



HAL
open science

Utilisation du facteur VII recombinant activé pour contrôler le saignement en chirurgie cardiaque : études cliniques observationnelles et études expérimentales

Marion Durand

► **To cite this version:**

Marion Durand. Utilisation du facteur VII recombinant activé pour contrôler le saignement en chirurgie cardiaque : études cliniques observationnelles et études expérimentales. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2010. Français. NNT : 2010NAN10079 . tel-01746337

HAL Id: tel-01746337

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01746337>

Submitted on 29 Mar 2018

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Marion DURAND**

**UTILISATION DU FACTEUR VII RECOMBINANT ACTIVE POUR
CONTROLLER LE SAIGNEMENT EN CHIRURGIE CARDIAQUE :
Etudes cliniques observationnelles et études expérimentales**

Le 12 Novembre 2010

Membres du jury :

| | | |
|----------------------|--------------------------------------|---|
| Rapporteurs : | Madame Sophie SUSEN | MCU-PH, Hématologie Biologique, Lille, |
| | Monsieur André VINCENTELLI | PU-PH, Chirurgie Cardiaque, Lille |
| Examineurs : | Monsieur Olivier BASTIEN | PU-PH, Anesthésie-Réanimation, Lyon |
| | Monsieur Gilles GROSDIDIER | PU-PH, Chirurgie Thoracique, Nancy |
| | Monsieur Jean-François HARDY | MD-PhD, Anesthésie-Réanimation, Montréal |
| | Monsieur Thomas LECOMPTE | PU-PH, Inserm U734-U961 Nancy Université, directeur de thèse |
| | Monsieur Jean-Pierre CARTEAUX | PU-PH, Chirurgie Cardiaque, co-directeur de thèse |

**INSERM U734, « Nouvelles approches anti thrombotiques », UHP-Nancy 1, Faculté de
Médecine 9, Avenue de la Forêt de Haye 54500 Vandoeuvre-Les-Nancy**

Remerciements

Aux membres du jury,

Aux collaborateurs et amis :

Du laboratoire de Chirurgie Expérimentale,

De l'Animalerie (et leurs locataires à poils blancs),

De l'U734,

De Genclis,

Des Services de Chirurgie Cardiaque, Thoracique, d'Anatomopathologie et d'Hématologie
Biologique du CHU de Nancy,

Et plus particulièrement à Thomas Lecompte et Anne Godier pour leur aide précieuse.

Abréviations

AAS : Acide Acétylsalicylique

AT : Antithrombine

CCP : Concentré de Complexe Prothrombinique

CCV : Chirurgie Cardio-Vasculaire

CEC : Circulation Extra Corporelle

DS : Durée de Saignement

ET : Evènement Thrombotique

FT : Facteur Tissulaire

FVW : Facteur von Willebrand

GPIb : Glycoprotéine Ib

GPIIb/IIIa : Glycoprotéine IIb/IIIa

HNF : Héparine Non Fractionnée

MSP : Masse de Sang Perdu

PSL : Produits Sanguins Labiles

Quick : Temps de Quick

rFVIIa : Facteur VII recombinant activé (humain)

t-PA : Tissue Plasminogen Activator

TAFI : Thrombin Activable Fibrinolysis Inhibitor

TCA : Temps de Céphaline plus Activateur

TCoA : Temps de coagulation Activée

TEG : Thromboélastogramme

TFPI : Tissue Factor Pathway Inhibitor

TIH : Thrombopénie Induite par l'Héparine

TS : Temps de saignement

ROTEM : Rotative Thromboelastometry

SFAR : Société Française d'Anesthésie Réanimation

SFCTCV : Société Française de Chirurgie Cardio-Thoracique et Vasculaire

VCF : Variations Cycliques de Flux

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|-----------|
| Remerciements | 2 |
| Abréviations | 3 |
| Introduction | 6 |
| Notions essentielles d'hémostase physiologique | 9 |
| Les acteurs de l'hémostase..... | 9 |
| <i>Les glycoprotéines plasmatiques</i> | 9 |
| <i>La thrombine</i> | 10 |
| <i>Les cellules endothéliales</i> | 11 |
| <i>Le facteur tissulaire</i> | 12 |
| <i>Les plaquettes</i> | 13 |
| <i>Les principaux inhibiteurs plasmatiques de la coagulation</i> | 14 |
| Conception moderne..... | 15 |
| Mécanismes d'action du rFVIIa - médicament | 18 |
| Structure et fonction | 18 |
| La voie FT dépendante..... | 19 |
| La voie FT indépendante..... | 20 |
| rFVIIa et thrombinographie | 20 |
| Le saignement en chirurgie cardiovasculaire | 23 |
| Ampleur du problème | 23 |
| Contexte - mécanismes | 23 |
| Origine du saignement | 26 |
| Situations particulières à risque élevé..... | 28 |
| « Monitoring » du saignement | 29 |
| « <i>Monitoring</i> » conventionnel..... | 30 |
| « <i>Monitoring</i> » non conventionnel..... | 31 |
| Arsenal thérapeutique en CCV | 33 |
| <i>Antifibrinolytiques</i> | 33 |
| <i>Desmopressine</i> | 34 |
| <i>Concentrés de complexes prothrombiniques</i> | 34 |
| <i>Autre</i> | 35 |
| Présentation du travail de thèse | 36 |
| Etudes cliniques | 37 |
| Publication 1 : case report..... | 40 |
| Observatoire national..... | 42 |
| <i>Objectif de l'observatoire</i> | 42 |
| <i>Population concernée</i> | 42 |
| <i>Origine et nature des données recueillies</i> | 42 |
| <i>Durée et modalités d'organisation</i> | 44 |
| <i>Conduite du projet</i> | 44 |
| <i>Recueil et centralisation des données</i> | 45 |
| <i>Aspects réglementaires</i> | 45 |
| <i>Résultats</i> | 45 |
| <i>Communications des résultats</i> | 46 |
| Publication 2 : article original soumis (Juin 2010) | 48 |
| Expérimentations animales | 66 |
| Choix de l'animal | 66 |
| Modèle de Folts..... | 68 |

| | |
|---|------------|
| Collaboration inter-laboratoire | 74 |
| Publication 3 : lettre à l'éditeur | 75 |
| Modèle d'hémorragie artérielle aiguë..... | 77 |
| <i>Mise en place du modèle</i> | 78 |
| <i>Protocole « PHJ »</i> | 80 |
| <i>Communications des résultats</i> | 83 |
| Publication 4 : article original | 84 |
| Discussion générale | 90 |
| Intérêt clinique | 90 |
| Modèle animal..... | 96 |
| Conclusions et perspectives | 100 |
| Références..... | 103 |

Introduction

L'hémorragie en chirurgie cardiaque est une complication non exceptionnelle et sérieuse. En effet, une perte sanguine supérieure à 2 L dans les 24 premières heures concerne de 5 à 7 % des patients¹ et la reprise chirurgicale pour hémostase concerne 5 % des opérés². La prise en charge du saignement nécessite la correction des troubles mis en évidence par des tests de laboratoire (transfusions de produits sanguin labiles ou PSL, administration de médicaments hémostatiques) et/ou la reprise chirurgicale précoce (décaillotage, hémostase mécanique). Les principales complications de l'hémorragie péri-opératoire sont une augmentation des durées de séjour en réanimation et d'hospitalisation ainsi qu'une diminution de la survie³.

Le facteur VII humain recombinant activé (rFVIIa, eptacog alpha, Novoseven®, Novonordisk A/S, Bagsvaerd, Denmark) est utilisé depuis le début des années 80 pour le traitement ou la prévention des hémorragies chez l'hémophile immunisé, porteur d'anticorps dirigés contre le facteur déficitaire (« inhibiteur »), VIII ou IX⁴.

Il est commercialisé en France depuis 1996 pour le traitement des hémorragies caractéristiques de l'hémophilie (diathèse hémorragipare constitutionnelle, génétiquement déterminée) avec inhibiteur. Des extensions d'indication ont été accordées en 1998 pour le traitement des hémorragies survenant chez des malades avec auto-anticorps dirigés contre le facteur VIII (pathologie souvent appelée « hémophilie acquise »); en 2004 pour le traitement des manifestations hémorragiques survenant au cours de la thrombasthénie de Glanzmann (pathologie plaquettaire constitutionnelle, génétiquement déterminée) quand des iso- ou allo-anticorps sont apparus, respectivement anti-GPIIb/IIIa et/ou anti-HLA, compromettant l'efficacité des transfusions plaquettaires; et enfin en cas de déficit constitutionnel en FVII. Compte tenu de la capacité hémostatique du produit dans les

situations rappelées ci-dessus et de l'absence de ressource thérapeutique dans certaines autres situations hémorragiques dramatiques, son usage hors AMM a eu tendance à s'étendre à des situations hémorragiques avec des anomalies de l'hémostase primaire (maladie de Willebrand)⁵, ou sans déficience préexistante de l'hémostase (coagulopathie acquise post-traumatique ou post-chirurgicale)^{6,7}.

La première publication en chirurgie cardio-vasculaire date de 1999⁸. A titre compassionnel, le rFVIIa a été utilisé dans certaines situations hémorragiques échappant aux thérapeutiques classiques au décours de la circulation extra-corporelle (CEC) après neutralisation de l'héparine par la protamine. Des observations cliniques avec utilisation du produit ont été interprétées comme compatibles avec un effet hémostatique (diminution du saignement et des transfusions) sans augmentation manifeste d'accidents thrombotiques. Bien que non évalué strictement dans ce type de contexte, le risque thrombotique ne peut être négligé. Il est particulièrement redouté chez les patients « poly-artériels », porteurs de prothèses valvulaires, de stents coronaires, d'assistances circulatoires ou encore chez lesquels une revascularisation coronaire a récemment été réalisée.

Actuellement, il n'existe pas de consensus à propos des bénéfices, des risques, ou encore de la dose optimale de rFVIIa en chirurgie cardiaque car il n'existe pas d'essai prospectif contrôlé randomisé pouvant apporter des réponses. En conséquence, nous devons rester prudents devant l'absence de preuves solides d'efficacité et de sécurité⁹. Or, une étude clinique prospective contrôlée randomisée (internationale, multicentrique) semble particulièrement difficile à conduire. En premier lieu, l'uniformisation ou du moins l'harmonisation, la convergence des pratiques dans le cadre de l'urgence est un défi encore non surmonté. Ensuite, le nombre de patients à inclure pour identifier des différences statistiquement significatives chez une population à importante morbi-mortalité est très

élevé. De même, les difficultés d'analyse sont nombreuses chez des patients poly-pathologiques.

En l'absence de tels travaux, les études observationnelles ('registres' nationaux) ont une place fondamentale afin d'encadrer l'usage clinique et d'en tirer le maximum d'informations. En parallèle, l'expérimentation animale peut apporter des réponses en permettant la création d'une situation critique qui est simplifiée, standardisée, reproductible mais néanmoins pertinente quant à certaines interrogations cliniques.

Dans cette thèse, nous rapportons le double chemin de réflexion clinique et expérimental entrepris sur la place du rFVIIa pour contrer le saignement en chirurgie cardiaque. Bien que nos travaux soient centrés sur un médicament, toutes nos études ont été réalisées en toute indépendance vis-à-vis de la firme qui le produit.

Notions essentielles d'hémostase physiologique

L'hémostase est un phénomène physiologique permettant de limiter les pertes sanguines provoquées par une lésion vasculaire. La lésion de l'endothélium vasculaire entraîne la formation d'un thrombus plaquettaire (hémostase primaire) et la formation d'un réseau de fibrine insoluble qui va consolider ce thrombus (coagulation plasmatique). La durée de formation du caillot stable chez l'homme sain est d'environ 7 minutes.

La coagulation conduit à la gélification du sang suite à une cascade de réactions protéolytiques. Ces réactions sont localisées au site de la brèche vasculaire et régulées spatialement et temporellement par différents systèmes d'inhibiteurs physiologiques. L'équilibre entre la coagulation et les mécanismes qui vont la limiter est fondamental, une rupture ayant pour conséquence un risque hémorragique (déficit en facteurs) ou thrombotique (excès de facteurs activés ou déficit en inhibiteurs).

La première étape de la coagulation est la formation de la thrombine. La seconde est la formation et la polymérisation de la fibrine en un réseau dense permettant la pérennisation du caillot jusqu'à réparation tissulaire. La protection contre l'extension du processus de coagulation à distance de son site d'initiation est assurée par plusieurs mécanismes. Les facteurs de coagulation activés localement sont rapidement dilués dans la circulation où ils seront inactivés par des inhibiteurs physiologiques (anticoagulant circulant naturels).

Les acteurs de l'hémostase

Les glycoprotéines plasmatiques

Les facteurs de la coagulation sont désignés pour la plupart par des chiffres romains allant de I à XIII, sauf la prékallikréine et le kininogène (KHPM). Ormis le facteur XIII qui n'intervient que dans la dernière étape de la coagulation (stabilisation de la fibrine), les autres interviennent dans l'ordre inverse de leur numérotation. Les glycoprotéines sont

reportées dans le tableau suivant, à l'exception du facteur III (FT) et du facteur IV (Calcium) de l'ancienne nomenclature maintenant tombée en désuétude.

| | kDa | mg/L | nmoles/L | t1/2 (h) |
|---|-----|-----------------------|----------|----------|
| I (fibrinogène) | 340 | 2-4 × 10 ³ | 909 | 100-150 |
| II (prothrombine) | 72 | 100-150 | 1400 | 50-120 |
| V (proaccélélerine) | 330 | 5-10 | 20 | 12-36 |
| VII (proconvertine) | 50 | 0,35-0,60 | 10 | 4-6 |
| VIII (antihémophilique A) | 330 | 0,1-0,2 | 0,7 | 10-16 |
| IX (antihémophilique B) | 57 | 3-5 | 90 | 24 |
| X (Stuart) | 59 | 7-17 | 160 | 36-48 |
| XI (plasma thromboplastin antécédent) | 160 | 3-6 | 31 | 40-80 |
| XII (Hageman) | 80 | 30-40 | 375 | 50-70 |
| XIII (stabilisant de la fibrine) | 320 | 20-30 | 31 | 150-300 |
| Prékallikréine | 85 | 25-50 | 58 | 35 |
| Kininogène de haut poids moléculaire | 100 | 60-90 | 63 | 150 |
| antithrombine (AT) | 65 | 180-300 | 3400 | 50-70 |
| second cofacteur de l'héparine (HCII) | 65 | 60-110 | 1363 | 60 |
| protéine C | 62 | 2,7-6 | 65 | 6-8 |
| protéine S | 70 | 25 | 14 | 60 |
| inhibiteur de la voie tissulaire (TFPI) | 42 | 0,1 | 2,5 | |

Figure 1 : Glycoprotéines plasmatiques de la coagulation

La thrombine

La thrombine (facteur IIa) est l'enzyme pivot de la coagulation. Elle accomplit plusieurs actions sur plusieurs substrats par son activité protéasique modulée par les ions Na⁺ (Fig. 2) :

- en transformant le fibrinogène en fibrine avec libération de fibrinopeptides (A et B)
- en activant le facteur XIII qui devient le XIIIa, qui stabilise la fibrine par des liaisons covalentes
- en activant les facteurs V et VIII qui deviennent Va et VIIIa,

Par son activité de messenger :

- elle active les plaquettes qui changent de forme, s'agrègent et libèrent diverses substances.
- elle favorise la prolifération des fibroblastes et des myocytes.

- elle augmente la capacité d'adhésion de diverses cellules dont les cellules métastatiques.
- elle possède des effets vasculaires, vasoconstriction par effet direct (artère lésée), ou vasodilatation par libération de NO (artère saine).
- elle active les leucocytes et les macrophages qui libèrent des cytokines pro inflammatoires.

Enfin, la thrombine possède des actions activatrices et inhibitrices de la coagulation par le biais de mécanismes respectivement plasmatiques et endothéliaux. Elle active les cellules endothéliales qui libèrent des prostacyclines, l'endothéline, le NO et le t-PA (tissu plasminogen activator = activateur de la fibrinolyse).

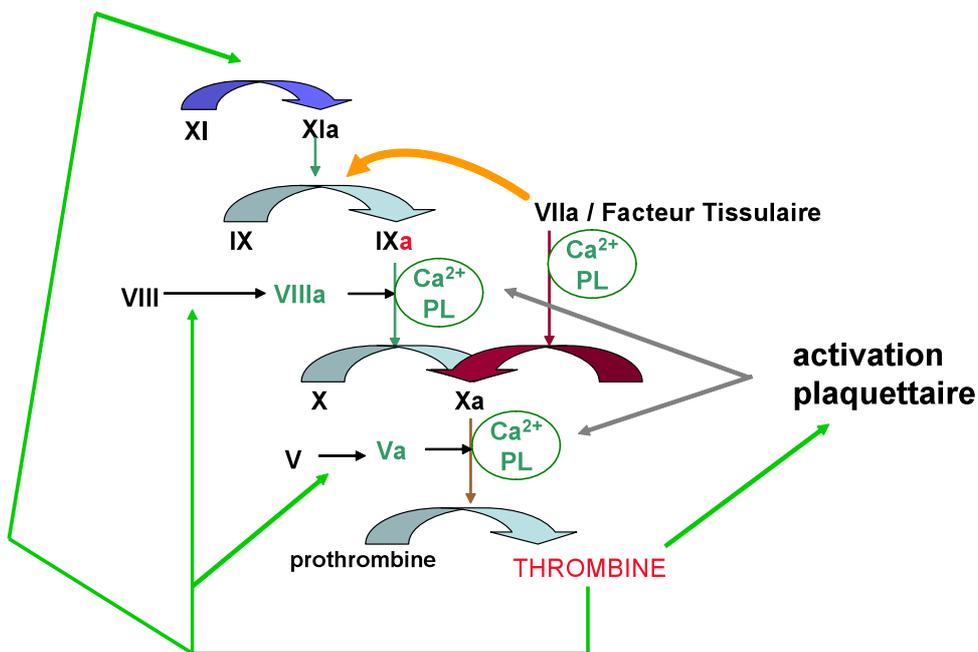


Figure 2 : Activation de la coagulation et rôle de la thrombine

Les cellules endothéliales

Le revêtement endothélial est une barrière continue ou discontinue selon la nature des capillaires. Il est composé d'une monocouche de cellules endothéliales de grande taille (40 à 50 µm de longueur) et très minces (1 µm d'épaisseur) avec la présence ou non de pores

d'un diamètre de 50 à 80 µm parfois obturés par un diaphragme (foie, rate, moelle osseuse, rein, intestins...) ¹⁰. Leurs noyaux, qui font saillie dans la lumière, et leurs corps cellulaires sont alignés dans l'axe du flux sanguin. Toute solution de continuité entre les cellules est rapidement comblée par les plaquettes (maintient de l'intégrité du mur vasculaire) avant la réparation définitive par les mitoses des cellules endothéliales. Ces dernières sont non thrombogènes à l'état basal, car leur face exposée au sang est chargée négativement et recouverte de mucopolysaccharides (glycocalyx). Lors d'une agression, l'exposition des couches sous-endothéliales entraîne l'activation et l'agrégation plaquettaire ainsi que la coagulation par exposition de FT.

Lors de la réaction hémostatique ou thrombogène, l'endothélium intervient comme agent régulateur via deux mécanismes :

- sécrétion de substances antiplaquettaires et vasodilatatrices (prostacycline, NO), activation de la fibrinolyse (t-PA)
- interactions membranaires spécifiques (thrombomoduline, sulfate d'héparane et autres glycosaminoglycanes) avec les protéines plasmatiques anticoagulantes (protéine C et thrombine, l'antithrombine et cofacteur II de l'héparine)

Le facteur tissulaire

Le FT est le premier et le principal initiateur de la coagulation *in vivo* en réponse à une lésion vasculaire (voie extrinsèque). C'est une glycoprotéine transmembranaire de 42 kDa dont la présence dans l'organisme est vitale ¹¹. Sa distribution varie selon les tissus. Il est exprimé de manière constitutive dans les cellules musculaire lisses, les péricytes et les fibroblastes adventitiels des vaisseaux sanguins. Sa teneur est importante dans certains organes : le cœur, les poumons, le placenta et le cerveau. La synthèse de FT est inductible dans les monocytes et cellules endothéliales. Il est en revanche indétectable dans le muscle

squelettique, le foie et les articulations (faites de cartilage avasculaire et de synovie vascularisée)¹². Associé aux phospholipides des membranes cellulaires, il est exposé au sang lors de la rupture endothéliale. De ce fait il constitue une barrière hémostatique physiologique. Il est également présent sous forme circulante à très faible concentration (< 1 pM). Son action potentielle dans cette situation n'est pas clairement établie. Des données suggèrent qu'il peut s'associer aux plaquettes activées lors de la formation du caillot et participer à sa formation au site lésionnel¹³. Dans sa forme non circulante, il est exposé localement au site de la lésion vasculaire et sa concentration est croissante avec la profondeur de la brèche (gradient de FT dans le mur vasculaire). Le facteur VII s'active au contact du FT et du complexe FT-FVIIa. Ce complexe déclenche la cascade de la coagulation, soit par voie directe (activation du facteur X) soit par la voie du complexe anti hémophilique (activation du facteur IX puis du VIII puis du X...).

Les plaquettes

Les plaquettes sont les actrices principales de l'hémostase primaire. Elles circulent à l'état non activé. Elles portent à leur surface des sites de liaison dont les plus importants sont les Glycoprotéines Ib et IIb/IIIa (GPIb, GPIIb/IIIa) et le récepteur de la thrombine. Ces glycoprotéines permettent aux plaquettes de reconnaître des ligands spécifiques comme le fibrinogène ou le FVW. Ce dernier circule complexé au FVIII coagulant. Le Facteur Von Willebrand (FVW) sert de ciment entre les plaquettes et le sous endothélium. En cas de brèche vasculaire, les plaquettes vont adhérer au sous-endothélium via le FVW et GPIb, puis s'agréger entre elles via GPIIb/IIIa. Lorsque les plaquettes sont activées, les phospholipides anioniques exposés à leur surface permettent la formation rapide de thrombine par activation des complexes ténase et prothrombinase (Fig. 3).

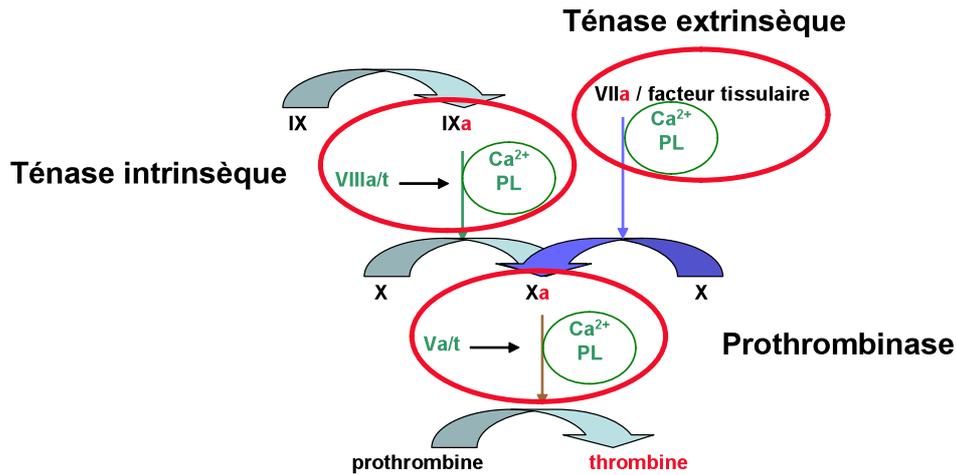


Figure 3 : Complexes de la coagulation

Les principaux inhibiteurs plasmatiques de la coagulation

Le système des inhibiteurs de la thrombine comporte notamment l'antithrombine (AT) et le second cofacteur de l'héparine. L'AT agit en se couplant en rapport équimolaire à la thrombine, et l'inhibe ainsi. En sus, l'AT peut inhiber le Xa et le IXa. Son action est accélérée par les héparines. Ainsi, l'action des héparines, et du fondaparinux, est médiée par l'AT.

Il existe également des inhibiteurs de la génération de la thrombine. La protéine C (vitamine K dépendante) est une pro-enzyme qui peut être activée par la thrombine en présence de thrombomoduline à la surface des cellules endothéliales. La protéine C activée est un inactivateur des facteurs Va et VIIIa en présence d'un cofacteur : la protéine S (vitamine K dépendante).

Le TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor) agit sous forme de complexe quaternaire avec les facteurs Xa, VIIa et le FT. Il est produit par les cellules endothéliales et 2/3 de son contingent y est fixé (1/3 circulant). Son rôle est d'inhiber l'activation du facteur Xa par la voie extrinsèque.

