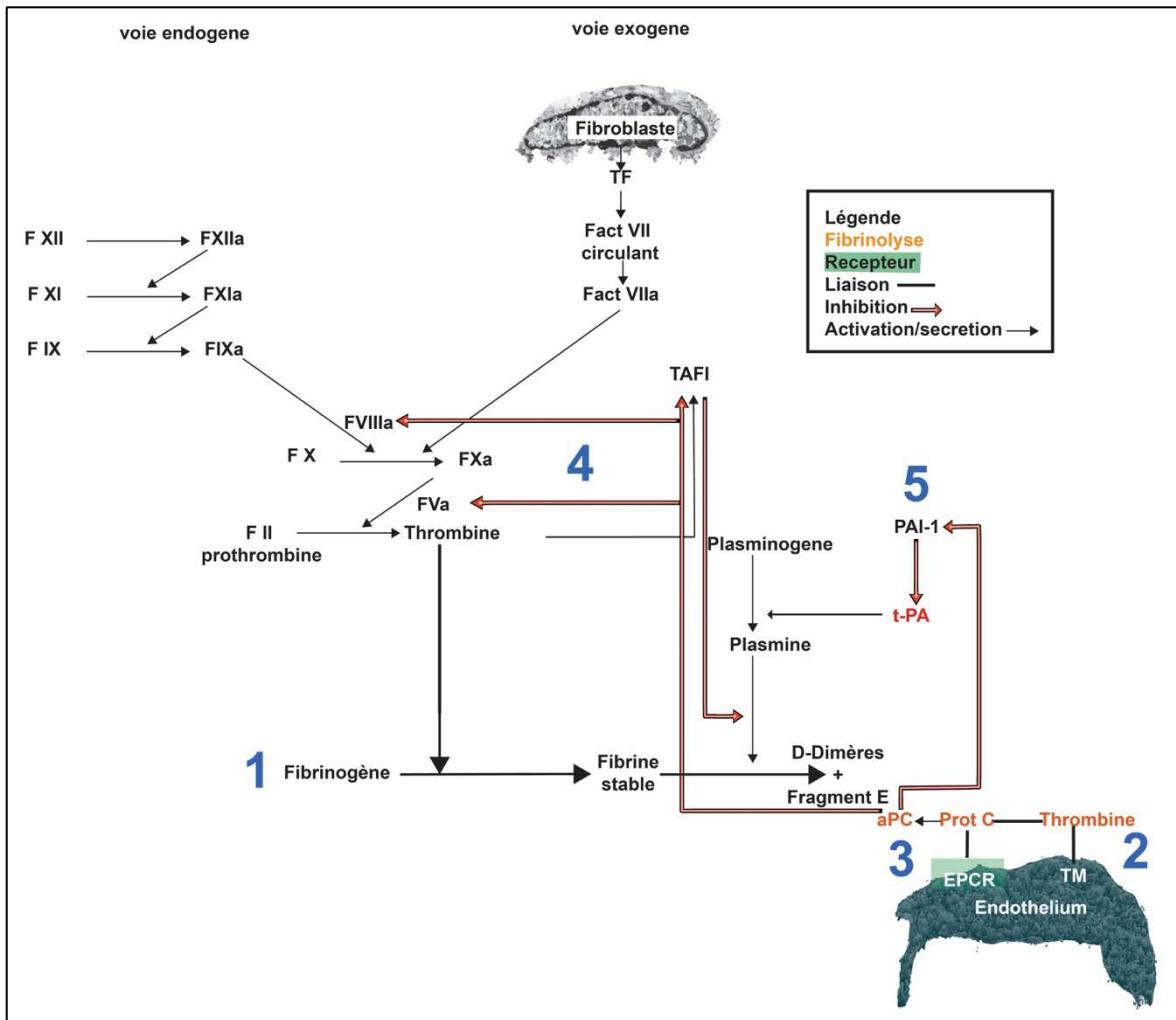


Figure 27: Hypothèse identifiant le fibrinogène comme élément central dans la genèse d'une ATC. A l'état normal, le fibrinogène réprime les interactions entre la thrombine et la thrombomoduline par inhibition compétitive sur le récepteur FRS. (1) Diminution de concentration sérique en fibrinogène corrélée à l'importance du traumatisme, du choc et du remplissage vasculaire. (2) L'hypofibrinogénémie entraîne une dérépression des interactions entre thrombine et thrombomoduline par levée d'inhibition compétitive. (3) Production de protéine C activée. (4) La protéine C activée exerce un contrôle négatif sur la formation de thrombine et une action fibrinolytique en réprimant PAI-1 (5).

Hypothèse 4 : Altération de la fonction plaquettaire

Les plaquettes constituent un élément fondamental dans les étapes d'initiation et de propagation de la coagulation décrites dans l'article de Hoffman et Monroe paru en 2001 fondant les bases des conceptions actuelles en hémostase (22). Selon ces conceptions, la thrombine formée lors de la phase d'initiation participe à l'activation plaquettaire médiée par les récepteurs PAR. Les plaquettes activées secrètent des molécules procoagulantes et exposent à leur surface des phosphatidylsérines, constituant à leur tour une surface procoagulante indispensable à la formation des caillots. De récents travaux suggèrent l'existence de troubles de la fonction plaquettaire chez les patients traumatisés graves (87) (88) (89). Selon cette hypothèse, l'augmentation de concentration plasmatique en facteur tissulaire lié au traumatisme

entrainerait une activation plaquettaire diffuse. Cette activation serait suivie d'une période de parésie durant laquelle les plaquettes ne seraient plus fonctionnelles. Ce mécanisme expliquerait une diminution de mortalité chez les patients traumatisés bénéficiant d'une transfusion plaquettaire, et ce même en l'absence de thrombopénie. Une étude de Wohlauer *et al.* réalisée en 2012 a évalué la réponse plaquettaire par thromboélastographie en contexte traumatique chez l'homme (89). Il a été observé une diminution de réponse plaquettaire corrélée à l'importance des lésions tissulaires et à la gravité du choc. Les déterminants de l'altération de la fonction plaquettaires, à savoir l'association de lésions tissulaire et d'une hémorragie étaient par conséquent les mêmes que ceux de l'ATC. Ces résultats suggèrent l'implication d'une altération de fonction plaquettaire dans la survenue d'une ATC. Solomon *et al.* ont également observé une diminution de fonction plaquettaire chez les patients décédés après traumatisme lors d'une étude réalisée en 2011 (90). Par la suite, Henriksen *et al.* ont établi de manière indiscutable la présence d'une diminution de fonction plaquettaire post-traumatique en réalisant en 2017 une analyse bi-variée de la fonction plaquettaire ajustée sur la numération (91) et tableau 8. De manière intéressante, il semblerait que ces troubles de la fonction plaquettaire soient réversibles après transfusion (92).

Table 1. Median Percent ADP and Percent Arachidonic Acid Receptor Inhibition and Other Physiologic Variables in All Patients and Specific Subpopulations						
	n	% ADP INH, median (IQR)	% AA INH, median (IQR)	Platelet count/ mL, mean (\pm SEM)	Hemoglobin g/dL, mean (\pm SEM)	Base deficit (mEq/L), mean (\pm SEM)
All trauma	51	86.1 (59.1)	44.9 (32.7)	229.4 (\pm 88.6)	12.8 (\pm 2.3)	6.4 (\pm 5.4)
Blunt	42	81.1 (59.7)	46.5 (43.0)	221.4 (\pm 90.7)	12.6 (\pm 2.2)	5.9 (\pm 5.3)
Penetrating	9	72.2 (34.5)	44.9 (32.7)	295.4 (\pm 87.4)	14.6 (\pm 2.7)	12.5 (\pm 2.1)
On antiplatelet medication	6	68.2 (23.0)	72.5 (50.1)	224.5 (\pm 143.9)	12.8 (\pm 2.7)	3.5 (\pm 3.3)

AA, arachidonic acid; INH, inhibition; IQR, interquartile range; INR, international normalized ratio.

Tableau 5 : inhibition de fonction plaquettaire constatée après traumatisme chez l'homme (91).

Les mécanismes intervenant dans cette perte de fonction plaquettaire impliquent une activation du complément et une surexpression de facteur tissulaire. En effet, Atefi *et al.* ont observé en 2016 une inactivation des plaquettes prélevées chez des patients sains en présence de sérum de patients traumatisés (figures 28). Celle-ci était associée à une activation du complément et un dépôt des fragments C3a et C4d à la surface des plaquettes, suggérant une perte de fonction médiée par le complément (figures 29 et (93)). Par ailleurs, l'expression de facteur tissulaire semble influer sur la réponse plaquettaire. En effet, Donahue *et al.* ont observés en 2014 une diminution de réponse plaquettaire après traumatisme crânien chez le rat Sprague Dawley (94). Le tissu cérébral contenant une forte quantité de facteur tissulaire, ces auteurs ont émis l'hypothèse suivante : un relargage massif de facteur tissulaire serait responsable d'une

activation plaquettaire diffuse et inappropriée, responsable d'une diminution de fonction durant une période dite « réfractaire ». Dans cette étude l'administration de refludan, un inhibiteur de la thrombine, a eu un effet protecteur contre l'altération de fonction plaquettaire. Ce résultat suggère une suractivation initiale médiée par la thrombine. Celle-ci pourrait être liée à l'action de la thrombine sur le relargage d'ADP plaquettaire, la période réfractaire correspondant au temps nécessaire pour reconstituer les stocks d'ADP. La deuxième hypothèse développée par ces auteurs se fonde sur l'effet répresseur de la thrombine sur la cyclooxygénase, enzyme nécessaire à la conversion de l'acide arachidonique en thromboxane A2. Le relargage massif de thrombine expliquerait ainsi la constatation d'une diminution de réponse plaquettaire lors du test à l'acide arachidonique. De manière intéressante, la survenue d'une altération de fonction plaquettaire n'était pas associée à une diminution des facteurs de la coagulation. Ces observations ont été confirmées en 2018 par Kornblith *et al.* qui ont par ailleurs établi l'association entre la présence d'un traumatisme crânien et une perte de fonction plaquettaire médiée par le vWF tableau 11 et (95).

Cette inactivation plaquettaire transitoire liée à une suractivation initiale en contexte traumatique a été dénommée « parésie plaquettaire» (96).

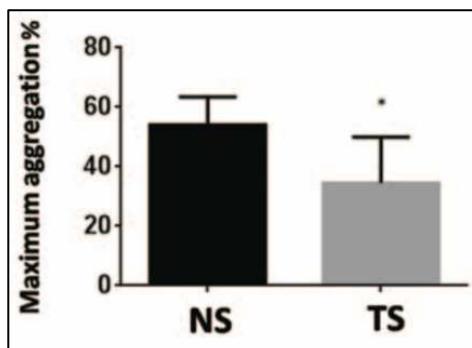


Figure 28:Agrégation plaquettaire mesurée en mélangeant des plaquettes issues de donneur sain avec un sérum de patients non traumatisés (NS) et traumatisés (TS) (93).

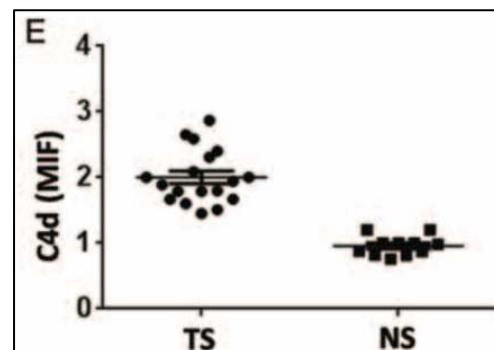


Figure 29: Dépôts plaquettaires de complément (C4d) en associant des plaquettes issues de patients sain avec un sérum issu de patients non traumatisés (NS) et traumatisés (TS) (93).

TABLE 2. PLATELET IMPEDANCE-BASED AGGREGATION
(ARBITRARY UNITS) AFTER TBI IN RATS

<i>Rat</i>	<i>ADP</i> (AU)	<i>Aspirin</i> (AU)	<i>Collagen</i> (AU)	<i>PAR-4 agonist</i> (AU)
Control	82.9±2.7	75.1±2.1	77.3±3.7	73.5±1.5
15 min	77.6±1.2	73.6±2.5	59.0±6.1 [†]	71.1±2.4
30 min	69.2±4.8*	71.8±6.9	54.4±5.4 [‡]	70.8±6.8
1 h	75.0±2.7*	67.1±2.5	59.2±6.3 [†]	61.5±6.0

Values are expressed as the mean±standard error of the mean ($N\geq 13$). Statistical analyses were performed using an unpaired *t*-test comparing a specific postinjury time point to the control.

* $p<0.05$; [†] $p<0.006$; [‡] $p<0.0005$.

TBI, traumatic brain injury; ADP, adenosine diphosphate; AU, arbitrary units; PAR-4, protease-activated receptor 4.

Tableau 6: Diminution de la réponse plaquettaire à l'ADP et au collagène évaluée par agrégométrie après traumatisme crânien chez le rat (95).

La figure 30 résume l'hypothèse d'une diminution de fonction plaquetttaire associée à la survenue d'une ATC.

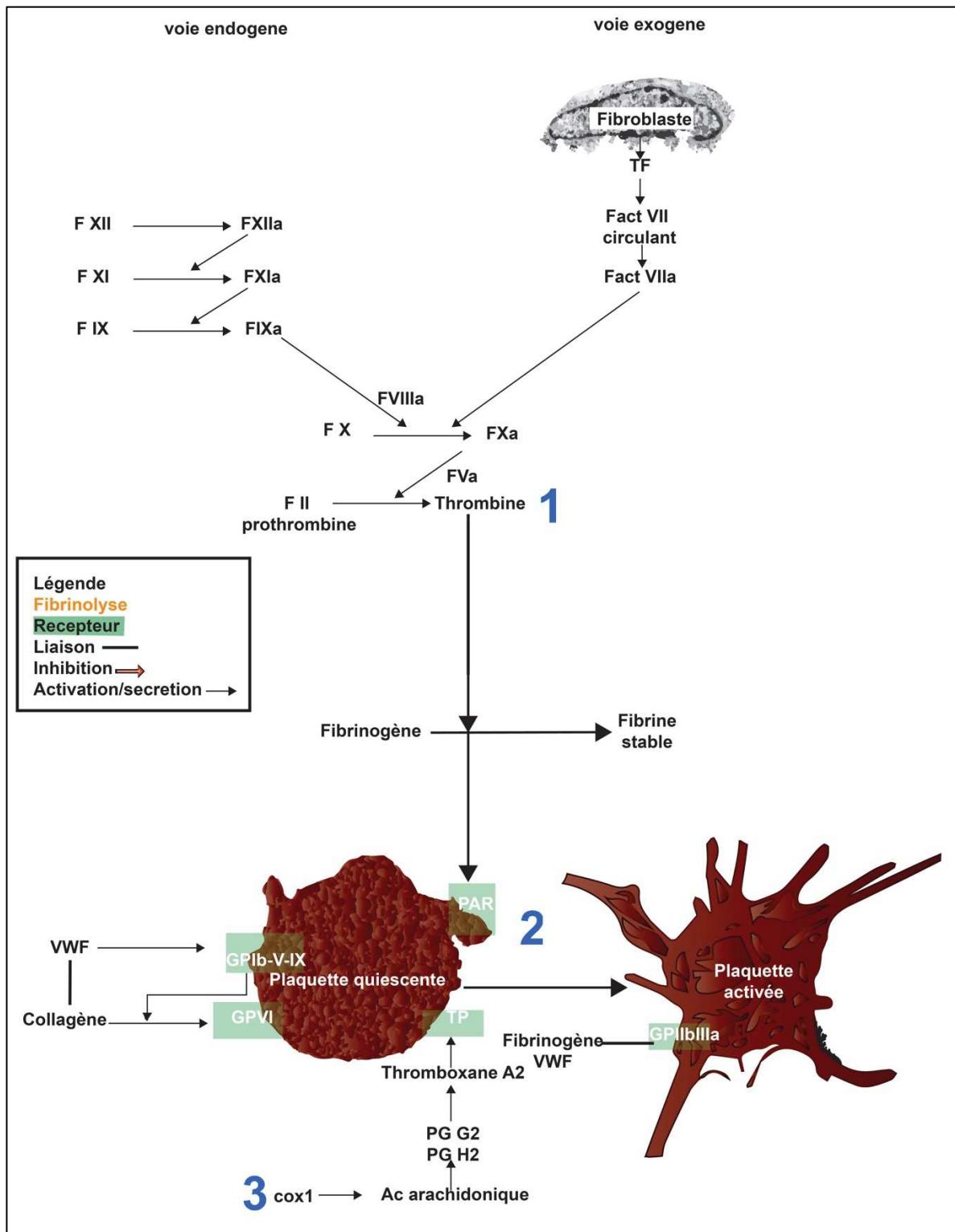


Figure 30: Hypothèse centrée sur une perte de fonction plaquetttaire. Exposition de facteur tissulaire stimulant la formation de thrombine (1). Le pic de thrombine entraîne une activation plaquetttaire diffuse via son action sur les récepteurs PAR (2), induisant un état réfractaire transitoire et correspondant à la reconstitution des stocks plaquettaires en ADP. Par ailleurs, la thrombine inhiberait la cox-1, enzyme impliquée dans l'activation plaquetttaire par l'acide arachidonique (3).

Hypothèse 5 : Dégradation du glycocalyx endothérial

Cette hypothèse est basée sur le fait qu'une insuffisance circulatoire est susceptible d'induire des lésions du glycocalyx endothérial. Par ailleurs, celui-ci régule l'activation de l'inflammation, faisant suspecter un rôle prépondérant de l'endothélium dans la phase tardive de l'ATC.

Le glycocalyx constitue une couche chargée négativement tapissant l'endothélium vasculaire. Celle-ci exclut les cellules circulantes et les macromolécules délimitant ainsi l'espace luminal. Le glycocalyx est un composant indispensable au maintien de l'intégrité de la fonction endothéliale (97). Son épaisseur augmente avec celle des parois vasculaires, allant de 2 à 4,5 microns. Sa couche endothéliale est riche en hydrates de carbones. Elle est liée aux cellules endothéliales par des protéines d'amarrage représentées par des protéoglycans et des glycoprotéines (figure 31). Les protéines d'amarrage forment un maillage dans lequel sont incorporées des molécules solubles issues du plasma et de l'endothélium. La couche lumineuse du glycocalyx est formée de composants plasmatiques solubles circulants dans un réseau constitué de protéoglycans et de glycosaminoglycans. Un équilibre dynamique entre synthèse et dégradation modifie l'épaisseur de cette couche en interaction constante avec le sang circulant. La thrombomoduline et l'antithrombine font partie des molécules solubles associées à cette couche lumineuse. Les protéoglycans sont des protéines centrales dans l'arrimage aux cellules. Elles sont représentées par les syndécans et les glypicans. Les syndécans sont des protéoglycans fermement connectés aux membranes cellulaires sur lesquelles s'arriment des glycosaminoglycans. L'expression des syndécans est étroitement liée au niveau d'activation des cellules endothéliales (98). Les glycosaminoglycans sont des polymères disaccharidiques formant des chaînes de longueur variables. Il en existe cinq types : les héparanes sulfates, les chondroïtines sulfates, les dermatanes sulfates, les kératanes sulfates et les hyaluronanes sulfates. Les héparanes sulfates représentent plus de la moitié de protéoglycans.

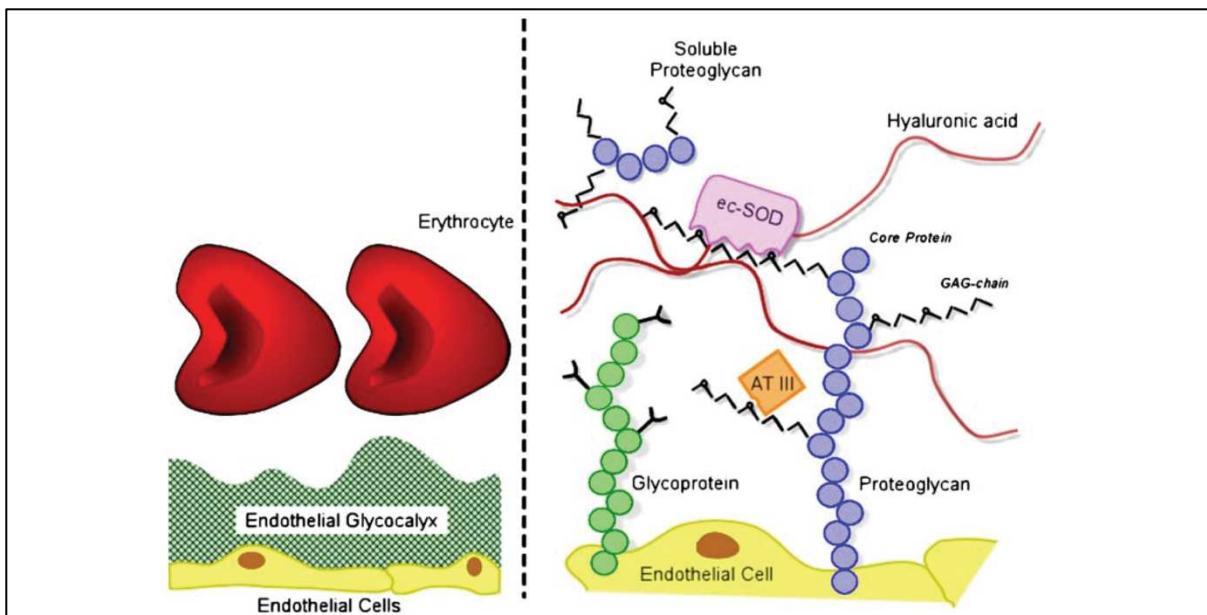


Figure 31: Composition du glycocalyx endothérial (97).

Le glycocalyx est situé à l'interface entre l'endothélium et la circulation sanguine. Il régule la perméabilité vasculaire (99) ainsi que les interactions entre les molécules présentes dans la circulation et l'endothélium. Les molécules les plus volumineuses sont les plus concernées par la fonction barrière du glycocalyx. Les lésions du glycocalyx sont associées à l'apparition d'œdèmes liés à un passage extravasculaire d'albumine (100). Une baisse de concentration plasmatique en albumine a d'ailleurs été observée en cas d'atteinte endothéliale liée au traumatisme (24). Cette fonction de barrière est liée à la conformation physique des molécules impliquées mais aussi à des phénomènes électrostatiques puisqu'elles contiennent de nombreuses charges négatives portées par les glycosaminoglycanes. L'endothélium est sensible aux mécanismes d'ischémie-reperfusion (101). Les cellules endothéliales se détachent de leur membrane basale dans ce contexte (102). Les modifications observées en cas d'ischémie sont les suivantes : augmentation du stress oxydatif (103), recrutement de cellules immunitaires et augmentation de la perméabilité de la barrière endothéliale (104). Ces remaniements endothéliaux sont secondaires à une altération du glycocalyx dont l'épaisseur diminue en raison de l'excrétion des chaînes de glycosaminoglycanes. Cette réduction est médiée par la xanthine-oxydoréductase, enzyme impliquée dans la production de « Reactive Oxygen Species » (ROS) dont les concentrations plasmatiques sont élevées chez les patients polytraumatisés (105). La dégradation du glycocalyx serait par ailleurs responsable d'une héparinisation endogène. Celle-ci a été mise en évidence après l'administration *in vitro* d'héparinases sur du sang prélevé sur des patients traumatisés graves entraînant une réversion des troubles de la coagulation (106) (107). Par ailleurs, la dégradation du glycocalyx constitue un signal d'activation de l'inflammation. Celle-ci entraîne la formation de thrombine, active la fibrinolyse et favorise le

recrutement de cellules immunitaires. L'ensemble de ces voies d'activation a été observé chez l'Homme en cas de traumatisme sévère. En effet, une étude de Haywood-Watson réalisée en 2011 portant sur un groupe de patients traumatisés a mis en évidence une augmentation de syndécan 1 associée à une augmentation du TCA, une diminution de protéine C, une augmentation de TM soluble et une augmentation des marqueurs sériques de l'inflammation (108). Le profil biologique de ces patients est par conséquent similaire en tout point à celui décrit en cas d'agression endothéliale. De manière intéressante, cette étude a mis en évidence une augmentation de syndécan-1 associée à une augmentation de perméabilité endothéliale réversible après administration de PFC en cas de traumatisme sévère, suggérant un effet protecteur de la transfusion sur l'endothélium. De manière similaire, une étude de Johannsen *et al.* réalisée en 2011 a observé une augmentation de concentration plasmatique en syndécan-1 dans le groupe des patients présentant un allongement de TCA (58), renforçant ainsi l'hypothèse d'une agression endothéliale associée à l'ATC. Wade *et al.* ont précisé la nature de cette atteinte lors d'une étude réalisée en 2018 portant sur des patients traumatisés sévères (109). Ces auteurs ont observé une augmentation de syndécan-1 sans augmentation associée de la concentration plasmatique en microvésicules endothéliales. Les microvésicules endothéliales étant un marqueur spécifique des lésions cellulaires, ces auteurs concluent à une dégradation isolée du glycocalyx, sans lésion cellulaire endothéliale, en cas de traumatisme. Il a également été observé une augmentation des concentrations plasmatiques en catécholamines endogènes suggérant une dégradation médiée par l'adrénaline. Concernant l'apparition d'une défaillance multiviscérale survenant à la phase tardive d'une ATC, il semble que la présence de lésions endothéliales favoriserait le relargage d'EPCR. Celui-ci ne serait par conséquent plus fonctionnel pour lier à la thrombomoduline, expliquant la survenue de microthrombi diffus (110). De plus, les dégradations du glycocalyx en contexte inflammatoire limiteraient l'activité de l'antithrombine, favorisant ainsi l'expression d'un phénotype thrombotique (73) (48).