Enfin, d'autres inhibiteurs appelés anti-protéases circulent dans le plasma : inhibiteur de la C1 estérase, antitrypsine, alpha-2-macroglobuline. Les principaux inhibiteurs de la coagulation sont représentés sur la figure 4.

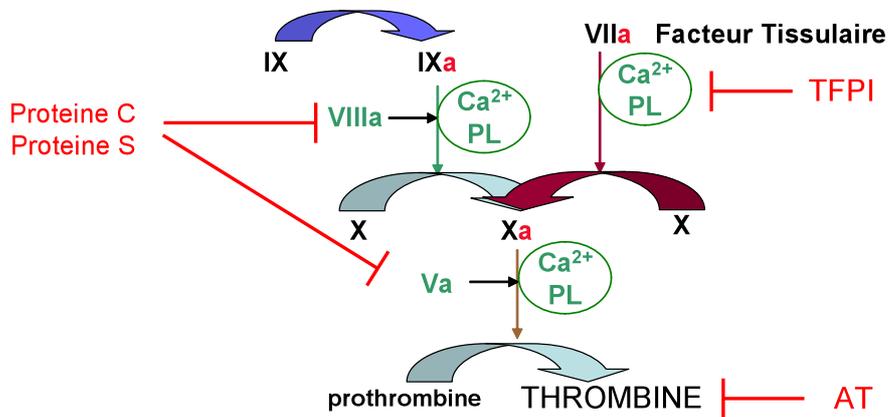


Figure 4 : Principaux inhibiteurs de la coagulation

Conception moderne

Le système de la coagulation a historiquement été divisé en deux voies : la voie intrinsèque, la voie extrinsèque avec leur convergence ; la voie commune¹⁴. La voie extrinsèque est ainsi nommée car elle fait intervenir le seul agent extrinsèque ; le FT. Le complexe FT-FVIIa est la clef de l'initiation de la coagulation par l'activation rapide mais limitée du facteur X en Xa de la voie commune et via l'activation du Facteur IX (boucle de Jossa) en IXa, ce qui permet l'activation, plus lente, d'un plus grand nombre de Xa. La ténase intrinsèque, qui comprend les facteurs anti-hémophiliques, est fondamentale pour l'amplification de la coagulation et la génération explosive de thrombine.

Cette description de la coagulation en cascade protéolytique date des années 60^{15, 16} et a eu l'intérêt de conceptualiser le phénomène. Cependant, cela ne reflète pas complètement la physiologie, ni les altérations du procédé. La vision moderne est appelée modèle cellulaire car l'hémostase est localisée sur des surfaces cellulaires particulières qui permettent à la

fois d'accélérer le phénomène (phospholipides procoagulants) tout en limitant spatialement la réaction au niveau du site de lésions. Les cellules impliquées sont essentiellement les plaquettes et les cellules endothéliales lésées (exposant le FT). Ainsi le modèle cellulaire peut être schématisé en trois phases¹⁷ (Figure 5) :

1-INITIATION : le déclenchement du mécanisme se situe au niveau des cellules exposant le FT. Le complexe FT-FVIIa active une petite quantité de X et IX. Le Xa forme alors avec le Va (provenant des granules α des plaquettes activées et activé par le IIa et le Xa) le complexe prothrombinase à la surface des cellules exposant le FT.

Le Xa libre est rapidement inactivé par le TFPI ou l'AT (limitation spatiale du phénomène). Ce n'est pas le cas du IXa qui peut se déplacer vers une autre plaquette ou autre surface cellulaire car il n'est pas inhibé par le TFPI.

2-AMPLIFICATION : La petite quantité de thrombine générée va activer les plaquettes et les facteurs V et VIII et XI sur leur surface. Ces facteurs activés vont contribuer à la génération explosive de thrombine.

3-PROPAGATION : Elle se réalise sur les plaquettes activées qui

- recrutent d'autres plaquettes
- accueillent les complexes ténase intrinsèque (IXa-VIIIa), qui peuvent activer le X sur les plaquettes (car ce dernier ne peut pas se déplacer dans sa forme activée), et prothrombinase.
- le Xa et le Va prolongent la génération explosive de thrombine jusqu'à un seuil suffisant pour générer la fibrine.

La fibrine est ensuite polymérisée et stabilisée par le facteur XIII. La thrombine qui est produite après la formation du caillot active le Thrombin Activable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI). Ce dernier permet de protéger le caillot de la fibrinolyse permettant ainsi la réparation tissulaire.

Et c'est pour cela que les hémophiles saignent. En effet l'activation du X par le complexe FT-FVIIa est rapidement limitée par le TFPI de même que le FT exposé est rapidement recouvert de plaquettes. En l'absence de ténase intrinsèque pleinement fonctionnelle, la génération de thrombine reste limitée, le caillot est fragile et trop sensible à la fibrinolyse.

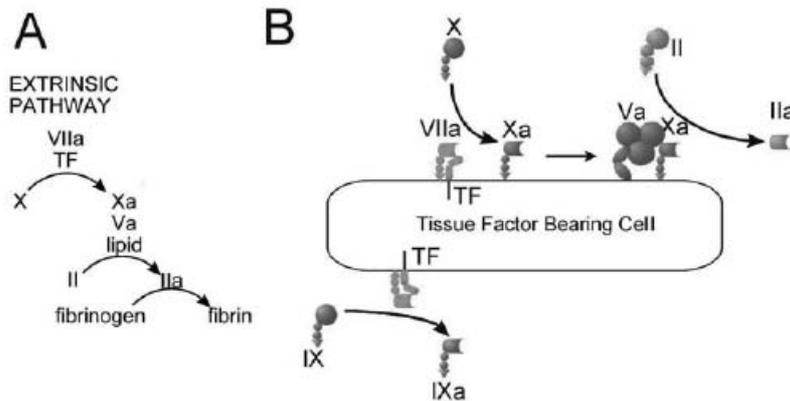


Figure 1. Extrinsic pathway occurs on TF-bearing cells. A, Proteins of the classical extrinsic pathway with the sequence of activation proceeding from TF. Deficiency of these proteins prolongs a prothrombin time assay. B, Factor VIIa bound to TF activates both factor X and factor IX. Factor Xa formed by factor VIIa/TF binds to factor Va on that cell and converts a small amount of prothrombin to thrombin

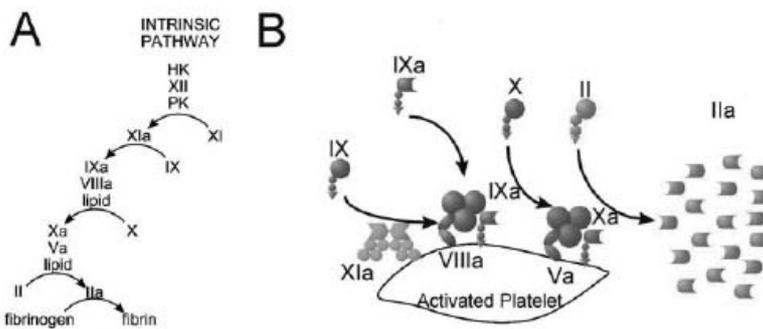


Figure 2. Intrinsic pathway occurs on activated platelets. A, The proteins of the classical intrinsic pathway are shown with the sequence of activation proceeding from high-molecular weight kininogen (HK) and prekallekrein (PK). Deficiency of any of these factors prolongs an activated partial thromboplastin time assay. However, deficiency of HK, PK, or factor XII is not associated with any bleeding tendency in humans. B, On the surface of an activated platelet, factor IXa formed on the TF-bearing cell can incorporate into a Xase complex. Addition factor IXa is formed by platelet-bound factor XIa. Factor Xa formed on the platelet surface is channeled into IIase complexes, leading to a burst of thrombin generation. Because factor XI is activated on the platelet surface by thrombin (see Figure 3), PK, HK, and factor XII are not required for thrombin generation in this model.

Figure 5 : La coagulation d'après Monroe et Hoffman¹⁷

Mécanismes d'action du rFVIIa - médicament

Structure et fonction

Le FVII est une sérine protéase de 406 acides aminés. La molécule comporte 4 domaines : un domaine N-terminal impliqué dans la liaison avec le FT et les phospholipides, 2 domaines EGF like (epidermal growth factor) de liaison avec le FT et 1 domaine sérine protéase qui comprend le site catalytique¹⁸.

Le FVIIa recombinant est issu du génie génétique et reproduit à l'identique (glycosylations comprises) la séquence d'acides aminés humaine du facteur VII sous sa forme activée. Sa production se fait à partir de l'ADNc codant le FVII, issu d'une banque génétique de foie¹⁹. L'ADNc est ensuite transcrit et l'ARNm traduit en FVII dans une lignée cellulaire eucaryote de rein de bébé hamster. L'activation du FVII se fait par hydrolyse entre les acides aminés 152 et 153 qui le clive en deux chaînes²⁰. Le facteur VII dans sa forme activée n'est physiologiquement présent qu'à l'état de traces dans la circulation sanguine (~ 1 % du FVII circulant ; soit 2-2,5 µg/L). Son mode d'action se développerait selon deux voies distinctes, dépendantes ou non du FT (Fig. 6).

D'après le modèle cellulaire de la coagulation, le FVIIa est un facteur clef dans les deux premières phases de la coagulation : l'initiation (activation du FX qui génère la petite quantité de thrombine nécessaire à l'activation des facteurs V, VIII, XI et des plaquettes) et l'amplification (activation du IX). Le principal inhibiteur physiologique du complexe FT-FVIIa est le TFPI ; l'AT est considérée comme ayant un faible effet inhibiteur. Il existe un inhibiteur artificiel, conçu comme médicament : un rFVIIa inactivé^{21, 22}.

Enfin, le rFVIIa possède une activité anti-fibrinolytique indirecte via l'activation du Thrombin Activable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI). Cela a été montré par Lisman *et coll.* avec du plasma déficient en FVIII²³. Ainsi, le caillot de fibrine formé plus rapidement peut

résister à une fibrinolyse prématurée et assurer une hémostase durable permettant la cicatrisation tissulaire.

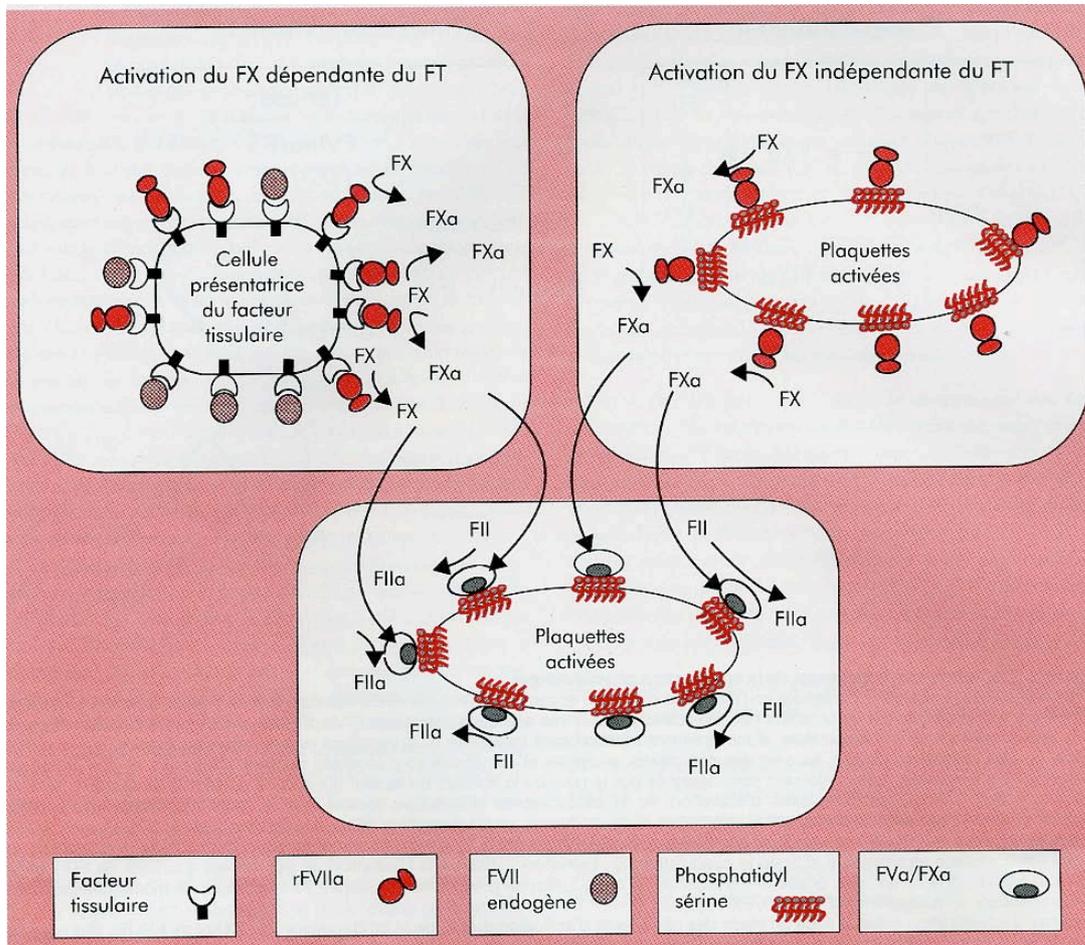


Figure 6 : Mécanismes d'action du rFVIIa selon P Sié et S Claeysens²⁴

La voie FT dépendante

Le rFVIIa déplace le FVII endogène inactif de sa liaison avec le FT et forme le complexe enzymatique FT-rFVIIa qui génère le Xa²². Le calcium est un cofacteur du complexe FVIIa-FT²⁵. Les premières molécules de thrombine générée activent les facteurs VIII, V et les plaquettes (phase d'initiation de la coagulation). Ainsi les complexes 'ténase' intrinsèque (FIXa/FVIIIa) et prothrombinase (FXa/FVa) assemblés à la surface des plaquettes activées entraînent la génération explosive de thrombine. Ce processus n'est pas systémique mais localisé au site de la lésion vasculaire où est exposé le FT et où sont

accumulées les plaquettes activées. La « concentration » locale atteinte en FT-rFVIIa peut être telle que l'effet du TFPI est diminué et que la boucle de Josso (impliquant les facteurs anti-hémophiliques - complexe 'ténase') est moins utile.

La voie FT indépendante

La seconde voie serait indépendante du FT. Des données suggèrent que le rFVIIa à forte concentration peut activer directement le FX en se liant à la surface des plaquettes activées, sur des plates-formes phosphatidyl serines, et ainsi entraîner une génération explosive de thrombine²⁶. Il a également été démontré qu'en cas de thrombasthénie de Glanzmann (déficit constitutionnel en GPIIb/IIIa) le rFVIIa peut compenser les perturbations de l'hémostase²⁷⁻²⁹. Le mécanisme proposé par Lisman *et coll.* implique la thrombine générée après l'activation directe du X par le couple rFVIIa-plaquettes. Cette thrombine augmenterait le recrutement des plaquettes (même déficientes) et augmenterait la formation de fibrine. Cette fibrine permettrait de compenser l'absence relative de plaquettes pour réaliser un clou hémostatique.

Il a été démontré que le complexe GPIb-IX-V à la surface des plaquettes activées (exposant des phospholipides anioniques) a une affinité directe pour le rFVIIa et permet une accélération de la génération de Xa³⁰. Ces mécanismes nécessitent de fortes concentrations de rFVIIa. Cela peut expliquer la raison des doses administrées ainsi que l'intérêt du rFVIIa pour les patients en syndrome hémorragique hors hémophilie : thrombasthénie de Glanzmann, thrombopathies médicamenteuses induites (anti GPIIb/IIIa)...

rFVIIa et thrombinographie

A titre d'exemple éloquent, nous présentons sur la figure 7 un thrombinogramme d'un patient présentant un saignement majeur post-CEC chez qui le rFVIIa a corrigé *in vitro* l'allongement du temps de latence avant la génération explosive de thrombine. Cet exemple

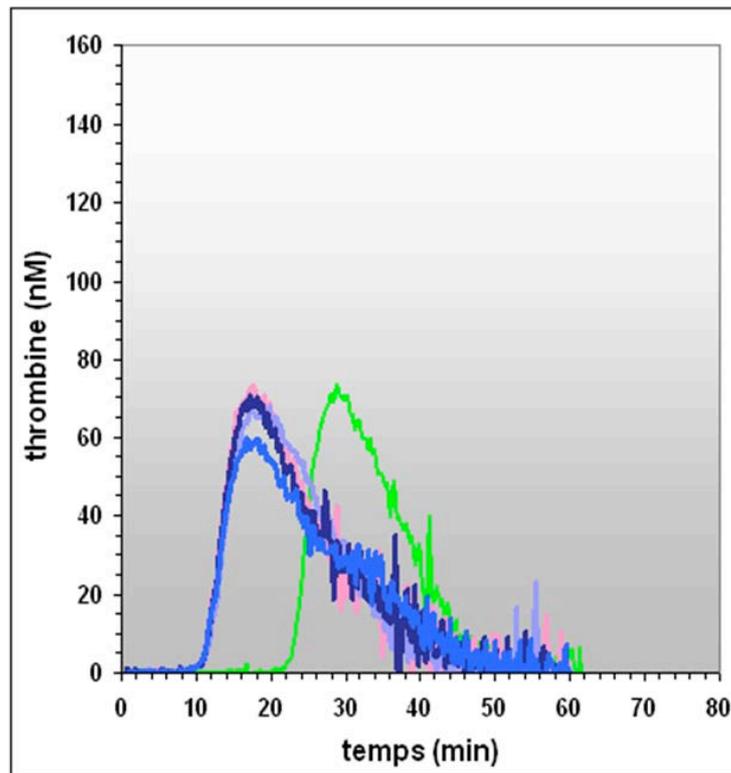
est particulièrement démonstratif de l'effet escompté du médicament. En effet, le rFVIIa décale la courbe vers la gauche sans modifier la quantité de thrombine générée (aire sous la courbe) et normalise ainsi le temps de génération de thrombine. La cinétique d'initiation de la coagulation semble dans cette situation la cause du saignement. Les autres acteurs nécessaires à la formation du caillot sont présents en quantité suffisante : aire sous la courbe (= potentiel thrombinique) normale. On ne trouve pas d'effet dépendant de la concentration dans cet exemple avec les concentrations utilisées. La posologie à déterminer dans cette situation devant s'approcher de la dose minimale nécessaire à la production rapide de thrombine (nécessité de déclencher la cascade de coagulation et non de combler un déficit de facteur). Cet exemple nous paraît représenter la situation optimale d'utilisation du rFVIIa en chirurgie cardiaque ; la coagulopathie acquise est responsable d'un saignement et ne peut être corrigée par les thérapeutiques classiques malgré une compensation qualitative et quantitative des pertes sanguines. Dans cette condition, le rFVIIa a permis de normaliser le temps de gélification du sang et de contrôler le saignement post-opératoire. Cela s'applique classiquement au saignement micro-vasculaire.

Le mode d'action du rFVIIa en CCV n'est pas déterminé. Nous pouvons émettre les deux hypothèses suivantes ;

1- FT dépendante : l'excès de TFPI induit par la CEC (qui inhibe le complexe FT-FVIIa) peut être surmonté par une dose de rFVIIa telle que la concentration de FVIIa circulant déclenche la coagulation. Ce phénomène peut se produire sur des brèches vasculaires non recouvertes de plaquettes

2- FT indépendante : sur les brèches vasculaires recouvertes de plaquettes, le FT n'est pas accessible et donc la génération de thrombine se produit via l'activation du X par le complexe GPIb-IX-V.

Nous formulons aussi l'hypothèse que le rFVIIa peut favoriser le contrôle d'un saignement d'une brèche vasculaire en condition hémostatique « normale » en déplaçant la courbe de génération de thrombine vers la gauche ce qui revient à créer des conditions hémostatiques « supra-normale ».



rFVIIa : 0 - 0,5 - 1,5 - 3,8 µg/mL

Figure 7 : Thrombinogrammes avec rFVIIa *in vitro* (plasma humain)

Données de V Régault

Le saignement en chirurgie cardiovasculaire

Ampleur du problème

L'activité en chirurgie cardiaque est croissante et concerne plus de 36 000 patients par an en France (Base de données EPICARD de la Société de Chirurgie Cardio-Vasculaire et Thoracique pour l'année 2007). La répartition est approximativement la suivante : 15 000 revascularisations myocardiques isolées, 12 000 remplacements valvulaires isolés, 5 200 chirurgies complexes (plusieurs valves ou valve + pontage), 2 600 chirurgies de l'aorte thoracique, 1 000 assistances circulatoires et 400 greffes cardio-pulmonaires. La mortalité varie de 2,3 % (revascularisation), 4,8 % (remplacement valvulaire), 7,8 % (chirurgie de l'aorte), pouvant aller jusqu'à 20,9 % (complications de l'infarctus). En dépit des progrès techniques et thérapeutiques (évolution des circuits de CEC, anti-fibrinolytiques, transfusion...) et en partie parce que cette chirurgie devient de plus en plus complexe avec des patients plus âgés et plus fragiles, la problématique du saignement est une des principales difficultés de la chirurgie cardiaque. L'hémorragie majeure est une complication à haute morbi-mortalité pouvant survenir jusqu'à 7 % des cas¹. On entend par hémorragie réfractaire un saignement majeur engageant le pronostic vital et qui échappe aux thérapeutiques classiques (médicamenteuses et chirurgicales).

Contexte - mécanismes

Les facteurs impliqués sont multiples : altérations inéluctables de l'hémostase secondaires à l'usage de la CEC (parfois plus prononcées par des modifications thérapeutiques préexistantes) et les facteurs liés au malade, cliniquement identifiables. Nous citerons les principaux : âge, sexe, poids, co-morbidités, hématokrite pré-opératoire... Les patients, dans leur grande majorité, présentent une co-morbidité pour laquelle ils reçoivent un traitement

antiplaquettaire (mono ou bi-thérapie) et/ou un traitement anticoagulant. Ces traitements induisent un risque hémorragique concomitant du risque thrombotique.

Certains types de chirurgie comportent des risques plus élevés de saignement : la chirurgie complexe, la chirurgie en urgence (patient instable avec souffrance viscérale, traitement anticoagulant, antiplaquettaire, ou thrombolyse), la chirurgie de l'arche aortique avec hypothermie profonde et arrêt circulatoire, et toute autre intervention avec CEC prolongée (> 1h), et enfin le cas délicat des assistances circulatoires (patient en défaillance viscérale avec anti-coagulation prolongée).

Les principales altérations de l'hémostase induites par la CEC ont été identifiées dès les années 60³¹⁻³³. Une thrombopénie apparaît dans les minutes suivant la mise en fonction de la pompe et se restaure en quelques jours. La perte de facteurs de coagulation (pro et anti coagulants) est essentiellement secondaire à leur consommation et leur dénaturation dans le circuit. Il existe également une activation de l'activité fibrinolytique³⁴. Enfin, l'activation du système fibrinolytique, rapportée dès les débuts de cette chirurgie, est en grande partie responsable des cataclysmes hémorragiques³⁵, avec apparition de plasmine dans la circulation (et diminution, par consommation, de la concentration de son inhibiteur, l' α 2-antiplasmine), et cela malgré une augmentation de l'inhibiteur de l'activateur tissulaire du plasminogène. Cette plasmine circulante est susceptible de provoquer plusieurs altérations défavorables pour l'hémostase :

1° - dissolution des réseaux hémostatiques de fibrine,

2° - dégradation de protéines de la coagulation en circulation, en premier lieu le fibrinogène mais également d'autres facteurs de coagulation comme le facteur V,

3° - altération plaquettaire directe, par protéolyse de glycoprotéines de membrane comme la GPIb, ou indirecte, par l'antagonisation des produits de dégradation du fibrinogène et de la fibrine avec le fibrinogène pour la liaison au complexe GPIIb/IIIa activé³⁶.

La plasmine peut, dans certaines conditions expérimentales, activer les plaquettes³⁷.

Il n'est pas certain que les résultats bénéfiques des médicaments anti-fibrinolytiques³⁸ soient exclusivement en rapport avec l'atténuation de l'activation du système fibrinolytique³⁹. S'ajoutent encore les principaux facteurs pro-hémorragiques et/ou pro-thrombotiques suivants⁴⁰ :

- consommation des facteurs de coagulation, l'hypo-fibrinogénémie
- importante inflammation systémique,
- libération de microparticules circulantes par les plaquettes⁴¹,
- intensité de l'inflammation qui est corrélée aux durées et tailles des surfaces de contact sang-circuit de CEC, au traumatisme chirurgical et à la réinjection de sang épanché⁴²,
- hémodilution (amorçage de la CEC, cardioplégie, remplissage vasculaire),
- hypothermie et ses effets délétères sur la fonction plaquettaire, la coagulation et la fibrinolyse.

Il existe également en post CEC : l'acidose, l'hypocalcémie et l'effet rebond de l'héparine non fractionnée (HNF)⁴³. Enfin, l'excès de protamine (ratio protamine/HNF > 2,6 :1) altère la fonction plaquettaire et augmente le saignement⁴⁴.

Ces anomalies transitoires, quoique d'ampleur variable, n'entraînent pas systématiquement de saignement majeur. A l'issue d'une intervention chirurgicale standard, les perturbations pro-hémorragiques sont compensées par des perturbations pro-thrombotiques. Il résulte de ce nouvel équilibre une hémostase « satisfaisante » en dépit de tests biologiques

conventionnels de laboratoire perturbés (cf. monitoring du saignement plus loin). Des travaux antérieurs non publiés, réalisés par JP Carteaux, V Regnault et T Lecompte, ont exploré les profils thrombinographiques de patients en pré et post-opératoire de CCV (remplacement valvulaire aortique standard). Chez les dix patients explorés, les potentiels thrombiniques n'étaient pas significativement modifiés en post-opératoire. En revanche, les concentrations de TFPI plasmatique libre étaient augmentées d'un facteur dix. On peut supposer que le retard de déclenchement de la coagulation est en partie attribuable au TFPI. Il est de même envisageable que le rFVIIa puisse rétablir cette coagulopathie en contrant l'effet inhibiteur du TFPI par saturation du FT par le rFVIIa.

Origine du saignement

On entend par saignement d'origine « biologique » les pertes sanguines considérées comme secondaires à des perturbations significatives de l'hémostase : le saignement est typiquement micro-vasculaire. Le saignement d'origine « chirurgicale » fait suite à une ou des brèches vasculaires en principe accessible(s) à un geste de réparation.

La situation la plus fréquente est mixte. En effet, les perturbations biologiques peuvent réactiver des zones dont l'hémostase s'était réalisée soit spontanément, soit chirurgicalement (perte du clou hémostatique) et les pertes sanguines secondaires à une brèche vasculaire entraînent rapidement une coagulopathie (cercle vicieux).

Au bloc opératoire et après neutralisation de l'HNF par la protamine, l'analyse de l'origine du saignement est facilitée par son observation directe dans le champ opératoire. Schématiquement ; soit une source isolée de saignement est authentifiée, soit un saignement diffus en nappe (micro-vasculaire) est constaté. L'absence de caillot et la récurrence du saignement dans des zones dont l'hémostase chirurgicale est conduite de manière itérative et inefficace sont en faveur d'un trouble de l'hémostase. Dans tous les cas, il doit être

envisagé que l'action hémostatique chirurgicale soit appuyée par une compensation des pertes sanguines appropriée.

Ce type de saignement, précoce, est lié :

- à une lésion vasculaire qui ne peut être comblée spontanément ; éventuellement plus manifeste après reprise de l'activité contractile (vaisseau remis en charge ; conditions hémodynamiques normales restaurées).
- à des perturbations initiales ou acquises en *per* opératoire de l'hémostase.

En réanimation, la question de l'origine de saignement se pose nécessairement pour la compréhension de la problématique et l'approche thérapeutique. Le témoignage du chirurgien est essentiel à l'analyse. Certains facteurs ont pu être identifiés en *per* opératoire sans avoir été corrigés car ils n'apparaissaient pas majeur alors (saignement diffus, survenant à la fermeture sternale). Le saignement peut correspondre une poursuite ou une reprise de l'hémorragie. Son origine peut être due à : un effet rebond d'HNF, une fibrinolyse, l'hypothermie du patient, une fragilité mécanique des caillots ou encore en cas de saignement massif, à un lâchage de suture.

Quelle que soit l'origine du trouble, la correction de la coagulopathie est fondamentale et à réévaluer régulièrement dans le temps. De même, la question de la reprise chirurgicale doit être rapidement évoquée. Pour exemple de notre pratique, lorsque le drainage médiastinal recueille plus d'un litre de sang dans les toutes premières heures post opératoires, un décaillotage chirurgical en urgence est proposé. Dans la grande majorité des cas, bien qu'aucun saignement actif ne soit mis en évidence, le simple fait de retirer les caillots et de laver permet d'interrompre la spirale hémorragique de la fibrinolyse au contact du caillot.

Les seuils de ré-exploration chirurgicale proposés par Kirklin et Barratt-Boyles sont de 10 mL/kg en 1h ou de 20 mL/kg en 3h⁴⁵. Or, le saignement moyen post CEC (drainage

médiastinal total) retrouvé dans une importante analyse rétrospective de Bélisle *et coll.* est proche d'un litre (~900 mL)⁴⁶. La frontière peut sembler ténue entre les deux c'est pourquoi la notion de cinétique du saignement doit prévaloir sur la quantité (lorsque cette dernière n'est pas encore massive). Les facteurs de risque de reprise chirurgicale ont été identifiés par Deng *et coll.*⁴⁷ et sont les suivants: l'âge (> 75 ans), la fraction d'éjection du ventricule gauche < 30 %, l'insuffisance rénale chronique et la chirurgie redux. Les autres paramètres favorisant le saignement on pu bénéficier d'avancées technologiques et techniques : chirurgie à cœur battant, amélioration des circuits de CEC (diminution du volume mort, utilisation de pompes centrifuges, amélioration des oxygénateurs, élimination du contact air-sang par les circuits fermés type mini-CEC), l'introduction de la cardioplégie chaude et sanguine, bistouris électriques et autres outils de coagulation, hémostatiques locaux (compresse et colles), couvertures chauffantes⁴³...

Situations particulières à risque élevé

Le saignement post-opératoire est à haut risque de survenue dans deux situations particulières. La première concerne l'utilisation de systèmes d'assistance respiratoire (type ECMO®) et/ou circulatoire (type Thoratec®). Ces dispositifs nécessitent une anti coagulation prolongée afin de protéger le patient et le circuit (notamment les membranes d'oxygénation) de la thrombose. Le saignement majeur (plus volontiers lors de la pose du système) n'est pas toujours contrôlé par le traitement médical : transfusions et neutralisation de l'HNF (risque thrombotique) et la reprise chirurgicale.

L'autre situation implique les nouveaux antithrombotiques, anticoagulants et antiagrégants :

- Les inhibiteurs directs de la thrombine : lépirudine (Réfludan®), bivalirudine (Angiox®), argatroban (Argatroban®).

- Les inhibiteurs du complexe GPIIb/IIIa : abciximab (Reopro®), eptifibatide (Integrilin®), tirofiban (Agrastat®)
- Le récent anti Xa, d'effet médié par l'AT : fondaparinux (Arixtra®).

Que ce soit dans le cadre de l'urgence chirurgicale, d'une assistance circulatoire ou d'une TIH, ces médicaments, plus ou moins réversibles ont des effets prolongés : leurs demi-vies sont considérablement prolongées en cas d'insuffisance rénale aiguë. De plus, l'absence d'antidote « vraie » pour ces produits représente un problème majeur de la prise en charge de l'hémorragie réfractaire dans ce contexte. En effet, la coagulopathie est secondaire à une inhibition (qui persiste avec la présence de la molécule) et non à une déplétion⁴⁸. Cette problématique est invariante avec les derniers anticoagulants (direct et actifs par voie orale) qui n'ont pas encore d'AMM (apixaban) ou récemment introduits (rivaroxaban).

« *Monitoring* » du saignement

Le monitoring par tests de laboratoire du saignement est indispensable à l'évaluation, la surveillance et le suivi de la gravité de l'hémorragie, l'orientation des choix thérapeutiques et à l'adaptation du traitement transfusionnel. La stratégie (dont on peut espérer qu'elle maximalise la probabilité d'efficacité) est fonction de l'observation et de l'interprétation en temps utile des paramètres cliniques pertinents.

Le débit de l'hémorragie est un critère majeur de la gravité du saignement. La quantification des pertes sanguines est réalisable au bloc opératoire par l'évaluation du volume dans sang aspiré ou retransfusé *post* protamine. En réanimation, le saignement extériorisé est recueilli par des drains aspiratifs, sachant qu'une partie peut ne pas être drainée et peut se collecter dans le médiastin ou les plèvres (estimable sur la radiographie thoracique).

La disponibilité des tests de laboratoire dépend des centres et des horaires. La fourniture et l'accessibilité de ces tests est le résultat de la volonté, des moyens financiers et de l'étroite collaboration des hématologistes, anesthésistes, réanimateurs et chirurgiens impliqués. Les informations apportées par les examens sont à corrélérer à l'état du patient au moment des prélèvements et sont donc descriptifs d'une situation antérieure. Dans le cadre de l'hémorragie majeure, le profil biologique du patient évolue rapidement au cours du syndrome hémorragique.

« Monitoring » conventionnel

Au laboratoire

L'hémogramme peut être obtenu rapidement (analyse en sang total) et permet de quantifier l'importance de la dilution et/ou de la consommation : taux d'hémoglobine, hématocrite, numération plaquettaire.

Les temps de céphaline plus activateur (TCA, exploration de la voie intrinsèque), temps de Quick (Quick, exploration de la voie extrinsèque) et la mesure du fibrinogène coagulable sont réalisés avec du plasma et requièrent plus de 30 minutes (centrifugation). La transfusion massive altère légèrement Quick et TCA (ratio patient/témoin < 1,8). Au-delà, le risque de saignement micro-vasculaire est majoré⁴⁹. En tant que substrat final de la coagulation, le fibrinogène est un facteur majeur lié au saignement micro-vasculaire. Le seuil est mal estimé si l'on en croit les différences rapportées dans la littérature : de 0,5 g/L pour la transfusion massive⁴⁹ à 2 g/L pour l'hémorragie de la délivrance⁵⁰.

Au lit du malade

HémoCue® (AB Leo Diagnostics, Sweden) est un appareil portable qui permet la mesure rapide de l'hémoglobine par prélèvement capillaire.

Les gaz du sang apportent rapidement des informations spécifiques que sont la PO₂, la PCO₂, l'excès de base et le pH et selon les modèles peuvent informer aussi sur la calcémie, l'hémoglobinémie.

Le temps de coagulation activée (TCoA) est dédié au monitoring de l'héparinothérapie et de sa neutralisation par la protamine pour la procédure de CEC. Ce test est réalisé avec du sang total natif (non anticoagulé) en présence d'un activateur (ex : céliste). Le temps de gélification du sang est mesuré. C'est un test de mise en œuvre immédiate, simple, peu coûteux. La durée du test est celle de sa mesure soit au moins 350 s, qui est le temps minimal requis pour démarrer une CEC. En dehors de cette utilisation, il ne présente pas d'intérêt car il n'est sensible qu'à des doses élevées d'HNF, spécifiques de l'usage de la CEC et de certaines procédures endovasculaires (angioplastie coronaire, neuroradiologie interventionnelle).

« Monitoring » non conventionnel

Thrombinographie

La thrombinographie est l'étude de la cinétique complète de l'activité thrombinique générée dans du plasma *in vitro*. C'est un phénotypage intégratif du système de la coagulation en présence de fibrinogène, des plaquettes et des systèmes inhibiteurs⁵¹. Cette approche considère que toute l'activité thrombinique (et elle apparaît en majorité au-delà du point de détection de la gélification) est susceptible de jouer un rôle *in vivo* ; le paramètre récapitulatif est appelé le potentiel thrombinique (l'aire sous la courbe de l'évolution de la concentration de thrombine en fonction du temps) et caractérise la réactivité endogène du système hémostatique (formation et extinction de la thrombine en présence de plaquettes et des systèmes inhibiteurs) du sujet. Cet outil reste d'usage limité et en chirurgie cardiaque, car il relève encore de la recherche clinique. Les contraintes d'acquisition des données (technique et temps > 1h) n'en font pas un outil d'intérêt en urgence. Cependant, dans notre

expérience, il a permis l'analyse et la compréhension de certaines situations critiques *a posteriori*, notamment suite à des situations de saignement dramatique avec usage de rFVIIa (avec et sans succès).

Thromboélastographie (TEG)

La TEG est utilisée en chirurgie cardiaque depuis plus de 40 ans⁵². Elle permet une évaluation globale – à l'exception des systèmes inhibiteurs - du système de la coagulation et de la fibrinolyse dans le sang total, de la formation initiale du caillot à sa rétraction puis sa dissolution. Il fournit des informations sur les protéines pro-coagulantes, la fibrinolyse et la participation plaquettaire à la formation du réseau de fibrine. Thrombinographie et thromboélastographie ont en commun la caractéristique de s'intéresser à ce qui se passe au-delà de la gélification observable du spécimen de sang. Cependant ces deux approches ne sont pas identiques. La thrombinographie explore directement l'évolution de la concentration de thrombine lors de la coagulation *in vitro* (dans des conditions expérimentales maintenant bien définies et reproductibles, avec un plasma riche en plaquettes, citraté, recalcifié). Alors que la thromboélastographie explore, au-delà de la gélification, les qualités mécaniques du caillot et leur évolution, qui peuvent d'ailleurs avoir un rapport avec le travail thrombinique post-gélification (structuration du réseau de fibrine et modulation de la fibrinolyse).

Il existe deux appareils. Sa forme récente, le TEG « rotatif » (ROTEM), est une aide à la stratégie transfusionnelle recommandée par la Société Européenne de Chirurgie Cardio Thoracique (grade B)⁵³. La durée d'analyse varie de 20 minutes à 1h. Un article récent suggère l'intérêt prédictif du TEG pour la réponse au rFVIIa dans l'hémorragie réfractaire⁵⁴. Le TEG est peu disponible en France, les quelques systèmes à disposition étant en prêt. Le coût du système et des réactifs est probablement le premier frein à l'extension d'usage.

Hepcon®

L'Hepcon/HMS plus (Medtronic Inc.) est un outil dédié au monitoring personnalisé de l'HNF et de la protamine au cours et au décours immédiat de la CEC. Les résultats sont obtenus rapidement mais le coût est important. Des travaux ont suggéré son intérêt en terme de diminution des pertes sanguines et de transfusion⁵⁵. Il présente un intérêt plus marqué pour la gestion de la protamine particulièrement délicate (CEC longue, administration d'HNF importante). Son utilisation n'est pas développée en France, ici encore pour des raisons financières.

Fonction plaquettaire

Le PFA-100® (Dade/Behring) est un test d'exploration de la fonction plaquettaire simple, sur sang total et reproductible (coefficient de variation de 5 à 14 %)⁵⁶. Il est capable de distinguer une anomalie de fonction secondaire à une prise d'antiagrégants, une maladie de Willebrand ou une thrombasthénie de Glanzmann. Il est peu utilisé dans le cadre de l'urgence car peu disponible, souvent localisé dans le laboratoire centralisé, et les résultats sont relativement longs à obtenir (> 30 min pour la technique).

Le VerifyNow® (Accumetrics) est un test qui peut être réalisé au lit du malade. Son intérêt a été évalué en chirurgie cardiaque dans une récente étude par mesure du blocage du récepteur P2Y12 plaquettaire⁵⁷. Les informations apportées par ce test sont avérées bien corrélées au saignement mais l'intérêt pour la gestion du saignement n'est pas encore formellement démontré.

Arsenal thérapeutique en CCV

Antifibrinolytiques

Les antifibrinolytiques représentent une classe thérapeutique fondamentale en CCV. Leur intérêt est de lutter contre la lyse prématurée de la fibrine par la plasmine. Le plasminogène est un zymogène circulant activé par le t-PA produit et libéré par les cellules endothéliales.

Actuellement, les deux molécules utilisées sont des analogues de la lysine, des inhibiteurs compétitifs du site de liaison à la fibrine. Le premier, l'acide aminocaproïque, n'est pas commercialisé en France. Le second, l'acide tranexamique (EXACYL®) est maintenant le seul antifibrinolytique utilisé en CCV en France. Une récente méta-analyse⁵⁸ met en exergue son intérêt en CCV sur le saignement post-opératoire et le recours à la transfusion mais deux domaines sont à éclaircir, d'une part la dose (longtemps sous estimée et grande variabilité allant jusqu'à un facteur 10) et d'autre part la sécurité neurologique chez les patients à risque vasculaire élevé (convulsion, AVC) qui est à définir, notamment à corrélérer aux doses utilisées.

Desmopressine

La desmopressine est un polypeptide de synthèse, analogue de la vasopressine. Il est utilisé comme hémostatique dans l'hémophilie A et la maladie de Willebrand car il augmente les concentrations plasmatiques du VIII et du FVW. Son utilisation en CCV a été décrite mais son intérêt non prouvé par plusieurs méta-analyses^{59, 60}. Le mécanisme d'action en CCV n'est pas élucidé, d'autant que les patients post CEC présentent déjà une augmentation du FVW. Un hypothétique intérêt pour des sous groupes de malades (sous antiplaquettaires notamment) doit être évalué. Des effets secondaires notables sont à lui attribuer (hypotension, tachycardie, infarctus du myocarde) et son intérêt n'étant pas supporté pas des arguments scientifiques, son utilisation est confidentielle⁶¹.

Concentrés de complexes prothrombiniques

Les concentrés de complexes prothrombiniques (CCP) distribués en France sont essentiellement composés de 4 facteurs non activés (X, IX, VII, II : vitamines K dépendants) et d'inhibiteurs (protéines C et S). Leur indication validée se limite à la réversion des anti-vitamines K⁶². Cependant, ils ont déjà été et sont parfois utilisés à titre exceptionnel dans le traitement d'hémorragies sévères notamment en chirurgie cardiaque⁶³.

Néanmoins, les données scientifiques supportant ce type d'utilisation sont encore insuffisantes⁶⁴.

Autre

Nous citerons :

- Le fibrinogène : celui disponible en France est un produit dérivé humain.
- les colles biologiques et compresses hémostatiques : nous les citons car elles sont distribuées et utilisées -de manière exceptionnelle ou systématique selon les équipes chirurgicales- mais nous ne développerons pas ici ces produits qui n'ont pas établi de preuve scientifique de leur utilité.

Présentation du travail de thèse

Après une introduction détaillée de la problématique du sujet, nous restituons ci-dessous l'ensemble des travaux qui définissent cette thèse. Ces derniers ont été conduits entre 2006 et 2009 au sein de l'unité INSERM U734 et les services de chirurgie cardio-thoracique et vasculaire et d'hématologie biologique du CHU de Nancy. Cette thèse a permis de rassembler les travaux cliniques et expérimentaux concernant l'utilisation du rFVIIa comme agent hémostatique en CCV afin d'en analyser les bénéfices et limites. Les deux chapitres suivants rapportent successivement les travaux menés de manière concomitante :

- Les études cliniques :

1- un case report sur l'usage de rFVIIa en post CEC d'un patient avec TIH²⁹,

2- l'observatoire national de l'usage du rFVIIa en CCV conduit de 2005 à 2007 (en révision).

- Les travaux expérimentaux ; nous rapportons le cheminement scientifique et logistique de l'expérimentation animale. Tous nos travaux ont été appliqués sur des lapins mâles pour s'affranchir des perturbations hormonales et de leur influence sur la coagulation. Cette seconde partie comporte :

1- la synthèse des résultats du modèle de thrombose artérielle cyclique (master 2 de sciences chirurgicales 2004-2005, INSERM U734)

2- une lettre à l'éditeur concernant des réflexions sur le modèle animal de thrombose artérielle cyclique⁶⁵,

3- l'article original de l'étude randomisée conduite en aveugle du modèle d'hémorragie artérielle aiguë que nous avons mis en place⁶⁶.

Etudes cliniques

Nous rapportons dans cette partie le développement et les résultats cliniques des expériences nancéienne et nationale de l'usage du rFVIIa en CCV. Comme nous l'avons précédemment exposé, la prévention et le traitement du saignement en post opératoire est au centre des préoccupations de la CCV. L'arsenal thérapeutique a récemment été amputé de l'anti-fibrinolytique considéré comme étant de référence pendant 18 ans : l'aprotinine (Trasylol®, Bayer). En effet, cette molécule a été retirée du marché français le 1^{er} Juillet 2008 suite aux conclusions de deux études comparatives versus deux autres anti-fibrinolytiques analogues de la lysine (acide tranexamique et acide aminocaproïque). La première, de Mangano *et coll.*⁶⁷ est une étude prospective observationnelle multicentrique contrôlée chez plus de 4300 patients opérés pour revascularisation myocardique. L'hypothèse de ce travail était d'évaluer le fondement de l'usage d'anti-fibrinolytiques chez des patients à risque de thrombose coronaire péri-opératoire. Or, les analyses multi-variées ont trouvé que l'aprotinine doublait le risque d'insuffisance rénale nécessitant une hémofiltration, augmentait de 55 % le risque de défaillance cardiaque et de 180 % le risque d'accident vasculaire cérébral. Pourtant, l'aprotinine était jusqu'alors largement utilisée et appréciée des thérapeutes pour son efficacité clinique perçue par les praticiens. Ces données ont été confirmées par l'étude BART publiée dans le *New England Journal of Medicine*⁶⁸. Dans cette étude indépendante de l'industrie et randomisée, Fergusson *et coll.* ont comparé l'aprotinine aux deux analogues de lysine sus cités chez 2331 patients à haut risque de saignement (chirurgie redux, urgente, valvulaire multiple, valve et pontages, chirurgie de l'aorte ascendante et de l'arche). Les conclusions ont été univoques. D'abord, l'étude a été interrompue en raison d'une surmortalité dans le groupe aprotinine. Ensuite, en dépit d'un modeste effet bénéfique sur le saignement dans le groupe aprotinine, le risque relatif de décès à 30 jours dans ce même groupe a été calculé à 1,53 (intervalle de confiance à 95 %, 1,06 à 2,22). Enfin, aucun sous-

groupe pouvant bénéficier de l'aprotinine n'a pu être identifié. Cette aventure nous rappelle l'exigence de vigilance, de remise en question et d'évaluation clinique pertinente au cours de la vie commerciale des molécules (phase IV).

Nos équipes locales d'hémostase et de CCV se sont intéressées à l'usage du rFVIIa dès 2003. Durant cette première année d'utilisation dans notre centre, le rFVIIa a été employé à neuf reprises en situation de sauvetage post CEC. L'usage du rFVIIa étant hors AMM, une étude rétrospective de ces cas a été réalisée afin d'observer nos pratiques et de surveiller la sécurité d'utilisation. Nous rapportons ci-dessous le résumé de ce travail non publié (2003, n = 9, Nancy).

Les patients étaient des adultes âgés de 15 à 73 ans ; six d'entre eux ont reçu une injection post-CEC après neutralisation de l'héparine au bloc opératoire, et dans les trois autres cas, l'injection a été administrée en réanimation. Tous les patients ont reçu une injection d'une dose de 60 µg/kg, arrondie à une ampoule de 4,8 mg de rFVIIa (formulation de l'époque). Une seconde injection a été réalisée chez deux patients. L'arrêt de l'hémorragie a été constaté chez huit des neuf patients ; le contrôle du saignement a été constaté dans les 30 à 45 minutes suivant l'injection du rFVIIa. Aucun événement indésirable d'ordre thrombotique n'a été détecté, dans les limites des explorations. Un patient est décédé au décours immédiat de l'intervention d'un syndrome hémorragique non contrôlé. Trois patients sont décédés à distance de l'intervention pour pathologie cardiaque grave associée à de multiples facteurs de co-morbidité.

Un cas particulier a alimenté nos réflexions et a été publié dans *l'European Journal of Cardiothoracic Surgery* (voir page suivante)²⁹. Il a rapporté l'utilisation du rFVIIa à la dose de 60 µg/kg pour contrôler une situation hémorragique grave dans un contexte complexe de surdosage en Tirofiban (anti GPIIb/IIIa), de Thrombopénie Induite par l'Héparine (TIH), d'urgence, d'insuffisance rénale et de chirurgie redux précoce. La persistance de l'effet de

tirofiban a été démontrée par des tests d'agrégation plaquettaire (photométrique en plasma riche en plaquettes et anticoagulé avec du citrate) et une injection de 60 µg/kg de rFVIIa a été suivie dans la demi-heure par l'arrêt du saignement. Aucune complication thrombotique n'a été détectée chez ce patient. Cela rejoint les données compatibles avec l'efficacité du rFVIIa en cas de thrombasthénie de Glanzmann qui est un défaut d'agrégation plaquettaire due à une altération du complexe GPIIb/IIIa⁶⁹. Nous profitons de cette thèse pour remercier Emmanuel de Maître qui réalisa alors les tests d'agrégation plaquettaire et contribua à la gestion de ce cas.