Ces études ont ainsi observé l'association entre la survenue de lésions de l'endothélium et d'une ATC. Elles n'ont cependant pas apporté la preuve expérimentale d'un lien de causalité entre ces deux phénomènes. En effet, une agression endothéliale aspécifique est susceptible de survenir en cas d'insuffisance circulatoire. Or, le déclenchement d'une ATC est soumis à la présence d'une hypo-perfusion tissulaire. La constatation de lésions endothéliales pourrait par conséquent ne constituer qu'un épiphénomène lié à une insuffisance circulatoire mais celles-ci auraient *a minima* pour conséquence d'aggraver une coagulopathie préexistante. La figure 32 résume l'hypothèse selon laquelle l'endothélium jouerait un rôle dans la survenue d'une ATC.

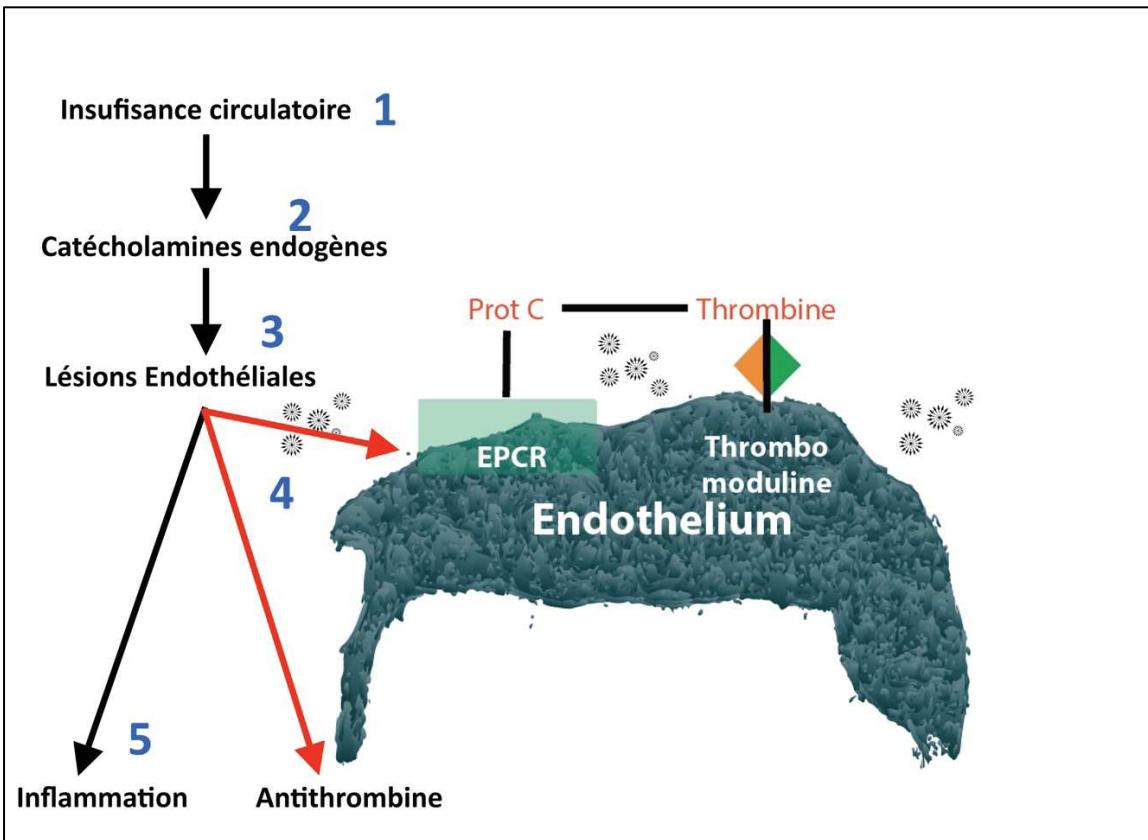


Figure 32: Rôle de l'endothélium dans la survenue d'une ATC. (1) L'insuffisance circulatoire entraîne une augmentation des catécholamines (2) responsable d'une dégradation du glycocalyx et d'une héparinisation endogène. Le phénotype exprimé à ce stade est celui d'une tendance à l'hémorragie. Dans un second temps, l'inhibition de l'EPCR et de l'antithrombine (4) et l'activation les voies de l'inflammation (5), favorisent l'expression d'un phénotype thrombotique.

Conclusion de la première partie

Nous avons présenté dans cette première partie les facteurs impliqués dans la survenue d'une coagulopathie traumatique. Les facteurs préexistants tels que l'âge, les troubles constitutionnels de l'hémostase et la prise de traitements antithrombotiques ont fait l'objet de nombreuses publications, de même que les facteurs exogènes tels que la dilution, l'hypothermie et l'acidose. L'influence de ces facteurs est désormais comprise et leur prise en charge fait l'objet de recommandations codifiées. En revanche, la physiopathologie de l'ATC, composante précoce, endogène et spécifique de la coagulopathie traumatique reste encore mal comprise. Les hypothèses pour expliquer la physiopathologie de l'ATC sont : une activation de la voie de la protéine C, une CIVD fibrinolytique, une diminution des stocks en fibrinogène, une altération de la fonction plaquettaire et une agression endothéliale (figure 33). Les hypothèses d'une activation de la voie de la protéine C et d'une CIVD traumatique s'opposent car elles impliquent respectivement une diminution et une augmentation de génération de thrombine. Les études citées dans cette première partie ont rapporté une association entre les mécanismes physiopathologiques cités précédemment et la survenue d'une ATC mais n'ont pas permis

d'établir les liens de causalité nécessaires à leur confirmation. En effet, les perturbations du système hémostatique en contexte traumatique restent difficiles à appréhender au moyen d'études cliniques en raison de l'hétérogénéité des profils clinico-biologiques présentés par les patients et de l'influence des facteurs aspécifiques de coagulopathie.

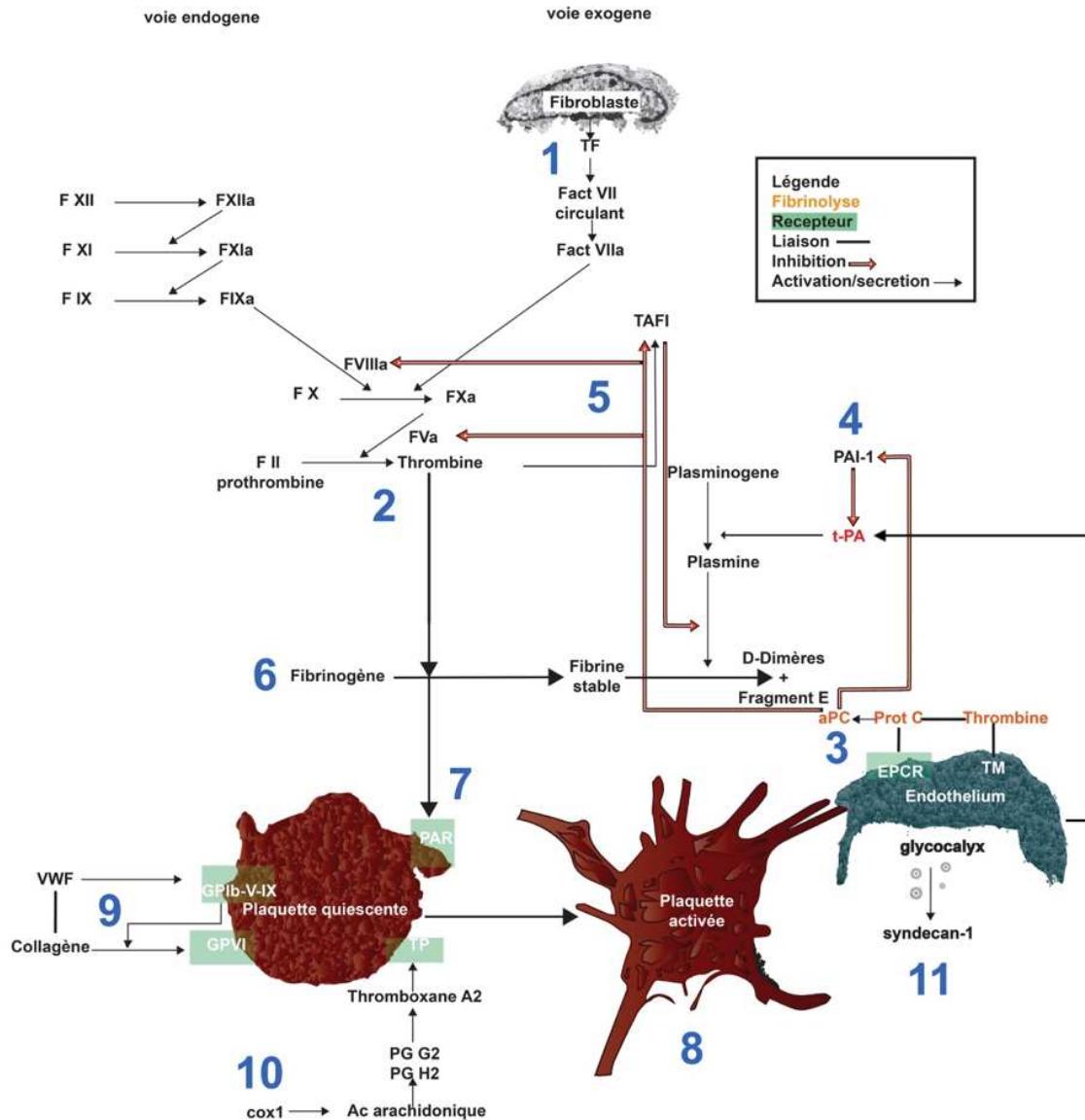


Figure 33: Schémas de synthèse résumant les principales hypothèses concernant la physiopathologie de l'ATC. (1) Exposition d'une grande quantité de facteur tissulaire sous endothérial secondaire au traumatisme. (2) « Burst » de thrombine entraînant une production excessive d'aPC (3) activant la fibrinolyse par dé-répression de PAI-1 (4). L'aPC inhibe la coagulation via l'inhibition des facteurs Va et VIIIa (5). La consommation du fibrinogène (6) favorise la disponibilité de la thrombine pour la thrombomoduline et entretient la fibrinolyse. (7) Activation plaquettaire diffuse liée au pic de thrombine et à son action sur les récepteurs PAR. (8) Les plaquettes activées sont dans un état réfractaire empêchant une activation ultérieure. La parésie plaquettaire est favorisée par une action inhibitrice de la thrombine, médiée par le vWF (9) et l'acide arachidonique (10). L'augmentation des catécholamines endogènes visant à compenser l'insuffisance circulatoire entraîne une dégradation du glycocalyx endothérial et des phénomènes d'héparinisation endogène (11). Le phénotype exprimé est à ce stade une tendance à l'hémorragie. Par la suite, l'agression endothéiale entraîne une activation des voies de l'inflammation, une répression de l'EPCR et de l'antithrombine aboutissant à la formation de microthrombi diffus favorisée par un épuisement des stocks en protéine C. Le phénotype exprimé à ce stade est une défaillance multiviscérale.

Objectifs

Les difficultés liées à la complexité des facteurs influençant le système hémostatique des patients traumatisés sévères pourraient être contournée par la mise au point d'un modèle animal permettant de reproduire une ATC en s'affranchissant des biais susceptible d'en perturber l'étude (17) (18).

Le premier objectif de ce travail de thèse était la mise au point un modèle animal d'ATC. Celui-ci devait répondre aux critères suivants : il devait respecter les critères éthiques en vigueur concernant l'expérimentation animale en France, être aisément reproductible, éviter la survenue de biais et l'intervention des facteurs préexistants ou exogènes de coagulopathie. En effet, une revue de la bibliographie de van Zyl *et al.* datant de 2015 a relevé l'existence de 27 modèles animaux de coagulopathie traumatique (19). Parmi ces modèles, seul 5 déclenchaient une coagulopathie en associant un traumatisme et une hémorragie. A titre d'exemple certaines utilisaient une injection de facteur tissulaire pour déclencher des anomalies de la coagulation. D'autres impliquaient la réalisation d'hémorragie sur modèle porcin, or le système hémostatique de ces animaux diffère de l'homme par une concentration plus faible en protéine C, élément central dans la survenue d'une ATC. Certains d'entre eux utilisaient des facteurs externes comme la dilution ou l'hypothermie pour déclencher une coagulopathie, ne ciblant pas spécifiquement l'ATC. L'étude des troubles de la coagulation précoces, endogènes et spécifiques résultant de l'association d'un traumatisme et d'une hémorragie presuppose par conséquent la construction d'un modèle animal dédié.

Le deuxième objectif était d'étudier les mécanismes physiopathologiques généraux intervenant dans l'ATC. En effet, le lien de causalité entre les différentes hypothèses décrites dans la première partie de cette thèse et la survenue d'une ATC restent débattues. A titre d'exemple, l'hypothèse d'une CIVD fibrinolytique presuppose une formation excessive de thrombine et celle d'une production excessive d'aPC implique une répression de la coagulation médiée par les FVa et FVIIa. Une mesure de la génération de thrombine en contexte d'ATC permettrait par conséquent de confronter ces deux hypothèses. La thrombine constituant une puissant activateur plaquettaire, une évaluation conjointe de la fonction plaquettaire permettrait d'explorer l'hypothèse d'une parésie plaquettaire post traumatique liée à une modification de génération de thrombine. L'étude des éléments clés du processus de coagulation que sont la thrombine et les plaquettes dans les conditions strictes d'un modèle animal d'ATC permettrait ainsi d'appréhender les mécanismes généraux intervenant dans sa survenue.

Partie 2 : Matériels et méthodes

Cette partie résume les procédures expérimentales utilisées lors des études décrites dans la troisième partie de ce travail de thèse.

Animaux

Des rats Sprague-Dawley adultes (430-650 grammes) ont été hébergés dans un environnement contrôlé (température $21\pm1^\circ\text{C}$, humidité relative $27\pm16\%$, cycle jour/nuit 12 h-12 h) avec un accès libre à la nourriture et à l'eau. Toutes les procédures ont été menées selon un protocole approuvé par le ministère de l'agriculture et le comité d'éthique animale.

Préparation

Anesthésie

Les animaux ont été anesthésiés par injection intrapéritonéale de kétamine (100mg/Kg) et de xylazine (10mg/Kg).

Maintien en normothermie

Une sonde rectale de mesure de température a été mise en place et les animaux ont été placés en décubitus dorsal sur un coussin chauffant asservi à la température, permettant leur maintien en normothermie ($37,5\pm0,5^\circ\text{C}$).

Catheterisation, sédation et contrôle des voies aériennes supérieures

Une incision cervicale de 2 cm a été pratiquée, suivie d'une trachéostomie réalisée à l'aide d'un tube en polyéthylène de 2 mm de diamètre. Un cathéter artériel a été inséré dans la carotide droite permettant les prélèvements sanguins et une surveillance continue de la pression artérielle. Un cathéter veineux a été inséré dans la veine jugulaire droite (figure 34), permettant une perfusion intraveineuse continue de kétamine (1mg/kg/h).

Suivi des paramètres physiologiques

Les signes vitaux (fréquence cardiaque, pression artérielle invasive et température) ont été enregistrés en continu pendant toute la procédure. Le dispositif est présenté figure 35.

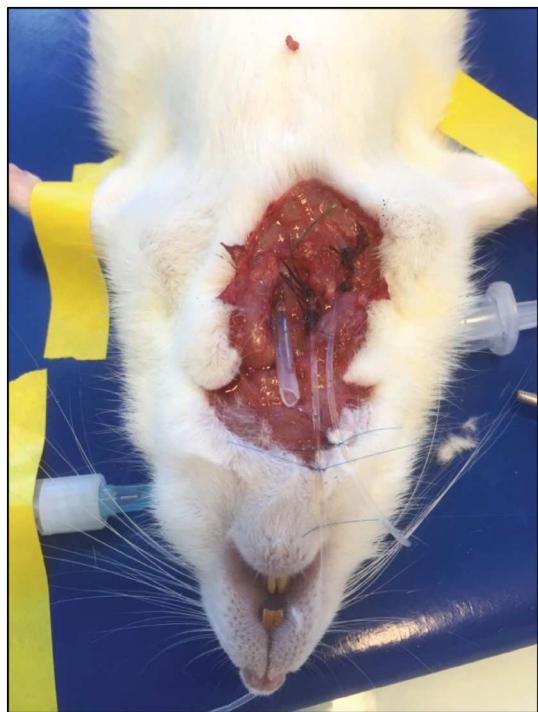


Figure 34: De gauche à droite, trachéostomie, cathéter artériel carotidien et veineux jugulaire après dissection cervicale.

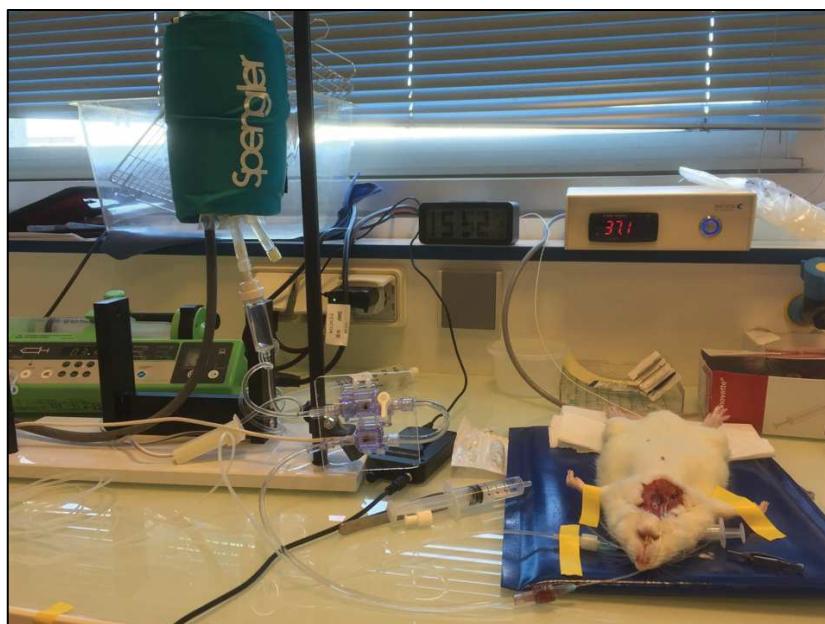


Figure 35: dispositifs permettant le contrôle de la température, la mesure continue de la pression artérielle et l'administration d'une sédation continue.

Procédure expérimentale

Groupes d'animaux

Les rats étudiés ont été répartis au hasard dans l'un des 4 groupes : Contrôle (C), Traumatisme (T), Hémorragie (H), Traumatisme et Hémorragie (TH).

Hémorragie

Dans les groupes H et TH, 20 % de la masse sanguine totale a été prélevée sur 10 minutes avec une seringue de 10 ml par le cathéter artériel. La masse sanguine totale a été estimée à 5 % du poids corporel.

Traumatisme

Dans les groupes T et TH, des traumatismes multiples ont été effectués comme suit. En premier lieu, 4 fractures diaphysaires fermées de membres (2 fémurs, 2 humérus) à 90 degrés ont été réalisées au moyen d'une pince non tranchante. Ensuite, une laparotomie médiane de 4 cm et quatre lésions spléniques de 1 cm ont été réalisées au moyen d'un ciseau chirurgical et d'un porte aiguille.

Temps d'observation

Un temps d'observation court (1 heure) a été choisi pour étudier la physiopathologie de l'ATC. En effet, des échanges liquidiens à travers la membrane capillaire s'initient dans les premières minutes après une hémorragie. Ce mécanisme de compensation est caractérisé par un transfert de liquide interstitiel vers la circulation sanguine. Il entraîne une dilution et constitue un facteur de confusion potentiel. La réalisation d'analyses biologiques plus tardives aurait mis en évidence l'effet combiné de l'ATC et de cette coagulopathie de dilution. De plus, l'ATC a été décrite comme survenant dans la première heure suivant le traumatisme. Ce délai est par conséquent cohérent avec la séquence observée chez l'homme.

Prélèvements sanguins

Aucune injection d'héparine n'a été effectuée pendant toute la durée de l'expérience. Les échantillons de sang ont été prélevés au moyen du cathéter artériel. Les cathéters ont été rincés avec 50 µL de NaCl à 0,9 % sans anticoagulant après chaque prélèvement pour prévenir la formation de caillots. Une seringue de 1 ml rincée à l'héparine (500UI/ml) a été utilisée pour

les tests d'agrégométrie plaquettaire. Un tube citraté de 1,4 ml à 3,2 % a été utilisé pour les tests d'hémostase. Les tubes ont été retournés 5 fois conformément aux recommandations du fabricant. Trois centrifugations de 15 minutes ont été effectuées : une à 1000 g et deux à 3000 g pour obtenir un plasma pauvre en plaquettes. Le plasma a été maintenu à -80 °C jusqu'à l'analyse.

Analyses des prélèvements sanguins

Dosages usuels

Le pH, les concentrations sanguines en hémoglobine, en lactate, en calcium en sodium et en potassium ont été mesurées instantanément après le prélèvement au moyen d'un appareil de biologie délocalisée (ABL80 FLEX, Radiometer, Copenhague, Danemark). Les analyses courantes d'hémostase (FII, FV, FX, fibrinogène, PT et aPTT) ont été réalisées sur le plasma pauvre en plaquettes au moyen d'un appareil automatisé (STA-R Evolution, Stago, Asnieres sur Seine, France).

Temps de Quick

Le temps de Quick, ou temps de prothrombine (PT), reflète l'activité des voies exogènes et communes de la coagulation *in vitro*. Il a été développé par Quick en 1935. Il consiste à mesurer le temps nécessaire à la formation d'un caillot de fibrine après l'ajout de facteur tissulaire recombinant, de phospholipides et de calcium à un plasma pauvre en plaquettes. Le plasma décalcifié est mélangé à 37° C avec une solution contenant du facteur tissulaire et des phospholipides. Du chlorure de calcium est ajouté pour initier la coagulation. Le temps écoulé entre l'ajout de calcium et la détection automatisée du caillot par densité optique est le temps de Quick. Son report sur la droite de Thivolle obtenue en testant des dilutions successives d'un plasma témoin permet de calculer le taux de prothrombine, exprimé en pourcentage par rapport au témoin. Ce calcul permet de s'affranchir des biais liés aux méthodes de mesures spécifiques à chaque laboratoire. Le taux de prothrombine est similaire au « prothrombin ratio » calculé dans les pays Anglo-Saxons.

Temps de céphaline activée

Le temps de céphaline activée (TCA, ou aPTT) est un reflet de l'activité des voies endogènes et communes de la coagulation. Le principe de ce test est similaire à la mesure du temps de Quick. Il est ajouté de la céphaline, composant qui a donné son nom au test. La céphaline est un substitut simulant la présence de phospholipides plaquettaires. Du plasma pauvre en

plaquettes décalcifiée est mélangé avec une solution comprenant un phospholipide (céphaline) et un activateur de contact (kaolin, silice micronisée ou acide ellagique). Du chlorure de calcium est ajouté pour initier la coagulation. Le TCA est le temps écoulé entre l'ajout de calcium et la détection d'un caillot de fibrine par mesure de densité optique.

Limites de ces tests

Ces tests mesurent le temps nécessaire à la détection d'un caillot après ajout d'un activateur de la coagulation. La détection d'un caillot correspond à la formation d'environ 5% de la thrombine totale susceptible d'être produite par le plasma. Ces tests n'explorent par conséquent que la phase initiale de la coagulation et sont peu performants pour diagnostiquer un état pro-thrombotique (111). Ces tests ne permettent pas l'évaluation de la fonction plaquettaire de la fibrinolyse (112). Les caractéristiques intrinsèques de ces tests réalisés couramment en médecine hospitalière constituent par conséquent une limite pour l'appréhension globale de la balance entre les mécanismes pro et anti-coagulants.