Case report

Heparin-induced thrombocytopenia and cardiopulmonary bypass: anticoagulation with unfractionated heparin and the GPIIb/IIIa inhibitor tirofiban and successful use of rFVIIa for post-protamine bleeding due to persistent platelet blockade

Marion Durand^{a,b,c,*}, Thomas Lecompte^{a,b,d},
Marie Hacquard^{a,b,d}, Jean-Pierre Carteaux^{a,b,c}

^a *Inserm, U 734, Vandoeuvre-les-Nancy, France*

^b *Nancy-Université Université Henri Poincaré, Nancy, France*

^c *CHU Nancy, Service de Chirurgie Cardio-Vasculaire, Nancy, France*

^d *CHU Nancy, Service d'Hématologie Biologique, Nancy, France*

Received 24 September 2007; received in revised form 25 March 2008; accepted 19 May 2008; Available online 24 June 2008

Abstract

Heparin-induced thrombocytopenia was diagnosed in a 50-year-old man on day 5 after cardiac surgery (aorto-coronary bypass and mitral valve replacement). He required redo (para-prosthesis leak) on day 13. The cardiopulmonary bypass (CPB) was performed with unfractionated heparin (UFH) and the platelet glycoprotein (GP) IIb/IIIa inhibitor tirofiban. Post-protamine bleeding likely due to documented persistent platelet blockade by tirofiban was successfully treated with one dose of recombinant activated factor VII (rFVIIa, 60 µg/kg). No thrombotic complications were detected. The management of CPB with UHF and tirofiban is a convenient option and rFVIIa seems appropriate to handle bleeding issues. © 2008 European Association for Cardio-Thoracic Surgery. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Heparin-induced thrombocytopenia; Cardiopulmonary bypass; Unfractionated heparin; Tirofiban; rFVIIa

1. Introduction

Heparin-induced thrombocytopenia type II (HIT) is associated with poor outcome in the context of cardiac surgery [1]. Cardiopulmonary bypass (CPB) requires an efficient anticoagulation and unfractionated heparin (UFH) remains the gold standard. Successful use of a direct thrombin inhibitor such as lepirudin or argatroban during CPB has been reported several times [2] but the need for dedicated intraoperative laboratory monitoring and the lack of an antagonist make their management tricky and risky. Tirofiban, a platelet glycoprotein (GP) IIb/IIIa inhibitor, has been used during CPB for a little while, in association with UFH [3]. Tirofiban has a short half-life but its main elimination route is via the kidneys. By strongly inhibiting fibrinogen binding to GPIIb/IIIa onto the surface of activated platelets, tirofiban can block platelet

aggregation (though not platelet activation) by HIT antibodies [2]. Recombinant activated factor VII (rFVIIa) is a powerful haemostatic agent increasingly used in cardiac surgery to stop refractory, life-threatening bleeding [4]. A case of HIT and CPB with porcine UFH and tirofiban is described hereafter, with the successful use of rFVIIa for post-protamine bleeding.

2. Case report

A 50-year-old man underwent four bypasses (LIMA and three saphenous grafts) plus a mechanical mitral valve replacement on the third day of a myocardial infarct. Since postoperative day 3 (POD 3), a continuous haemofiltration was required for anuric renal failure (creatinemia = 270 µmol/l). On POD 5, HIT was suspected in view of a persistent thrombocytopenia (45 G/l). UFH was stopped and danaparoid therapy was introduced through continuous intravenous infusion at the recommended dose. HIT was confirmed by positive ELISA and platelet aggregation tests. After a satisfactory evolution (increase in platelet count

* Corresponding author. Address: CHU Nancy, Service de Chirurgie Cardio-Vasculaire, Nancy, France. Tel.: +33 6 10 57 96 21; fax: +33 3 83 08 44 08. E-mail address: durandmarion@hotmail.com (M. Durand).

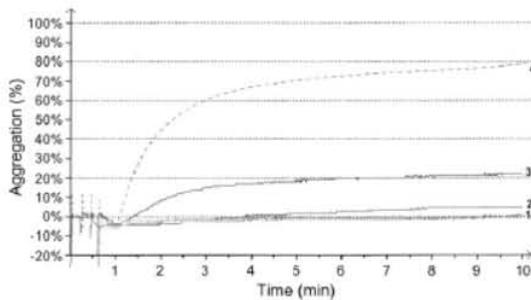


Fig. 1. Photometric platelet aggregometry 5 min after tirofiban bolus infusion. Test made with platelet rich plasma (239 G/l). Curves 1: ADP = 10 and 20 μ M. Curve 2: Collagen = 2 μ g/ml. Curve 3: Collagen = 20 μ g/ml. Curve 4: typical normal tracing.

without thrombosis), acute haemodynamic failure occurred on POD 13. A para-prosthesis massive leak was diagnosed by trans-thoracic echocardiography. A surgical redo valve replacement had to be performed in emergency. Danaparoid infusion was stopped 1 h before surgery and CPB was performed with UFH and tirofiban. The platelet blockade was assessed by a photometric platelet aggregometry (Fig. 1). Thirty minutes before the end of CPB, tirofiban infusion was stopped. After adequate UFH neutralisation with protamine, a diffuse and important bleeding was noticed in the operating theatre. The blood from the CPB suction device was retransfused without being processed. Despite massive transfusion (11 units of blood product, including platelet concentrate), the bleeding was so important that the chest could not be closed. Persistent platelet blockade by tirofiban (2 h after the injection's end) was documented by aggregometry (Fig. 2) and held as the main factor for haemorrhage, whereas platelet count and clotting times were within usual post-CPB values (aPTT = 39 s with 35 s mean normal time, PT = 22 s with 13.2 s mean normal time). At this time, danaparoid antiXa level was 0.2 IU/ml, which was rather low and could not be held responsible for the haemorrhage. We therefore decided to proceed to rFVIIa injection at the dose of 60 μ g/kg, since it is our current policy to do a trial in case of intractable post-protamine bleeding and there is a strong rationale that this drug can improve haemostasis in case of defective GPIIb/IIIa

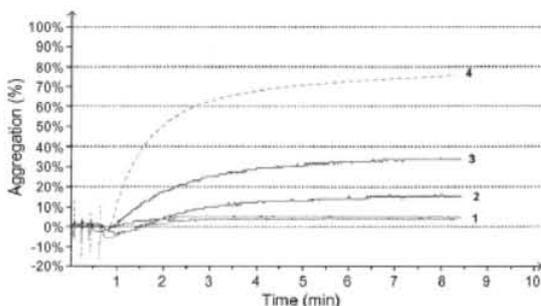


Fig. 2. Photometric platelet aggregometry before rFVIIa infusion (2 h after the end of tirofiban infusion). Test made with platelet rich plasma (137 G/l). Curves 1: ADP = 10 and 20 μ M. Curve 2: Collagen = 2 μ g/ml. Curve 3: Collagen = 20 μ g/ml. Curve 4: typical normal tracing.

function as discussed below. The bleeding dramatically decreased to 50 ml/h within 30 min and PT shortened to 13.2 s. The chest could be readily closed and the patient left the operating room 2 h after protamine injection. Back in the intensive care unit, neither recurrent bleeding nor thrombosis was noticed.

3. Comment

To the best of our knowledge this is the first report of the use of rFVIIa on a patient under tirofiban during cardiac surgery. Tirofiban effect on platelet aggregation is major but reversible, with a short half-life as long as the renal function is not compromised. In this particular case, the patient had severe renal failure. The long lasting antiplatelet effect of tirofiban could not be handled by blood product transfusion, presumably since transfused platelets are inhibited by the high amount of plasma drug [5]. We used rFVIIa at the moderate dose that we are used to [6] and as already reported in cardiac surgery [7]. The haemostatic effect was noticed in as short a time as 30 min. We believe that rFVIIa overcame the antiplatelet effect of tirofiban by boosting thrombin generation as previously demonstrated [8]. Patients with inherited GPIIb/IIIa deficiency have been successfully managed with rFVIIa [9], and two tirofiban-treated patients have received it for major haemorrhage [10].

Thus, rFVIIa seems appropriate to manage bleeding consequences of tirofiban persistent effect, especially on patients with renal failure. Alternately, ultrafiltration or modified zero-balanced ultrafiltration can be used [2]. By contrast, a failure of rFVIIa could be anticipated if a direct thrombin inhibitor such as lepirudin was chosen, with dramatic accumulation in case of renal impairment. In spite of high thrombotic risk associated with HIT and potential thrombotic risk of rFVIIa, none of these adverse effects were observed. However, we suggest considering a dose of rFVIIa lower than 90 μ g/kg in order to reduce this risk [6].

References

- [1] Kuitunen A, Suojaranta-Ylinen R, Raivio P, Kukkonen S, Lassila R. Heparin-induced thrombocytopenia following cardiac surgery is associated with poor outcome. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2007;21(1):18–22.
- [2] Warkentin TE, Greinacher A. Heparin-induced thrombocytopenia and cardiac surgery. *Ann Thorac Surg* 2003;76(6):2121–31.
- [3] Commin PL, Rozec B, Trossaert M, Le Teunier Y, Fournet X, Blanloeil Y. Use of heparin and platelet GPIIb/IIIa inhibitor tirofiban for cardiac surgery in patients for suspicion of heparin-induced thrombocytopenia. *Ann Fr Anesth Reanim* 2006;25(11–12):1153–7.
- [4] Warren O, Mandal K, Hadjianastassiou V, Knowlton L, Panesar S, John K, Darzi A, Athanasiou T. Recombinant activated factor VII in cardiac surgery: a systematic review. *Ann Thorac Surg* 2007;83(2):707–14.
- [5] Tchong JE. Clinical challenges of platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibitor therapy: bleeding, reversal, thrombocytopenia, and retreatment. *Am Heart J* 2000;139(2 Pt 2):S38–45.
- [6] Blanloeil Y, Rigal JC, Bastien O, Carreau JP, Toussaint-Hacquard M, Lecomte T. Recombinant activated factor VII to control bleeding in cardiovascular surgery: need of efficacy and safety validation (Editorial in French). *Ann Fr Anesth Reanim* 2006;25:2–5.
- [7] von Heymann C, Redlich U, Jain U, Kastrop M, Schroeder T, Sander M, Grosse J, Ziemer S, Koscielny J, Konertz WF, Wernicke KD, Spies C. Recombinant activated factor VII for refractory bleeding after cardiac surgery – a retrospective analysis of safety and efficacy. *Crit Care Med* 2005;33(10):2241–6.

- [8] Lisman T, Moschatsis S, Adelmeijer J, Nieuwenhuis HK, De Groot PG. Recombinant factor VIIa enhances deposition of platelets with congenital or acquired alpha IIb beta 3 deficiency to endothelial cell matrix and collagen under conditions of flow via tissue factor-independent thrombin generation. *Blood* 2003;101(5):1864–70.
- [9] Poon MC, D'Oiron R, Von Depka M, Khair K, Négrier C, Karafoulidou A, Huth-Kuehne A, Morfini M. International Data Collection on Recombinant

- Factor VIIa and Congenital Platelet Disorders Study Group. Prophylactic and therapeutic recombinant factor VIIa administration to patients with Glanzmann's thrombasthenia: results of an international survey. *J Thromb Haemost* 2004;2(7):1096–103.
- [10] Stepinska J, Banaszewski M, Konopka A, Szajewski T. Activated recombinant factor VII (rFVIIa) in bleeding management after therapy with IIb/IIIa-inhibitor tirofiban. *Thromb Haemost* 2002;87(2):355–6.

Observatoire national

En raison de l'usage croissant du rFVIIa en chirurgie cardiaque et de son utilisation à des doses et dans des circonstances mal définies, il est apparu utile et pertinent de mettre en place un observatoire national prospectif d'utilisation du rFVIIa dans les syndromes hémorragiques réfractaires en chirurgie cardiaque avec ou sans CEC. Cet observatoire a été placé sous l'égide de la Société Française de Chirurgie Cardio-Thoracique et Vasculaire (SFCTCV), et Nancy en a été le centre investigateur.

Objectif de l'observatoire

L'objectif de cet observatoire a été d'établir une base de données prospective, multicentrique, nationale recueillant des informations sur les caractéristiques cliniques et la prise en charge thérapeutique des tous les patients ayant présenté un syndrome hémorragique en *per* ou *post* CCV avec ou sans CEC et ayant reçu le médicament.

Population concernée

Tout adulte ayant présenté un syndrome hémorragique et ayant reçu du rFVIIa au décours d'un acte de CCV avec ou sans CEC, sans critère d'exclusion.

Origine et nature des données recueillies

La fiche de recueil a été validée par le comité de pilotage. Cette fiche exhaustive comportait 12 pages. Les données recueillies d'après le dossier médical ont porté sur :

- Les caractéristiques du patient en préopératoire : âge, sexe, poids, taille
- Les pathologies principales et associées
- Le type de chirurgie
- Le protocole détaillé CEC d'héparinisation et de neutralisation

- Une description aussi précise que possible du syndrome hémorragique et de ces causes probables – et en post-opératoire le volume horaire recueilli dans les drains pendant les 5 premiers jours.

Les informations concernant le traitement du syndrome hémorragique avant et après rFVIIa

- Produits Sanguins Labiles : description et quantités
- Produits de remplissage : description et quantités
- Neutralisation de l'héparine CEC résiduelle ou administrée en post CEC
- Anti-fibrinolytiques : description et quantités
- Colles biologiques chirurgicales : description et quantités

Les informations relatives à l'administration du rFVIIa :

- Heure et dose initiale, nombre d'injections, dose totale. Séquence avec PSL et produits de remplissage : récapitulatif exhaustif.
- Si plusieurs injections, récapitulatif pendant au moins 24 heures après dernière injection.

L'évaluation de l'efficacité du traitement en terme binaire Oui/Non :

- Les investigateurs pensent que le saignement s'est arrêté ou a pu être contrôlé après l'administration du produit, ou que la reprise chirurgicale a été rendue possible
- Pas d'effet
- Décès ou non jugé en rapport direct ou indirect, ou sans rapport avec le saignement « traité » par le rFVIIa.

Le recueil des données biologiques pertinentes.

Les complications :

- Défaillance multi-viscérale
- Insuffisance respiratoire

- Insuffisance rénale
- Troubles du rythme auriculo-ventriculaire
- Thrombose artérielle (IDM, AVC ischémique avec ou sans imagerie, ischémie mésentérique ...) ou veineuse

En cas de nécessité ou d'incohérence, le praticien en charge du patient a pu être contacté pour compléter la fiche de recueil.

Durée et modalités d'organisation

L'observatoire a été conduit selon un plan prédéfini, du 1^{er} Janvier 2005 au 1^{er} Octobre 2007.

Conduite du projet

Le projet est placé sous l'égide de la SFCTCV. La conduite de ce projet a été confiée au Professeur Jean-Pierre Carteaux.

Cette initiative a été encadrée par des échanges au sein du GIHP (Groupe d'Intérêt en Hémostase Péri opératoire), club de la Société Française d'Anesthésie Réanimation (SFAR) associant des spécialistes de l'hémostase et de la thrombose d'autres spécialités.

Un comité de pilotage composé de chirurgiens cardiaques, d'anesthésistes réanimateurs de la spécialité, d'hémostasiens et d'un épidémiologiste – méthodologiste a été constitué. Les membres sont nommés ici par ordre alphabétique : Olivier Bastien (Réanimation, Lyon), Christophe Beaufreton (chirurgie cardiaque, Angers), Yvonnick Blanloeil (Réanimation, Nantes), Stéphanie Boini (Epidémiologie, Nancy), Serge Briançon (Epidémiologie, Nancy), Jean-Pierre Carteaux (Chirurgie cardiaque, Nancy), Marie Hacquard (Hémostase, Nancy), Brigitte Jude (Hémostase, Lille), Thomas Lecompte (Hémostase, Nancy) et Alain Pavie (Chirurgie cardiaque, Paris). Le comité a compris en son sein au moins un représentant de

chaque société professionnelle concernée : SFCTCV, SFAR, Groupe d'Etude de l'Hémostase et de la Thrombose de la Société Française d'Hématologie.

L'observatoire a été soutenu financièrement sans contre-partie par le laboratoire Novo Nordisk®.

Recueil et centralisation des données

Tous les centres hospitaliers français pratiquant la CCV ont été contactés. Les données de chaque centre ont été envoyées directement au Centre d'Epidémiologie Clinique du CHU de Nancy qui s'est chargé de la collection des données. Les règles de confidentialité ont été respectées.

Aspects réglementaires

Les médecins reportant les données n'ont pas été rémunérés pour leur participation à cet observatoire.

Commission Nationale Informatique et Liberté

Un dossier du projet a été soumis au Comité Consultatif sur le Traitement de l'Information en matière de Recherche dans le Domaine de la Santé et à la CNIL pour approbation.

Comité de Protection des Personnes

Cet observatoire s'étant développé en situation pragmatique, la relation médecin patient n'a pas été modifiée et n'a donc pas justifié d'une soumission à l'approbation d'un CCP.

Ces aspects réglementaires ont été pris en charge et validés par le CEC CHU Nancy – Inserm (Pr S Briançon).

Résultats

Durant la période d'observation (2005-2007) 109 cas d'utilisation ont été rapportés, dont 37 cas d'assistances circulatoires. L'injection a été unique dans 76 % des cas. Les patients ont été traités au bloc opératoire (49 %) ou en réanimation (51 %). La durée moyenne

d'intervention a été de 8,6 h [2-30] et la durée moyenne de CEC a été de 209 min [35-590]. Le saignement s'est arrêté dans 43 % des cas (dose $81 \pm 31 \mu\text{g/kg}$), a diminué dans 37 % des cas ($71 \pm 24 \mu\text{g/kg}$), et a persisté dans 20 % des cas ($64 \pm 23 \mu\text{g/kg}$). Nous avons trouvé une corrélation significative entre la dose de rFVIIa administrée et l'arrêt du saignement (test de Kruskal-Wallis, $p=0,044$). La médiane des PSL délivrés est passée de 25 (2-90) avant à 6 (0-48) après l'administration de rFVIIa ($p < 0.001$). Le saignement horaire des patients traités en réanimation ($n=34$) a diminué de $365 \pm 212 \text{ mL/h}$ à $115 \pm 106 \text{ mL/h}$ ($p < 0.001$). Des évènements thrombotiques ont été rapportés chez 24 % des patients. La survie à 28 j a été de 60 %. Les patients chez lesquels le saignement a été jugé non modifié après administration du rFVIIa ont une survie à un mois deux fois moins importante que ceux chez qui le saignement s'est arrêté (40 % versus 80 %).

En conclusion, dans cette étude observationnelle en chirurgie cardiaque, l'administration de rFVIIa a été associée au contrôle de l'hémorragie dans la majorité des cas sans objectiver d'Éts de forte imputabilité, y compris chez les patients porteurs d'une assistance circulatoire mécanique.

Dans ce travail, nous avons colligé un groupe important d'assistances (plus de 1/3 patients), ce qui correspond à une très importante représentation des assistances circulatoires par rapport à la population de CCV (d'après les données nationales EPICARD : 1 patient sur 30) et en regard de la littérature. L'administration du rFVIIa a été dans la grande majorité en accord avec les recommandations d'utilisation⁷⁰. Ce travail constitue une première base de données concernant le saignement majeur en chirurgie CCV et l'utilisation de rFVIIa dans les centres français de CCV.

Communications des résultats

Ces résultats ont été communiqués lors des manifestations scientifiques suivantes.

- SFCTCV, Versailles, Juin 2008 (Communication orale)
 - Société Française d'Hématologie : Paris, Avril 2009 (Poster)
 - European Society of Surgical Research : Nîmes Mai 2009 (Communication orale et abstract British Journal of Surgery 2009; 96(S5):1-72 (abstract) doi: 10.1002/bjs.6650)*
 - International Society of Thrombosis and Haemostasis, Boston, Juillet 2009 (Poster)
 - Congrès de la SFAR, Paris, Septembre 2009 (Communication orale et Poster)
- * : Présentations par l'auteur de la thèse

Une publication est en cours de révision pour l'*European Journal of Cardiothoracic Surgery*. Nous présentons sa version finale dans les pages suivantes.

Publication 2 : article original soumis (Juin 2010) en révision

Off-label use of recombinant activated factor VII in intractable hemorrhage after cardiovascular surgery: an observational study of practices in 23 French cardiac centers (2005-6-7)

First authors: Marie Hacquard 1,2,3, Marion Durand 1,2,4 (contributed equally)

Marie Hacquard^{1,2,3}; Marion Durand^{1,2,4} (contributed equally); Thomas Lecompte^{1,2,3}, MD; Stéphanie Boini^{5,6,7}; Serge Briançon^{5,6,7}; Jean-Pierre Carteaux^{1,2,4}.

1 Inserm U734 currently U961 starting from January 1st 2009, Nancy, France

2 Nancy University

3 Hematology Lab, Nancy Hospital, France

4 Cardiac Surgery Department, Nancy Hospital, France

5 INSERM, CIC-EC CIE6, Nancy, France

6 Department of Clinical Epidemiology and Evaluation, Nancy, France

7 Nancy-University, EA 4003, Nancy, France

Abstract

Objectives: To describe French off-label use of rFVIIa for intractable bleeding in major cardio-vascular surgery.

Methods: Retrospective observational analysis of data from 2005 to October 2007 (no formal guideline was available). The collect request form was elaborated by a multidisciplinary committee.

Results: Data on 109 patients - 37 mechanical cardiac assist devices – were collected, with repeated injection for 24 %. Bleeding stopped, decreased or continued in 43 %, 37 % and 20 % of the cases respectively. Hourly bleeding (for patients treated in ICU) decreased from 365 ± 212 to 115 ± 106 mL.h⁻¹ ($p < 0.001$). The median number of transfused products was 25 (2-90) before and 6 (0-48) after rFVIIa ($p < 0.001$). Most patients had been well compensated with fibrinogen (> 1 g.L⁻¹) and platelets (> 50 G.L⁻¹) before rFVIIa. The bleeding outcome (cessation, decrease or no change) was associated with the infused dose (81 ± 31 , 71 ± 24 , 64 ± 23 $\mu\text{g.kg}^{-1}$; $p = 0.044$) and did not differ whether rFVIIa was administered in the operating room (49 %) or in ICU (51%). Thrombotic events occurred in 13 % of patients without and 27 % of those with assist devices (but without intra-device clotting). Overall 28-day survival rate was 60 % and associated with bleeding outcome ($p = 0.002$).

Conclusions: rFVIIa rescue therapy was followed by bleeding control in a substantial number of the patients with seemingly acceptable safety. Our observational study suggests that the dose to be tested prospectively is 80 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ at least.

Keywords: cardiac surgery, rFVIIa, coagulation, hemorrhage, registries.

Introduction

Bleeding is a major issue in cardiac surgery concerning 5 to 7 % of patients [1]. In fore plan, cardiopulmonary bypass (CPB) induces bleeding tendency by multiple ways: hemodilution, coagulation and fibrinolysis activation, platelet dysfunction and heparinization. Excessive bleeding occurs more frequently in high risk surgery: redo, emergency and technically difficult with a long CPB, hypothermia; and in patients with heparin induced thrombocytopenia, endocarditis, anticoagulant therapy... Several therapeutic strategies have been developed to decrease the impact of haemostatic system activation in order to improve patient care [2]. But dramatic bleeding is still a troublesome situation in cardiac surgery leading to a 2 to 3 fold increase in mortality [3,4].

Since 1999, recombinant activated human factor VII (rFVIIa, Novoseven®, Novo Nordisk) has been used as a compassionate therapy for life threatening hemorrhage following cardiac surgery. Its approved use by European Medicines Agency (EMA) is restricted to bleeding treatment or prophylaxis during invasive surgery for immunized hemophiliacs, Glanzmann thrombasthenia patients with anti GPIIb/IIIa or anti HLA antibodies and refractory to platelet transfusion, and for patients with inherited factor VII deficiency. Currently, some data concerning efficacy and safety of rFVIIa in cardiac surgical setting are available. However, as salvage rFVIIa is employed in exceptional and dramatic situations, a prospective randomized controlled study in cardiac surgery is hardly feasible; there is up to now only two prospective randomized double blind trial in cardiac surgery [5,6] but the majority of data are restricted to case reports or retrospective studies [7,8], and to three observational studies in Canada [9], USA[10] and New Zealand [11] where therapeutic attitudes may differ from European practices. Thus we conducted an observational study in French cardiac centers from 2005 to 2007.

Material and methods

Patients

Adult patients were eligible when they received rFVIIa after major cardiovascular surgery with or without CPB in any French hospitals from January 1st 2005 to October 31st 2007. There were no exclusion criteria.

Data collection

Data on the off label use of rFVIIa in cardiovascular surgery were retrospectively collected according to a standardized procedure established by a multidisciplinary scientific committee (surgeon, anesthetist, hematologist, epidemiologist, pharmacist). The French Society of Thoracic and Cardiovascular Surgery, the French Society of Anesthesia and Intensive Care

and the working group on Thrombosis and Hemostasis of the French Society of Hematology supported this study and contributed to the nationwide diffusion of the project to each surgical centre. Data were reported by the practitioners who prescribed rFVIIa in a clinical report form (crf). In addition to the conventional data, the practitioner was asked to characterize the presumed cause of bleeding as “surgical” or “not surgical” and to summarize his judgment about the bleeding outcomes after the rFVIIa administration. The questionnaire was returned to the Nancy Hospital and carefully checked for data consistency by two of the investigators and if needed and whenever possible, completed or corrected after further contact.