Agrégométrie plaquettaire

Mesure de la fonction plaquettaire

Le développement de tests permettant d'individualiser la prise en charge de l'hémostase constitue une tendance forte en médecine intensive (113). Celle-ci a pour finalité de proposer aux patients une prise en charge en temps réel et adaptée à leur statut physiologique (114). Nous avons réalisé les mesures de fonction plaquettaire au moyen d'un appareil d'agrégométrie (Multiplate, Roche diagnostics, Munich), délivrant les résultats en 6 minutes. Les principales voies d'activation plaquettaire sont explorées par agrégométrie au moyen de cinq réactifs (figure 36) :

- « ADP » : Il s'agit d'un nucléotide stocké dans les granules denses. En cas d'activation celles-ci libèrent leur contenu, entraînant une activation de proche en proche par activation des récepteurs P2Y1 et P2Y12.
- « ASPI » : Il contient de l'acide arachidonique qui est converti en thromboxane A2, puissant activateur plaquettaire.
- « COLL » : Il contient du collagène I qui active les plaquettes *via* un récepteur spécifique. Cette liaison libère de l'acide arachidonique servant de substrat à la cyclo-oxygénase qui le transforme en thromboxane A2.

- « RISTO » : Il contient de la ristocétine qui induit la fixation du vWF sur son récepteur plaquettaire, activant l'agrégation.
- « PAR-4 » : Le réactif PAR-4 stimule l'agrégation plaquettaire *via* le récepteur de la thrombine chez le rat.

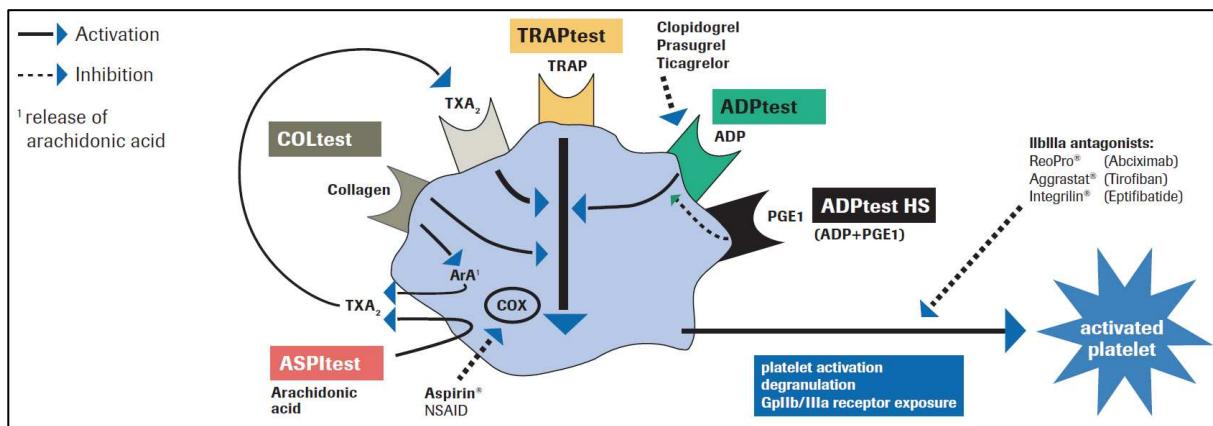


Figure 36: Cinq tests d'activation plaquettaires par agrégométrie.

L'ajout de réactif entraîne une agrégation plaquette se traduisant par une augmentation de résistance électrique mesurée entre deux électrodes. L'impédance mesurée est convertie par l'appareil en unités arbitraires (U). L'aire sous la courbe (AUC) obtenue en traçant l'évolution de l'impédance en fonction du temps pendant 6 minutes est le reflet de l'activité plaquette (figure 37).

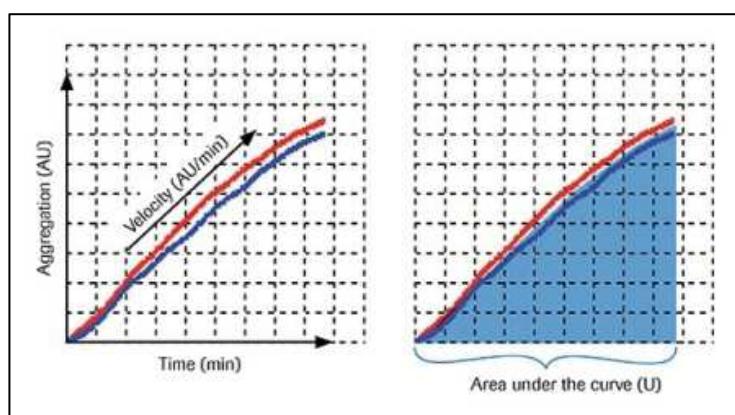


Figure 37: Courbes et mesures obtenues lors du test d'agrégation plaquette. L'aire sous la courbe est le reflet de la fonction plaquette obtenue pour chaque activateur.

Afin d'optimiser la sensibilité de ce test pour détecter une éventuelle perte de fonction plaquette chez le rat, nous avons déterminé les courbes doses-réponses des réactifs chez cet animal (données non publiées). Une modélisation des courbes doses-réponses par régression

logarithmique normale cumulative a été ensuite réalisée (figure 38). Ces modélisations ont permis de déterminer les EC₅₀ et leurs intervalles de confiance à 95% pour trois agonistes (tableau 7). Les EC₅₀ sont les concentrations en réactif permettant d'obtenir la moitié de la réponse maximale.

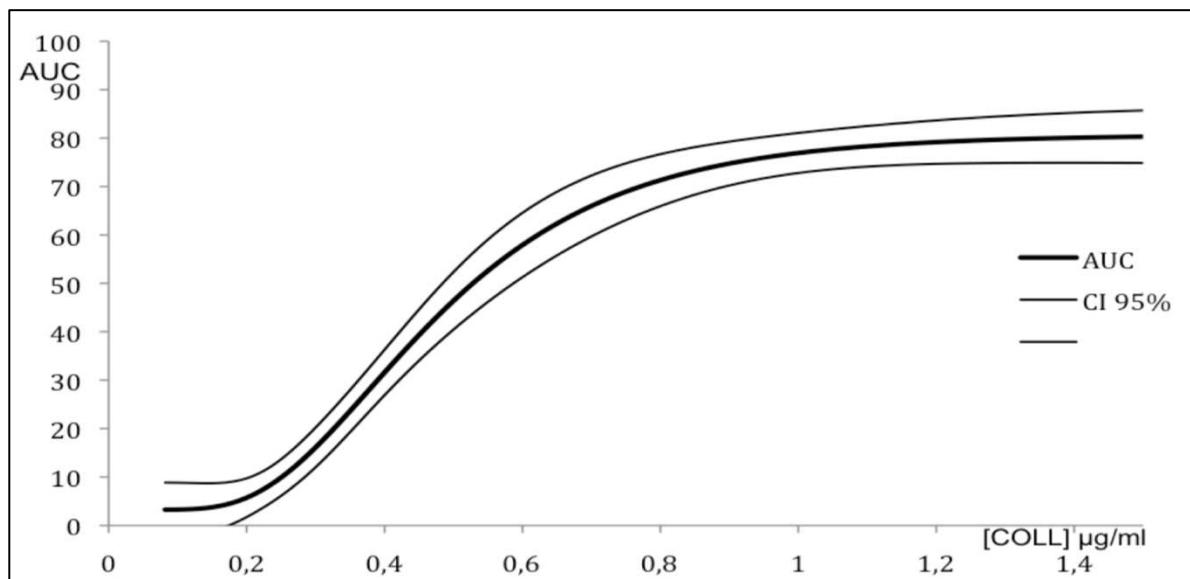


Figure 38: Modélisation de la courbe de régression logarithmique cumulatifs pour le réactif "coll".

Réactif	EC50	IC 95%
Coll	0,46 µg/ml	[0,436 ; 0,500]
ADP	2,70 µMol/l	[1,89 ; 3,45]
PAR-4	37.34 µMol/l	[35.2-39.91]

Tableau 7 : Détermination des EC-50 pour les réactifs multiplate chez le rat.

Test de génération de thrombine

Les tests de génération de thrombine ont été réalisés de la manière suivante : Du plasma pauvre en plaquettes a été incubé avec un activateur contenant du facteur tissulaire recombinant et des phospholipides. La densité de la solution, reflet de la formation de thrombine, a été détectée par fluorimétrie, permettant le tracé des courbes de génération de thrombine (Thrombinoscope BV, Maastricht, Pays-Bas). Ces courbes sont caractérisées par 5 paramètres principaux : l' "endogenous thrombin potential" (ETP), le temps de latence, le pic, et le temps de pic. Un exemple de courbe de génération de thrombine est présenté figure 39.

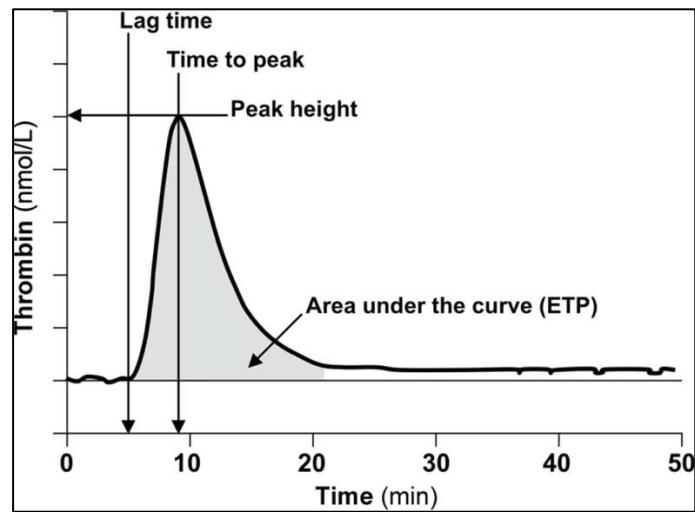


Figure 39: paramètres mesurés lors d'un test de génération de thrombine (115).

Partie 3 : Deux études sur l'ATC

Etude 1 : Mise au point d'un modèle murin d'ATC

Introduction

Les différentes hypothèses présentées dans la première partie de cette thèse concernent un système complexe : l'hémostase. Les perturbations de ce système finement régulé au décours d'un traumatisme sont difficiles à appréhender par une approche clinique pure. En effet, les patients traumatisés graves sont à la fois peu nombreux et variables en matière de gravité. Ces particularités les rendent peu accessibles à la réalisation d'études basées sur la comparaison de groupes homogènes (116). La réalisation d'études animales constitue une alternative permettant de pallier à cette difficulté. L'absence de modèle pertinent a été identifiée comme axe de recherche par plusieurs experts (17) (18). Afin de développer un schéma expérimental pertinent pour l'étude de l'ATC, nous avons défini les caractéristiques définissant, selon nous, le modèle « idéal ». Celui-ci devait répondre à des normes éthiques, présenter un mécanisme lésionnel et une séquence cohérente avec les observations faites chez l'homme et éliminer l'influence des facteurs aspécifiques de coagulopathie. Nous avons par ailleurs identifié un biais susceptible de remettre en cause les résultats de nombreuses études animales portant sur l'ATC. En effet, la plupart de ces études ont comparé un groupe comportant une hémorragie avec un groupe associant une hémorragie et un traumatisme. Ce dernier groupe présentant des troubles de la coagulation plus marqués, les auteurs concluaient à la présence d'une ATC. Cependant, le traumatisme étant susceptible de provoquer une hémorragie dans les tissus lésés, la constatation des troubles de la coagulation pouvait être la conséquence de ce saignement surajouté. L'hémorragie liée au traumatisme doit par conséquent être évaluée dans un groupe spécifique afin de prendre en considération l'existence de ce biais de déplétion. Nous avons ainsi confronté les caractéristiques définissant le modèle « idéal » aux modèles précédemment publiés afin de proposer un schéma expérimental susceptible de reproduire une coagulopathie aigue traumatique non soumise à l'influence de facteurs confondants. Cette étude a fait l'objet d'une publication dans la revue « Scientific Reports » (117).

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

A clinically relevant and bias-controlled murine model to study acute traumatic coagulopathy

C. Gangloff^{1,2}, O. Grimault^{1,3}, M. Theron¹, K. Pichavant¹, H. Galinat⁴, F. Mingant⁴ & Y. Ozier^{1,5}

Acute traumatic coagulopathy (ATC) is an acute and endogenous mechanism triggered by the association of trauma and hemorrhage. Several animal models have been developed, but some major biases have not yet been identified. Our aim was to develop a robust and clinically relevant murine model to study this condition. Anesthetized adult Sprague Dawley rats were randomized into 4 groups: C, control; T, trauma; H, hemorrhage; TH, trauma and hemorrhage ($n = 7$ each). Trauma consisted of laparotomy associated with four-limb and splenic fractures. Clinical variables, ionograms, arterial and hemostasis blood tests were compared at 0 and 90 min. ATC and un-compensated shock were observed in group TH. In this group, the rise in prothrombin time and activated partial thromboplastin was 29 and 40%, respectively. Shock markers, compensation mechanisms and coagulation pathways were all consistent with human pathophysiology. The absence of confounding factors, such as trauma-related bleeding or dilution due to trans-capillary refill was verified. This ethic, cost effective and bias-controlled model reproduced the specific and endogenous mechanism of ATC and will allow to identify potential targets for therapeutics in case of trauma-related hemorrhage.

Every year, 5.6 million people die worldwide as a result of trauma. The four leading causes of trauma are road traffic injuries, self-inflicted violence, inter personal violence and falls, responsible for 25, 16, 10 and 6% of death, respectively. Almost 50% of them affect young people aged between 15 and 44 years, explaining their social impact and financial burden to the healthcare system^{1,2}. Uncontrolled bleeding is a major cause of preventable death in this setting³.

Major trauma with hemorrhage is associated with a specific pathophysiologic sequence. The initial phase is characterized by a macrocirculatory failure. The effects of hypovolemia are initially compensated by an activation of the sympathetic system⁴. Tachycardia and peripheral vasoconstriction maintain blood pressure and tissue perfusion in critical organs. This state is denominated "compensated shock". If compensation mechanisms are overwhelmed, arterial blood pressure decreases and death occurs due to the inability to maintain tissue perfusion in critical organs. This state is called "un-compensated shock". In parallel, microcirculation regulates the distribution of blood flow within the capillary network of each organ in order to match oxygen delivery and demand and optimize oxygen extraction⁴. In a later phase, after several days, activation of the immune system leads to similar patterns such as those described in sepsis. Microcirculatory dysfunction sustains tissue hypoperfusion and multiple organ failure. This phenomenon explains the occurrence of delayed mortality despite the restoration of a normal blood pressure^{5,6}.

An acute traumatic coagulopathy (ATC) dramatically increases blood losses. This specific coagulation disorder develops extremely quickly in the first 60 minutes after trauma and is detected in approximately one third of multiple injured patients upon hospital admission⁷⁻⁹. Its presence is associated with higher mortality rates and transfusion requirements¹⁰. ATC is an endogenous phenomenon occurring independently from external factors such as dilution, hypothermia or anti-thrombotic treatments¹¹. However, external factors aggravate this pre-existing coagulopathy¹². Therefore, in this setting, current guidelines recommend limiting fluid resuscitation,

¹EA4324-ORPHY, Université de Bretagne Occidentale, IBSAM, UFR Sciences et Techniques, 6 Avenue Le Gorgeu, CS 93837, 29238 Brest Cedex 3, France, Brest, France. ²Department of emergency medicine, CHU Pontchaillou, 2 Rue Henri le Guilloux, 35000, Rennes, France. ³SAMU, SMUR and department of emergency medicine, Hôpital de la Cavale Blanche, boulevard Tanguy Prigent, Brest, France. ⁴Department of biology and hemostasis, CHRU Cavale Blanche, boulevard Tanguy Prigent, Brest, France. ⁵Department of anaesthesia, Hôpital de la Cavale Blanche, boulevard Tanguy Prigent, Brest, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.G. (email: cedric.gangloff@chu-rennes.fr)

maintaining normothermia and reversing antithrombotic therapies¹¹. ATC is defined as an increase in prothrombin time (PT) and/or activated partial thromboplastin time (aPTT) due to the combination of trauma and hemorrhage. The coagulation disorder is correlated with the extent of tissue trauma and the severity of shock¹⁰. The difficulty to characterize this condition is reflected by the variety of designations proposed, such as “acute coagulopathy of trauma shock”¹³, “disseminated intravascular coagulation with the fibrinolytic phenotype”¹⁴ or “trauma induced coagulopathy”¹⁵. ATC is a complex phenomenon, involving coagulation factors, C protein, platelets and endothelial dysfunction but its physiopathology remains unclear^{16,17}. An imbalance between procoagulant and fibrinolytic pathways is suspected to be a key component of this condition during the acute phase¹⁸. Pro and anti-inflammatory patterns are involved in the late phase¹⁹.

ATC's physiopathology and the detection of potential targets for new therapeutics are a matter of great concern for trauma-teams. Thus, the “trans-agency consortium for trauma-induced coagulopathy” (TACTICS) in USA²⁰ or “task force for advanced bleeding care in trauma” in Europe focused on this topic and made proposals for further works^{1,21}. In addition, international experts emphasized a lack of relevant experimental models designed to study ATC^{22,23}. An ideal model should have the following characteristics²³: low cost, mechanisms and timeline similar to real-life patients, control of exogenous factors and potential biases. Several models were developed to study ATC^{22,23} but a recent review²⁴ pointed out the difficulties in studying its endogenous mechanism. Indeed, among 27 distinct animal models, only 5 triggered a coagulopathy by using the combination of trauma and hemorrhage. For example, in one of them, ATC was triggered by a tissue factor infusion without trauma. This mechanism was therefore not similar to real-life patients²⁵. Some models involved high-cost protocols on pigs²⁶⁻³⁰. In addition, pigs seem to be in a hypercoagulable state, with C protein levels lower than in humans^{31,32}. Others studies used external factors such as dilution or hypothermia to trigger coagulopathy. They were therefore not focused on the endogenous mechanism^{26,27,33,34}.

In addition, a confounding factor was neither identified nor controlled in many studies^{28,29,35,36}. We called it “depletion bias”. Several animal studies on ATC compare groups subjected to an hemorrhage alone with groups subjected to an hemorrhage associated with trauma¹⁰. This last group presented higher coagulation disorders and studies conclude to the presence of ATC. However, trauma could induce an additional bleeding in injured tissues. Therefore, higher coagulation disorders detected in traumatized animals can rather be due to this additional bleeding than to a specific mechanism linked with the combination of trauma and hemorrhage. To control this depletion bias, the amount of bleeding due to trauma has to be assessed in a specific group. Unfortunately, bleedings due to trauma cannot be easily quantified. There is no measurement tool to evaluate the amount of blood in bone or liver fractures in rats. Therefore, hemorrhage due to trauma has to be indirectly assessed using clinical and biological variables such as heart rate, blood pressure, pH, blood lactates, base excess and hemoglobin^{5,15,37,38}.

The objective of this study was to develop a clinically relevant and controlled biases model of ATC to study its pathophysiology and consequences during the early phase of a major trauma.

Materials and Methods

Animals. Twenty-eight adult Sprague-Dawley rats (430–650 g, Janvier SAS, Le Genest St Isla, France) were housed in a controlled environment (temperature 21 ± 1 °C, relative humidity 27 ± 16%, 12–12 h light-dark cycle) with *ad libitum* access to food and water. All procedures were conducted following a protocol approved by the French ministry of agriculture (APAFIS#3797_2016012211009124) and the local university animal research ethic committee. Procedures were in accordance with the guide for the care and use of laboratory animals published by the US National Institutes of Health³⁹.

Preparation. After 1 week of housing, each rat was randomly assigned to an experimental group. Then, animals were anesthetized with an intra-peritoneal injection of ketamine (100 mg/Kg, Virbac, Carros, France) and xylazine (10 mg/Kg, Virbac, Carros, France). A temperature probe was inserted rectally and animals were placed in supine position on a warming pad (Z31SY, Ascon tecnologic, Italy) to maintain central body temperature in a normal range (37.5 ± 0.5 °C). A 2 cm cervical incision was performed, followed by a tracheostomy (2 mm diameter polyethylene tube). An arterial catheter (Leader Flex 22 G, 0.7 × 40 mm, Vygon, France) was inserted in the right carotid allowing blood sampling and continuous intra-arterial pressure monitoring. A venous catheter was inserted in the left jugular vein (Leader Flex 22 G, 0.7 × 40 mm, Vygon, France) followed by a continuous intravenous infusion of ketamin (1 mg/kg/h, Virbac inc., Carros, France). Ketamine was diluted in sodium chloride 0.9%, continuously infused at a rate of 1 ml/kg/h. Vital signs (heart rate, invasive arterial pressure and body temperature) were continuously recorded during all the procedure (MP35, Biopac systems inc. Varna, Bulgaria).

Experimental procedure. The experimental procedure was summarized in Fig. 1A total of 29 rats were included. One was excluded due to technical issue during blood collection (catheter misplacement). The 28 rats studied were allocated randomly to one of the 4 groups (n = 7 per group): Control (C) in which trauma and hemorrhage were not performed; Trauma (T) in which trauma was performed but not hemorrhage; Hemorrhage (H) in which hemorrhage was performed but not trauma; Trauma and hemorrhage (TH) in which trauma and hemorrhage were performed. In groups H and TH, 20% of total blood mass was gently collected in 10 min with a 10 ml syringe through the arterial catheter. Total blood mass was estimated at 5% of body weight. In groups T and TH, multiple traumas were performed as follows: 4 closed limb fractures on mid-height of the bone (2 femurs, 2 humerus) at 90 angular degrees with pliers (water pump pliers 250 mm, Facom, France). Then a 4 cm median laparotomy, and four spleen crushings of 1 cm on the inferior border of the spleen were done with surgical scissors and a needle holder, respectively (KS-463, Keysurgical, U.S.A.).

Observation time. A very short observation time was chosen to investigate the endogenous mechanism of ATC. Indeed, transcapillary refill begins in the first minutes after hemorrhage. This compensatory mechanism

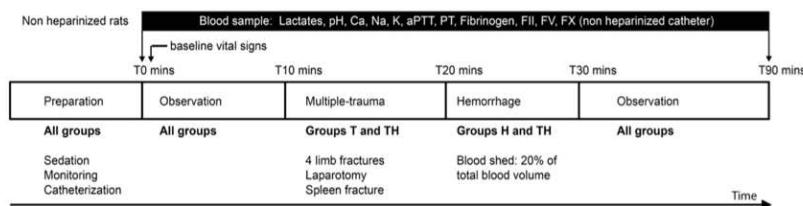


Figure 1. Experimental protocol. Group C, without trauma without hemorrhage; T, trauma without hemorrhage; H, hemorrhage without trauma; TH, hemorrhage with trauma (n = 7 in each group).

is characterized by the transfer of interstitial fluid to the intravascular area, limiting the consequences of hypovolemia^{40–42}. It also leads to dilution and constitutes a potential confounding factor. Thus, biological analyses at a later stage would have investigated the combined effect of both ATC and dilution coagulopathy due to transcapillary refill. This could have impaired the identification of the specific mechanisms related to ATC.

Blood Samples. No injection of heparin was performed during the whole experimentation. Blood samples were collected through the arterial catheter. Catheter was flushed with 50 µL of 0.9% NaCl without anticoagulant after each sampling, to prevent clot formation. A 1 ml syringe rinsed with heparin 500 UI/ml was used for point of care tests. A 1.4 ml 3.2% citrated tube (Monovette, Saerstedt France) was used for hemostasis tests. Citrated tubes were gently turned upside-down 5 times. Three 15 min centrifugations were performed: one at 1000 g and two at 3000 g (centrifuge 2–16 K, Sigma, Germany) to obtain poor platelet plasma. Plasma was frozen at –80 °C until measurements.

Blood analysis. Arterial blood pH, concentrations of hemoglobin, lactate, calcium, sodium and potassium were measured instantaneously after blood collection with a point-of-care analyser (ABL80 FLEX, Radiometer, Copenhagen, Denmark). Hemostasis analysis (FII, FV, FX, fibrinogen, PT and aPTT) were performed on platelet poor thawed plasma on an automated analyser (STA-R Evolution, Stago, Asnieres sur Seine, France). PT, aPTT times and fibrinogen concentrations were measured with specific reagents, « neoplastine Cl + 10 », « trinicot aPTTb », and « STA liquid fib », respectively. Specific factor-depleted plasmas (Stago, Asnieres sur Seine, France) were used to determine coagulation factor times. Coagulation factor activities were expressed in time-to-clot instead of percentages in this study. Indeed, these percentages are expressed in comparison with the laboratory reference in humans and references for rats are not available. Therefore, we made the choice to express non-modified data: the time to clot in seconds. This time is inversely proportional to the factor activity.

Statistical analysis. Statistical analyses were performed with “SPSS statistics for Macintosh” software version 21 (I.B.M. corp., Armonk, NY, 2012). Line graphs, boxplots and histograms were performed with “Prism 7 for Mac OS X” version 7.0a (Graphpad software, La Jolla, USA, 2016). Considering that the PT and aPTT values obtained at 0 min are reference values for each animal, ratios were calculated as follows: PT ratio = (PT at 90 min)/(PT at 0 min), aPTT ratio = (aPTT at 90 min)/(aPTT at 0 min). Two-way repeated measures analyses of variance with adequate post hoc tests were used to compare means over time within and between groups. Results were expressed as the mean ± standard error of mean (SEM), unless otherwise stated. A p-value of <0.05 was considered statistically significant.

Availability of data and material. The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Results

Group comparability and effects of anesthesia. At 0 min, no statistical difference between groups was observed for all variables ($p > 0.05$). In addition, anesthetic agents did not interfere with hemodynamic because heart rate and MAP did not vary significantly over time in group C ($p > 0.05$, Fig. 2A,B). These results allow comparisons between groups at the end of the experimentation without doubt concerning potential bias due to the procedure.

ATC was reproduced in this model. The main objective of this study was to reproduce the specific mechanism leading to ATC. However, trauma or hemorrhage alone could induce coagulation impairments. Thus, we studied their single effects on coagulation in group T and H, and compared them to their association in group TH. Mean PT, PTr, aPTT and aPTTr increased significantly in group TH compared to group C, T and H ($p < 0.05$, Fig. 3A–D). The four main biological markers of ATC were therefore present in the TH group^{10,11}. This coagulation disorder was specifically induced by the association of trauma and hemorrhage because no statistical difference between C, T and H groups was retrieved for these variables ($p > 0.05$, Fig. 3A–D). The absence of potential confounding factors that may interfere with coagulation was also verified. No significant decrease in hemoglobin was observed in group H, suggesting the absence of transcapillary refill⁴⁰. As mentioned in the “observation time” section, this compensatory mechanism leads to dilution and could have interfered with ATC. In addition, we

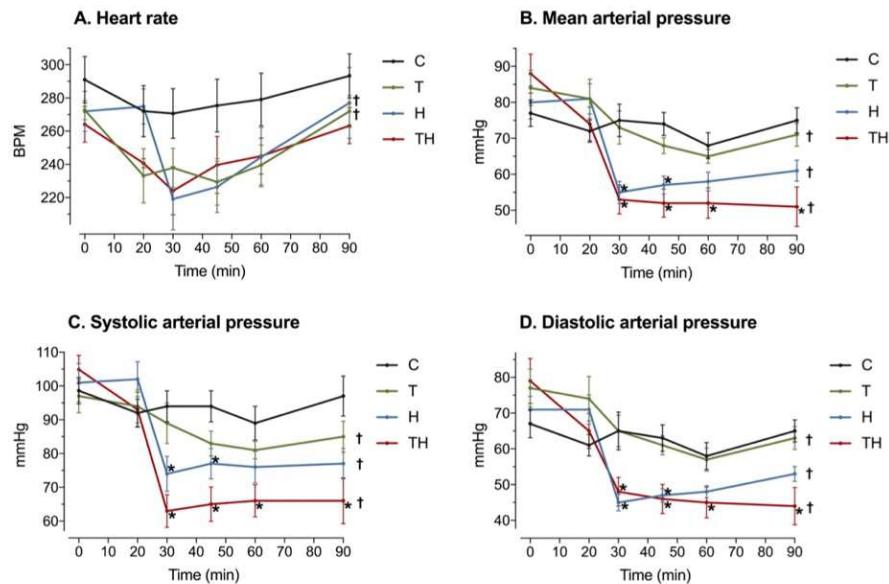


Figure 2. Hemodynamic variables. C, Control; T, Trauma; H, Hemorrhage; TH, Trauma and hemorrhage, n = 7 per group. Values represent mean \pm SEM. * $p < 0.05$ compared with group C; † $p < 0.05$ for repeated measure ANOVA, meaning a statistically significant effect of time in concerned group.

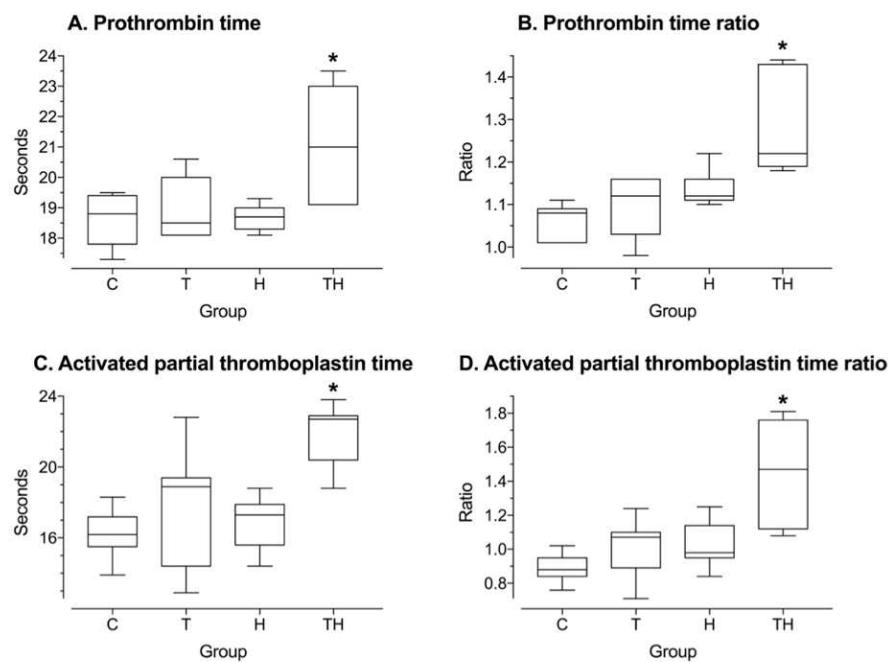


Figure 3. General coagulation assays. Box and whisker plot of general coagulation assays at 90 min in each experimental group. C, Control; T, Trauma; H, Hemorrhage; TH, Trauma and hemorrhage, n = 7 per group. Whiskers represent the 5th and 95th percentiles. * $p < 0.05$ versus C T and H. Ratios were calculated for each animal as follows: (value at 90 min)/(value at 0 min).

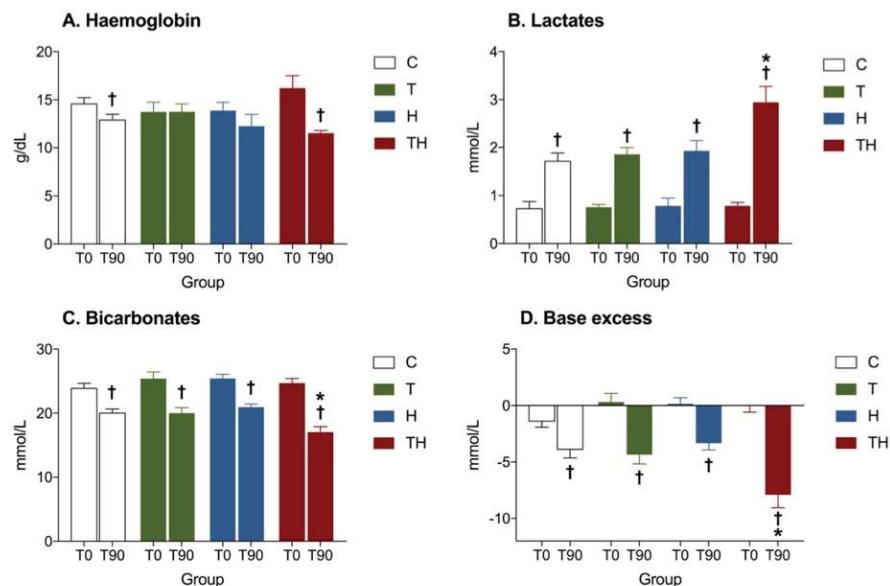


Figure 4. Shock variables. Mean values at 0 min and 90 min in each experimental group. C, Control; T, Trauma; H, Hemorrhage; TH, Trauma and hemorrhage, n = 7 per group. ${}^{\dagger}p < 0.05$ compared with 0 min in the same group, $*p < 0.05$ versus C T and H. Data are presented as mean \pm SEM.

	Group C	Group T	Group H	Group TH	p-value
Arterial blood tests					
pH					
T0	7.35 \pm 0.018	7.37 \pm 0.016	7.36 \pm 0.012	7.38 \pm 0.005	0.441
T90	7.38 \pm 0.017	7.36 \pm 0.006	7.37 \pm 0.017	7.32 \pm 0.033	0.412
pO ₂ (mmHg)					
T0	69.2 \pm 3.3	62 \pm 2.5	66 \pm 1.8	69.8 \pm 2.5	0.158
T90	83.8 \pm 6.6	79.2 \pm 2	71.8 \pm 4.9	77.2 \pm 5.6	0.437
pCO ₂ (mmHg)					
T0	44.8 \pm 3.3	44.5 \pm 2.5	46 \pm 1.8	42.4 \pm 2.5	0.748
T90	34.43 \pm 1.6*	36.1 \pm 1.1 [†]	36.9 \pm 1.8 [*]	34.5 \pm 2.8 [†]	0.760
Ionogram					
Calcium (mg/L)					
0 min	1.36 \pm 0.46	1.42 \pm 0.02	1.33 \pm 0.02	1.29 \pm 0.03	0.186
90 min	1.38 \pm 0.03	1.25 \pm 0.02 [†]	1.3 \pm 0.04	1.4 \pm 0.11	0.336
Sodium (mEq/L)					
0 min	140 \pm 1.49	142 \pm 0.72	141 \pm 1	141 \pm 1.01	0.740
90 min	143 \pm 0.77 [†]	144 \pm 2.79	136 \pm 3.5	142 \pm 3.1	0.202
Potassium (mmol/L)					
0 min	5.34 \pm 0.24	5.14 \pm 0.34	5.09 \pm 0.13	5.57 \pm 0.23	0.527
90 min	5.39 \pm 0.17	6.03 \pm 0.26	5.80 \pm 0.24 [†]	6.73 \pm 0.26*	0.005*

Table 1. Arterial blood tests and ionogram assays. Data are presented as mean \pm SEM. C, Control; T, Trauma; H, Hemorrhage; TH, Trauma and hemorrhage, n = 7 per group. ${}^{\dagger}p < 0.05$ compared with C, ${}^{\ddagger}p < 0.05$ compared with 0 min in the same group.

neither used fluid replacement nor antithrombotic injection that could dilute coagulation factors or modify their activities. We also prevented hypothermia which is known to reduce clotting factor enzymatic protease activity *in vivo*. Coagulopathy was therefore due to a specific and endogenous mechanism, strictly corresponding to the definition of ATC.

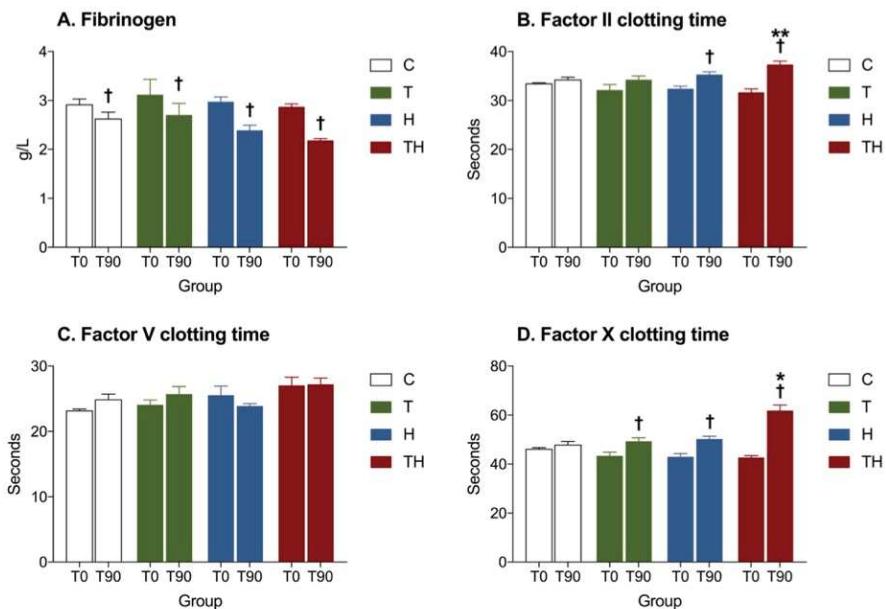


Figure 5. Coagulation factors. Histograms of specific coagulation factors at 0 min and 90 min in each experimental group. C, Control; T, Trauma; H, Hemorrhage; TH, Trauma and hemorrhage, n = 7 per group. *p < 0.05 compared with 0 min in the same group, *p < 0.05 versus C T and H. **p < 0.05 versus C and T. Data are presented as mean ± SEM.

Un-compensated shock was triggered by ATC. Next, we wanted to evaluate the clinico-biological consequences of ATC, which is a key point to explain higher mortality rates in case of trauma-related hemorrhage. In group TH, we observed a significant decrease in base excess concentrations ($p < 0.05$, Fig. 4D) associated with an increase in lactate ($p < 0.05$, Fig. 4B) and potassium concentrations ($p < 0.05$, Table 1). The rise in lactate concentration evidences the presence of cellular hypoxemia and the transition from aerobiosis to anaerobiosis. The lowering in base excess reflects a metabolic acidosis and the rise in potassium concentration indicates the presence of cellular leakage. These results indicate an energetic imbalance between cellular incomes and needs leading to cellular dysfunction, corresponding to the definition of shock: “a state in which the circulation is unable to deliver sufficient oxygen to meet the demands of the tissues”⁴³. In addition, arterial pressure remained low until the end of the experimentation in group TH ($p < 0.05$, Fig. 2B–D). Compensatory mechanisms were therefore not sufficient to maintain blood pressure; this clinico-biological status is also known as un-compensated shock. In contrast, arterial pressures fell just after trauma/hemorrhage and raised slowly during the experimentation in group T and H ($p > 0.05$, Fig. 2B–D). Biological markers of shock were also negative in these groups ($p > 0.05$, Fig. 4B–D). Consequently, ATC induced a switch from compensated to un-compensated shock in this model.

ATC was associated with a specific coagulation profile. We then studied specific coagulation factors to identify their role in case of ATC. A significant decrease in fibrinogen concentration was observed in all groups, probably due to clot formation after cervical incision and cannulation (Fig. 5A). Interestingly, a significant negative linear relationship between PT ratio and fibrinogen serum concentrations at 90 min was retrieved (intercept, 3.57; coefficient, -1.04; p, 0.0272; R², 0.6561; adjusted R², 0.5873). This result highlights a protective effect of fibrinogen against ATC. In addition, a significant increase of FII and FX times from 0 to 90 min was observed in this study ($p < 0.05$, Fig. 5B–D). These data suggest that specific coagulations pathways mediated by FII and FX are involved in ATC’s genesis.

Discussion

This model was particularly consistent with human ATC in terms of temporality, type of injuries, compensation mechanisms and coagulation impairments. Indeed, in most countries, patients are brought to hospital in approximately 60 min⁴⁴ and injuries performed in this study were consistent with those retrieved after traffic accidents⁴⁴. In addition, compensatory mechanisms were similar to those described in humans to maintain blood pressure and homeostasis. Concerning blood pressure, we observed a decrease in heart rate in group T, H ad TH, suggesting an activation of the Bezold Jarisch reflex (Fig. 2A). This reflex increases end-diastolic volumes and cardiac output by lengthening the time allowed to fill cardiac chambers^{45–47}. It is triggered by left ventricle stretch receptors, endogenous catecholamines and serotonin. Serotonin is released after platelet activation, explaining bradycardia in T and TH groups. Stretch receptor and catecholamines are activated in case of hypovolemia, explaining

bradycardia in H and TH groups. Concerning homeostasis, alveolar hyperventilation and bicarbonates consumption to maintain pH in normal range were retrieved in this model (Table 1). Moreover, the protective role of fibrinogen was observed⁴⁸ and values for aPTT and PT ratios were comparable to those retrieved in humans when ATC occurs¹⁰.

The role of previously identified confounding factors was then assessed to guarantee the robustness of the model. The absence of transcapillary refill was established by comparing hemoglobin concentrations at 0 and 90 min in the H group to ensure the absence of spontaneous dilution due to hemorrhage (Fig. 4A). The “depletion bias” was assessed by comparing markers of hemorrhage to ensure the absence of significant bleeding in the trauma group. In our model, mean arterial pressure, base excess, hemoglobin, bicarbonates and lactate concentrations were similar in group C and T at the end of the experimentation and did not vary during time in group T (Figs 2B and 4A–D). Therefore, trauma alone did not lead to any significant bleeding. As far as we know, this study is the first to identify and verify the absence of these two major bias.

Then, we wanted to illustrate the usefulness of our model to explore ATC's pathophysiology. To this purpose, analysis of coagulation factors concentrations were performed and allowed us to hypothesize that TFPI could play a role in case of trauma-related hemorrhage. Indeed, activation of C-protein pathway is known to be one of the key drivers of ATC^{49–51}. This activation leads to a decrease in FV^{52,53}. Interestingly, in our study, ATC occurred in group TH without any change in FV time. On the contrary, FX time raised, indicating a decrease of FX activity. These data suggest that APC's activation is not the only mechanism to trigger ATC. Another pathway inhibiting specifically FX appears to be involved in this context. A valid theory could be that FX was repressed by an inappropriate secretion of tissue factor pathway inhibitor (TFPI). TFPI is a serine protease inhibitor⁵⁴. One of its major isoform, TFPI α , is localized on endothelium and platelets in humans, and only in platelet in murines⁵⁵. It is externalized after platelet activation and has 3 Kunitz domains^{56–58}. The first domain binds to the active site of FVIIa, the second to the active site of FX and the third to protein S^{59,60}. This structure explain why TFPI induces a specific repression of FX^{61–63}. Consequently, an increase in TFPI plasma concentration could explain the inhibition of FX observed in this experimentation. These findings reinforce the theory that platelets and/or endothelium play a role in ATC's genesis.

In addition, our model has particularities that could be of interest for further studies. As far as we know, it is the first to demonstrate and reproduce the switch from compensated to un-compensated shock due to ATC. This makes possible to explain why higher mortality rates are observed in this condition. Moreover, it is the first to show that ATC can arise even in case of moderate hemorrhage. Indeed, ATC occurred with only a loss of 20% of total blood mass whereas 40% were usually necessary in previous studies. In addition, no animal died before the end of the procedure. This small mammalian model is therefore ethic, time and cost-effective.

The main limitation of this model is that average total blood mass of rats is about 25 ml. Volumes were therefore limited to avoid hemodynamic disturbance due to blood samples. High volumes or repeated blood samples, for example to investigate the time course of multiple coagulation factors in the same time, are therefore excluded. This constraint applies to all small mammalian models. In further studies we should consider that one general assay such as PT or aPTT will be sufficient to conclude to the presence of ATC. The remaining blood will be available to explore ATC's pathophysiology. Others limitations should be considered: Clotting factors serum concentrations are not similar among species; quantitative results are therefore not strictly transferable to humans. However, the role of coagulation in survival is so crucial that key mechanisms were probably conserved between species during evolution.

In conclusion, this model reproduced the sequence and timeline retrieved in humans in case of severe trauma associated with hemorrhage. The combination of these two factors induced a specific and endogenous coagulopathy fitting the definition of ATC. A complete consistency with humans was observed concerning clinical and biological markers for shock, compensation mechanism, protective factors and coagulation disorders involved in this condition. We identified and controlled two new bias: majored bleedings due to trauma and dilution due to transcapillary refill. Moreover, we reproduced the switch from compensated to un-compensated shock when ATC occurs, corresponding to the time when compensation mechanisms are overwhelmed. This could help to understand the pathophysiology of ATC at this key moment and to identify potential targets for therapeutics to decrease mortality. In addition, we demonstrated that ATC can occur even in case of moderate hemorrhage and we made the hypothesis that TFPI could repress FX in this case. This model is therefore effective to explore coagulation patterns involved in the genesis of ATC and its consequences on tissue perfusion.

References

- Global, regional, and national age–sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet: GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators* **385**, 117–171 (2015).
- Cothren, C. C., Moore, E. E., Hedegaard, H. B. & Meng, K. Epidemiology of urban trauma deaths: a comprehensive reassessment 10 years later. *World J Surg* **31**, 1507–11 (2007).
- Stanworth, S. J. *et al.* Mortality from trauma haemorrhage and opportunities for improvement in transfusion practice. *Br J Surg* <https://doi.org/10.1002/bjs.10052> (2016).
- Libert, N., Harrois, A. & Duranteau, J. Haemodynamic coherence in haemorrhagic shock. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* **30**, 429–435 (2016).
- Zhang, Q. *et al.* Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* **464**, 104–7 (2010).
- Xiao, W. *et al.* A genomic storm in critically injured humans. *J Exp Med* **208**, 2581–90 (2011).
- Theusinger, O. M. *et al.* Changes in Coagulation in Standard Laboratory Tests and ROTEM in Trauma Patients Between On-Scene and Arrival in the Emergency Department. *Anesthesia & Analgesia* **120**, 627–635 (2015).
- Engels, P. T. *et al.* The Natural History of Trauma-Related Coagulopathy: Implications for Treatment. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care* **71**, S448–S455 (2011).
- Maegele, M. *et al.* Early coagulopathy in multiple injury: an analysis from the German Trauma Registry on 8724 patients. *Injury* **38**, 298–304 (2007).