Objective and criteria

The objective of the study was to describe French practices regarding the off-label use of rFVIIa for intractable and life threatening bleeding in major cardiovascular surgery. The recorded outcomes were bleeding, thrombotic complications and death. With respect to bleeding, the physician in charge of the patient was asked to classify the bleeding outcomes into 1 of the 3 following categories: cessation, decrease or no change. Bleeding cessation was defined as follows (i) possibility of chest closure and ⁷¹ surgeon’s judgment, in the operating room (OR); (iii) no need for urgent reoperation; (iv) volume drainage in the chest tubes and transfusion requirement down to locally accepted values. Bleeding was considered to be decreased but not stopped when criteria ⁷¹ and (iv) were only partially fulfilled and unchanged in any other case. Local physician’s classification was independently checked by 2 of the authors (M Hacquard, JP Carreaux) and found reliable. Major safety issues were any events documented or presumed to be thrombotic.

Statistical Analysis

Data were processed in a Access© specific database. Statistical analysis was performed using SAS version 9.1 system software (SAS Inc, Cary, NC). Data were summarized as median, minimum and maximum or frequency as appropriated, except for hourly bleeding and injected dose of rFVIIa which have been expressed as mean \pm SD. Hourly bleeding data were available for 68 patients (34 receiving rFVIIa in OR, 34 in the intensive care unit - ICU). For the other patients we had only overall bleeding outcome. Comparisons were performed using non parametric tests, namely Fisher exact test for categorical variables and Kruskal and Wallis test for interval-defined variables. Survival was described using Kaplan-Meier curves and groups were compared using the log-rank test. Since no censoring occurred before 28 days curves are displayed after the last death occurred.

Results

During the study period (January 2005-October 2007), 109 cases of rFVIIa off-label use in adult cardiovascular surgery were reported from 23 hospitals (22 university hospital, 1 private hospital). During this period, NovoNordisk provided to French hospitals 141 treatments for bleeding in cardiac surgery. So, completeness of the records was 77 % of rFVIIa use in cardiac surgery in France during the index period.

Patient characteristics

Most of the 109 patients were male (74 %). The median age was 54 years (range 16 to 85). The median Body Mass Index was 24.5 kg.m⁻² (range 16 to 37). Among these patients, 31.2 % had a history of thrombotic event, 17.6 % had pre-existing renal failure and 34 % had received preoperative antithrombotic therapy or had a known coagulopathy. The type of cardiovascular surgery and the surgical characteristics are described in table 1.

Settings and reasons of rFVIIa administration

rFVIIa was administered in OR (49 %) or ICU (51%). The precise clinical setting of rFVIIa first administration, taking into account the reoperation scenario, is described in figure 1. The bleeding was deemed as linked to a “surgical” cause or considered to be due to coagulopathy for 13 and 35 % of the patients respectively; for the others both reasons were mentioned. Among the 70 patients who did not receive rFVIIa during the first operation, 28 (40 %) underwent a redo for surgical hemostasis before rFVIIa administration. Most patients were heavily transfused and received multiple hemostatic treatments as reported in table 2. In most instances, patients were well compensated before rFVIIa injection in order to reach a plasma concentration of fibrinogen up to 1 g.L⁻¹ and a platelet count up to 50 G.L⁻¹ (table 3) as recommended in the European guidelines [12-13].

rFVIIa doses and bleeding outcomes

Seventy six percent of patients received a single dose of rFVIIa ($74 \pm 28 \mu\text{g.kg}^{-1}$ [Min 16- Max 206]). When they received two injections (n=26), the first dose was $62 \pm 28 \mu\text{g.kg}^{-1}$ [16-126] and the second ($61 \pm 31 \mu\text{g.kg}^{-1}$ [14-160]) was administered in order to consolidate the beneficial effect (n=13) or because of the absence of amelioration of the bleeding (n=12). The mean time interval between the two injections was 2h20 min [0-11]. The median number of transfused blood products was 25 (2-90) before and 6 (0-48) after rFVIIa ($p < 0.001$), with a decrease in the number of transfused RBC units from 10 [0-48] to 2 [0-18] ($p < 0.0001$). For patients treated in ICU, the chest tubes drainage significantly decreased after rFVIIa injection from $365 \pm 212 \text{ mL.h}^{-1}$ to $115 \pm 106 \text{ mL.h}^{-1}$ ($p < 0.001$) (figure 2). For patients treated in OR the bleeding rate was not assessable before injection, but the hourly chest tube drainage

measured in ICU appeared to be normal [14] (figure 3). On the basis of the predefined criteria, the bleeding stopped in 43 % of cases, decreased in 37 % of cases, and remained unchanged in 20 % of cases. The total median number of products transfused after rFVIIa was 3 [Min 0 – Max 34], 5 [0-40] and 10 [0-48] in the 3 bleeding outcome groups respectively ($p=0.013$). Reoperation after rFVIIa injection was performed in 17.9%, 20.0% and 44.4% of the patients of each group respectively. Regarding the factors that may influence the bleeding outcome, there was no difference regarding bleeding outcome according to the setting of injection (OR or ICU) or bleeding causes (surgical or not). We found a statistically significant difference regarding the injected doses between the 3 outcome groups ($p=0.044$) (figure 4). Among the other factors that might have been associated with outcome, surgery mean duration (h) was 7.7 ± 4.5 , 7.7 ± 4.5 , 11.3 ± 4.0 ($p < 0.001$), and total number of transfused units before rFVIIa injection (median [Min-Max]) was 21 [2-90], 30 [5-82], 35 [12-66] ($p = 0.074$) for stopped, decreased and unchanged bleeding groups respectively.

Adverse events and overall survival

No symptomatic event that was either documented or presumed to be thrombotic and closely related in time to rFVIIa administration was reported. However, thrombotic events were mentioned for 20 patients (24 %). Of note, they occurred more frequently in the group of patients with cardiac assist devices (27 % of the patients in the group of cardiac assist devices vs 14 % in the group without). There was no suggestion of intradvice coagulation however as detailed below. The 28 days survival rate was 60 %. The survival rate curves over 28 days are displayed in figure 5. The survival of patients with bleeding cessation was significantly better than the survival of the two other groups ($p=0.002$).

Details on patients with mechanical cardiac assist device

In this series, 37 patients who received rFVIIa had a mechanical circulatory assisting device: 29 ExtraCorporal Membrane Oxygenator (ECMO), 7 Transcutaneous Ventricular Assisting Device (Thoratec®) and 2 Biventricular Assisting Device (CardioWest®). The treatment was given in the OR for 18 patients and in the ICU for the others. The mean injected dose was $68.4 \pm 19.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, and 9 patients had two injections. The bleeding stopped in 10 patients, decreased in 14 patients and remained unchanged in 13 patients. Thrombotic events were noted in 10 patients (ie 27 % of the patients of this group as mentioned above) but no clotting of the cardiac assist devices assessed through flow rate reductions, device power-consumption increases or device failure. Thrombotic events in patients of this group represent half of the total thrombotic events. The survival rate at 28 days was 45.7 %.

Discussion

This is the first European observational report of rFVIIa use in cardiac surgery. As a rule the patients who received rFVIIa underwent very complex surgery and had massive bleeding. The use of rFVIIa was in good accordance with the European Guidelines [12,13]: salvage therapy with attention paid to fibrinogen and platelet levels, body temperature, pH correction... Those parameters are likely to be prerequisites for rFVIIa efficacy. Surprisingly, we found two patients who received rFVIIa prior to transfusion. After a second look to their observations we learnt that one patient was a hemophiliac and that the other one was described by the practitioners in charge as an erroneous use. It might be stunning, 22 patients received prothrombin complex concentrate before rFVIIa. This was in the course of antivitamin K therapy normalization before surgery rather than a treatment for bleeding.

As previously reported in several previous studies [5,9-11,15], we noticed that rFVIIa given for intractable haemorrhage after major cardiac surgery was associated to a marked decrease in transfusion and blood derived-products use and likewise to bleeding arrest or decrease in 80 % of the cases whatever the alleged cause of bleeding (surgical, acquired coagulopathy or both). Furthermore, we found a statistically significant association between the dose and bleeding outcomes that had not been previously reported in the other studies. The mean dose infused in the group of patients with bleeding arrest was around 80 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ whereas the mean dose infused in the group of patients with sustained bleeding was around 65 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. These data are somewhat different from those of Masud et al [10], who performed a subgroup analysis on the potential dose-effect relationship and who found no difference between the quartiles $>30 \mu\text{g.kg}^{-1}$. However, in that latter study, the analysis was based on the magnitude of transfused RBC reduction, and not on bleeding. Similarly, Willis et al [16] did not observe any difference in a subgroup analysis of the Australian-New Zealand registry that may be due to the difference of methodology used (predefinition of dose subgroups). The reasons why a dose relationship was not evidenced in the 2 previous multicenter observational studies is unclear. Although the differences in the dose we noticed were in a narrow range, our data suggest that the most effective dose is at least 80 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Interestingly, this dose is quite similar to that used for hemophiliacs, which is 90 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

Regarding the factors that may influence the bleeding outcome, intervention duration and the quantity of transfused products before rFVIIa injection tend to be longer and higher respectively in the group of patients with sustained bleeding despite rFVIIa as compared to the others. These results are in agreement with Karkouti et al [17], who showed that outcomes was related to the quantity of RBC transfused at the time of rFVIIa injection. The appropriate

time of the rFVIIa administration in order to be the most effective is an important but unresolved issue: available data suggest that rFVIIa infusion should not be too much deferred or postponed. Survival rate curves show that death occurs in the early days of surgery and presumably due to the bleeding and its sequelae. A major concern of rFVIIa off-label use is safety which essentially pertains on the thrombotic risk [18-20]. In our study, events deemed of thrombotic nature were reported in 24% of the patients, a frequency that might appear as high. However, concerning this endpoint, it seems appropriate to consider separately patients with or without assisting circulatory device as it is well recognized that the presence of a cardiac assist devices may favor the occurrence of thromboembolic complications, which are particularly worrisome in those patients. Noteworthy, the number of thrombotic events was similar to those reported in the other studies [11,15,17] (approximately 14 % for the patients without circulatory cardiac assist devices). This frequency appears to be of the same order of magnitude than the occurrence of thrombosis described in this high risk population after cardiac surgery who did not receive rFVIIa: indeed, the incidence of thrombosis was 10% in the control group of the study of Karkouti et al [15], and 12% in a prospective cohort study of the incidence of DVT in high risk ICU patients [21]. However, we did not find a relation between rFVIIa dose and thrombotic event occurrence. We reported the most substantial series of rFVIIa in mechanical circulatory support (37 patients). Moreover the previous largest series of patients with cardiac assist devices receiving rFVIIa was related to pediatric population [22]. The mean dose of rFVIIa used in our series was slightly lower than in the subgroup without assistance. None of these patients developed assisting circulation device coagulation that resulted in device failure, which is of major concern in these patients. Our data corroborate those of Masud et al [10]. Thrombotic events occurred in 10 of these 37 patients. This thromboembolic events rate is of the same order of the one of the series of Gandhi et al [23] (10/37) and is similar to that awaited in such population despite the incidence of thromboembolic events in patients with cardiac assist devices is poorly documented. One study assessed thromboembolic events in ECMO patients and showed that the incidence is at least 28 % [24,25]. It is very encouraging to see that in this population the use of rFVIIa was associated with clinical improvement without clearly apparent increase in thrombosis occurrence.

The use of rFVIIa remains highly contained. Rethoracotomy is the primary recommended option in order to correct a localized source of bleeding, but it might *per se* worsen the prognosis [4] when no obvious local surgical source is found or when surgical correction is very difficult or even impossible. To our surprise rFVIIa was associated to bleeding arrest or

decrease even when the alleged cause of bleeding was surgical. It is tempting to speculate that a systemic injection of rFVIIa might allow efficient local build up of hemostatic plug. However, pending further evidence, we do not recommend to use rFVIIa as the first option in that setting.

In conclusion, this French retrospective multicenter observational study brings a brick in the wall of efficacy and safety assessment of rFVIIa in cardiac surgery. This work points to a plausible rFVIIa efficiency at around 80 µg.kg⁻¹ with no clear indication of a detrimental excess of thrombosis. Considering the difficulty to set an appropriate prospective randomized clinical trial in those particularly severe and complex bleeding patients in cardiac surgery, we suggest suitable experimental animal studies to reinforce those findings and help to better define the dose in the absence of a relevant, widely accepted laboratory test to document the effect of rFVIIa. In the absence of a multicenter prospective study on the efficacy of rFVIIa in intractable bleeding in cardiac surgery, the report of each use in national surveys seems mandatory. In the meantime rFVIIa has been authorized by the French regulatory agency for such use as a temporary procedure with suggested doses ranging from 60 to 90µg.kg⁻¹.

Acknowledgements

We would like to thank the members of scientific committee (Pr O Bastien, Pr Y Blanloeil, Dr C Beaufreton, Pr B Jude, Pr A Pavie) and all the physicians who participated to this study (a list can be provided).

Tables

| Type of surgery | n (%)** | median | Min-Max |
|--|-----------------|--------|---------|
| Coronary surgery | 20 (18) | | |
| Valvular surgery | 35 (32) | | |
| Aortic surgery | 39 (36) | | |
| Others | 3 ⁷² | | |
| Cardiac Assist Device | 37 (34) | | |
| Transplantation | 19 (17) | | |
| Relevant surgical characteristics | | | |
| Urgent surgery | 56 (51) | | |
| Redo surgery | 29 (27) | | |
| Complex surgery* | 26 (24) | | |
| Pre-operative antiplatelet agent and/or known coagulopathy | 37 (34) | | |
| Surgery median duration (h) | | 8.6 | 2-30 |
| Surgery with cardiopulmonary bypass (CPB) | 95 (85) | | |
| Aorta cross-clamping | | | |
| Hypothermia ($\leq 34^{\circ}\text{C}$) | 59 (66) | | |

* complex surgery is defined as any other procedure than isolated coronary artery bypass grafting or isolated valve surgery.

** : percentage of available data

Table 1: Type of surgery and surgical characteristics

| Blood products | median [Min-Max] |
|-------------------------------------|-------------------------|
| Red Blood Cells (RBC) | 10 [0-48] |
| Platelet Concentrates (PC) | 2 [0-8] |
| Fresh Frozen Plasma (FFP) | 10 [0-37] |
| Other haemostatic treatments | n (%)* |
| Aprotinin | 81 (84) |
| Fibrinogen | 47 (48) |
| Biological glue | 30 (36) |
| Prothrombin complex concentrates | 22 (24) |
| Tranexamic acid | 11 (12) |
| Desmopressin | 1 (1) |

*: percentage of available data

Table 2: Medical treatments for bleeding since beginning of surgery and before rFVIIa administration

| Laboratory Parameters | Percentage of patients | mean \pm SD |
|---|-------------------------------|---------------------------------|
| Prothrombin Time < 50% (activity percentage) | 55 | |
| Platelet count < $50 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ | 7 | |
| Fibrinogen < $1 \text{ g} \cdot L^{-1}$ | 4 | |
| Haematocrit (%) | | 28 ± 5 |

Table 3: Laboratory data before rFVIIa infusion

Figures

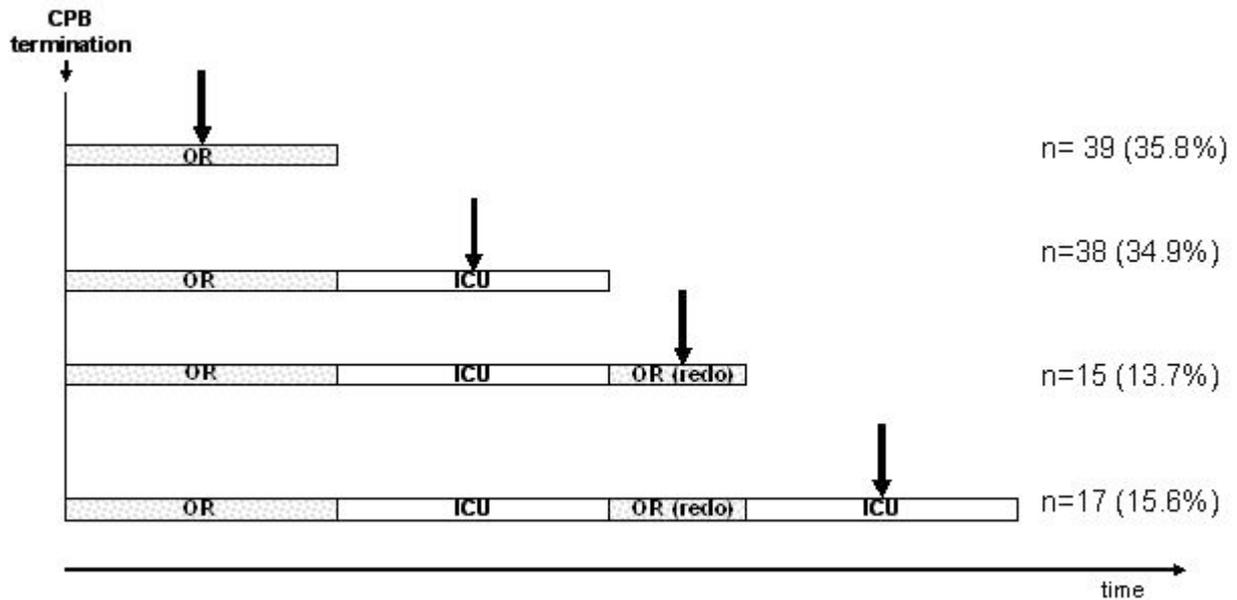


Figure 1: Clinical settings of administration of single or first injection of rFVIIa (number and percentage of patients for each scenario). Bold arrow indicates the time of rFVIIa injection. Time scale begins at CPB completion. OR= operating room; ICU = intensive care unit.

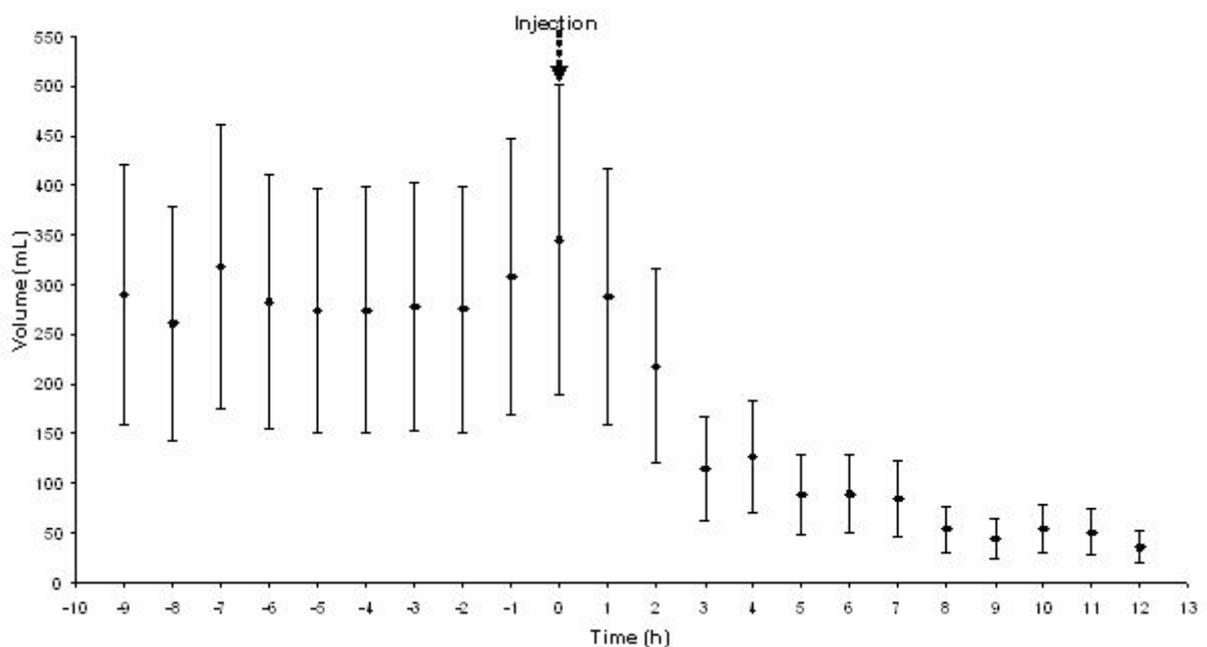


Figure 2: Chest tube hourly volume drainage in the ICU before and after rFVIIa injection for patients receiving rFVIIa in the ICU (n=34)

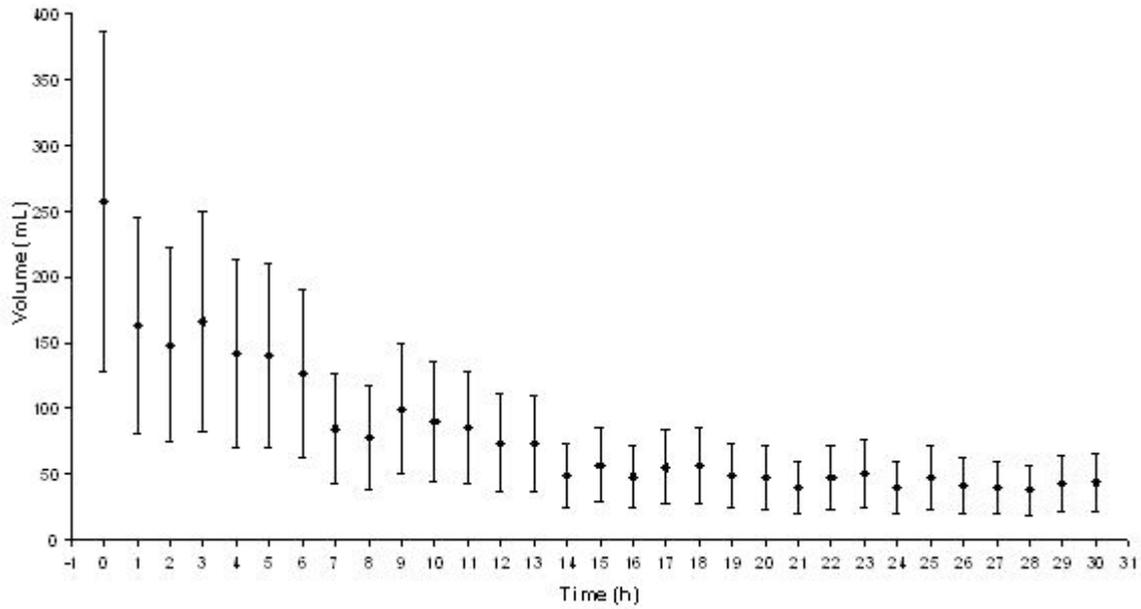


Figure 3: Chest tube hourly volume drainage in the ICU for patient who received rFVIIa in the OR (n=34)

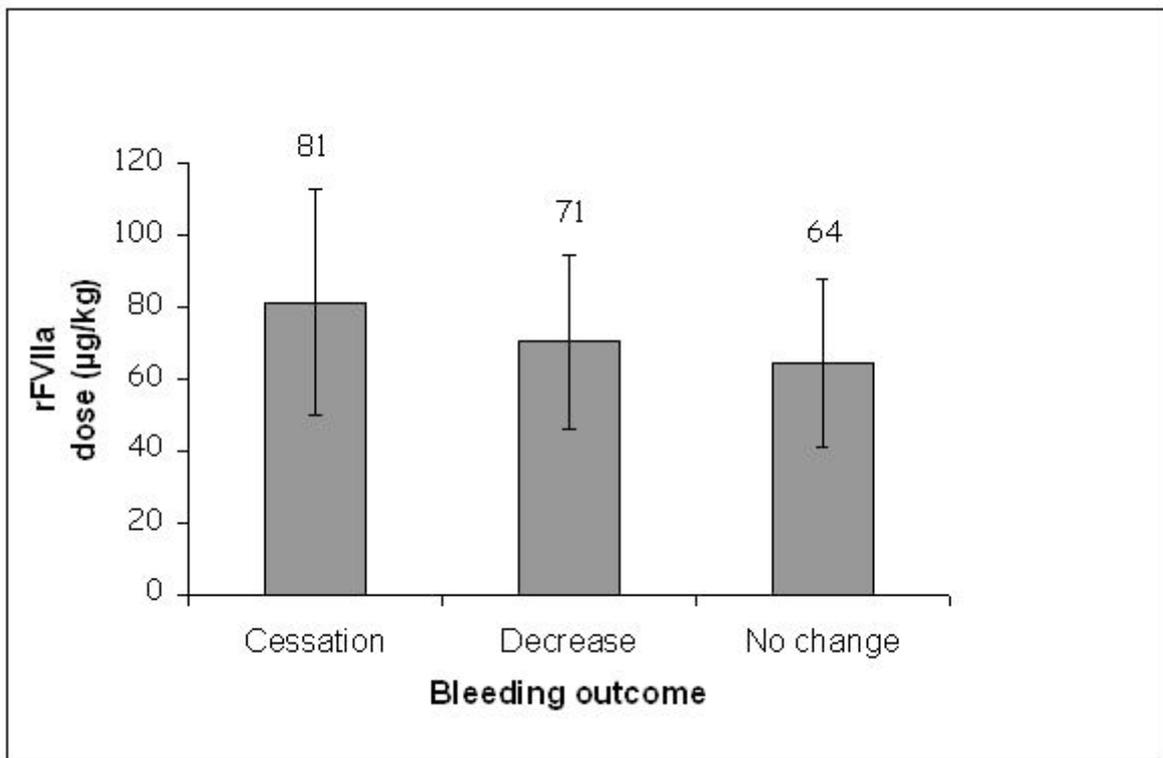
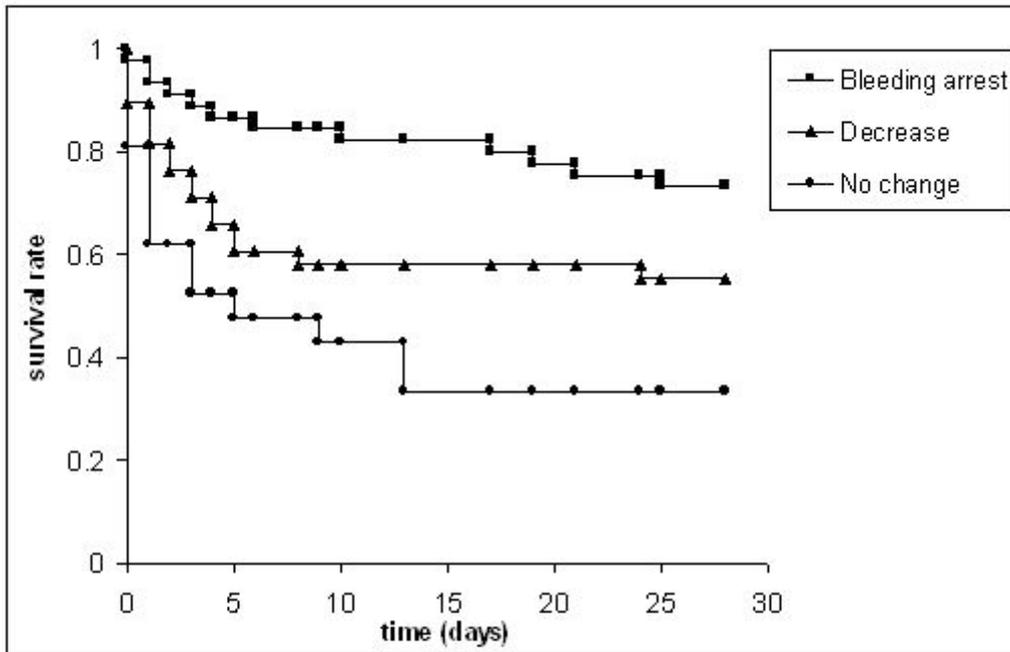


Figure 4: Mean rFVIIa dose related to bleeding outcome.