10. Frith, D. *et al.* Definition and drivers of acute traumatic coagulopathy: clinical and experimental investigations. *J Thromb Haemost* **8**, 1919–25 (2010).
11. Rossaint, R. *et al.* The European guideline on management of major bleeding and coagulopathy following trauma: fourth edition. *Crit Care* **20**, 100 (2016).
12. Hess, J. R. *et al.* The coagulopathy of trauma: a review of mechanisms. *J Trauma* **65**, 748–54 (2008).
13. Oshiro, A. *et al.* Hemostasis during the early stages of trauma: comparison with disseminated intravascular coagulation. *Crit Care* **18**, R61 (2014).
14. Gando, S. *et al.* Differentiating disseminated intravascular coagulation (DIC) with the fibrinolytic phenotype from coagulopathy of trauma and acute coagulopathy of trauma-shock (COT/ACOTS). *J Thromb Haemost* **11**, 826–35 (2013).
15. Neal, M. D. *et al.* Clinical assessment of trauma-induced coagulopathy and its contribution to postinjury mortality: A TACTIC proposal. *J Trauma Acute Care Surg* **79**, 490–2 (2015).
16. White, N. J. *et al.* Early Hemostatic Responses to Trauma: Identified Using Hierarchical Clustering Analysis. *J Thromb Haemost* <https://doi.org/10.1111/jth.12919> (2015).
17. Dobson, G. P., Letson, H. L., Sharma, R., Sheppard, F. R. & Cap, A. P. Mechanisms of early trauma-induced coagulopathy: The clot thickens or not? *J Trauma Acute Care Surg* **79**, 301–9 (2015).
18. Wu, X., Darlington, D. N. & Cap, A. P. Procoagulant and fibrinolytic activity after polytrauma in rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **310**, R323–9 (2016).
19. Darlington, D. N. *et al.* Trauma-Induced Coagulopathy Is Associated with a Complex Inflammatory Response in the Rat. *Shock* **44**(Suppl 1), 129–37 (2015).
20. Mann, K. G. & Freeman, K. TACTIC: Trans-Agency Consortium for Trauma-Induced Coagulopathy. *J Thromb Haemost* **13**(Suppl 1), S63–71 (2015).
21. Spahn, D. R. *et al.* Management of bleeding and coagulopathy following major trauma: an updated European guideline. *Crit Care* **17**, R76 (2013).
22. Frith, D., Cohen, M. J. & Brohi, K. Animal models of trauma-induced coagulopathy. *Thromb Res* **129**, 551–6 (2012).
23. Parr, M. J. *et al.* Traumatic coagulopathy: where are the good experimental models? *J Trauma* **65**, 766–71 (2008).
24. van Zyl, N., Reade, M. C. & Fraser, J. F. Experimental Animal Models of Traumatic Coagulopathy: A Systematic Review. *Shock* <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000372> (2015).
25. Hayakawa, M. *et al.* Massive amounts of tissue factor induce fibrinogenolysis without tissue hypoperfusion in rats. *Shock* **39**, 514–9 (2013).
26. Doran, C. M. *et al.* Targeted resuscitation improves coagulation and outcome. *J Trauma Acute Care Surg* **72**, 835–43 (2012).
27. Mohr, J. *et al.* Induced hypothermia does not impair coagulation system in a swine multiple trauma model. *J Trauma Acute Care Surg* **74**, 1014–20 (2013).
28. Duan, K. *et al.* A time course study of acute traumatic coagulopathy prior to resuscitation: from hypercoagulation to hypocoagulation caused by hypoperfusion? *Transfus Apher Sci* **50**, 399–406 (2014).
29. Hagemo, J. S. *et al.* Changes in fibrinogen availability and utilization in an animal model of traumatic coagulopathy. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med* **21**, 56 (2013).
30. Lesperance, R. N. *et al.* Recombinant factor VIIa is effective at reversing coagulopathy in a lactic acidosis model. *J Trauma Acute Care Surg* **72**, 123–9 (2012).
31. Velik-Salchner, C. *et al.* Normal values for thrombelastography (ROTEM) and selected coagulation parameters in porcine blood. *Thromb Res* **117**, 597–602 (2006).
32. Siller-Matula, J. M., Plasenzotti, R., Spiel, A., Quehenberger, P. & Jilma, B. Interspecies differences in coagulation profile. *Thromb Haemost* **100**, 397–404 (2008).
33. Martini, J., Cabrales, P., Fries, D., Intaglietta, M. & Tsai, A. G. Effects of fibrinogen concentrate after shock/resuscitation: a comparison between *in vivo* microvascular clot formation and thromboelastometry*. *Crit Care Med* **41**, e301–8 (2013).
34. Iwamoto, S., Takasu, A. & Sakamoto, T. Therapeutic mild hypothermia: effects on coagulopathy and survival in a rat hemorrhagic shock model. *J Trauma* **68**, 669–75 (2010).
35. White, N. J., Martin, E. J., Brophy, D. F. & Ward, K. R. Coagulopathy and traumatic shock: characterizing hemostatic function during the critical period prior to fluid resuscitation. *Resuscitation* **81**, 111–6 (2010).
36. Mulier, K. E., Greenberg, J. G. & Beilman, G. J. Hypercoagulability in porcine hemorrhagic shock is present early after trauma and resuscitation. *J Surg Res* **174**, e31–5 (2012).
37. Maegele, M. *et al.* Revalidation and update of the TASH-Score: a scoring system to predict the probability for massive transfusion as a surrogate for life-threatening haemorrhage after severe injury. *Vox Sang* **100**, 231–8 (2011).
38. Mutschler, M. *et al.* The ATLS(R) classification of hypovolaemic shock: a well established teaching tool on the edge? *Injury* **45**(Suppl 3), S35–8 (2014).
39. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *National Research Council of the National Academies* Available at: <https://grants.nih.gov/grants/olaw/guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals.pdf> (2011).
40. Sallum, E. A. *et al.* Blood loss and transcapillary refill in uncontrolled treated hemorrhage in dogs. *Clinics* **65**, 67–78 (2010).
41. Lloyd, S., Boulanger, B. & Johnston, M. The lymphatic circulation plays a dynamic role in blood volume and plasma protein restitution after hemorrhage. *Shock* doi:8799953 (1996).
42. Prist, R. *et al.* A quantitative analysis of transcapillary refill in severe hemorrhagic hypotension in dogs. *Shock* **1**, 188–195 (1994).
43. Aya, H. D. *et al.* From cardiac output to blood flow auto-regulation in shock. *Anaesthetist Intensive Ther* **47 Spec No**, s56–62 (2015).
44. Nance, M., Steward, R., Rotondo, M. & Nathens, A. B. NTDB annual report 2015. *American College of Surgeons Committee on Trauma Leadership* (2015).
45. Wisbach, G., Tobias, S., Woodman, R., Spalding, A. & Lockette, W. Preserving cardiac output with beta-adrenergic receptor blockade and inhibiting the Bezold-Jarisch reflex during resuscitation from hemorrhage. *J Trauma* **63**, 26–32 (2007).
46. Aviado, D. M. & Guevara Aviado, D. The Bezold Jarisch Reflex. *Ann N Y Acad Sci* **940**, 48–58 (2001).
47. Verberne, A. J., Saita, M. & Sartor, D. M. Chemical stimulation of vagal afferent neurons and sympathetic vasomotor tone. *Brain Res Brain Res Rev* **41**, 288–305 (2003).
48. Stinger, H. K. *et al.* The ratio of fibrinogen to red cells transfused affects survival in casualties receiving massive transfusions at an army combat support hospital. *J Trauma* **64**, S79–85; discussion S85 (2008).
49. Davenport, R. A. *et al.* Activated Protein C Drives the Hyperfibrinolysis of Acute Traumatic Coagulopathy. *Anesthesiology* **126**, 115–127 (2017).
50. van Zyl, N. *et al.* Activation of the protein C pathway and endothelial glycocalyx shedding is associated with coagulopathy in an ovine model of trauma and hemorrhage. *J Trauma Acute Care Surg* **81**, 674–84 (2016).
51. Howard, B. M. *et al.* Inducing Acute Traumatic Coagulopathy *In Vitro*: The Effects of Activated Protein C on Healthy Human Whole Blood. *PLoS One* **11**, e0150930 (2016).
52. Dahlback, B. Pro- and anticoagulant properties of factor V in pathogenesis of thrombosis and bleeding disorders. *Int J Lab Hematol* **38**(Suppl 1), 4–11 (2016).
53. Dahlback, B. & Villoutreix, B. O. Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway: novel insights into structure-function relationships and molecular recognition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 1311–20 (2005).

54. Mast, A. E. Tissue Factor Pathway Inhibitor: Multiple Anticoagulant Activities for a Single Protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **36**, 9–14 (2016).
55. Maroney, S. A. *et al.* Temporal expression of alternatively spliced forms of tissue factor pathway inhibitor in mice. *J Thromb Haemost* **7**, 1106–13 (2009).
56. Novotny, W. F., Girard, T. J., Miletich, J. P. & Broze, G. J. Platelets secrete a coagulation inhibitor functionally and antigenically similar to the lipoprotein associated coagulation inhibitor. *Blood* **72**, 2020–5 (1988).
57. Maroney, S. A., Cooley, B. C., Ferrel, J. P., Bonesho, C. E. & Mast, A. E. Murine hematopoietic cell tissue factor pathway inhibitor limits thrombus growth. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**, 821–6 (2011).
58. Maroney, S. A. & Mast, A. E. Expression of tissue factor pathway inhibitor by endothelial cells and platelets. *Transfus Apher Sci* **38**, 9–14 (2008).
59. Hackeng, T. M., Sere, K. M., Tans, G. & Rosing, J. Protein S stimulates inhibition of the tissue factor pathway by tissue factor pathway inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 3106–11 (2006).
60. Girard, T. J. *et al.* Functional significance of the Kunitz-type inhibitory domains of lipoprotein-associated coagulation inhibitor. *Nature* **338**, 518–20 (1989).
61. Novotny, W. F., Girard, T. J., Miletich, J. P. & Broze, G. J. Purification and characterization of the lipoprotein-associated coagulation inhibitor from human plasma. *J Biol Chem* **264**, 18832–7 (1989).
62. Camire, R. M. Rethinking events in the haemostatic process: role of factor V and TFPI. *Haemophilia* **22**(Suppl 5), 3–8 (2016).
63. Peraramelli, S. *et al.* Role of exosite binding modulators in the inhibition of Fxa by TFPI. *Thromb Haemost* **115**, 580–90 (2016).

Acknowledgements

Kerri Moore, Jean Alain Martignole. This work was supported by public funding provided by the French ministry of research.

Author Contributions

C.G., K.P., M.T. and O.G. designed the experiment. C.G. performed the experiments. C.G. and M.T. performed statistical analysis. C.G. wrote the manuscript. K.P., M.T., F.M., H.G. and Y.O. revised the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

Additional Information

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

Conclusion

Nous avons établi dans cette première étude un modèle murin répondant strictement à la définition de l'ATC, à savoir un trouble de la coagulation précoce, endogène et spécifique caractérisé par l'expression d'un phénotype hémorragique et résultant de l'association d'un traumatisme et d'une hémorragie. En effet, l'apparition à 1 heure de troubles de la coagulation témoignait de son caractère précoce. Les facteurs extrinsèques de coagulopathie (dilution, hypothermie, traitements antithrombotiques) ont été éliminés dès la construction du modèle, il s'agissait par conséquent d'une coagulopathie endogène. De plus, un allongement significatif du PT et du TCA était observé dans le groupe associant un traumatisme et une hémorragie, témoignant de son caractère spécifique. Le biais de déplétion était absent car il n'y a pas eu d'évolution significative des marqueurs d'hémorragie dans le groupe « trauma ». De plus, nous avons constaté une insuffisance circulatoire décompensée dans le groupe comportant une ATC, témoignant de l'association entre la survenue d'une ATC et l'expression d'un phénotype hémorragique. Ce modèle animal fiable et reproductible d'ATC a permis d'en préciser la physiopathologie lors d'une deuxième étude.

Etude 2 : Physiopathologie de l'ATC

Introduction

L'objectif de notre deuxième étude était d'évaluer de manière globale les perturbations de l'hémostase induites par l'ATC afin de les confronter aux hypothèses décrites dans la première partie de cette thèse. Celle d'une production excessive d'aPC responsable d'une hyperfibrinolyse se heurte à un paradoxe : l'aPC inhibant les facteurs Va et VIIIa, la génération de thrombine devrait être diminuée. Cependant, plusieurs expérimentations réalisées chez l'homme ont rapporté une augmentation de génération de thrombine (58) (55) (59). Cet argument a été repris par *Gando et al.* pour défendre l'hypothèse selon laquelle l'ATC ne constituerait pas une entité physiopathologique spécifique mais serait en réalité une CIVD fibrinolytique. Ces auteurs ont proposé un relargage endothérial précoce de t-PA pour expliquer la survenue d'une fibrinolyse non liée à l'activation de la voie de la protéine C mais n'en ont pas apporté la preuve expérimentale (76). De plus, certaines études ont rapporté une préservation ou une diminution de génération de thrombine en contexte traumatique, remettant en cause l'hypothèse d'une CIVD (78). La mesure de la génération de thrombine dans les conditions strictes d'une ATC permettrait par conséquent de confronter ces deux hypothèses. La thrombine est un élément central du système hémostatique car elle active la polymérisation de la fibrine. Sa formation est soumise au résultat de la balance entre les voies pro- et anticoagulantes, dont les éléments clés sont les facteurs Va, VIIIa et l'aPC. De plus, la thrombine constitue un puissant activateur plaquettaire *via* son action sur les récepteurs PAR. La mesure de la fonction plaquettaire associée à celle de la génération de thrombine permettrait par conséquent de préciser les voies impliquées dans la survenue d'une ATC. Nous avons par conséquent centré cette étude sur l'étude de la génération de thrombine et de la fonction plaquettaire en contexte d'ATC. Un dosage des facteurs clés de la coagulation a également été réalisé pour expliquer d'éventuelles modifications de génération de thrombine en cas d'ATC. La fonction plaquettaire, second élément clé susceptible d'expliquer la physiopathologie de l'ATC, a été évaluée par aggrégométrie selon plusieurs voies d'activation. Cette étude fera prochainement l'objet d'une soumission à une revue scientifique.

**New considerations on pathways involved in acute traumatic coagulopathy:
The thrombin generation paradox**

C. Gangloff^{1,2*}, F. Mingant³, M. Theron¹, H.Galinat³, O. Grimault^{1,4}, Y.Ozier^{1,5}, K.Pichavant-Rafini¹

*Correspondence : cedric.gangloff@chu-rennes.fr

1 : EA4324-ORPHY, Université de Bretagne Occidentale, IBSAM, UFR Sciences et Techniques, 6 Avenue Le Gorgeu, CS 93837, 29238 Brest Cedex 3, France Brest, France.

2 : Department of emergency medicine, CHU Pontchaillou, 2 Rue Henri le Guilloux, 35000 Rennes, France.

3 : Department of biology and hemostasis, CHRU Cavale Blanche, boulevard Tanguy Prigent, Brest, France.

4 : SAMU, SMUR and department of emergency medicine. Hôpital de la Cavale Blanche, boulevard Tanguy Prigent, Brest, France.

5 : Department of anaesthesiology, Hôpital de la Cavale Blanche, boulevard Tanguy Prigent, Brest, France.

Full list of author information is available at the end of the article.

Introduction

Trauma is a leading cause of death among young peoples, explaining its social impact and financial burden to healthcare system [1]. Hemorrhage is identified as a major cause of preventable death in this context [2]. One third of severe trauma patients presents an acute traumatic coagulopathy (ATC) upon hospital admission. ATC is an acute, specific and endogenous phenomenon specifically triggered by the association of trauma and hemorrhage. Its presence is associated with higher mortality and transfusion rates [3]. External factors such as hypothermia, anti-thrombotics and dilution can reinforce this coagulopathy [4]. In the first hours, hemorrhage and macrocirculatory impairment are responsible of an early mortality peak. In the following days, a delayed mortality due to microcirculatory defects reflecting a prothrombotic state is observed [5]. The physiopathology of ATC is still debated due to its complexity but the involvement of an imbalance between pro- and anti-coagulant pathways, platelets and endothelium is currently admitted by several authors [6][7][8][9]. However, interactions between them remain unclear. Some authors hypothesized an increased production of aPC to explain the emergence of hyper-fibrinolysis in case of ATC, but this hypothesis is contradicted by studies reporting an increase in thrombin generation after severe trauma while it should be reduced due to the inhibitory effect of aPC on FVa and FVIIIa . This argument has been echoed by advocates of another hypothesis: ATC would in reality be a trauma-related DIC with early fibrinolytic phenotype explained by an endothelial release of t-PA . These authors argued that aPC concentrations observed in case of ATC were insufficient to repress FVa and FVIIIa and lengthen PT and aPTT times *in vitro* . At last, contradictory studies reported normal or decreased thrombin generation in case of ATC. Observation of thrombin generation on a reliable animal model, not influenced by confounding factors conventionally identified in clinical studies would therefore allow a confrontation between these two hypotheses. Another unresolved concern is the role of platelet on ATC. Jacoby and al. observed a rise in platelet-activation markers associated with hypo-functional platelets in non-survival patients, suggesting the presence of a refractory state due to trauma [10] [11]. In addition, a loss of

platelet function was identified as a predictive factor of mortality in this context [12][13]. These concerns explain why thrombin generation test (TGT) and platelet aggregometry were recently identified as potentially useful to offer an individualized care management to traumatized patients [14]. Our team recently published an animal model reproducing the timeline and main mechanisms observed in humans in case of ATC [15]. This non-biased model gives the opportunity to explore ATC's pathophysiology. The objective of this experimentation was to explore the general hemostasis disorders involved in ATC's genesis to compare them with hypotheses proposed to explain its pathophysiology. This would make possible to identify targets for therapeutics in case of major trauma.

2. Materials and methods

2.1. Animals

60 adult Sprague-Dawley rats (430-650 g, Janvier SAS, Le Genest St Isla, France) were housed in a controlled environment (temperature $21\pm1^{\circ}\text{C}$, relative humidity $27\pm16\%$, 12-12 h light-dark cycle) with *ad libitum* access to food and water. All procedures were conducted following a protocol approved by the French ministry of agriculture (APAFIS#5194-2016042513131045) and the local university animal research ethic committee. Procedures were in accordance with the guide for the care and use of laboratory animals published by the US National Institute of Health [16].

2.2. Preparation

After 1 week of housing, animals were anesthetized with an intra-peritoneal injection of ketamin (100mg/Kg, Virbac, Carros, France) and xylazin (10mg/Kg, Virbac, Carros, France). A temperature probe was inserted rectally and animals were placed in supine position on a warming pad (Z31SY, Ascon technologic, Italy) to maintain central body temperature in a normal range ($37.5\pm0.5^{\circ}\text{C}$). A 2cm cervical incision was performed, followed by a tracheostomy (2mm diameter polyethylene tube). An arterial catheter (Leader Flex 22G, 0,7 x 40mm, Vygon, France) was inserted in the right carotid allowing blood sampling and continuous intra-arterial pressure monitoring. A venous catheter was inserted in the left jugular vein (Leader Flex 22G, 0,7 x 40mm, Vygon, France) followed by a continuous intravenous infusion of ketamin (1mg/kg/h, Virbac inc., Carros, France). Ketamin was diluted in sodium chloride 0.9%, continuously infused at a rate of 1ml/kg/h. Vital signs (heart rate, invasive arterial pressure and body temperature) were continuously recorded during all the procedure (MP35, Biopac systems inc. Varna, Bulgaria).

2.3. Experimental procedure

The experimental procedure was summarized in fig.1. A total of 60 rats were enrolled and allocated randomly to one of the 4 experimental groups (n=15 per group): Control (C) in which trauma or hemorrhage were not performed; Trauma (T) in which trauma was performed but not hemorrhage; Hemorrhage (H) in which hemorrhage was performed but not trauma; Trauma and hemorrhage (TH) in which trauma and hemorrhage were performed. In groups H and TH, 20% of total blood mass was gently collected in 10 min with a 10 ml syringe through the arterial catheter. Total blood mass was estimated at 5% of body weight. In groups T and TH, multiple traumas were performed as follows: 4 closed limb fractures on mid-height of the bone (2 femurs, 2 humerus) at 90 angular degrees with pliers (water pump pliers 250mm, Facom, France). Then a 4cm median laparotomy, and four spleen crushings of 1 cm on the inferior border of the spleen were done with surgical scissors and a needle holder, respectively (KS-463, Keysurgical, U.S.A.).

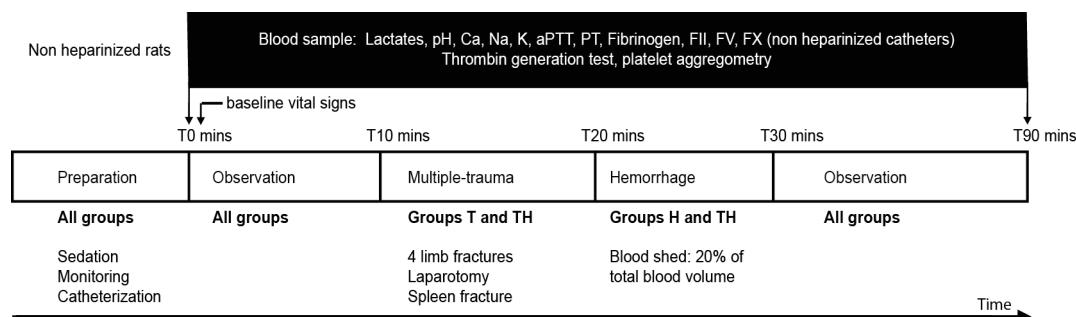


Figure 1. Experimental protocol. Group C, without trauma without hemorrhage; T, trauma without hemorrhage; H, hemorrhage without trauma; TH, hemorrhage with trauma (n = 15 in each group).

2.4. Blood Samples

No injection of antithrombotic was performed during the whole experimentation. All blood samples were collected through the arterial catheter. A 1ml syringe rinsed with heparin 500UI/ml was used for point of care tests. A 1.4ml 3.2% citrated tube (Monovette, Saerstedt, France) was used for hemostasis tests. The catheter was flushed with 50 µL of 0.9% NaCl (without anticoagulant) after each sampling. Citrated tubes were gently turned upside-down 5 times. Three 15 min centrifugations were performed: one at 1000 g and two at 3000 g (centrifuge 2-16K, Sigma, Germany) to obtain poor platelet plasma. Plasma was frozen at -80 °C until measurements.

2.5 Blood analysis

Arterial blood pH, lactate and potassium concentrations were measured instantaneously after blood collection with a point-of care analyzer (ABL80 FLEX, Radiometer, Copenhagen, Denmark). FII, FV, FX, fibrinogen, PT and aPTT assays were performed on platelet poor thawed plasma on an automated analyzer (STA-R Evolution, Stago, Asnieres sur Seine, France). PT, aPTT times and fibrinogen concentrations were measured with specific reagents, « neoplastine Cl+10 », « triclot aPTTb », and « STA liquid fib », respectively. Specific factor-depleted plasmas (Stago, Asnieres sur Seine, France) were used to determine coagulation factor times. Coagulation factor activities were expressed in time-to-clot instead of percentages in this study. Indeed, these percentages are expressed in comparison with the laboratory reference in humans and references for rats are neither available nor standardized. Therefore, we made the choice to express a non-modified data: the time to clot in seconds. This time is inversely proportional to the factor activity. Thrombin generation test was performed using the Thrombinoscope CAT (Calibrated Automated Thrombogram, Maastricht, The Netherlands) assay according to the manufacturer's instructions (Diagnostica Stago, Asnières, France) [7,8]. 20 microliters of plasma was incubated with 20 µL PPP-ReagentTM (containing 5 pM recombinant tissue factor and 4 µM phospholipids) for 10 minutes in round-bottomed 96-well black microplates. For each sample, a calibrator (Thrombin CalibratorTM) was run in parallel in order to correct the fluorescence signal for substrate consumption and plasma color variability. Thrombin generation was initiated by the addition of 20 µL of FluCa-KitTM). Fluorescence was detected by a Fluoroskan Ascent1 fluorimeter (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA) and the thrombin generation curves were analysed by the Thrombinoscope software (Thrombino- scope BV, Maastricht, The Netherlands). Thrombin generation curves was characterised by 5 parameters: "Endogenous thrombin potential" (ETP), the area under the curve expressed in nMol/L of thrombin per minute; "lagtime", the length of time required before thrombin generation starts; "peak", the highest thrombin concentration; "time to peak", the length of time until peak and "start tail", the duration to end-point of thrombin generation. Platelet aggregometry was performed with a multiplate analyzer (Verum Diagnostica GmbH, Munich, Germany) in whole blood sample immediately after blood collection in 3.2% citrated tube (Monovette, Saerstedt France) as described by manufacturer. Three platelet agonists specific to 3 pathways were tested: "PAR-4 test" (70 mMol/l, PAR-4 receptor, SIGMA, St Louis, U.S.A.), "ADP test" (10 Mmol/l, ADP receptor, Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Mannheim, Germany) and "COLLtest" (1.4 mcg/ml, collagen receptor, Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Mannheim, Germany). Shortly, after adjunction of the reagent, platelet aggregation led to an increase in impedance between two electrodes placed in a whole blood sample. This increase reflected platelet aggregation after activation. The procedure was

followed in conformity with manufacturer's instruction for each blood sample: 300 μ L of the whole blood was added to 300 μ L of sodium chloride into the electrode cartridge. Blood was continuously mixed with a magnetic stir bar and impedance was measured during 6 minutes after adjunction of each platelet agonist. The value recorded was the area under the curve (AUC).

2.6. Statistical analysis and Graphics

Statistical analyses were performed with "SPSS statistics for Macintosh" software version 21 (I.B.M. corp., Armonk, NY, 2012). Line graphs, boxplots and histograms were performed with "Prism 7 for Mac OS X" version 7.0a (Graphpad software, La Jolla, USA, 2016). At the time of the first sampling, all the animal being strictly identical, the results were pooled in a baseline group. They were compared with the sampling performed at 90 min for each group (C, T, H and TH). One-way ANOVA with adequate post hoc tests were used to compare means between groups. Results were expressed as the mean \pm standard error of mean (SEM). A p-value < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Markers of ATC

Mean PT was statistically higher than baseline at the end of the experimentation in groups C, T, H and TH. At 90 min there was no effect of trauma or hemorrhage but the group TH had a PT significantly longer than C, T and H groups (fig. 2A). Similar trends were observed for aPTT: in TH group a strong increase of aPTT was observed, and at 90 min trauma and hemorrhage were not different from group C and baseline (fig 2B).

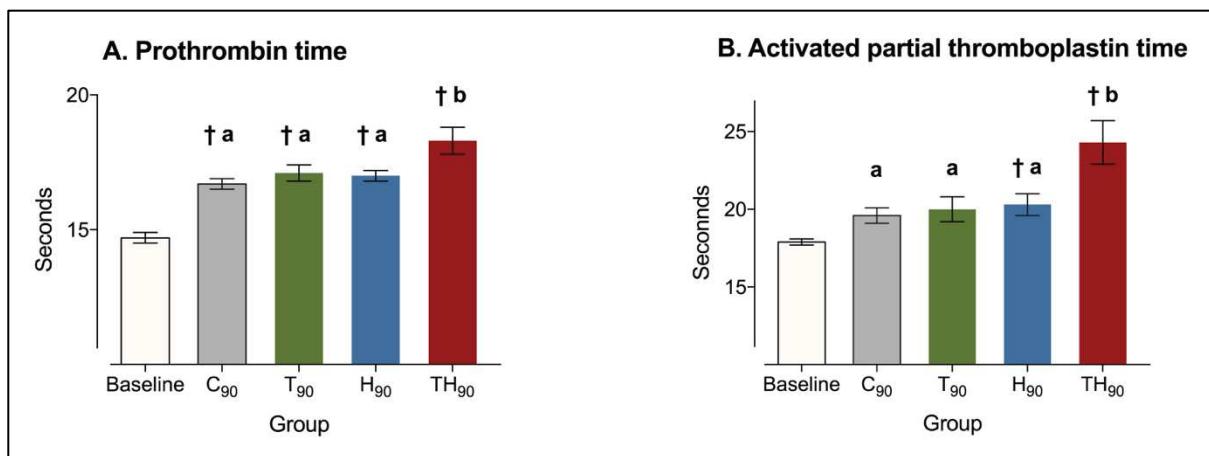


Figure 2. Markers of ATC. Baseline, pooled values from all groups at 0 min; C₉₀, Control at 90 min; T₉₀, Trauma at 90 min; H₉₀, Hemorrhage at 90 min; TH₉₀, Trauma and hemorrhage at 90 min. For t0 n=22; for C90, T90 H90 and TH 90 n=9 to 11. Data are presented as mean ± SEM. ANOVA I significance was designated at the p < 0.05 level of confidence. †, significantly different from baseline. Letter differences indicate statistical differences between groups at 90 min.