A statistically significant difference was found between the 3 groups (Kruskall-Wallis, $p = 0.044$)



| Number of patients at risk | D ₀ | D ₅ | D ₁₀ | D ₂₁ | D ₂₈ |
|----------------------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| bleeding arrest | 45 | 39 | 37 | 34 | 33 |
| decrease | 38 | 23 | 22 | 22 | 21 |
| no change | 21 | 10 | 9 | 7 | 7 |

Figure 5: Survival rate curves over 28 days for the three groups.

A statistically significant difference was found between the 3 curves ($p=0.002$).

References

- [1] Despotis GJ, Avidan MS, Hogue CW Jr. Mechanisms and attenuation of hemostatic activation during extracorporeal circulation. *Ann Thorac Surg* 2001; 72:S1821-S1831.
- [2] Levy JH. Pharmacologic preservation of the hemostatic system during cardiac surgery. *Ann Thorac Surg* 2001; 72:S1814-S1820.
- [3] Dacey LJ, Munoz JJ, Baribeau YR, Johnson ER, Lahey SJ, Leavitt BJ, Quinn RD, Nugent WC, Birkmeyer JD, O'Connor GT. Reexploration for hemorrhage following coronary artery bypass grafting: incidence and risk factors. Northern New England Cardiovascular Disease Study Group. *Arch Surg* 1998; 133:442-447.
- [4] Moulton MJ, Creswell LL, Mackey ME, Cox JL, Rosenbloom M. Reexploration for bleeding is a risk factor for adverse outcomes after cardiac operations. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996; 111:1037-1046.
- [5] Diprose P, Herbertson MJ, O'Shaughnessy D, Deakin CD, Gill RS. Reducing allogeneic transfusion in cardiac surgery: a randomized double-blind placebo-controlled trial of antifibrinolytic therapies used in addition to intra-operative cell salvage. *Br J Anaesth* 2005; 94:271-278.
- [6] Gill R, Herbertson M, Vuylsteke A, Olsen PS, von Heymann C, Mythen M, Sellke F, Booth F, Schmidt TA. Safety and efficacy of recombinant activated factor VII: a randomized placebo-controlled trial in the setting of bleeding after cardiac surgery. *Circulation*. 2009;120:21-7
- [7] Warren O, Mandal K, Hadjianastassiou V, Knowlton L, Panesar S, John K, Darzi A, Athanasiou T. Recombinant Activated Factor VII in Cardiac Surgery: A Systematic Review. *Ann Thorac Surg* 2007; 83:707-714.
- [8] Aldouri M. The use of recombinant factor VIIa in controlling surgical bleeding in non-haemophiliac patients. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002; 32 Suppl 1:41-46.
- [9] Karkouti K, Beattie WS, Arellano R, Aye T, Bussieres JS, Callum JL, Cheng D, Heinrich L, Kent B, Lee TW, MacAdams C, Mazer CD, Muirhead B, Rochon AG, Rubens FD, Sawchuk C, Wang S, Waters T, Wong BI, Yau TM. Comprehensive Canadian review of the off-label use of recombinant activated factor VII in cardiac surgery. *Circulation* 2008;118 :331-338.
- [10] Masud F, Bostan F, Chi E, Pass S, Samir H, Stuebing K, Liebl M. Recombinant factor VIIa treatment of severe bleeding in cardiac surgery patients: a retrospective analysis of dosing, efficacy, and safety outcomes. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2009; 23:28-33.

- [11] Dunkley S, Phillips L, McCall P, Brereton J, Lindeman R, Jankelowitz G, Cameron P. Recombinant activated factor VII in cardiac surgery: experience from the Australian and New Zealand Haemostasis Registry. *Ann Thorac Surg* 2008; 85:836-844.
- [12] Vincent JL, Rossaint R, Riou B, Ozier Y, Zideman D, Spahn DR. Recommendations on the use of recombinant activated factor VII as an adjunctive treatment for massive bleeding--a European perspective. *Crit Care* 2006; 10:R120.
- [13] Dunning J, Versteegh M, Fabbri A, Pavie A, Kohl P, Lockowandt U, Nashef S, on behalf of the EACTS Audit and Guidelines Committee. Guideline on antiplatelet and anticoagulation management in cardiac surgery. *Eur J Cardiothorac Surg* 2008; 34:73-92.
- [14] B elisle S, Hardy JF. Hemorrhage and the use of blood products after cardiac operations: myths and realities. *Ann Thorac Surg* 1996;62:1908-1917.
- [15] Karkouti K, Beattie W, Wijeyesundera D, Yau T, McCluskey S, Ghannam M, Sutton D, van Rensburg A, Karski J. Recombinant factor VIIa for intractable blood loss after cardiac surgery: a propensity score-matched case-control analysis. *Transfusion* 2005; 45:26-34.
- [16] Willis C, Bird R, Mullany D, Cameron P, Phillips L. Use of rFVIIa for critical bleeding in cardiac surgery: dose variation and patient outcomes. *Vox Sang* 2010; 98:531-537.
- [17] Karkouti K, Yau T, Riazi S, Dattilo K, Wasowicz M, Meineri M, McCluskey S, Wijeyesundera D, van Rensburg A, Beattie W. Determinants of complications with recombinant factor VIIa for refractory blood loss in cardiac surgery. *Can J Anesth* 2006; 53:802-809.
- [18] O'Connell K, Wood J, Wise R, Lozier J, Braun M. Thromboembolic adverse events after use of recombinant human coagulation factor VIIa. *JAMA* 2006; 295:293-298.
- [19] Roberts HR. Recombinant factor VIIa (Novoseven) and the safety of treatment. *Semin Hematol* 2001; 38(Suppl 12):48-50.
- [20] von Heymann C, Redlich U, Jain U, Kastrup M, Schroeder T, Sander M, Grosse J, Ziemer S, Koscielny J, Konertz WF, Wernecke KD, Spies C. Recombinant activated factor VII for refractory bleeding after cardiac surgery--a retrospective analysis of safety and efficacy. *Crit Care Med* 2005;33:2241-2246.
- [21] Marik P, Andrews L, Maini B. The incidence of deep venous thrombosis in ICU patients. *Chest* 1997; 111:661-664.
- [22] Agarwal HS, Bennett JE, Churchwell KB, Christian KG, Drinkwater DC Jr, He Y, Taylor MB. Recombinant factor seven therapy for postoperative bleeding in neonatal and pediatric cardiac surgery. *Ann Thorac Surg* 2007; 84:161-168.

- [23] Gandhi MJ, Pierce RA, Zhang L, Moon MR, Despotis GJ, Moazami N. Use of activated recombinant factor VII for severe coagulopathy post ventricular assist device or orthotopic heart transplant. *J Cardiothorac Surg* 2007; 2:32.
- [24] Rastan AJ, Lachmann N, Walther T, Doll N, Gradistanac T, Gommert JF, Lehmann S, Wittekind C, Mohr FW. Autopsy findings in patients on postcardiotomy extracorporeal membrane oxygenation (ECMO). *Int J Artif Organs* 2006; 29:1121-1131.
- [25] Schenk S., El-Banayosy A, Prohaska W, Arusoglu L, Morshuis M, Koester-Eiserfunke W, Kizner L, Murray E, Eichler P, Koerfer R, Greinacher A. Heparininduced thrombocytopenia in patients receiving mechanical circulatory support. *J. Thorac Cardiovasc Surg* 2006;131:1373-1381.

Expérimentations animales

Compte tenu des difficultés de réalisations et des biais des études cliniques dans ce domaine (urgence, saignement massif, difficulté d'inclusion, hétérogénéité des situations cliniques...), l'expérimentation animale paraît particulièrement légitime et pertinente pour progresser dans l'évaluation de la place du rFVIIa en CCV. En effet, la modélisation d'une situation clinique chez l'animal autorise la reproductibilité des lésions et limite les biais d'analyse. Nous avons deux champs d'étude concernant les effets du rFVIIa : les conséquences thrombotiques (sécurité) et son effet hémostatique (efficacité). Chacun de ces deux versants a été exploré au moyen d'un modèle dédié, dans le respect du cadre réglementaire et éthique concernant l'expérimentation animale.

L'implantation du modèle animal dans l'unité Inserm U734 a débuté en 2004 dans le cadre d'un master 2 de sciences chirurgicales. L'objet de nos premiers travaux était d'évaluer les effets pro-thrombotique et hémostatique du rFVIIa dans les conditions optimales d'utilisation du médicament : $\text{pH} \geq 7,2$, $\text{Ht} > 24 \%$, $\text{Pq} > 50 \text{ G/L}$, $\text{Fg} > 0,5 \text{ g/L}$ ⁷⁰ ; soit une hémostase non compromise et des animaux normo-thermes. C'est pourquoi nous décidés de réaliser toutes nos expérimentations avec des animaux aux compétences hémostatiques non altérées.

Nous rapportons ci-dessous le développement de notre démarche scientifique par ordre chronologique.

Choix de l'animal

Toutes nos expériences ont été conduites avec des lapins mâles New Zealand. Le choix de l'animal a été déterminé pour les raisons suivantes :

- Connaissance de son système hémostatique : l'hémostase du lapin est étudiée depuis de nombreuses années et ses différences avec le système humain sont bien répertoriées⁷³. De

plus, le FT de lapin est utilisé chez l'humain pour déclencher la coagulation (par exemple la Neoplastine®, Diagnostica Stago).

- Facilité de conditionnement et de manipulation : les lapins sont des animaux calmes et de poids moyen (~2,5 Kg) et pas impressionnants (facilité de manipulation).

- Abords vasculaires techniquement aisément accessibles. Que ce soit la veine marginale de l'oreille, les carotides et les fémorales : la pose de cathéter, la dissection et l'abord de ces vaisseaux nécessitent peu d'expertise, le cou et le Scarpa sont peu gras et les plans de dissection sont faciles à aborder. De même, le monitoring hémodynamique et la ventilation sont simples à réaliser.

- La littérature concernant le modèle est abondante : le lapin est un animal très utilisé dans les modèles animaux de thrombose et d'hémorragie, nous citons en exemple les références principales^{65, 74-76}.

- Affranchissement des variations hormonales des lapines et de leurs conséquences sur l'hémostase.

Sans s'épancher sur les obstacles du quotidien de l'expérimentation animale, nous souhaitons insister sur le fait que nous sommes partis d'aucune expérience de la manipulation du lapin que ce soit personnel ou dans notre laboratoire. Après avoir appris à se saisir de l'animal, notre première et primordiale tâche a consisté en la mise au point d'un protocole d'anesthésie analgésie permettant :

- la stabilité hémodynamique de l'animal dans le temps,

- une analgésie profonde,

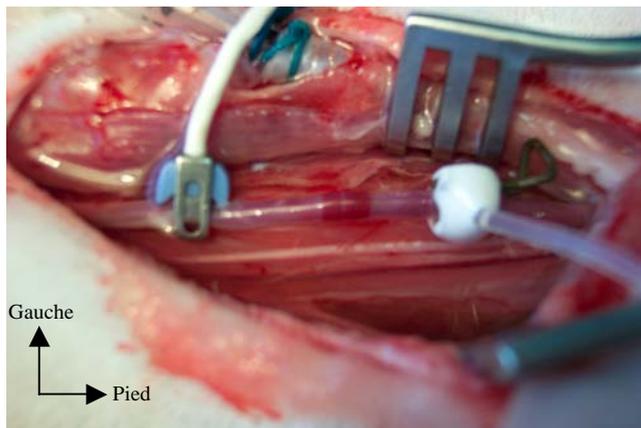
- un relâchement musculaire permettant de contrôler les paramètres de ventilation de l'animal sans apnée précoce (et fatale...).

Nous avons débuté avec un ancien protocole d'anesthésie au pentobarbital. Or, nous avons rapidement expérimenté que la DL50 (dose létale à 50 %) du lapin est proche de la dose thérapeutique recommandée (apnée et bas débit cardiaque précoce entraînant le décès rapide et indolore de l'animal, données non publiées). Nous avons décidé d'établir un nouveau protocole dédié au lapin. Pour ce faire, nous avons rencontré un vétérinaire, et adapté ses conseils aux recommandations sur l'expérimentation animale (master BTIGF sciences chirurgicales, manuel du Dr Vons, revue de la littérature) et aux capacités du laboratoire. Ceci a abouti à un protocole associant deux analgésiques hypnotiques : la kétamine 1000 (Virbac®) à la xylazine (Rompun 2%, Bayer®) en intra-veineux dans la veine marginale, administrés en bolus et en continu un pousse seringue électrique. Par la suite, nous avons eu le plaisir et l'honneur de partager cette adaptation avec nos collaborateurs et amis de l'équipe du Pr CM Samama, qui l'ont immédiatement adoptée.

Modèle de Folts

Le modèle de Folts a été développé afin d'étudier *in vivo* l'interaction entre les plaquettes et le mur vasculaire (endothélium et média) de l'artère lésée et sténosée. Le modèle initial a été établi chez le chien, au niveau coronaire (thèse de JD Folts, université de Wisconsin 1972). Son objectif avait été de modéliser *in vivo* ce qui s'appelait à l'époque l'angor instable en produisant une lésion endothélo-vasculaire par traumatisme externe puis en la couvrant d'une bague sténosante. Ses premiers travaux ont attesté l'effet anti-thrombotique de l'acide acétylsalicylique (AAS). Ces premiers travaux ont valu au modèle d'être étiqueté modèle « plaquettaire ». Or, il n'est pas que plaquettaire : il a été par la suite utilisé pour l'évaluation d'anticoagulant et en premier lieu l'HNF à forte dose⁷⁷.

Figure 8 : Capteur de débit (bleu),
lésion carotidienne (hématome)
et bague sténosante en silicone (blanc).



Le débit sanguin dans l'artère est mesuré par un capteur doppler placé en amont de la lésion (Fig. 8). L'adhérence des plaquettes par l'intermédiaire du FVW au contact des couches sous-endothéliales puis leur activation entraînent la formation d'un thrombus initialement plaquettaire. Ce dernier obstrue progressivement la lumière artérielle jusqu'à l'interruption du flux sanguin. L'embolisation (partielle) de ce thrombus peut être spontanée (influence du gradient de pression dans la sténose) ou facilitée par une délicate manœuvre (induite). Cet événement se répète ensuite périodiquement, ce qui se traduit par des variations cycliques de flux (VCF). Aucun test biologique n'a été associé au modèle initialement décrit par Folts.

Son application a été transposée à d'autres espèces animales : le cochon⁷⁸, le babouin⁷⁹, le lapin⁷⁴, le cochon d'Inde⁸⁰, ainsi qu'à d'autres territoires vasculaires comme les artères fémorales et carotides^{74, 81}.

Nous avons associé un modèle de temps de saignement (TS) micro-vasculaire à l'oreille précédemment décrit^{82, 83} afin de compléter l'expérimentation par l'observation d'un éventuel effet anti-hémorragique du rFVIIa.

Une série préliminaire d'expérimentations, dont les courbes sont représentées sur la figure 9, a permis de valider notre adaptation du modèle en reproduisant l'abolition des VCF par une forte dose d'HNF (100 UI/kg + 1 UI/kg/min) et par 10 mg/kg d'AAS^{74, 77} ($p < 0,05$) dans une étude randomisée contrôlée en aveugle ($n = 15$). Les périodes d'observation des VCF

ont été de 30 min chacune : une avant l'injection et 3 après. Ainsi chaque période pouvait être comparée à une autre chez le même animal, faisant du lapin son propre témoin.

Ensuite nous avons appliqué le modèle pour un protocole avec le rFVIIa. Cette seconde étude a été également randomisée et conduite en aveugle, avec deux doses de rFVIIa (15 et 60 µg/kg) *versus* contrôle. Dans ce protocole, les périodes d'observation des VCF ont été maintenues à 30 min : une avant l'injection et deux après. Nous n'avons pas trouvé de différence de nombre de VCF entre les groupes (courbes sur la figure 10). Nous n'avons pas non plus identifié de thrombose extensive dans les groupes traités. Le faible effectif a été la limite majeure pour la validation et la publication de ces résultats (n = 15). Néanmoins, aucune tendance pro-thrombotique n'a été retrouvée à ces deux doses. Nous rapportons dans le tableau suivant les résultats des dosages du rFVIIa chez ces lapins. Les mesures ont été réalisées avec un test ELISA.

Tableau I : Dosage du rFVIIa

| Lapin | rFVIIa à 10 min | rFVIIa à 60 min | % de diminution de rVIIa |
|----------------|------------------|-----------------|--------------------------|
| R3 | 39 | 25 | 36 |
| R5 | 47 | 27 | 43 |
| R8 | 35 | 13 | 65 |
| R12 | 36 | 18 | 52 |
| R15 | 45 | 19 | 58 |
| R1 | 329 | 257 | 22 |
| R2 | 352 | 233 | 34 |
| R9 | 214 | 108 | 50 |
| R11 | 391 | 186 | 53 |
| R14 | 140 | 80 | 43 |
| moyenne | 41 ± 5 | 20 ± 6 | 50 ± 12 |
| moyenne | 285 ± 104 | 173 ± 77 | 39 ± 12 |

Unités : µg/L, résultats du groupe forte dose en **gras**

En parallèle, les durées de saignement ont été diminuées par le rFVIIa. Cependant, son effet hémostatique sur ce modèle de saignement micro-vasculaire n'est pas extrapolable à l'hémorragie réfractaire en CCV. Nos conclusions ont donc été limitées sur ce point. Nous rapportons sur les pages suivantes les courbes de débit carotidien pulsés de tous les animaux des deux protocoles sus-cités (Fig. 9 et 10). Nous pouvons remarquer la stabilité du modèle au cours des expérimentations.

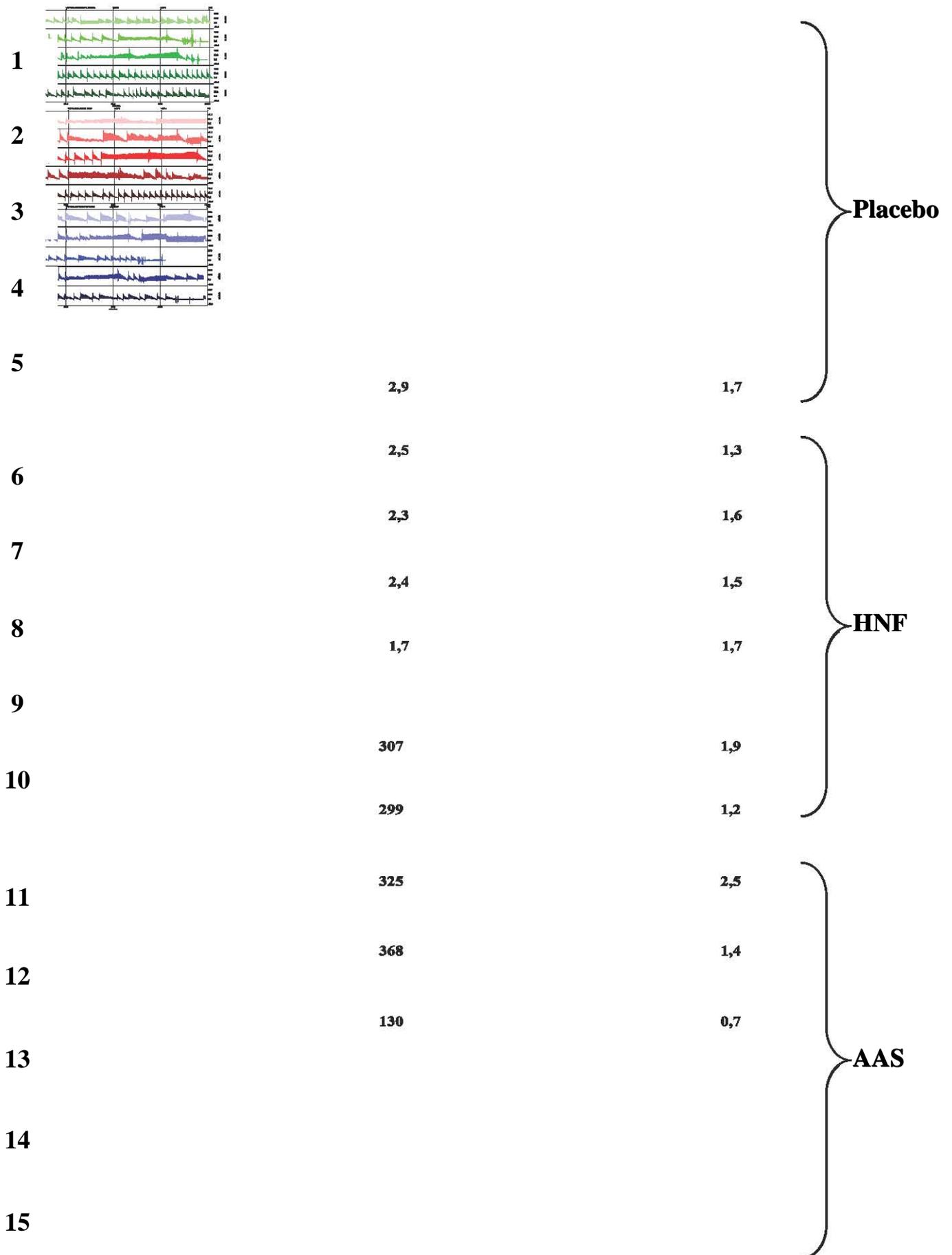


Figure 9 : Courbes des débits carotidiens pulsés des 15 lapins du protocole 1
 Les chiffres représentent l'héparinémie en U anti-Xa/mL pour le groupe rouge et la concentration de TXR₂ en ug/mL pour le groupe bleu