3.1. Shock markers

In the C group, MAP, Heart rate, lactates, base excess, potassium and hemoglobin concentrations were modified when compared to baseline (table 1). When compared to the control group, the trauma induced a modification of base excess at 90 min (at -5.4 ± 0.8). Hemorrhage alone decreased MAP and Hemoglobin concentration both of 20% and slightly increased blood pH (to 7.43). In TH group, statistical modifications of MAP, (-49%) lactate (to 2 ± 0.4 mMol), base excess (to -8.03 ± 0.9 mMol), pH (to 7.45 ± 0.05) and potassium (to 5.95 ± 0.31 mMol) blood levels were observed during the experimentation. The evolution of MAP during the experiment in each group was reproduced figure 3.

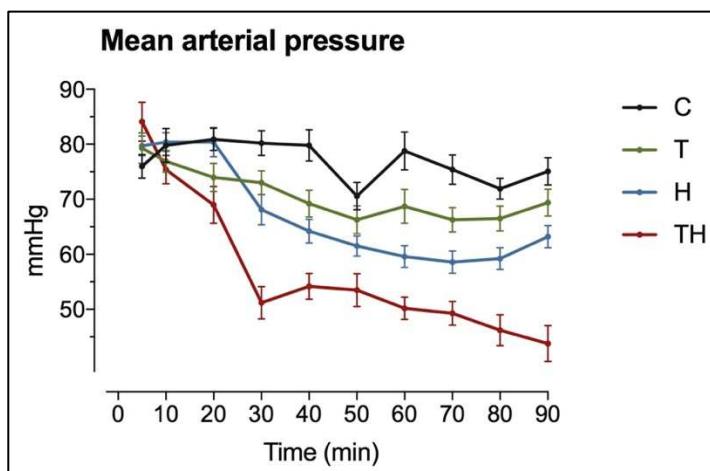


Figure 3. Evolution of MAP during time in each group. C, Control; T, Trauma; H, Hemorrhage; TH, Trauma and hemorrhage, n=15 per group. Values represent mean ± SEM.

Table 1. Markers of shock, trauma and hemorrhage.

	Baseline	Group C ₉₀	Group T ₉₀	Group H ₉₀	Group TH ₉₀	ANOVA p-value
Clinical markers						
Mean arterial pressure (mmHg)	80± 2	75± 3 ^{a†}	69± 2 ^{ab†}	63± 2 ^{b†}	43± 3 ^{c†}	<0.001*
Heart rate (min ⁻¹)	269± 4	250± 8 ^{ab†}	245± 11 ^{a†}	269± 9 ^{b†}	275± 6 ^b	0.014*
Biological markers						
Lactates (mmol/L)	0.5± 0.1	1± 0.1 ^{a†}	0.9± 0.2 ^{a†}	1.3± 0.2 ^{a†}	2± 0.4 ^{b†}	<0.001*
Base excess (mmol/L)	0.4±0.2	-2.4±0.3 ^{a†}	-5.4±0.8 ^{b†}	-2.6±0.5 ^{a†}	-8.03±0.9 ^{c†}	<0.001*
pH	7.39±0.01	7.36±0.04 ^a	7.41±0.01 ^{ab}	7.43±0.02 ^b	7.45±0.05 ^{b†}	0.049*
Potassium (mmol/L)	3.51±0.05	4.55±0.22 ^{a†}	4.68±0.13 ^{a†}	4.39±0.13 ^{a†}	5.95±0.33 ^{b†}	<0.001*
Hemoglobin (g/dl)	16.5± 0.1	14.8± 0.2 ^{ab†}	15.6± 0.3 ^{a†}	13.4±0.6 ^{c†}	14.1± 0.3 ^{bc†}	<0.001*

Data are presented as mean ± SEM. Baseline, pooled values from all groups at 0 min; C₉₀, Control at 90 min; T₉₀, Trauma at 90 min; H₉₀, Hemorrhage at 90 min; TH₉₀, Trauma and hemorrhage at 90 min. ANOVA I significance was designated at the p < 0.05 level of confidence. † significant difference with baseline group. At 90 min, letter differences indicate statistical differences between groups. For t0 n=47 to 56, for the other groups n=9 to 15 analyses per group.

3.2 Thrombin generation tests

In group C, lagtime, peak, time to peak and start tail were different from baseline (table 2). Trauma by itself induced no modification when compared with the C group. Hemorrhage induced an increase in ETP, in peak amplitude and in start tail. TH group exhibited a statistically different ETP when compared to group C.

Table 2. Thrombin generation test.

	Baseline	Group C ₉₀	Group T ₉₀	Group H ₉₀	Group TH ₉₀	ANOVA p-value
Endogenous thrombin potential (nmol/l/min)	369±13	228±23 ^a	262±18 ^{ab}	297±19 ^b	312±19 ^b	0.05*
Lagtime(min)	2.07±0.07	2.49±0.10 [†]	2.38±0.08 [†]	2.41±0.14 [†]	2.47±0.09 [†]	<0.001*
Peak (nmol/l)	93.0±5.2	60.5±6.7 ^{a†}	73.6±5.7 ^{ab†}	86.9±6.8 ^b	79.2±6.6 ^{ab}	0.009*
Time to peak (min)	4.0±0.1	4.3±0.1 ^{a†}	4.1±0.1 ^a	4.1±0.1 ^a	4.5±0.1 ^{a†}	0.02*
Start tail(min)	53.6±3.9	34.3±4.2 ^{a†}	42.2±3.2 ^a	52.8±4.1 ^b	40.9±4.3 ^a	0.02*

Data are presented as mean ± SEM. Baseline, pooled values from all groups at 0 min; C₉₀, Control at 90 min; T₉₀, Trauma at 90 min; H₉₀, Hemorrhage at 90 min; TH₉₀, Trauma and hemorrhage at 90 min. ANOVA I significance was designated at the p < 0.05 level of confidence. † significant difference with baseline group. At T90, letter differences indicate statistical differences between groups. For t0 n=43 to 52, for the other groups n=12 to 15 analyses per group.

3.3 Specific coagulation assays

In the control group, FII and FX times were increased and fibrinogen concentration decreased when compared to baseline. Trauma induced no modification of the measured coagulation parameters. The hemorrhage induced a significant increase of FV time. In group TH, all the measured parameters were modified : FII, FV and FX times were longer than in group C and

the fibrinogen concentration was significantly lowered (figure 4). A statistically significant inversed relationship between fibrinogen concentration and aPTT was observed (figure 5).

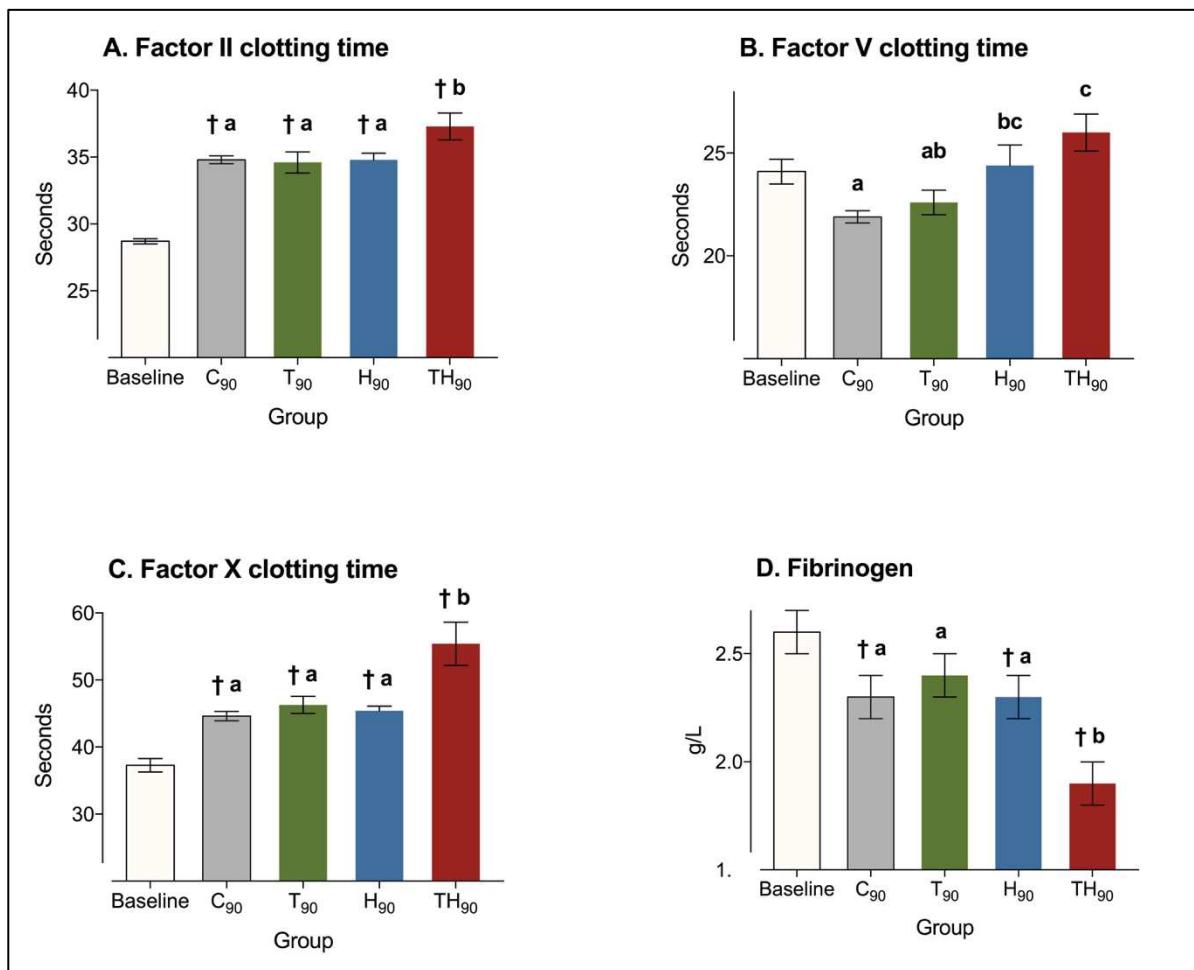


Figure 4. Coagulation factors. Baseline, pooled values from all groups at 0 min; C₉₀, Control at 90 min; T₉₀, Trauma at 90 min; H₉₀, Hemorrhage at 90 min; TH₉₀, Trauma and hemorrhage at 90 min. For baseline n=13 to 19, for the other groups n=7 to 11 analyses per group. Data are presented as mean \pm SEM. ANOVA I significance was designated at the p < 0.05 level of confidence. †, significant difference with baseline. Letter differences indicate statistical differences between groups at 90 min.

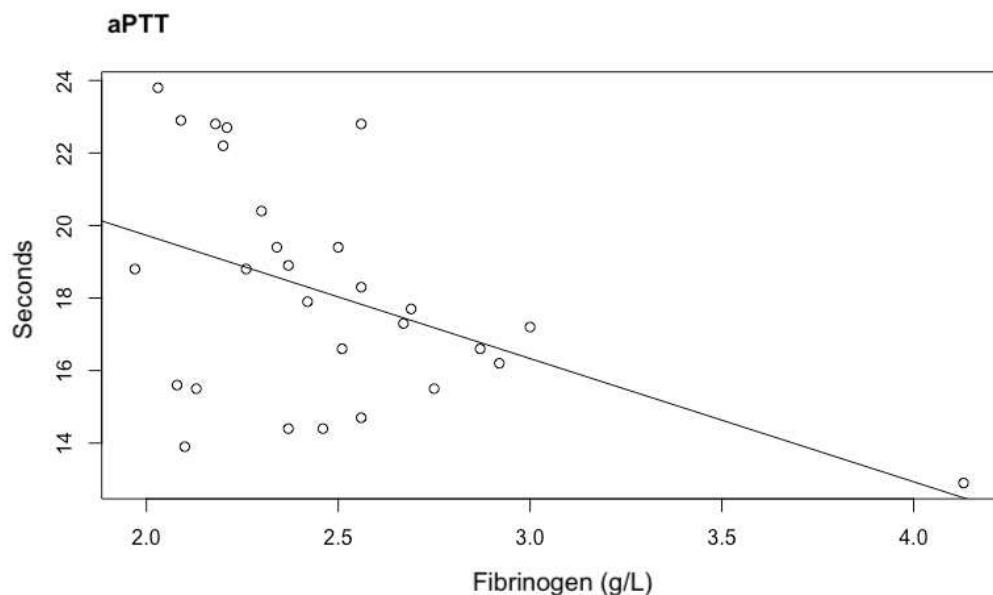


Figure 5. aPTT in expressed as a function of fibrinogen concentration at 90 min in all groups (n=28). Inversed linear relationship between aPTT and fibrinogen concentration (intercept, 26.53±3.16; coefficient, -3.40±1.26; Adjusted R-squared: 0.1878; p=0.0123).

3.4 Platelet count and aggregometry

In the case of platelet count, baseline was different from C, H and TH groups (table 3). There was no effect of the different treatments at 90 min. Concerning aggregometry parameters, the area under the curve for collagen was different in groups C and TH from baseline. There was no statistical difference between groups C, T, H or TH, for any of the measured parameters.

Table 3. Platelet count and aggregometry.

	Baseline	Group C ₉₀	Group T ₉₀	Group H ₉₀	Group TH ₉₀	ANOVA p-value
Platelets (platelets/l)	570± 8	517± 12 ^{a†}	533± 26 ^a	493± 17 ^{a†}	525± 15 ^{a†}	<0.001*
PAR-4 (AUC)	74.7± 2.5	69.4± 4.1	83.5± 7.0	63.3± 5.7	70.3± 4.7	0.146
ADP (AUC)	91.0± 1.8	90.9± 4.1	100.0± 5.7	87.3± 4.4	85.3± 4.3	0.214
COLL (AUC)	86.0± 2.0	77.4± 2.5 ^{a†}	84.3± 2.8 ^a	80.5± 3.6 ^a	75.5± 4.0 ^{a†}	0.047*

Data are presented as mean ± SEM. Baseline, pooled values from all groups at 0 min; C₉₀, Control at 90 min; T₉₀, Trauma at 90 min; H₉₀, Hemorrhage at 90 min; TH₉₀, Trauma and hemorrhage at 90 min. ANOVA I significance was designated at the p < 0.05 level of confidence. † significant difference with baseline group. At T90, letter differences indicate statistical differences between groups. For t0 n=40 to 56, for the other groups n=7 to 15 analyses per group.

4. Discussion

4.1 Model relevance

The depletion bias was controlled in this study

Trauma is likely to induce hemorrhage in injured tissues. Therefore, higher coagulation disorders observed in group TH can rather be due to this additional bleeding than to a specific mechanism such as ATC. To control this potential bias, hemorrhage due to trauma has to be assessed in a specific group. In this experimentation, there was no statistical difference for shock and hemorrhage markers such as MAP, lactates levels, and hemoglobin at the end of the experimentation in group C and T. Thus, trauma did not lead to any significant bleeding. The depletion bias identified in our previous study was not present [15].

The TH group reproduced ATC, and only ATC

Mean PT and aPTT were statistically longer in group TH than in all other groups at the end of the experimentation. The main biological markers of ATC were therefore positive in group TH [10][11]. Moreover, we did not use fluid replacement that could dilute coagulation factors or antithrombotic injection to prevent clot formation, and we prevented hypothermia that could reduce clotting factor enzymatic protease activity. Thus, all extrinsic factors were controlled. The lengthening of PT and aPTT was therefore due to an endogenous mechanism. The coagulation disorder observed in group TH fits all the characteristics defining ATC: An acute and endogenous coagulopathy specifically triggered by trauma and hemorrhage.

A bleeding phenotype was triggered by ATC

This model reproduced the mechanism explaining higher mortality rates when humans present ATC [3]. In group H, MAP fell just after hemorrhage and raised slowly until 90 min because compensatory mechanism, such as peripheral vasoconstriction, were able to counterbalance the effects of hypovolemia due to blood losses (figure 3). This phenomenon is called compensated shock. In contrary, MAP remained lower in group TH at 90 min. This persisting hypotension was associated with an increase in lactate and potassium concentrations and a decrease in base excess concentration (table 1). These markers reflect the presence of a cellular energetic imbalance between needs and supply leading to cellular leakages [17] [18]. This particular state is called uncompensated shock and leads to death in absence of circulatory support such as fluid replacement or vasopressor therapies [1]. In this experimentation, uncompensated shock was related to the presence of ATC because it was present only in group TH. ATC was therefore associated with a bleeding phenotype.

4.2 Early activation of pro- and anti-coagulant pathways in case of ATC

The thrombin generation paradox: a statement

TGT has been recently identified as a promising assay to evaluate patients suffering from acute hemorrhage [19]. This test reflects the total amount of thrombin that a plasma sample can generate under the action of pro and anticoagulant drivers [20]. ETP is the main parameter measured by this test, giving a global overview of the coagulation profile due to thrombin's ending position in the coagulation cascade [21] [22]. In case of coagulation factor depletion, thrombin generation tends to decrease [23]. This coagulation profile was observed in group C. Indeed, FV, FX and ETP decreased in this group, probably due to cervical incision, tracheostomy and catheters insertions. To the contrary, we observed normal ETCs in group TH at the end of the experimentation despite higher FV and FX times.

This clinical-biological profile combining a haemorrhagic phenotype, a depletion of coagulation factors and the preservation of thrombin generation observed in group TH must be confronted with the two hypotheses that have been in opposition for several years concerning ATC's patho-physiology: trauma-related DIC and excessive protein C activation. In case of DIC, a major increase in thrombin generation and a dramatic decrease in platelet count should be observed . In this experimentation, thrombin generation was preserved and platelets count was slightly decreased in group TH at 90 min. These results are not in accordance with the trauma-related DIC hypothesis. Similarly, the observation of normal ETPs is inconsistent with the hypothesis of an isolated increase in aPC, which implies a decrease in thrombin generation mediated by the inhibition of FVa and FVIIIa. Interestingly, we observed a bleeding phenotype in group TH. This result can only be explained by the presence of fibrinolysis because thrombin generation was normal in this group. This assumption is reinforced by the observation of a marked decrease in fibrinogen concentration, as usually observed in case of fibrinolysis and by several studies reporting an increase in aPC in the presence of ATC.

In this experiment, we observed the preservation of normal thrombin generation despite a clinico-biological profile in favor of an aPC-mediated fibrinolysis, suggesting the existence of a mechanism protecting thrombin generation against aPC. We called this phenomenon the "thrombin generation paradox".

Pathways involved in the thrombin generation paradox: an hypothesis

We identified a mechanism that could explain the observation of a paradoxically normal thrombin generation despite the activation of fibrinolysis by aPC. Indeed, the activity of

prothrombinase complex, which plays a crucial role in thrombin generation, is enhanced by two proteins rising in case of trauma-related hemorrhage: myosin and TF.

Major trauma leads directly to cellular damages by mechanical action on tissues [24]. Plasmatic rises in potassium, tissular factor [25] and myosin [26] [27] due to cellular leakage are observed in this condition. This mechanism called rhabdomyolysis or “crush syndrom” is potentialized by shock [28]. Indeed, in case of shock, the increase in blood potassium level is correlated with the importance of tissue hypoxia [18]. Hyperkalemia is secondary to the blockage of the Na-K ATPase pump [29] and the activation of the K_{ATP} channels triggered by cellular hypoxia [30] [31]. This activation leads to a hyperpolarization of the cellular plasmatic membrane and blocks voltage-dependent calcium channels. Hyperpolarization leads to a decrease in myocardial contractility and a vasoplegy, reinforcing shock [32] [33]. This vicious circle leading to death was reproduced in this experimentation: uncompensated shock and hyperkalemia were observed in group TH. For these reasons, the rise in blood potassium observed in our study reflects the severity of tissular damages and it can be reasonably hypothesized that it was associated with higher myosin and TF serum concentrations in group TH [34]. **The role of myosin:** A recent study demonstrated that myosin is able to bind factors Xa and Va, signing the ability to create a stable ternary complex called prothrombinase that promotes prothrombin activation [35]. Thus, a rise in myosin in group TH could promote thrombin generation, explaining normal ETPs despite the consumption of coagulation factors and fibrinolysis. **The role of TF:** As previously described, prothrombinase complex is composed by factor Va and factor Xa, and thrombin generation is directly dependent from its activity. In consequence, a decrease in factor X should lead to a lowering in ETP. However this lowering is limited in presence of high levels of TF that promote activation of factor X [36]. These patterns were retrieved in group C and TH. Indeed, a lowering in factor X activity and ETP was observed in group C, reflecting a subtle impairment in coagulation process due to cervical incisions, tracheostomy and catheters insertions. In contrast, a lowering of factor X without decrease in ETP was observed in group TH. In this last group, higher level of TF due to trauma should have limited the decrease in ETP.

Clinical implications: The observation of paradoxically normal ETPs in group TH indicates the presence of pro-coagulant processes in case of trauma-related shock and is consistent with a recent study on humans [34]. The main advantage of this pro-coagulant mechanism in terms of survival could be to counterbalance the effect of coagulation factors depletion and aPC-mediated fibrinolysis. But thrombosis is the price to pay to lower mortality [37] :a recent

publication concluded that a procoagulant phenotype was a predictor of symptomatic venous thromboembolism after trauma [38]. These observations are consistent with the fact that, after several days, patients with ATC present higher mortality rates despite the restauration of a normal blood pressure. Indeed, the presence of ATC is associated with multiple organ failures related to microcirculation defects [39][40][41][42] [43] [44] [45].

4.2. Fibrinogen plays a key-role in ATC

In our study, fibrinogen concentration was dramatically decreased in group TH at the end of the experimentation. At the same time, ETP was higher in group TH than in group C. These results could be explained by the structure of fibrinogen, thrombomodulin and thrombin. Indeed, fibrinogen and thrombomodulin have the same binding site on thrombin, the FRS site, suggesting a competitive inhibition of fibrinogen on the thrombin/ thrombomodulin complex. We therefore hypothesize that, in case of ATC, a decrease in fibrinogen concentration could decrease thrombin consumption. In the same time and despite the preservation of normal thrombin concentrations, the lowering in fibrinogen concentration could decrease its competitive inhibition on the thrombin/ thrombomodulin complex and activate the protein C pathway, reinforcing fibrinolysis. In addition, we observed an inversed correlation between fibrinogen levels and aPTT, suggesting a protective role of fibrinogen against ATC (figure 5). This result strengthen the hypothesis of a central role of fibrinogen in ATC's pathophysiology, (which could be explained by a decrease in the competitive inhibition of fibrinogen on the thrombin/ thrombomodulin complex), and is coherent with the hypothesis of an increase in aPC leading to fibrinolysis.

4.3. ATC was not associated with hypo-functional platelets in this study

Another hypothesis to explain the pathophysiology of ATC would be a loss of platelet function leading to a hemorrhagic phenotype on the early phase of trauma. According to this hypothesis, the burst in thrombin would cause diffuse platelet activation via their PAR receptors. This excessive activation would be followed by a refractory period characterized by a loss in platelet function. In this study, we observed no increase in thrombin generation and platelet response was similar in groups C, T, H and TH at 90 min. These results invalidate the hypothesis of a decrease in platelet function mediated by thrombin as a key driver in ATC's genesis. Similar results were observed on traumatized patients: A recent study concluded to the absence of association between injury severity and multiplate aggregometry test results on humans [14].

4.4. Limitations

This experimentation was conducted on rats, and conclusions cannot be directly transposed on humans. However, hemostasis mechanisms, playing a crucial role in survival, are highly conserved between species. In this experimentation, low volumes of blood were sampled in order to avoid mimicking excessive bleedings, which would have biased the experiment. Unfortunately, the small volumes of blood samples collected were insufficient to confirm all the hypothesis developed here and confirmation of the implications actors of the ATC such as aPC, TF or myosin will have to be confirmed by direct analyses.

5. Conclusion

ATC resulted in a specific clinico-biological profile combining a haemorrhagic phenotype, the depletion of coagulation factors (including fibrinogen), a sub-normal platelet count and the preservation of thrombin generation. These results are nor in accordance with the hypothesis of a trauma-related DIC. In contrast, they were consistent with an excessive fibrinolysis mediated by aPC. The crucial role of fibrinogen in ATC was confirmed in this experimentation. It could be explained by a decrease of its competitive inhibition on the thrombin/thrombomodulin complex, reinforcing aPC-mediated fibrinolysis. The paradoxically preserved thrombin generation in this setting suggests a protective mechanism mediated by myoglobin and TF. In addition, we observed that ATC could occur without any impairment in platelet function. In consequence, this experimentation made possible a better understanding of ATC's pathophysiology which appears to be partially counterbalanced by survival-related mechanisms at the cost of an increase in thrombotic events.

6. Bibliography

1. Rossaint R, Bouillon B, Cerny V, Coats TJ, Duranteau J, Fernandez-Mondejar E, et al. The European guideline on management of major bleeding and coagulopathy following trauma: fourth edition. *Crit Care*. 2016;20:100.
2. Global, regional, and national age–sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet: GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators*. 2015;385:117–71.
3. Frith D, Goslings JC, Gaarder C, Maegele M, Cohen MJ, Allard S, et al. Definition and drivers of acute traumatic coagulopathy: clinical and experimental investigations. *J Thromb Haemost*. 2010;8:1919–25.
4. Stanworth SJ, Davenport R, Curry N, Seeney F, Eaglestone S, Edwards A, et al. Mortality from trauma haemorrhage and opportunities for improvement in transfusion practice. *Br J Surg*. 2016;

5. Oshiro A, Yanagida Y, Gando S, Henzan N, Takahashi I, Makise H. Hemostasis during the early stages of trauma: comparison with disseminated intravascular coagulation. *Crit Care*. 2014;18:R61.
6. Dobson GP, Letson HL, Sharma R, Sheppard FR, Cap AP. Mechanisms of early trauma-induced coagulopathy: The clot thickens or not? *J Trauma Acute Care Surg*. 2015;79:301–9.
7. Hess JR, Brohi K, Dutton RP, Hauser CJ, Holcomb JB, Kluger Y, et al. The coagulopathy of trauma: a review of mechanisms. *J Trauma*. 2008;65:748–54.
8. Cohen MJ, Kutcher M, Redick B, Nelson M, Call M, Knudson MM, et al. Clinical and mechanistic drivers of acute traumatic coagulopathy. *J Trauma Acute Care Surg*. 2013;75:S40–7.
9. Xiao W, Mindrinos MN, Seok J, Cuschieri J, Cuenca AG, Gao H, et al. A genomic storm in critically injured humans. *J Exp Med*. 2011;208:2581–90.
10. Jacoby RC, Owings JT, Holmes J, Battistella FD, Gosselin RC, Paglieroni TG. Platelet Activation and Function after Trauma: The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care. 2001;51:639–47.
11. Wohlauer MV, Moore EE, Thomas S, Sauaia A, Evans E, Harr J, et al. Early Platelet Dysfunction: An Unrecognized Role in the Acute Coagulopathy of Trauma. *Journal of the American College of Surgeons*. 2012;214:739–46.
12. Kutcher ME, Redick BJ, McCreery RC, Crane IM, Greenberg MD, Cachola LM, et al. Characterization of platelet dysfunction after trauma: *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. 2012;73:13–9.
13. Furay EJ, Daley MJ, Teixeira PG, Coopwood TB, Aydelotte JD, Malesa N, et al. Goal Directed Platelet Transfusions Correct Platelet Dysfunction and May Improve Survival in Patients with Severe Traumatic Brain Injury: *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. 2018;1.
14. George MJ, Burchfield J, MacFarlane B, Wang Y-WW, Cardenas JC, White NJ, et al. Multiplate and TEG platelet mapping in a population of severely injured trauma patients: Multiplate and TEG platelet mapping in trauma. *Transfusion Medicine [Internet]*. 2017 [cited 2017 Oct 5]; Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/tme.12473>
15. Gangloff C, Grimault O, Theron M, Pichavant K, Galinat H, Mingant F, et al. A clinically relevant and bias-controlled murine model to study acute traumatic coagulopathy. *Scientific Reports [Internet]*. 2018 [cited 2018 May 23];8. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-018-24225-1>
16. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [Internet]. National Research Council of the

- National Academies. 2011. Available from: <https://grants.nih.gov/grants/olaw/guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals.pdf>
17. Wilson M, Davis DP, Coimbra R. Diagnosis and monitoring of hemorrhagic shock during the initial resuscitation of multiple trauma patients: a review. *The Journal of Emergency Medicine*. 2003;24:413–22.
 18. Rocha Filho JA, Nani RS, D’Albuquerque LAC, Malbouisson LMS, Carmona MJC, Rocha-e-Silva M, et al. Potassium in Hemorrhagic Shock: A Potential Marker of Tissue Hypoxia: The *Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care*. 2010;68:1335–41.
 19. Lancé MD, Ninivaggi M, Schols SEM, Feijge MAH, Oehrl SK, Kuiper GJAJM, et al. Perioperative dilutional coagulopathy treated with fresh frozen plasma and fibrinogen concentrate: a prospective randomized intervention trial: Dilutional coagulopathy treated with FFP and fibrinogen. *Vox Sanguinis*. 2012;103:25–34.
 20. Tripodi A. Thrombin Generation Assay and Its Application in the Clinical Laboratory. *Clinical Chemistry*. 2016;62:699–707.
 21. Lancé MD. A general review of major global coagulation assays: thrombelastography, thrombin generation test and clot waveform analysis. *Thrombosis journal*. 2015;13:1.
 22. Hemker H. Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system. 2008;
 23. Martini WZ, Cortez DS, Dubick MA, Blackbourne LH. Different recovery profiles of coagulation factors, thrombin generation, and coagulation function after hemorrhagic shock in pigs: *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. 2012;73:640–7.
 24. Rocksén D, Gryth D, Druid H, Gustavsson J, Arborelius UP. Pathophysiological effects and changes in potassium, ionised calcium, glucose and haemoglobin early after severe blunt chest trauma. *Injury*. 2012;43:632–7.
 25. Howard BM, Miyazawa BY, Dong W, Cedron WJ, Vilardi RF, Ruf W, et al. The tissue factor pathway mediates both activation of coagulation and coagulopathy after injury: *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. 2015;79:1009–14.
 26. Löfberg M, Tähtelä R, Häkkinen M, Somer H. Myosin heavy-chain fragments and cardiac troponins in the serum in rhabdomyolysis: diagnostic specificity of new biochemical markers. *Archives of neurology*. 1995;52:1210–1214.
 27. Guerrero M, Guiu-Comadell M, Cadefau JA, Parra J, Balius R, Estruch A, et al. Fast and slow myosins as markers of muscle injury. *British Journal of Sports Medicine*. 2008;42:581–4.
 28. Huerta-Alardín AL, Varon J, Marik PE. Bench-to-bedside review: Rhabdomyolysis—an overview for clinicians. *Critical care*. 2004;9:158.
 29. Terkildsen JR, Crampin EJ, Smith NP. The balance between inactivation and activation of

- the Na⁺-K⁺ pump underlies the triphasic accumulation of extracellular K⁺ during myocardial ischemia. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*. 2007;293:H3036–45.
30. Ashcroft SJ, Ashcroft FM. Properties and functions of ATP-sensitive K-channels. *Cellular signalling*. 1990;2:197–214.
 31. Buckley J, Singer M, Clapp L. Role of KATP channels in sepsis. *Cardiovascular Research*. 2006;72:220–30.
 32. Lange M, Morelli A, Westphal M. Inhibition of potassium channels in critical illness. *Current Opinion in Anesthesiology*. 2008;21:105–110.
 33. Evgenov OV, Pacher P, Williams W, Evgenov NV, Mabley JG, Cicila J, et al. Parenteral administration of glipizide sodium salt, an inhibitor of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels, prolongs short-term survival after severe controlled hemorrhage in rats*: *Critical Care Medicine*. 2003;31:2429–36.
 34. Matijevic N, Wang Y-WW, Wade CE, Holcomb JB, Cotton BA, Schreiber MA, et al. Cellular microparticle and thrombogram phenotypes in the Prospective Observational Multicenter Major Trauma Transfusion (PROMMTT) Study: Correlation with coagulopathy. *Thrombosis Research*. 2014;134:652–8.
 35. Deguchi H, Sinha RK, Marchese P, Ruggeri ZM, Zilberman-Rudenko J, McCarty OJT, et al. Prothrombotic skeletal muscle myosin directly enhances prothrombin activation by binding factors Xa and Va. *Blood*. 2016;128:1870–8.
 36. Duchemin J. influence of coagulation factors and tissue factor concentration on the thrombin generation test in plasma. *Thromb Heamost*. 2008;
 37. Al Dieri R, de Laat B, Hemker HC. Thrombin generation: What have we learned? *Blood Reviews*. 2012;26:197–203.
 38. Park MS, Spears GM, Bailey KR, Xue A, Ferrara MJ, Headlee A, et al. Thrombin generation profiles as predictors of symptomatic venous thromboembolism after trauma: A prospective cohort study. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. 2017;83:381–7.
 39. Morris RS, Schaffer BS, Lundy JB, Pidcock HF, Chung KK, Darlington DN, et al. Immunopathological response to severe injury: platelet activation and the Th-17 immune response. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 2017;1.
 40. Seshadri A, Brat GA, Yorkgitis BK, Keegan J, Dolan J, Salim A, et al. Phenotyping the Immune Response to Trauma: A Multiparametric Systems Immunology Approach*. *Critical Care Medicine*. 2017;45:1523–30.
 41. Lenz A, Franklin GA, Cheadle WG. Systemic inflammation after trauma. *Injury*. 2007;38:1336–45.
 42. Nast-Kolb D, Aufmkolk M, Rucholtz S, Obertacke U, Waydhas C. Multiple organ failure

still a major cause of morbidity but not mortality in blunt multiple trauma. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. 2001;51:835–842.

43. Gando S, Sawamura A, Hayakawa M. Trauma, Shock, and Disseminated Intravascular Coagulation: Lessons from the Classical Literature. *Annals of Surgery*. 2011;254:10–9.

44. Owen HC, Torrance HDT, Jones TF, Pearse RM, Hinds CJ, Brohi K, et al. Epigenetic regulatory pathways involving microRNAs may modulate the host immune response following major trauma: *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. 2015;79:766–72.

45. Osborn TM, Tracy JK, Dunne JR, Pasquale M, Napolitano LM. Epidemiology of sepsis in patients with traumatic injury: *Critical Care Medicine*. 2004;32:2234–40.

Conclusion

Dans cette seconde étude, nous avons mis en évidence une ATC dans le groupe associant un traumatisme et une hémorragie. Ces résultats confortent ceux de notre première expérimentation, confirmant ainsi la reproductibilité du modèle. Le groupe contrôle présentait une diminution de génération de thrombine expliquée par l'incision cervicale, la trachéostomie et à la catheterisation. Il a été observé dans le groupe TH une thrombopénie non cliniquement significative et un ETP similaire en début et en fin de procédure, infirmant l'hypothèse d'une CIVD. De même, aucune diminution significative de fonction plaquettaire n'a été observée dans le groupe TH, infirmant l'hypothèse d'une parésie plaquettaire nécessaire à la genèse d'une ATC. En revanche L'association d'une hypofibrinogénémie, d'une génération de thrombine normale et d'un phénotype hémorragique signait l'existence d'une fibrinolyse médiée par l'aPC dans le groupe TH. L'observation d'ETP paradoxalement normaux dans ce groupe suggérant un effet protecteur du facteur tissulaire et de la myosine. En effet, une augmentation des concentrations sériques de ces deux protéines est généralement constatée en cas de traumatisme sévère (118). La myosine forme un complexe ternaire favorisant l'action des facteur Va et Xa (119) et le facteur tissulaire limite la baisse d'ETP liée à une consommation du facteur X (120). La préservation de la capacité du système à générer de la thrombine en dépit d'une activation de la fibrinolyse constituerait ainsi un moyen de limiter la mortalité en contexte post-traumatique.

Conclusion générale

Deux études animales ont été réalisées durant cette thèse. La première nous a permis d'établir un modèle murin reproductible et fiable de coagulopathie aigue traumatique. Sa mise au point a nécessité l'exclusion des facteurs aspécifiques de coagulopathie et le contrôle de biais potentiels. Les troubles de la coagulation reproduits dans ce modèle répondaient à tous les critères d'une ATC. Les résultats de notre seconde étude portant sur la physiopathologie de l'ATC étaient compatibles avec l'hypothèse d'une activation de la fibrinolyse liée à une production excessive d'aPC et favorisée par la diminution des stocks en fibrinogène mais pas avec celle d'une CIVD fibrinolytique ou d'une parésie plaquettaire. De plus, nous avons observé une préservation de génération de thrombine pouvant être expliquée par un effet protecteur du facteur tissulaire et de la myosine. Ces résultats renforcent la thèse d'une activation de la voie de la protéine C développée par Brohi *et al en 2007 (29)*. Nous proposons une conception actualisée de la physiopathologie de l'ATC à l'issue des travaux réalisée durant cette thèse figure 40. La faible masse sanguine de ces animaux n'a cependant pas permis d'évaluer l'ensemble des voies impliquées dans la physiopathologie de l'ATC. Pour s'affranchir de cette contrainte, une étude transcriptomique est en cours de réalisation au sein du laboratoire ORPHY. Celle-ci vise à déterminer les clusters de gènes sur- ou sous-exprimés par l'analyse des ARN messagers en contexte d'ATC. Ce type d'analyse a la particularité d'intéresser l'ensemble du transcriptôme et ne nécessite que de très faibles volumes d'échantillons sanguins. Les données issues de cette expérimentation nous permettront de confronter les hypothèses émises lors de ce travail de thèse et d'appréhender cette entité physiopathologique complexe sous l'angle d'une dysrégulation des interactions entre hémostase et immunité.

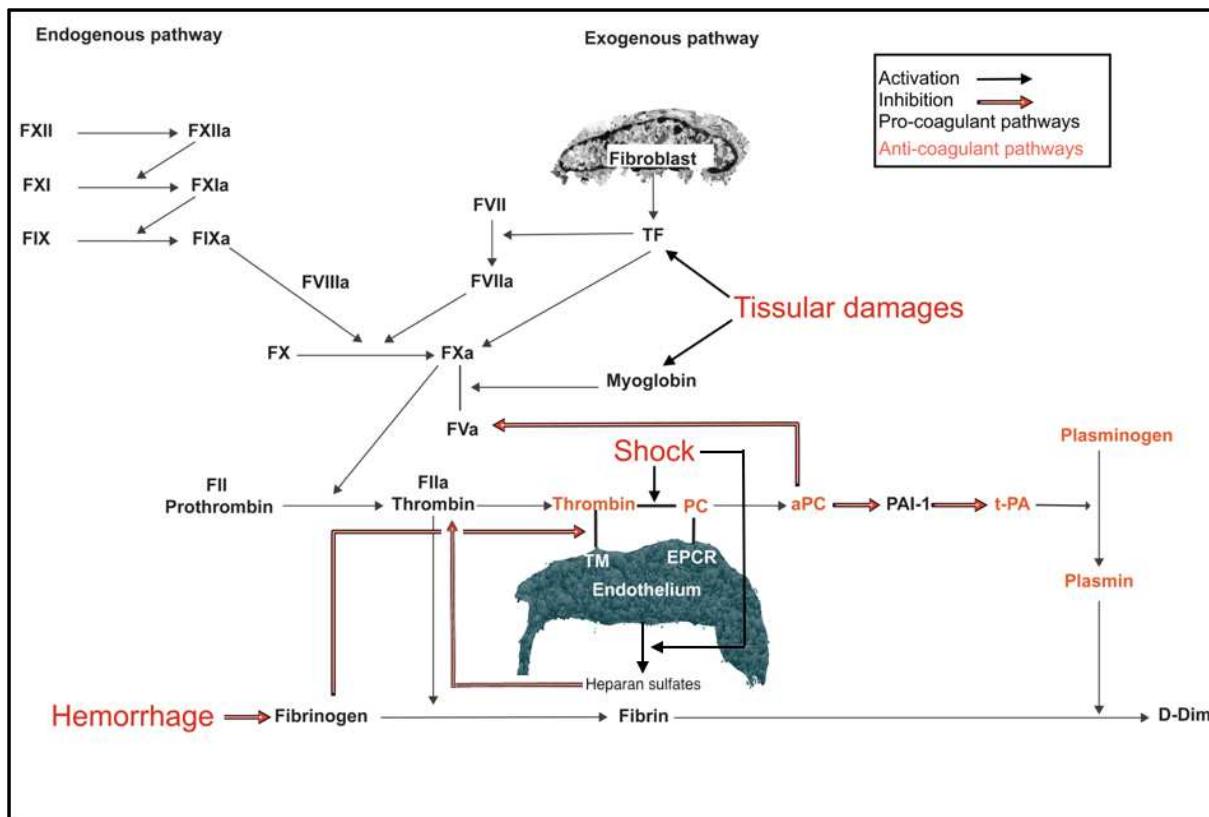


Figure 40: Mise en perspective des résultats issus des études réalisées lors de ce travail de thèse et des données bibliographiques concernant la physiopathologie de l'ATC. L'état de choc entraîne une agression endothéliale et l'exposition d'héparanes-sulfates réprimant la formation de thrombine. La baisse de clairance de la thrombine dans les tissus hypoperfusés favorise la production d'aPC en favorisant les interactions entre thrombine et thrombomoduline. L'hémorragie entraîne une déplétion des stocks de fibrinogène et favorise également la formation d'aPC par levée d'inhibition compétitive sur les interactions thrombine/thrombomoduline. Il en résulte une hyper-fibrinolyse traduite par l'expression d'un phénotype hémorragique. Les lésions tissulaires entraînent une augmentation des concentrations plasmatiques en TF et en myoglobine favorisant l'action des facteurs Va et Xa, préservant la génération de thrombine de l'action inhibitrice de l'aPC et des héparanes-sulfates. Ce mécanisme protecteur est susceptible d'expliquer l'observation d'une génération de thrombine normale à la phase précoce et l'expression d'un phénotype pro-thrombotique après traitement de l'état de choc et restauration des stocks de fibrinogène.

Bibliographie

1. Global, regional, and national age–sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. The Lancet: GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. 2015;385:117-71.
2. Cothren CC, Moore EE, Hedegaard HB, Meng K. Epidemiology of urban trauma deaths: a comprehensive reassessment 10 years later. World J Surg. juill 2007;31:1507-11.
3. Dutton RP, Stansbury LG, Leone S, Kramer E, Hess JR, Scalea TM. Trauma Mortality in Mature Trauma Systems: Are We Doing Better? An Analysis of Trauma Mortality Patterns, 1997–2008: The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care. sept 2010;69(3):620-6.
4. Libert N, Harrois A, Duranteau J. Haemodynamic coherence in haemorrhagic shock. Best Pract Res Clin Anaesthesiol. déc 2016;30:429-35.
5. Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. Nature. 4 mars 2010;464:104-7.
6. Xiao W, Mindrinos MN, Seok J, Cuschieri J, Cuenca AG, Gao H, et al. A genomic storm in critically injured humans. J Exp Med. 19 déc 2011;208:2581-90.
7. Theusinger OM, Baulig W, Seifert B, Müller SM, Mariotti S, Spahn DR. Changes in Coagulation in Standard Laboratory Tests and ROTEM in Trauma Patients Between On-Scene and Arrival in the Emergency Department: Anesthesia & Analgesia. mars 2015;120(3):627-35.
8. Engels PT, Rezende-Neto JB, Al Mahroos M, Scarpelini S, Rizoli SB, Tien HC. The Natural History of Trauma-Related Coagulopathy: Implications for Treatment: The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care. nov 2011;71:S448-55.
9. Maegele M, Lefering R, Yucel N, Tjardes T, Rixen D, Paffrath T, et al. Early coagulopathy in multiple injury: an analysis from the German Trauma Registry on 8724 patients. Injury. mars 2007;38:298-304.
10. Frith D, Goslings JC, Gaarder C, Maegele M, Cohen MJ, Allard S, et al. Definition and drivers of acute traumatic coagulopathy: clinical and experimental investigations. J Thromb Haemost. sept 2010;8:1919-25.
11. Rossaint R, Bouillon B, Cerny V, Coats TJ, Duranteau J, Fernandez-Mondejar E, et al. The European guideline on management of major bleeding and coagulopathy following trauma: fourth edition. Crit Care. 2016;20:100.
12. White NJ, Contaifer D, Martin EJ, Newton JC, Mohammed BM, Bostic JL, et al. Early Hemostatic Responses to Trauma: Identified Using Hierarchical Clustering Analysis. J Thromb

Haemost. 28 mars 2015;

13. Dobson GP, Letson HL, Sharma R, Sheppard FR, Cap AP. Mechanisms of early trauma-induced coagulopathy: The clot thickens or not? J Trauma Acute Care Surg. août 2015;79:301-9.
14. Wu X, Darlington DN, Cap AP. Procoagulant and fibrinolytic activity after polytrauma in rat. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 15 févr 2016;310:R323-9.
15. Darlington DN, Gonzales MD, Craig T, Dubick MA, Cap AP, Schwacha MG. Trauma-Induced Coagulopathy Is Associated with a Complex Inflammatory Response in the Rat. Shock. août 2015;44 Suppl 1:129-37.
16. Mann KG, Freeman K. TACTIC: Trans-Agency Consortium for Trauma-Induced Coagulopathy. J Thromb Haemost. juin 2015;13 Suppl 1:S63-71.
17. Frith D, Cohen MJ, Brohi K. Animal models of trauma-induced coagulopathy. Thromb Res. mai 2012;129:551-6.
18. Parr MJ, Bouillon B, Brohi K, Dutton RP, Hauser CJ, Hess JR, et al. Traumatic coagulopathy: where are the good experimental models? J Trauma. oct 2008;65:766-71.
19. van Zyl N, Reade MC, Fraser JF. Experimental Animal Models of Traumatic Coagulopathy: A Systematic Review. Shock. 17 mars 2015;
20. Versteeg HH, Heemskerk JWM, Levi M, Reitsma PH. New Fundamentals in Hemostasis. Physiological Reviews. janv 2013;93(1):327-58.
21. Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting. Science. 18 sept 1964;145(3638):1310-2.
22. Hoffman M, Monroe D. A Cell-based Model of Hemostasis. Thrombosis and Haemostasis. 2001;85(06):958-65.
23. Neal MD, Moore HB, Moore EE, Freeman K, Cohen MJ, Sperry JL, et al. Clinical assessment of trauma-induced coagulopathy and its contribution to postinjury mortality: A TACTIC proposal. J Trauma Acute Care Surg. sept 2015;79:490-2.
24. Gonzalez Rodriguez E, Cardenas JC, Lopez E, Cotton BA, Tomasek JS, Ostrowski SR, et al. Early Identification of the Patient with Endotheliopathy of Trauma by Arrival Serum Albumin: SHOCK. juill 2018;50(1):31-7.
25. Laursen TH, Meyer MAS, Meyer ASP, Gaarder T, Naess PA, Stensballe J, et al. Thrombelastography early amplitudes in bleeding and coagulopathic trauma patients: Results from a multicenter study. Journal of Trauma and Acute Care Surgery. févr 2018;84(2):334-41.
26. Oshiro A, Yanagida Y, Gando S, Henzan N, Takahashi I, Makise H. Hemostasis during the early stages of trauma: comparison with disseminated intravascular coagulation. Crit Care.

2014;18:R61.