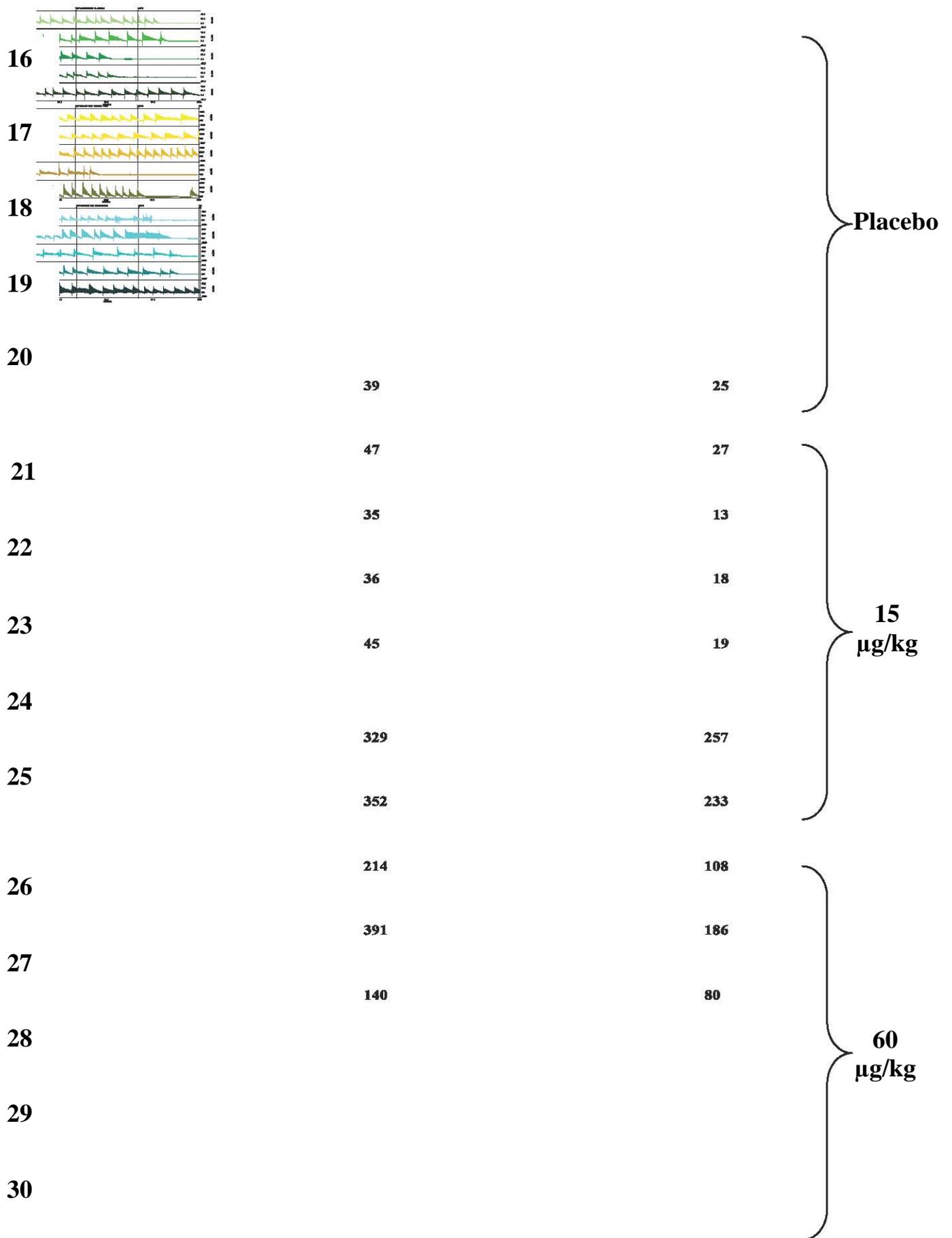


Figure 10 : Courbes des débits carotidiens pulsés des 15 lapins du protocole 2
 Les chiffres représentent la concentration de rVIIa en µg/L

Collaboration inter-laboratoire

A ce stade de nos travaux, nous avons eu l'opportunité de rencontrer des équipes travaillant sur les mêmes thématiques (efficacité et sécurité du rFVIIa) et sur le même modèle mais avec de résultats différents. Suite à la publication des travaux Godier *et coll.*⁷⁵ (Pr CM. Samama, Paris) et de Charbonneau *et coll.*⁷⁶ (Pr J.F. Hardy, Montréal), nous avons organisé une rencontre afin de discuter des variables du modèle et ainsi de mieux comprendre les différences de nos résultats et d'interprétation des VCF ; spontanées⁸⁴, facilitées (Nancy) ou les deux (Montréal). Les résultats de travaux ont été les suivants :

- Paris ; le rFVIIa a été pro-thrombotique et hémostatique à 150 µg/kg
- Montréal ; le rFVIIa a été pro-thrombotique et non hémostatique à 100 µg/kg
- Nancy ; le rFVIIa a été non pro-thrombotique mais hémostatique à 15 et 60 µg/kg.

Outre les variations doses et de conditions expérimentales (température, dilution, anesthésie, ventilation...), les modalités de réalisation de la lésion (intensité et longueur) et de la sténose (circonférentielle, adaptée) nous sont apparues cruciales. Afin de corroborer ces analyses nous avons conduit des expériences de lésions carotidiennes (n=4 lapins soit 8 carotides) avec nos forceps respectifs (Paris et Nancy) et avons comparé les lésions sur le plan histologique. Nous avons communiqué nos conclusions dans une lettre parue dans l'*European Journal of Anaesthesiology* (cf. pages suivantes) en réponse à un article de Dellamonica *et coll.* traitant de l'effet de l'hypoxie sur les VCF⁸⁵. Notre conclusion suggère la réalisation d'un traumatisme important avec une FiO2 élevée pour évaluer les drogues anti-thrombotiques et inversement pour les pro-thrombotiques⁶⁵. Subséquemment, les deux équipes (Paris et Nancy) ont uniformisé leurs modalités d'anesthésie, de sténose et de ventilation.

Publication 3 : lettre à l'éditeur

344 European Journal of Anaesthesiology 2009, Vol 26 No 4

Modified Folts models in the rabbit: variations on a well worn theme

Marion Durand^{a,c,g}, Anne Godier^{d,e}, Thomas Lecompte^{a,f,g}, Jean-Francois Hardy^b, Olivier David^{a,g}, Jean-Pierre Carteaux^{a,c,g} and Charles-Marc Samama^{d,e}

^aInsem U 734, Vandoeuvre-les-Nancy, France, ^bDepartment of Anesthesiology, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Hôpital Notre Dame, Montréal, Canada, ^cDepartment of Cardiovascular Surgery, Centre Hospitalier Universitaire Nancy, Vandoeuvre-les-Nancy, France, ^dDepartment of Anesthesiology and Intensive Care, Hôpital Hôtel Dieu, Paris, France, ^eInsem U765, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris, France, ^fLaboratory of Hematology, Centre Hospitalier Universitaire Nancy, France and ^gNancy Université, Vandoeuvre-les-Nancy, France

Correspondence to Marion Durand: Clinique de Chirurgie Cardiovasculaire et Thoracique, 5, allée du Morvan, 54500 Vandoeuvre-les-Nancy, France
Tel: +33 3 83 15 30 34; e-mail: durandmarion@hotmail.com

Received 16 July 2008 Accepted 24 July 2008

Editor,

We read with interest the paper by Dellamonica *et al.* [1] regarding an arterial cyclic thrombosis model in rabbit. As we work on the same model, we would like to share some comments regarding the procedure. In 1976, John Folts developed a canine model of coronary stenosis with intimal injury in order to reproduce experimentally the clinical situation of unstable angina [2]. In this dynamic model, a vascular wall injury associated with a stenosis of the artery (both induced experimentally) produces cyclic flow reductions (CFRs) characterized by a gradual decrease in blood flow followed by a sudden restoration of flow, either spontaneous or facilitated. The endothelial damage induces the formation of a platelet plug, which embolizes and forms again in a cyclic fashion. This model was extended by Folts [3] and others [4,5] to different species and vascular territories.

We, as others, have adapted the Folts model to the rabbit's carotid in our respective laboratories. We all monitored carotid thrombosis formation by measuring electromagnetic flow while controlling haemodynamic and ventilation variables. Although all three groups worked on the potential prothrombotic effect of recombinant activated factor VII, our observations were not similar [6,7]. Fortunately, we were able to discuss the differences in our results, particularly those concerning CFRs and their significance. This letter, as a link to the work by Dellamonica *et al.* [1], gives us an opportunity to share our conclusions.

First, there is concern about the ventilation parameters, as p_{O_2} affects the occurrence of CFR. The frequency and the tidal volume are established for rabbits as follows: frequency = 40–45 cycles min^{-1} and tidal volume = 5 ml kg^{-1} . Therefore, the only variable parameter is FiO_2 . Dellamonica *et al.* [1] show that an abrupt decrease of p_{O_2} decreases the number of CFR. This result is very interesting and similar to the finding by Godier *et al.* [6] (same low number of CFR in 21% FiO_2) and

DOI:10.1097/EJA.0b013e328318c60c

Charbonneau *et al.* [7] (CFR tend to vanish in room air ventilation). Therefore, FiO_2 should be adapted depending on the prothrombotic or antithrombotic trend of the experiment.

Second, anaesthetic procedures are achieved by three different products: isoflurane gas and intramuscular curare injection, intravenous mixture of ketamine and xylazine or intravenous penthotal infusion. These therapeutics lead to variations in blood pressure, heart rate and platelet aggregation. Isoflurane provides the best haemodynamic stability and no platelet interaction, but its use is much more expensive. Furthermore, it does not dispense with the use of analgesia, which will interact with platelets and the haemodynamics. The effective dose of pentobarbital is close to the lethal dose in rabbit and makes its use tricky and is not recommended by veterinary surgeons. Therefore, the combination of ketamine and xylazine could be the best solution, even if ketamine interacts with platelets, regarding its efficacy on anaesthesia–analgesia without vasoplegia.

Third, although we all define CFRs as a progressive reduction in blood flow followed by a sudden return to the initial level (in the absence of haemodynamic variations), the characterization of CFRs varies. The Nancy group shakes the clamp to induce CFRs, the Paris group considers only spontaneous emboli CFRs and does not mechanically dislodge the thrombus by shaking, and the Montreal group accepts both induced and spontaneous CFRs (and identifies them as such).

Thus, stenosis and carotid injury should be standardized. The stenosis can be achieved by a silicone occluder or a metal vascular clamp to obtain a consistent 10% decrease in mean carotid flow. Arterial deendothelialization is produced by external compression of the artery. However, even if nontraumatic forceps are always used, forceps differ from one laboratory to another and can lead to unavoidable differences in the degree of arterial trauma.

We investigated whether the use of a specific forceps induces more or less severe lesions. In the same rabbit, the injury was made with the Nancy group's forceps on one carotid artery and with the Paris group's forceps on the other. We then compared histological injuries. The Nancy group's forceps resulted in a higher degree of trauma; although the length of injury is similar, depth is obviously different. We postulate that more traumatic forceps will result in more thrombotic lesions. Logically, in the Nancy group's technique, as the injury is more traumatic, the model is more thrombotic, and the clamp must be shaken to obtain CFRs rather than irreversible thrombosis. In the Paris group's technique, the lesion is less pronounced, and spontaneous emboli may occur.

In conclusion, it is important to consider variations in experimental design. We suggest that the degree of trauma should be chosen with respect to the aim of the study and the drug under study; the more traumatic forceps and elevated FiO_2 should be used to study antithrombotic drugs, whereas the less traumatic forceps and room air ventilation should be used to test prothrombotic drugs.

References

- 1 Dellamonica J, Mazoyer E, Rosa JP, *et al.* Abrupt oxygen decrease influences thrombosis and bleeding in stenosed and endothelium-injured rabbit carotid arteries. *Eur J Anaesthesiol* 2008; **25**:1–7.
- 2 Folts JD, Crowell EB Jr, Rowe GG. Platelet aggregation in partially obstructed vessels and its elimination with aspirin. *Circulation* 1976; **54**:365–370.
- 3 Folts J. An in vivo model of experimental arterial stenosis, intimal damage, and periodic thrombosis. *Circulation* 1991; **83**:IV3–IV14.
- 4 Golino P, Ambrosio G, Pascucci I, *et al.* Experimental carotid stenosis and endothelial injury in the rabbit: an in vivo model to study intravascular platelet aggregation. *Thromb Haemost* 1992; **67**:302–305.
- 5 Roux S, Carreaux JP, Hess P, *et al.* Experimental carotid thrombosis in the guinea pig. *Thromb Haemost* 1994; **71**:252–256.
- 6 Godier A, Mazoyer E, Cymbalista F, *et al.* Recombinant activated factor VII efficacy and safety in a model of bleeding and thrombosis in hypothermic rabbits: a blind study. *J Thromb Haemost* 2007; **5**:244–249.
- 7 Charbonneau S, Girard F, Boudreault D, *et al.* Recombinant human activated factor VII is thrombogenic in a rabbit model of cyclic flow reduction and does not reduce intra-abdominal bleeding. *Thromb Haemost* 2007; **97**:296–303.

DOI:10.1097/EJA.0b013e32831bc69e

Modèle d'hémorragie artérielle aiguë

La suite de nos travaux a été axée sur la démonstration de l'efficacité du rFVIIa chez l'animal pour traiter une lésion dite « chirurgicale », à savoir une brèche vasculaire macroscopique. Ce modèle n'a pas tant été établi afin de mimer une situation clinique que pour permettre de démontrer le concept suivant : la compétence hémostatique supra-normale (induite par le rFVIIa en condition de capacité hémostatique initialement non altérée) permet d'obtenir un effet local suffisant (boost hémostatique ; caillot plus rapidement formé et plus solide) pour contrôler un saignement artériel aigu non contrôlable par un système hémostatique normal.

Il est très important de rappeler ici que :

Nous n'avons jamais envisagé de substituer un médicament à la réparation chirurgicale. Nous avons simplement entrepris d'explorer un concept qui pourrait s'avérer être une alternative à la chirurgie lorsque cette dernière n'est pas accessible en temps utiles (traumatologie) ou lorsque sa pratique peut être délétère (CCV : nécessité de CEC redux, arrêt circulatoire...).

Nous avons recherché dans la littérature un modèle validé de saignement artériel aigu chez le lapin. Il en existe un chez le cochon, réalisant une plaie calibrée de l'aorte abdominale non contrôlée⁸⁶⁻⁸⁸. Ce modèle de lésion n'est pas transposable au lapin pour des raisons de calibre de vaisseaux. De plus, notre objectif n'était pas de travailler avec un modèle animal instable hémodynamiquement et nécessitant des manœuvres de ressuscitation. Enfin, nous n'avons pas envisagé de changer d'espèce animale. Cette recherche s'étant donc avérée infructueuse, nous avons entrepris l'élaboration d'un modèle original dédié à cette démonstration. Ainsi, nous avons pu établir un modèle bien adapté à l'expérimentation que nous voulions mener sur des animaux d'environ 2,5 kg. Les lapins ont été anesthésiés selon le protocole kétamine-xylazine mentionné ci-dessous :

- Induction par un bolus de kétamine (15 mg/kg) et xylazine (1 mg/kg)
- Entretien IVSE par kétamine (40 mg/kg/h)

Une anesthésie locale cervicale a été réalisée avant de pratiquer la cervicotomie pour trachéotomie. Les paramètres de ventilation en air ambiant ont été : volume courant de 3 mL/kg, et fréquence respiratoire de 40 cycles/min. Un « monitoring » continu de la pression artérielle a été assuré par un cathéter artériel fémoral, qui a également servi de site de prélèvement. Les contraintes du modèle ont été les suivantes :

- Accès vasculaire simple d'une artère élastique de bon calibre (aorte ou une de ses branches).
- Lésion systématisée et reproductible entraînant un saignement artériel persistant (au moins une heure).
- Contrôle du saignement systématisé pour minimiser les pertes sanguines afin de maintenir la stabilité hémodynamique de l'animal et récupérer le sang épanché (quantification des pertes).

Mise en place du modèle

Le vaisseau retenu pour créer la lésion a été la carotide commune. C'est une artère élastique d'environ 2 mm. Nous avons envisagé de travailler sur l'aorte abdominale mais des expérimentations préliminaires nous en ont démontré les limites : la laparotomie abdominale avec éviscération nécessaire à l'exposition du vaisseau entraîne un traumatisme chirurgical important (déshydratation, hypothermie, souffrance viscérale) qui déstabilise l'hémodynamique de l'animal.

L'utilisation d'un cathéter de gros calibre a permis de réaliser une lésion importante, véritable brèche vasculaire. Des lésions au moyen de cathéters de 14-16-18 et 20 Gauges on

été étudiées. Celui de 18 G a été retenu comme le plus approprié pour créer la lésion (fig.11).



Figure 11: Lésion de la carotide par un cathéter de 18 G

Au cours de nos expérimentations préliminaires, l'insertion du cathéter sur une longueur de 1 cm dans la carotide a entraîné une lésion pulsatile persistante au delà d'une heure. Une compression externe par un poids d'environ 80 g posé sur une compresse a permis de limiter les pertes sanguines sans interrompre le flux dans la carotide (Fig. 12). L'évaluation des pertes a pu être faite par pesée des compresses.



Figure 12 : Compression de la lésion

Nous avons décidé de :

- vérifier la persistance du saignement visuellement chaque minute lors d'une brève mobilisation du poids et de la compresse puis leur remplacement,
- noter et retenir le temps comme durée de saignement en cas d'arrêt de ce dernier,

- laisser la carotide découverte en cas d'arrêt de saignement afin de dépister la récurrence du saignement et de reprendre le compte de temps,
- comptabiliser 60 min comme durée de saignement en cas de saignement persistant à 60 min (troncature).

Protocole « PHJ »

C'est le nom que nous avons attribué à ce protocole contrôlé randomisé (= protocole hémorragie). Nous avons décidé d'étudier 2 doses de rFVIIa *versus* contrôle (eau). La première dose (80µg/kg) a été inspirée des résultats de l'observatoire national suggérant une réponse clinique du produit à cette dose. La seconde de 200 µg/kg a été déduite des travaux de traumatologie qui ont utilisé de fortes doses⁸⁹.

Les critères de jugement d'efficacité retenus ont été :

- 1- la durée du saignement (min)
- 2- la masse de sang épanché (g).

Les critères de jugement de sécurité retenus ont été :

1- La recherche de micro-thrombi dans la vascularisation hépatique et rénale par examen microscopique de fragments de foie et de rein (Pr F. Plénat). Ces derniers ont été prélevés en fin d'expériences par laparotomie abdominale. Nous avons opté pour ces deux organes car ils présentent une micro-vascularisation très importante et sont deux sites de défaillance viscérale primordiaux en clinique. Des raisons logistiques ne nous ont pas permis d'analyser les cerveaux et les cœurs des animaux bien que ces deux organes vitaux soient les organes pour lesquels les complications thrombotiques soient redoutées. D'une part, le cerveau étant l'organe d'aval circulatoire de la lésion carotidienne, son analyse aurait pu être perturbée par des embolies carotidiennes. D'autre part, une thrombose coronaire n'était

pas attendue chez des lapins sains sans lésions de sténose et de désendothélialisation (Folts coronaire).

Enfin, le FT dans le foie est indétectable et le réseau micro-vasculaire hépatique en fait un excellent piège pour d'éventuels micro-thrombi circulants. L'hypothèse de sécurité n'a pas été de suggérer une action « intelligente » du rFVIIa uniquement sur le site lésionnel mais de dépister une coagulation intra-vasculaire avec le contingent de FT circulant dans des organes à riche micro-vascularisation comme le foie et le rein.

2- L'observation de la carotide en fin d'expérimentation pour objectiver la perméabilité du vaisseau (pulsatilité), avec réalisation d'une ponction distale en cas d'arrêt du saignement pour visualiser un saignement actif et pulsé.

Afin de s'assurer de la similitude des groupes et de la persistance du saignement, le traitement a été administré 5 minutes après la création de la lésion. L'observation s'est prolongée 55 min, soit une durée totale d'hémorragie d'une heure. Le protocole est reporté sur le schéma suivant.

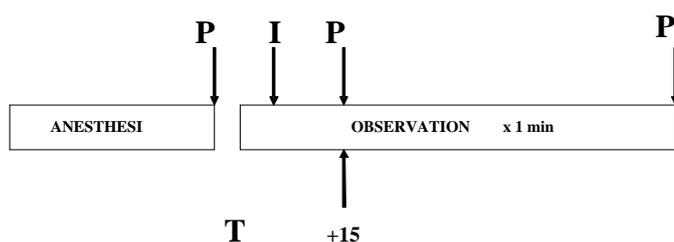


Figure 13 : Protocole PHJ

P : prélèvement sanguin pour numération sanguine et Quick

P2 et 3 : + activité rFVIIa

P3 : + prélèvement hépatorénal

I : injection traitement

T : temps

Les expérimentations ont été conduites dans un laboratoire agréé avec respect des règles d'éthique de l'expérimentation animale de l'Inserm (Convention du Conseil de l'Europe STE N°123, Directive Européenne n°86/609/CEE et Décret Français n°87-848 ; arrêtés du

19 Avril 1988). A la fin de chaque expérience, l'animal a été sacrifié par administration d'un bolus i.v. de pentobarbital (1 mg/kg IVD).

Nous présentons ici le résumé en français de l'article original :

Introduction

L'utilisation du facteur VII recombinant activé (rFVIIa) pour traiter un saignement incontrôlable est toujours controversée. L'objet de notre travail a été d'évaluer l'efficacité et la sécurité d'utilisation de deux doses de rFVIIa pour contrôler un saignement artériel aigu post lésionnel chez le lapin sain.

Matériel et Méthode

Un modèle original a été établi chez le lapin New Zealand anesthésié, ventilé et maintenu en normothermie. Cinq minutes après avoir effectué une lésion standardisée de la carotide droite comprimée au moyen d'un poids métallique, les lapins ont été randomisés pour recevoir : de l'eau PPI, 80 µg/kg ou 200 µg/kg de rFVIIa. L'efficacité du traitement a été évaluée sur la durée du saignement, jugé toute les minutes par examen de la lésion et sur la masse de sang perdue (MSP) calculée par pesée des compresses recueillant le sang épanché. La sécurité du traitement a été appréciée par recherche de thrombi à l'examen macroscopique et microscopique de fragments de foie et de rein prélevés à la fin de l'expérimentation.

Résultats

Soixante lapins New Zealand mâles de 2500 ± 300 g ont été randomisés. La DS et la MSP ont été statistiquement réduites après injection de rFVIIa dans les deux groupes traités versus contrôle, mais aucune différence significative n'a été trouvée entre les doses de 80 et 200 µg/kg (résultats en médiane [min; max] et p versus contrôle; contrôle: DS 56 min [7; 60] et MSP 22,5 g [1; 58], 80 µg/kg: 15 min [5; 60] ($p=0,011$) et 12 g [0; 36] ($p=0,033$),

200 µg/kg: 10 min [5; 60] ($p=7,2\times 10^{-4}$) et 5 g [0; 31] ($p=0,005$). Le Quick a été statistiquement raccourci après l'injection de rFVIIa, avec une différence significative entre les deux groupes traités à 55 min de l'injection ($p=0,005$, résultats en médiane [min; max]; 80 µg/kg: 6,9 s [6,1; 11,7]; 200 µg/kg: 6,5 s [6,5; 7,3] Aucune thrombose macro ou microscopique n'a été détecté dans aucun groupe.

Conclusion

Dans cette étude expérimentale randomisée en aveugle, le rFVIIa s'est avéré efficace pour contrôler un saignement artériel aigu chez le lapin normotherme, sans effet dose ni évènement thrombotique authentifiés.

Communications des résultats

Ces résultats ont été présentés aux congrès suivants :

- European Society of Surgical Research : Nîmes Mai 2009 (Communication orale et abstract British Journal of Surgery 2009; 96(S5):1-72 (abstract) doi: 0.1002/bjs.6650)*
- International Society of Thrombosis and Haemostasis, Boston, Juillet 2009 (Poster)*
- Congrès de la Société Française d'Anesthésie Réanimation, Paris, Septembre 2009 (Communication orale et Poster)*

* : Présentation par l'auteur de la thèse

L'article original publié dans l'*European Journal of Anaesthesiology* est présenté dans les pages suivantes⁶⁶.

Publication 4 : article original

ORIGINAL ARTICLE

Recombinant activated factor VII attenuates major arterial bleeding in noncoagulopathic rabbits

Marion Durand, Anne Godier, Véronique Notet, Marie Hacquard, Olivier Collignon, Gilles Corbonnois, François Plénat, Jean-Pierre Carteaux and Thomas Lecomte

Background and objective Recombinant activated factor VII (rFVIIa), which is used off-label as an adjuvant therapy for uncontrolled and life-threatening bleeding, might also attenuate intractable bleeding related to macrovascular arterial lesions. Here we evaluated the efficacy of rFVIIa in sealing a large arterial wound in haemostatically competent rabbits.