27. Gando S, Wada H, Thachil J, Scientific, Standardization Committee on DIC of the IS on T, Haemostasis. Differentiating disseminated intravascular coagulation (DIC) with the fibrinolytic phenotype from coagulopathy of trauma and acute coagulopathy of trauma-shock (COT/ACOTS). *J Thromb Haemost*. mai 2013;11:826-35.
28. Brohi K. Acute coagulopathy of trauma: hypoperfusion induces systemic anticoagulation and hyperfibrinolysis. *Journal of trauma*. 2008;64:1211-7.
29. Brohi K, Cohen MJ, Ganter MT, Matthay MA, Mackersie RC, Pittet J-F. Acute Traumatic Coagulopathy: Initiated by Hypoperfusion: Modulated Through the Protein C Pathway? *Annals of Surgery*. mai 2007;245(5):812-8.
30. Spahn DR, Bouillon B, Cerny V, Coats TJ, Duranteau J, Fernandez-Mondejar E, et al. Management of bleeding and coagulopathy following major trauma: an updated European guideline. *Crit Care*. 2013;17:R76.
31. Calland JF, Ingraham AM, Martin N, Marshall GT, Schulman CI, Stapleton T, et al. Evaluation and management of geriatric trauma: An Eastern Association for the Surgery of Trauma practice management guideline. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. nov 2012;73:S345-50.
32. Kunitake RC, Kornblith LZ, Cohen MJ, Callcut RA. Trauma Early Mortality Prediction Tool (TEMPT) for assessing 28-day mortality. *Trauma Surgery & Acute Care Open*. janv 2018;3(1):e000131.
33. Perkins JG, Cap AP, Weiss BM, Reid TJ, Bolan CE. Massive transfusion and nonsurgical hemostatic agents: *Critical Care Medicine*. juill 2008;36(Suppl):S325-39.
34. Moyer J, Shah J, Nowakowski K. Does Antithrombotic Drug Use Mandate Trauma Team Activation in Awake Geriatric Patients with Intracr.pdf. *Am Surg*. 2018;1(84(7)):1180-4.
35. Udayachalerm S, Rattanasiri S, Angkananard T, Attia J, Sansanayudh N, Thakkinstian A. The Reversal of Bleeding Caused by New Oral Anticoagulants (NOACs): A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 3 sept 2018;107602961879633.
36. McMillian WD, Rogers FB. Management of Prehospital Antiplatelet and Anticoagulant Therapy in Traumatic Head Injury: A Review: *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care*. mars 2009;66(3):942-50.
37. Reynolds B, Forsythe R, Cuschieri J. Hypothermia in massive transfusion have we been paying enough attention to it ? *J Trauma Acute Care Surg*. 2012;73(2):486-91.
38. Ehrl D, Heidekrueger PI, Rubenbauger J, Ninkovic M, Broer PN. Impact of Prehospital

Hypothermia on the Outcomes of Severely Burned Patients. Journal of Burn Care & Research. 17 août 2018;39(5):739-43.

39. Shaw GJ, Dhamija A, Bavani N, Wagner KR, Holland CK. Arrhenius temperature dependence of in vitro tissue plasminogen activator thrombolysis. Physics in Medicine and Biology. 7 juin 2007;52(11):2953-67.
40. Briot R, Brun J, Debatty G, Koch F-X, Torres J-P, Bach V, et al. Prise en charge d'un malade en hypothermie accidentelle. Réanimation. nov 2010;19(7):607-15.
41. Caspers M, Schäfer N, Fröhlich M, Bauerfeind U, Bouillon B, Mutschler M, et al. How do external factors contribute to the hypocoagulative state in trauma-induced coagulopathy? – In vitro analysis of the lethal triad in trauma. Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine [Internet]. déc 2018 [cité 22 oct 2018];26(1). Disponible sur: <https://sjtrem.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13049-018-0536-8>
42. Noel P, Cashen S, Patel B. Trauma-Induced Coagulopathy: From Biology to Therapy. Seminars in Hematology. juill 2013;50(3):259-69.
43. Martini WZ, Dubick MA, Pusateri AE, Park MS, Ryan KL, Holcomb JB. Does Bicarbonate Correct Coagulation Function Impaired by Acidosis in Swine?: The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care. juill 2006;61(1):99-106.
44. Suzuki N, Fujimoto Z, Morita T, Fukamizu A, Mizuno H. pH-Dependent Structural Changes at Ca²⁺-binding Sites of Coagulation Factor IX-binding Protein. Journal of Molecular Biology. oct 2005;353(1):80-7.
45. Meng ZH, Wolberg AS, Monroe DM, Hoffman M. The Effect of Temperature and pH on the Activity of Factor VIIa: Implications for the Efficacy of High-Dose Factor VIIa in Hypothermic and Acidotic Patients: The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care. nov 2003;55(5):886-91.
46. Nance M, Steward R, Rotondo M, Nathens AB. NTDB annual report 2015. American College of Surgeons Committee on Trauma Leadership. 2015;
47. Cotte J, Courjon F, Beaume S, Prunet B, Bordes J, N'Guyen C, et al. Vittel criteria for severe trauma triage: Characteristics of over-triage. Anaesthesia Critical Care & Pain Medicine. avr 2016;35(2):87-92.
48. Baker SP, O'Neill B, Haddon W, Long WB. The injury severity score: a method for describing patients with multiple injuries and evaluating emergency care. The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care. mars 1974;14(3):187-96.
49. Stewart RM. American College of Surgeons Committee on Trauma Leadership. 2016;147.

50. Wang G, Bainbridge D, Martin J, Cheng D. The Efficacy of an Intraoperative Cell Saver During Cardiac Surgery: A Meta-Analysis of Randomized Trials: Anesthesia & Analgesia. août 2009;109(2):320-30.
51. Prist R, Rocha-e-Silva M, Scalabrini A, Coelho J, Franca V, Meneghetti C, et al. A quantitative analysis of transcapillary refill in severe hemorrhagic hypotension in dogs. Shock. 1994;1(3):188-95.
52. Wilson M, Davis DP, Coimbra R. Diagnosis and monitoring of hemorrhagic shock during the initial resuscitation of multiple trauma patients: a review. The Journal of Emergency Medicine. mai 2003;24(4):413-22.
53. Davis JW, Dirks RC, Kaups KL, Tran P. Base deficit is superior to lactate in trauma. The American Journal of Surgery. avr 2018;215(4):682-5.
54. American College of Surgeons Committee on Trauma. ATLS® Student Manual 9th Edition. American College of Surgeons; 2012.
55. Davenport RA, Guerreiro M, Frith D, Rourke C, Platton S, Cohen M, et al. Activated Protein C Drives the Hyperfibrinolysis of Acute Traumatic Coagulopathy. Anesthesiology. janv 2017;126:115-27.
56. Letson H, Dobson G. 7.5% NaCl Resuscitation Leads to Abnormal Clot Fibrinolysis after Severe Hemorrhagic Shock and its Correction with 7.5% NaCl Adenosine, Lidocaine, and Mg²⁺. Journal of Emergencies, Trauma, and Shock. 2018;11(1):15.
57. Gando S, Mayumi T, Ukai T. Activated protein C plays no major roles in the inhibition of coagulation or increased fibrinolysis in acute coagulopathy of trauma-shock: a systematic review. Thrombosis Journal [Internet]. déc 2018 [cité 26 oct 2018];16(1). Disponible sur: <https://thrombosisjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12959-018-0167-3>
58. Johansson PI, Sørensen A, Perner A, Welling K, Wanscher M, Larsen CF, et al. Disseminated intravascular coagulation or acute coagulopathy of trauma shock early after trauma? An observational study. Critical Care. 2011;15(6):R272.
59. Yanagida Y, Gando S, Sawamura A, Hayakawa M, Uegaki S, Kubota N, et al. Normal prothrombinase activity, increased systemic thrombin activity, and lower antithrombin levels in patients with disseminated intravascular coagulation at an early phase of trauma: Comparison with acute coagulopathy of trauma-shock. Surgery. juill 2013;154(1):48-57.
60. Campbell JE, Meledeo MA, Cap AP. Comparative Response of Platelet fV and Plasma fV to Activated Protein C and Relevance to a Model of Acute Traumatic Coagulopathy. Lenting PJ, éditeur. PLoS ONE. 12 juin 2014;9(6):e99181.
61. Howard BM, Kornblith LZ, Cheung CK, Kutcher ME, Miyazawa BY, Vilardi RF, et al. Inducing Acute Traumatic Coagulopathy In Vitro: The Effects of Activated Protein C on

Healthy Human Whole Blood. PLoS One. 2016;11:e0150930.

62. Effects of tranexamic acid on death, vascular occlusive events, and blood transfusion in trauma patients with significant haemorrhage (CRASH-2): a randomised, placebo-controlled trial. *The Lancet*. juill 2010;376(9734):23-32.
63. Yazer MH, Spinella PC, Allard S, Roxby D, So-Osman C, Lozano M, et al. Vox Sanguinis International Forum on the use of prehospital blood products and pharmaceuticals in the treatment of patients with traumatic haemorrhage. *Vox Sanguinis*. oct 2018;113(7):701-6.
64. Gayet-Ageron A, Prieto-Merino D, Ker K, Shakur H, Ageron F-X, Roberts I, et al. Effect of treatment delay on the effectiveness and safety of antifibrinolytics in acute severe haemorrhage: a meta-analysis of individual patient-level data from 40 138 bleeding patients. *The Lancet*. janv 2018;391(10116):125-32.
65. Gando S, Sawamura A, Hayakawa M. Trauma, Shock, and Disseminated Intravascular Coagulation: Lessons from the Classical Literature. *Annals of Surgery*. juill 2011;254(1):10-9.
66. Adrie C, Laurent I, Monchi M, Cariou A, Dhainaut J-F, Spaulding C. Postresuscitation disease after cardiac arrest: a sepsis-like syndrome?: *Current Opinion in Critical Care*. juin 2004;10(3):208-12.
67. Simmons J, Pittet J-F. The coagulopathy of acute sepsis: *Current Opinion in Anaesthesiology*. avr 2015;28(2):227-36.
68. Lupu C, Herlea O, Tang H, Lijnen RH, Lupu F. Plasmin-dependent proteolysis of tissue factor pathway inhibitor in a mouse model of endotoxemia: *Plasmin proteolysis of TFPI in endotoxemia*. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. janv 2013;11(1):142-8.
69. Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM, Stafforini DM. The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis: *Critical Care Medicine*. mai 2002;30(Supplement):S294-301.
70. Levi M, Poll T. Coagulation in Patients with Severe Sepsis. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 15 janv 2015;41(01):009-15.
71. Faust SN, Levin M, Harrison OB, Goldin RD, Lockhart MS, Kondaveeti S, et al. Dysfunction of Endothelial Protein C Activation in Severe Meningococcal Sepsis. *New England Journal of Medicine*. 9 août 2001;345(6):408-16.
72. Levi M, van der Poll T, Büller HR. Bidirectional Relation Between Inflammation and Coagulation. *Circulation*. 8 juin 2004;109(22):2698-704.
73. Shimada K, Ozawa T, Kobayashi M. Human recombinant interleukin-1?- and tumor necrosis factor ?-mediated suppression of heparin-like compounds on cultured porcine aortic endothelial cells. *Journal of Cellular Physiology*. sept 1990;144(3):383-90.

74. Delabranche X, Helms J, Meziani F. Immunohaemostasis: a new view on haemostasis during sepsis. *Annals of Intensive Care* [Internet]. déc 2017 [cité 11 oct 2018];7(1). Disponible sur: <https://annalsofintensivecare.springeropen.com/articles/10.1186/s13613-017-0339-5>
75. Wada T, Gando S, Maekaw K, Katabami K, Sageshima H, Hayakawa M, et al. Disseminated intravascular coagulation with increased fibrinolysis during the early phase of isolated traumatic brain injury. *Critical Care* [Internet]. déc 2017 [cité 26 oct 2018];21(1). Disponible sur: <http://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13054-017-1808-9>
76. Gando S, Levi M, Toh C-H. Disseminated intravascular coagulation. *Nature Reviews Disease Primers*. 2 juin 2016;2:16037.
77. Fröhlich M, Schäfer N, Caspers M, Böhm JK, Stürmer EK, Bouillon B, et al. Temporal phenotyping of circulating microparticles after trauma: a prospective cohort study. *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine* [Internet]. déc 2018
78. Harr JN, Moore EE, Wohlauer MV, Droz N, Fragoso M, Banerjee A, et al. The Acute Coagulopathy of Trauma is Due to Impaired Initial Thrombin Generation but Not Clot Formation or Clot Strength. *Journal of Surgical Research* [Internet]. avr 2011 [cité 12 oct 2018]; Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022480411002861>
79. Dunbar NM, Chandler WL. Transfusion Practice: Thrombin generation in trauma patients. *Transfusion*. 4 août 2009;49(12):2652-60.
80. Chandler WL. Procoagulant Activity in Trauma Patients. *American Journal of Clinical Pathology*. juill 2010;134(1):90-6.
81. Taylor F, Toh C-H, Hoots K, Wada H, Levi M. Towards Definition, Clinical and Laboratory Criteria, and a Scoring System for Disseminated Intravascular Coagulation: On behalf of the Scientific Subcommittee on Disseminated Intravascular Coagulation (DIC) of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH). *Thrombosis and Haemostasis*. 2001;86(11):1327-30.
82. Diez N, Montes R, Alonso A, Medina P, Navarro S, Espana F, et al. Association of increased fibrinogen concentration with impaired activation of anticoagulant protein C. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. févr 2006;4(2):398-402.
83. De Cristofaro R, De Candia E. Thrombin Domains: Structure, Function and Interaction with Platelet Receptors. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. juin 2003;15(3):151-63.
84. Rourke C, Curry N, Khan S, Taylor R, Raza I, Davenport R, et al. Fibrinogen levels during trauma hemorrhage, response to replacement therapy, and association with patient outcomes: *Fibrinogen levels during trauma hemorrhage*. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. juill 2012;10(7):1342-51.
85. Schlimp CJ, Voelckel W, Inaba K, Maegele M, Schöchl H. Impact of fibrinogen

concentrate alone or with prothrombin complex concentrate (+/- fresh frozen plasma) on plasma fibrinogen level and fibrin-based clot strength (FIBTEM) in major trauma: a retrospective study. Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine. 2013;21(1):74.

86. Curry N, Foley C, Wong H, Mora A, Curnow E, Zarankaite A, et al. Early fibrinogen concentrate therapy for major haemorrhage in trauma (E-FIT 1): results from a UK multi-centre, randomised, double blind, placebo-controlled pilot trial. Critical Care [Internet]. déc 2018 [cité 26 oct 2018];22(1). Disponible sur: <https://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13054-018-2086-x>
87. Kutcher ME, Redick BJ, McCreery RC, Crane IM, Greenberg MD, Cachola LM, et al. Characterization of platelet dysfunction after trauma: Journal of Trauma and Acute Care Surgery. juill 2012;73(1):13-9.
88. Furay EJ, Daley MJ, Teixeira PG, Coopwood TB, Aydelotte JD, Malesa N, et al. Goal Directed Platelet Transfusions Correct Platelet Dysfunction and May Improve Survival in Patients with Severe Traumatic Brain Injury: Journal of Trauma and Acute Care Surgery. août 2018;1.
89. Wohlauer MV, Moore EE, Thomas S, Sauaia A, Evans E, Harr J, et al. Early Platelet Dysfunction: An Unrecognized Role in the Acute Coagulopathy of Trauma. Journal of the American College of Surgeons. mai 2012;214(5):739-46.
90. Solomon C, Traintinger S, Ziegler B, Hanke A, Rahe-Meyer N, Voelckel W, et al. Platelet function following trauma: A Multiple Electrode Aggregometry study. Thrombosis and Haemostasis. 2011;106(08):322-30.
91. Henriksen HH, Grand AG, Viggers S, Baer LA, Solbeck S, Cotton BA, et al. Impact of blood products on platelet function in patients with traumatic injuries: a translational study. Journal of Surgical Research. juin 2017;214:154-61.
92. Wu X, Darlington DN, Montgomery RK, Liu B, Keesee JD, Scherer MR, et al. Platelets derived from fresh and cold-stored whole blood participate in clot formation in rats with acute traumatic coagulopathy. British Journal of Haematology. déc 2017;179(5):802-10.
93. Atefi G, Aisiku O, Shapiro N, Hauser C, Dalle Lucca J, Flaumenhaft R, et al. Complement Activation in Trauma Patients Alters Platelet Function: SHOCK. sept 2016;46:83-8.
94. Donahue DL, Beck J, Fritz B, Davis P, Sandoval-Cooper MJ, Thomas SG, et al. Early Platelet Dysfunction in a Rodent Model of Blunt Traumatic Brain Injury Reflects the Acute Traumatic Coagulopathy Found in Humans. Journal of Neurotrauma. 15 févr 2014;31(4):404-10.

95. Kornblith LZ, Robles AJ, Conroy AS, Hendrickson CM, Calfee CS, Fields AT, et al. Perhaps it's not the platelet: Ristocetin uncovers the potential role of von Willebrand factor in impaired platelet aggregation following traumatic brain injury. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. nov 2018;85(5):873-80.
96. Jacoby RC, Owings JT, Holmes J, Battistella FD, Gosselin RC, Paglieroni TG. Platelet Activation and Function after Trauma: The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care. oct 2001;51(4):639-47.
97. Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MAMJ, oude Egbrink MGA. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. juin 2007;454(3):345-59.
98. Tkachenko E, Rhodes JM, Simons M. Syndecans: New Kids on the Signaling Block. *Circulation Research*. 18 mars 2005;96(5):488-500.
99. Vink H, Duling BR. Capillary endothelial surface layer selectively reduces plasma solute distribution volume. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. janv 2000;278(1):H285-9.
100. van Haaren PMA, VanBavel E, Vink H, Spaan JAE. Localization of the permeability barrier to solutes in isolated arteries by confocal microscopy. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. déc 2003;285(6):H2848-56.
101. Wada T, Gando S, Mizugaki A, Kodate A, Sadamoto Y, Murakami H, et al. Differences in coagulofibrinolytic changes between post-cardiac arrest syndrome of cardiac causes and hypoxic insults: a pilot study. *Acute Medicine & Surgery*. juill 2017;4(3):371-2.
102. Oliver MG, Specian RD, Perry MA, Granger DN. Morphologic assessment of leukocyte-endothelial cell interactions in mesenteric venules subjected to ischemia and reperfusion. *Inflammation*. oct 1991;15(5):331-46.
103. Kurose I, Argenbright LW, Wolf R, Lianxi L, Granger DN. Ischemia/reperfusion-induced microvascular dysfunction: role of oxidants and lipid mediators. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. juin 1997;272(6):H2976-82.
104. Kupinski AM, Shah DM, Bell DR. Transvascular albumin flux in rabbit hindlimb after tourniquet ischemia. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. mars 1993;264(3):H901-8.
105. Beitl E, Banasova A. Nitric oxide elevation in polytrauma is driven by oxygen radicals. *Physiol Res*. 2017;30(66):561-5.
106. Ostrowski SR, Johansson PI. Endothelial glycocalyx degradation induces endogenous heparinization in patients with severe injury and early traumatic coagulopathy: *Journal of*

- Trauma and Acute Care Surgery. juill 2012;73(1):60-6.
107. Rehm M, Bruegger D, Christ F, Conzen P, Thiel M, Jacob M, et al. Shedding of the Endothelial Glycocalyx in Patients Undergoing Major Vascular Surgery With Global and Regional Ischemia. *Circulation*. 23 oct 2007;116(17):1896-906.
108. Haywood-Watson RJ, Holcomb JB, Gonzalez EA, Peng Z, Pati S, Park PW, et al. Modulation of Syndecan-1 Shedding after Hemorrhagic Shock and Resuscitation. McNeil P, éditeur. PLoS ONE. 19 août 2011;6(8):e23530.
109. Wade CE, Matijevic N, Wang Y-WW, Rodriguez EG, Lopez E, Ostrowski SR, et al. Absences of Endothelial Microvesicle Changes in the Presence of the Endotheliopathy of Trauma: SHOCK. avr 2018;1.
110. Guitton C, Gérard N, Sébille V, Bretonnière C, Zambon O, Villers D, et al. Early rise in circulating endothelial protein C receptor correlates with poor outcome in severe sepsis. *Intensive Care Medicine*. juin 2011;37(6):950-6.
111. Carlier L, Hunault G, Macchi L. Thrombin generation in plasma its assessment via the endogenous thrombin potential. *Thromb Res*. 1995;135(1):192-7.
112. Solomon C, Baryshnikova E, Schlimp CJ, Schöchl H, Asmis LM, Ranucci M. FIBTEM PLUS Provides an Improved Thromboelastometry Test for Measurement of Fibrin-Based Clot Quality in Cardiac Surgery Patients: Anesthesia & Analgesia. nov 2013;117(5):1054-62.
113. Choi PA, Parry PV, Bauer JS, Zusman BE, Panczykowski DM, Puccio AM, et al. Use of Aspirin and P2Y12 Response Assays in Detecting Reversal of Platelet Inhibition With Platelet Transfusion in Patients With Traumatic Brain Injury on Antiplatelet Therapy: Neurosurgery. août 2016;1.
114. Shupp JW, Brummel-Ziedins KE, Cohen MJ, Freeman K, Hammamieh R, Mudunuri US, et al. Military Supplement: Assessment of Coagulation Homeostasis in Blunt, Penetrating, and Thermal Trauma. *SHOCK*. oct 2018;1.
115. Tripodi A. Thrombin Generation Assay and Its Application in the Clinical Laboratory. *Clinical Chemistry*. 1 mai 2016;62(5):699-707.
116. Meledeo MA, Herzig MC, Bynum JA, Wu X, Ramasubramanian AK, Darlington DN, et al. Acute traumatic coagulopathy: The elephant in a room of blind scientists. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. juin 2017;82:S33-40.
117. Gangloff C, Grimault O, Theron M, Pichavant K, Galinat H, Mingant F, et al. A clinically relevant and bias-controlled murine model to study acute traumatic coagulopathy. *Scientific Reports [Internet]*. déc 2018 [cité 23 mai 2018];8(1). Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/s41598-018-24225-1>
118. Rocha Filho JA, Nani RS, D'Albuquerque LAC, Malbouisson LMS, Carmona MJC,

- Rocha-e-Silva M, et al. Potassium in Hemorrhagic Shock: A Potential Marker of Tissue Hypoxia: The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care. juin 2010;68(6):1335-41.
119. Deguchi H, Sinha RK, Marchese P, Ruggeri ZM, Zilberman-Rudenko J, McCarty OJT, et al. Prothrombotic skeletal muscle myosin directly enhances prothrombin activation by binding factors Xa and Va. Blood. 6 oct 2016;128(14):1870-8.
120. Duchemin J. influence of coagulation factors and tissue factor concentration on the thrombin generation test in plasma. Thromb Heamost. 2008;

Titre : Physiopathologie de la coagulopathie aigüe traumatique

Mots clés : traumatisme, choc, coagulation

Résumé : Une coagulopathie aigüe traumatique est constatée chez environ un tiers des patients traumatisés sévères. Ce trouble précoce, endogène et spécifique nécessite l'association d'importantes lésions tissulaires et d'une hémorragie. La phase initiale est caractérisée par l'expression d'un phénotype hémorragique responsable d'une mortalité précoce, la phase tardive par l'expression d'un profil pro-thrombotique responsable d'une mortalité retardée. La physiopathologie de ce phénomène est encore mal comprise. Celle-ci pourrait impliquer une dysrégulation de la voie de la protéine C, une CIVD fibrinolytique, une diminution des stocks en fibrinogène, une altération de la fonction plaquettaire et une agression endothéliale. Plusieurs auteurs ont relevé l'absence de modèle animal pertinent pour vérifier ces hypothèses. Les objectifs de ce travail de thèse ont été la mise au point d'un modèle animal de coagulopathie aigüe traumatique et l'étude de sa physiopathologie.

Une première étude a été réalisée, permettant la mise au point d'un modèle murin de coagulopathie traumatique. Celle-ci a mis en évidence un trouble de la coagulation précoce, endogène et spécifique associé à l'expression d'un phénotype hémorragique et répondant à tous les critères clinico-biologiques d'une coagulopathie aigüe traumatique. Une deuxième étude basée sur ce modèle a été réalisée afin de mettre en évidence les mécanismes généraux intervenant dans la physiopathologie de la coagulopathie aigüe traumatique. Le rôle protecteur du fibrinogène a été confirmé dans cette étude. Le profil clinico-biologique observé associait une génération de thrombine normale, une discrète thrombopénie et un phénotype hémorragique. Celui-ci infirmait l'hypothèse d'une CIVD mais était compatible avec celle d'une fibrinolyse médiée par une production accrue de protéine C activée.

Title : Acute traumatic coagulopathy

Keywords : trauma, shock, coagulopathy

Abstract : An acute traumatic coagulopathy is observed in about one-third of severely traumatized patients. This early, endogenous and specific disorder occurs when tissue damages are combined with hemorrhage. The early phase of this condition is characterized by the expression of a bleeding phenotype and a lengthening in prothrombin time. The late phase is characterized by a pro-thrombotic profile leading to multiple organ failure. The physiopathology of this phenomenon is still poorly understood. This could involve a dysregulation of the protein C pathway, fibrinolytic DIC, a decrease in fibrinogen, impairment in platelet function and endothelial damages. Various authors have emphasized the lack of relevant animal model to study this phenomenon.

The objective of this work was to develop an animal model of acute traumatic coagulopathy to study its pathophysiology. A first study was performed and led to the development of a murine model of traumatic coagulopathy. This study revealed a hemostasis disorder that meets all the criteria of acute traumatic coagulopathy. Then, a second study based on this model was performed to observe general hemostasis disorders occurring in the context of trauma-associated hemorrhage. This study confirmed the protective role of fibrinogen against ATC. The clinicalbiological profile observed in the case of ATC combining normal thrombin generation, subtle thrombocytopenia and hemorrhagic phenotype observed in the case of ATC invalidated the hypothesis of DIC but was compatible with fibrinolysis mediated by an increase in activated protein C.