Methods Sixty male New Zealand rabbits were randomly divided into vehicle control and 80 and 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ rFVIIa groups ($n=20$ animals each). A standardized wound of the isolated right carotid artery was made in all rabbits with an 18-G catheter. Bleeding, which was limited by mild compression, was assessed every minute. At 5 min, an intravenous bolus of vehicle or human rFVIIa was given and the animals were further observed for 1 h. Efficacy was assessed from the bleeding duration and blood mass lost. Statistical significance was defined as P less than 0.05. All investigators were blinded to the treatment the animals received.

Results The bleeding duration and blood mass lost were significantly reduced in both rFVIIa dosage groups as compared with the vehicle control group. For the vehicle, 80 and

200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ rFVIIa groups, the median bleeding durations were 56 min (range 7–60 min), 15 min (range 5–60 min) and 10 min (range 5–60 min), respectively; and the median blood mass losses were 22.5 g (range 1–58 g), 12 g (range 0–36 g) and 5 g (range 0–31 g), respectively. The prothrombin time was shorter in the rFVIIa groups. Visual inspection of the carotid artery and microscopic analysis of the liver and kidney revealed neither gross thrombi nor entrapped microthrombi in any rabbit.

Conclusion Recombinant FVIIa at 80 or 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ promoted the sealing of a large and slightly compressed arterial wound in rabbits. These results suggest a potential role for the drug in the management of massive bleeds due to an arterial lesion when surgical intervention is not immediately and readily available. Safety should remain a matter of concern.

Eur J Anaesthesiol 2010;27:000–000

Keywords: animal model, arterial bleeding, rabbit, rFVIIa

Received 1 February 2010 Revised 4 June 2010
Accepted 8 June 2010

Introduction

Recombinant activated factor VII (rFVIIa; Novoseven, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark) was first developed for the treatment of spontaneous or traumatic bleeding in haemophilic patients.¹ The tissue factor (TF) activated factor VII (FVIIa) complex initiates coagulation by the massive activation of factors X and IX, thereby promoting thrombin generation.^{2,3} High FVIIa concentrations reportedly activate factor X in a TF-independent and platelet-dependent manner.³ Thus, rFVIIa is generated at sites of TF exposure and/or platelet accumulation such as vascular injuries; rFVIIa induces a thrombin burst on the surface of activated platelets.

The withdrawal of aprotin has generated an immediate need for pharmacological therapies to control postoperative haemorrhage.^{4,5} For the past decade, rFVIIa has increasingly been used as an adjunctive therapy for uncontrolled and life-threatening bleeding in various situations (trauma, surgery, gynaecology). Despite numerous case reports and case series describing its successful use, our understanding of published randomized controlled trials leads us to conclude that the effectiveness of rFVIIa as a haemostatic drug remains unclear.^{6,7} Large-powered randomized studies are difficult to perform for uncommon therapeutics.^{8–10} Intractable bleeding cases are rare and heterogeneous and, frequently, must be addressed as an emergency, making systematic observation and analysis difficult such as in retrospective war wounded studies.¹¹ These findings highlight the need for the proof of concept of rFVIIa efficacy in reproducibly injured animals.

We hypothesized that rFVIIa could be used in the management of a major arterial lesion, encountered during cardiovascular surgery or as a result of trauma, that cannot be controlled by the haemostatic system, even though it is completely normal. This therapy would not replace surgical treatment of the leak, but could be useful in some circumstances such as when surgery is not rapidly available (trauma) or when surgery may be

From the Inserm, U734, Vandœuvre-lès-Nancy (MD, MH, GC, J-PC, TL), Henri Poincaré University (MD, MH, GC, J-PC, TL), Department of Cardiothoracic and Vascular Surgery, Nancy University Hospital, Nancy (MD, J-PC), Anaesthesiology and Intensive Care Unit, Hôtel Dieu, Paris Descartes University, Paris (AG), Gendis, Vandœuvre-lès-Nancy (VN, OC), Department of Hematology Biology, Nancy University Hospital, Nancy (MH, TL) and EA Prédiction et Modulation de la Réponse thérapeutique en Cancérologie, Nancy University, Nancy (FP), France

Correspondence to Marion Durand, CHU Nancy, Service de Chirurgie Cardio-Vasculaire, 5 Allée du Morvan, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, Nancy, France
Tel: +33 6 10 57 96 21; e-mail: durandmarion@hotmail.com

The study was presented at the European Society of Surgical Research, Nimes, France, May 2009 (oral communication), International Society of Thrombosis and Haemostasis, Boston, USA, July 2009 (poster) and Société Française d'Anesthésie Réanimation, Paris, France, September 2009 (poster and oral communication).

harmful for the patient (damage control).¹¹ We assumed that the boost of coagulation initiated by rFVIIa might allow a plug to be formed quickly, ensuring haemostasis at the site of vascular injury where a normal clot would not form.

We designed a major arterial bleeding wound model and compared the effects of two doses of rFVIIa with those of the vehicle in a randomized and blinded study. We chose rabbit, as this animal is widely used to test new haemostatic drugs^{12,13} and the rabbit carotid is easily exposed. In line with European guidelines, the animals were noncoagulopathic, haemostatically competent and were treated under normothermic conditions;^{14,15} no resuscitation or blood dilution manoeuvres were performed after treatment injection to avoid confounding factors.

The primary objective of our study was to bring the proof of concept that systemic administration of a haemostatic drug, rFVIIa, can attenuate and even stop an arterial bleeding due to a major lesion in a haemostatically competent animal.

The secondary objectives were

- (1) to compare two doses, the high dose ($200 \mu\text{g kg}^{-1}$) matches the dose investigated in trauma studies and the low dose ($80 \mu\text{g kg}^{-1}$) is within the range of the most frequently used dose in clinical practice,
- (2) to look at circulating microthrombus formation by examination of the microvasculature of the liver and kidney and
- (3) to look at major intraluminal extension of the haemostatic plug formed at the site of the arterial lesion.

Methods

Animals were treated according to the ethics rules of the 'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale' in France and European directive no. 86/609/CEE. Sixty New Zealand male rabbits (Cegav, St Mars d'Egronne, France) were housed one per cage and provided with tap water and food *ad libitum*. Animals were used in experiments after an acclimation period of at least 1 week. Animals were sacrificed at the end of the experiments with an intravenous (i.v.) injection of pentobarbital (60 mg kg^{-1} ; Penthotal, Abbot, Illinois, USA).

Surgical procedure

Rabbits ($\sim 2.5 \text{ kg}$) were anaesthetized with a mixture of ketamine (15 mg kg^{-1} , ketamine 1000; VIRBAC Santé Animale, Carros, France) and xylazine (1 mg kg^{-1} , Rompun; Bayer, Leverkusen, Germany) given through a 22-G catheter (Introcan Certo; B Braun, Melsungen, Germany) placed in the left ear marginal vein. Anaesthesia was maintained during the course of the experiment with a continuous i.v. injection of ketamine ($40 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$,

sufficient to maintain a slight corneal reflex) in saline (9% NaCl, Baxter, Abbot).

After a local anaesthetic (1 ml s.c. lidocaine; Aguetant, Lyon, France) was provided, a median neck incision was made and tracheotomy was performed to ensure mechanical ventilation (respiratory rate, $45 \text{ cycles min}^{-1}$; tidal volume, 5 ml kg^{-1}). Ventilation parameters were previously established to maintain physiological pH and oxygen saturation levels.¹⁶ Body temperature was maintained in the range of $38\text{--}38.5^\circ\text{C}$ using an electric blanket (medium blanket system; Harvard Apparatus, Massachusetts, USA). A 22-G catheter was surgically placed in the left femoral artery for continuous haemodynamic monitoring and blood sample collection. Data were collected and treated with a monitoring system (Acqknowledge 3.7; Biopac, California, USA) and a PC (Presario; Compaq, California, USA).

Protocol design

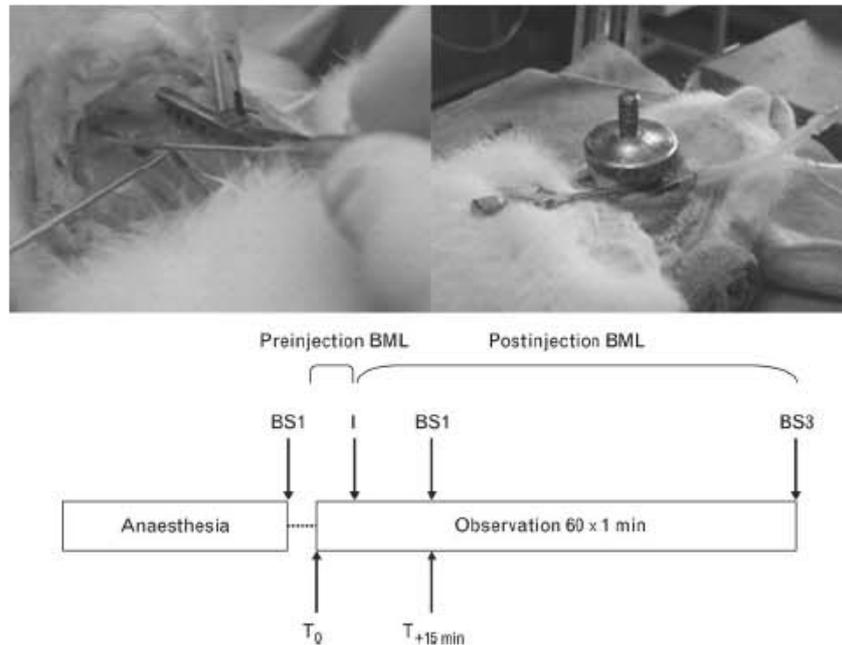
The carotid lesion, the bleed control and the schematic of the protocol design are shown in Fig. 1. The total length of the right common carotid artery was gently isolated and cleared of the surrounding fascia. An arterial lesion was produced by a 1 cm catheterization of the carotid with an 18-G needle catheter close to the thyroidal branch, marking the beginning of the observation period (T_0). The catheter diameter was chosen to be close to the carotid lumen to make a reproducible and large break of the artery. The size of the catheter was chosen after prior validation of its long-lasting bleeding characteristics.

The catheter was removed and a gauze ball (to measure blood loss) and metal weight (to control bleeding) were immediately placed on the lesion. Based on prior validation with a Doppler control, the chosen weight was heavy enough to provide appropriate compression to avoid rapid and lethal haemorrhage, but light enough to maintain blood flow through the vessel. Bleeding was visually controlled each minute for 1 h by quickly and gently removing and placing the gauze and weight. The gauze balls were weighed before the experiment (tare weight), after treatment administration [preinjection blood mass loss (BML)] and at the end of the experiment (postinjection BML) to collect and compare the lost blood mass before and after treatment injection.

After a 5 min observation period of ongoing pulsate bleeding, animals ($n=60$) were randomly assigned to receive either a 1 ml i.v. bolus of vehicle (solvent for lyophilized drug) or 80 or $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ rFVIIa in the left marginal ear vein. The treatment aliquots were prepared and frozen before the beginning of the study. The investigator was blinded to the treatment group.

When the carotid stopped bleeding, the time was noted and the vessel was left uncovered until the end of the experiment. In the case of bleeding recurrence, which occurred in six rabbits, the gauze and weight were

Fig. 1



Lesion, bleed control and protocol design. Left, catheterization of the carotid with an 18-G needle catheter. Right, the bleed is partially controlled by the weight. Protocol: BML, blood mass loss; BS, blood samples; I, aliquot injection; T_0 , arterial lesion.

replaced and the time of bleeding was recorded and added. At the end of the experiment when bleeding had stopped, the permeability of the vessel was assessed by visual examination (pulsatile vessel, no gross thrombosis) and by a needle puncture close to the haemostatic plug to assess pulsate bleeding. When bleeding was still ongoing after 60 min of observation, the length of bleeding noted was 60 min. No animal died.

Pathology

To assess systemic thrombus formation in the animals, we examined the liver and kidney microvasculature. The abundant microvasculature of these organs makes them highly sensitive targets for intravascular emboli. Slices (0.5–1.0 cm thick) of the left liver lobe and right kidney were harvested from each animal through a median laparotomy at the end of each experiment. These were stored in 4% (v/v) buffered formaldehyde (pH 7.4) for 48 h. The slices were then routinely processed and embedded in paraffin. Paraffin blocks were used to generate 5 μm thick haematoxylin and eosin-stained sections that were analysed by an experienced pathologist blinded to the experimental conditions.¹⁷

Blood samples

Arterial femoral blood was collected into tubes containing citrate (Coagulation 9NC/1.4 ml, citrate 0.106 mol l^{-1} ;

Sarstedt Monovette, Numbrecht, Germany) before carotid injury and at 10 and 55 min after the start of intravenous vehicle or rFVIIa. The haematocrit, haemoglobin level and platelet count were measured in duplicate with an automated device (Micros 60; ABX, Montpellier, France). Platelet poor plasma (PPP) was obtained by centrifugation at $2500 \times g$ for 10 min at 20°C and was frozen at -80°C . The prothrombin time (PT)¹⁶ and rFVIIa activity were measured after investigators were unblinded. The PT was determined using an automated device (STA-R; Diagnostica Stago, Asnières-sur-Seine, France) with 100 μl of frozen thawed PPP and 200 μl of Neoplastine CI Plus (Diagnostica Stago) at 37°C . The rFVIIa clotting activity, measured only for blood samples 2 and 3 and for rabbits treated with rFVIIa, was measured using frozen thawed PPP with the same automated device and FVII-deficient plasma (STA-Deficient VII; Diagnostica Stago).

Endpoints

The primary endpoint for bleeding (efficacy) was bleeding duration. The secondary endpoint was the BML. The main endpoint for intravascular microthrombosis (safety) was the presence of microthrombi in the liver and kidney microvasculature. The other endpoint was the carotid patency (both macroscopic and after distal puncture).

Table 1 Physical, haemodynamic and laboratory variables at baseline of the three groups of 20 rabbits each

| Variable | Vehicle | 80 µg kg ⁻¹ | 200 µg kg ⁻¹ | P |
|---|------------|------------------------|-------------------------|-------------------|
| Weight (g) | 2446 ± 204 | 2506 ± 313 | 2416 ± 281 | NS |
| Haematocrit (%) | 28.4 ± 2.3 | 27.9 ± 1.6 | 29.5 ± 2.8 | NS |
| Platelet count (10 ⁹ l ⁻¹) | 305 ± 59 | 357 ± 57 | 369 ± 69 | 0.002* to 0.005** |
| Mean AP (mmHg) | 49 ± 8 | 48 ± 11 | 55 ± 12 | NS |
| Heart rate (beats min ⁻¹) | 214 ± 19 | 209 ± 22 | 209 ± 18 | NS |

Values are expressed as mean ± SD. Mean AP, mean arterial pressure; NS, not statistically significant. * Comparison between vehicle and 80 µg kg⁻¹. ** Comparison between vehicle and 200 µg kg⁻¹.

Statistical analysis

Data are expressed as the mean ± SD or median (range). The level of significance was set at *P* less than 0.05. Comparisons between dosage groups were performed using Wilcoxon's test and intragroup differences were tested using the Wilcoxon's signed rank test. Results are shown in box-and-whiskers plots showing the mean, median and 5th, 25th, 75th and 95th percentiles.

Results

Haemodynamic and blood sample results

The haemoglobin level, haematocrit, platelet count, mean arterial pressure, heart rate, arterial pH and temperature remained within physiological ranges throughout the experiments in the three groups, with no statistical difference except for platelet count (Table 1). The mean PT's and FVII activities for the three groups are shown in Tables 2 and 3.

Bleeding duration and blood mass lost

The bleeding duration was statistically reduced by rFVIIa injection in both treatment groups. For the vehicle, 80 and 200 µg kg⁻¹ rFVIIa groups, the median bleeding durations were 56 min (range 7–60 min), 15 min (range 5–60 min) and 10 min (range 5–60 min), respectively, but no statistically significant difference was found between the 80 and 200 µg kg⁻¹ doses (Fig. 2a). Thirteen rabbits were still bleeding at the end of the experiment, including nine in the vehicle group and two in each rFVIIa group. Although the preinjection BML did not differ among the three groups (data not shown), the median postinjection BML of the vehicle group was significantly higher than that of the 80 or 200 µg kg⁻¹ rFVIIa groups (Fig. 2b). No significant difference was seen between the postinjection BMLs of the 80 and 200 µg kg⁻¹ rFVIIa group animals.

Table 2 Mean prothrombin time (s) in three groups at each time point

| Time/group | Vehicle | 80 µg kg ⁻¹ | 200 µg kg ⁻¹ |
|-------------------------|-----------|------------------------|-------------------------|
| Baseline | 8.7 ± 0.3 | 8.4 ± 0.5 | 8.6 ± 0.3 |
| <i>P</i> versus vehicle | | 0.033 | 0.54 |
| Injection + 10 min | 8.8 ± 0.3 | 6.9 ± 0.3 | 6.5 ± 0.4 |
| <i>P</i> versus vehicle | | 9 × 10 ⁻⁸ | 9.3 × 10 ⁻⁸ |
| Injection + 55 min | 9.3 ± 0.6 | 7.3 ± 1.2 | 6.5 ± 0.5 |
| <i>P</i> versus vehicle | | 3 × 10 ⁻⁸ | 9.8 × 10 ⁻⁸ |

Values are expressed as mean ± SD.

Pathology and carotid patency

Examination of the liver and kidney fragments revealed no evidence of treatment-related pathological changes, with no macroscopic or microscopic thrombosis in any animal. When carotid bleedings stopped before the end of the experiment (47/60 cases), no macroscopic thrombosis was noted, as indicated by the pulsating vessels. Furthermore, no carotid thrombosis was found, as needle puncture always revealed pulsate bleeding.

Discussion

In this randomized, placebo-controlled rabbit study, we showed that rFVIIa might be successfully used to control an intractable bleed caused by a surgical wound or trauma by reducing both bleeding duration and BML. No thrombus was found in our macroscopic or microscopic analysis. The 80 µg kg⁻¹ dose seemed large enough to facilitate haemostasis, as no statistical difference was noted between the 80 and 200 µg kg⁻¹ doses.

To our knowledge, this is the first time that rFVIIa has been shown to be effective in treating severe arterial bleeds in a healthy rabbit model without resuscitation or blood dilution. This result was obtained with the lowest dose we studied, which is similar to that currently used in clinical practice, based on the PT decrease and FVII activity measurements.¹⁸ Interactions between animal TFs and human FVIIa vary depending on the animal species. As most standard clinical in-vitro coagulation assays are performed with rabbit brain thromboplastin, the choice of a rabbit model seems to be more relevant than another species model.

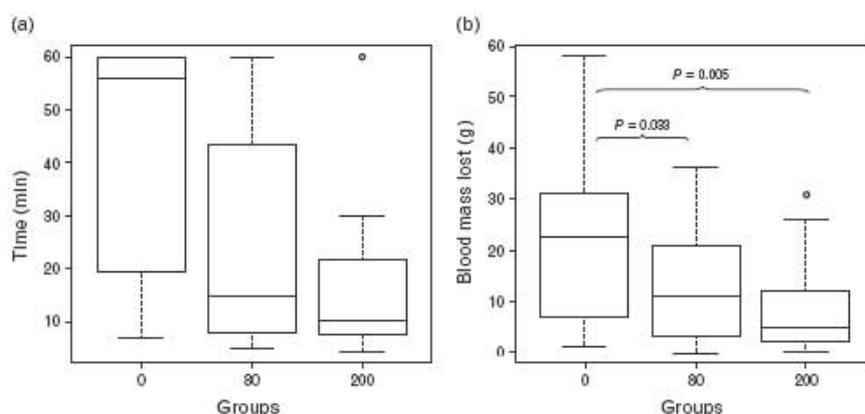
In the only published prospective trial of human penetrating trauma using rFVIIa, Boffard *et al.*¹⁹ found that repeated doses of 100 µg kg⁻¹ rFVIIa reduced blood loss only in the case of blunt trauma and not in penetrating trauma cases. In 2009, Gill *et al.*²⁰ published the only known randomized controlled trial for rFVIIa in cardiac surgery. Although the results were encouraging, their conclusion was very cautious. Their dose escalation study

Table 3 Mean activity of FVII in the two treated groups

| Time/group | 80 µg kg ⁻¹ | 200 µg kg ⁻¹ | P |
|------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| +10 min | 576 ± 174 | 1100 ± 484 | 7.1 × 10 ⁻⁸ |
| +55 min | 528 ± 162 | 1118 ± 482 | 6 × 10 ⁻⁸ |

Values are expressed as mean ± SD in units dl⁻¹.

Fig. 2



(a) Bleeding duration (min). A significant difference was found between the vehicle control and the $80 \mu\text{g kg}^{-1}$ ($P = 0.011$) or the $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ ($P = 7.24 \times 10^{-4}$) rFVIIa group. (b) Postinjection blood mass lost (g). A statistically significant difference was found between the vehicle control and the $80 \mu\text{g kg}^{-1}$ ($P = 0.033$) or the $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ ($P = 0.005$) rFVIIa group.

was stopped at $80 \mu\text{g kg}^{-1}$ for safety reasons; increased adverse events, including stroke, were seen in patients treated with rFVIIa, although this increase was not significant. The bleeding rate inclusion criterion was not spectacular.

Two recent studies in swine have demonstrated the efficacy of rFVIIa in major aortic wounds.^{21,22} Using resuscitated animals, Sapsford *et al.*²¹ found that rFVIIa prolonged the survival time by a few hours. McMullin *et al.*²² observed that swine prophylactically treated with $90 \mu\text{g kg}^{-1}$ rFVIIa prior to aortotomy and subsequent resuscitation displayed reduced bleeding volumes compared with controls.^{21,22} Although suitable conditions for rFVIIa use include appropriate blood product compensation in terms of haemoglobin level, PT, platelet count, fibrinogen and temperature,¹⁴ animal models used to study rFVIIa frequently employ blood dilution, thrombopathic animals or hypothermic conditions.¹² In contrast with these previous studies, we ensured appropriate conditions for rFVIIa use by using normothermic, non-acidotic and noncoagulopathic rabbits, bleeding was quantified before rFVIIa administration to ensure group homogeneity and wound reproducibility, and we avoided the use of intravascular fluids, as intravascular fluids can potentially affect haemostasis. The rFVIIa efficacy would be affected by the degree of haemodilution and the diluent used²³ and potential thrombotic side-effects could be masked.

We established an original model of long-lasting (1 h) arterial wound bleeding in rabbits. This model was implemented in our laboratory and validated by preliminary studies regarding the reproducibility and stability of the lesion and the carotid compression (unpublished data). We found no difference among the 60 rabbits in

their preinjection BML (~ 13 g), indicating that our animals were similar with respect to the arterial lesion.

These results must be viewed within the context of the limitations of the study. The study was conducted in rabbits. This arterial wound model management does not mimic any common clinical setting, as no resuscitation had to be performed. Pathological examination was restricted to a selected area of the liver and kidney, so we cannot rule out a deleterious prothrombotic effect. Although the baseline platelet counts were different among the three groups, all counts were within the normal range for rabbits. It is unlikely that such a small difference with counts remaining within the normal range would have biased the results. The baseline PT was slightly different between the vehicle and $80 \mu\text{g kg}^{-1}$ rFVIIa group, although both values were also within the normal range. We assume that this was a random variation that should not have biased the results.

With this animal model, we sought to reproduce a severe arterial wound such as may occur during human cardiovascular surgery or trauma. We suggest that rFVIIa at a low dose can attenuate life-threatening bleeding when time or safety issues or technical difficulties preclude surgical treatment. The treatment is not administered to compensate for a coagulation factor deficiency, but as an adjunctive therapy to boost a natural process in an emergency. Our results support that, in the case of intractable bleeding, coagulation has to be improved with blood product transfusion before rFVIIa administration. We conclude that this animal study provides the proof of concept that systemic administration of rFVIIa, known to promote microvascular bleeding cessation when haemostasis is deficient, can also attenuate a major arterial bleed at least when haemostasis is not deficient.

Acknowledgements

The authors are grateful to Novonordisk for drug supply without participating in the study design, analysis or writing of the paper. The authors declare neither financial support nor conflict of interest.

References

- Hedner U. Recombinant activated factor VII as a universal haemostatic agent. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998; **9** (Suppl 1):S147–S152.
- D'Andrea D, Ravera M, Golino P, et al. Induction of tissue factor in the arterial wall during recurrent thrombus formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; **23**:1684–1689.
- Roberts HR, Monroe DM, White GC. The use of recombinant factor VIIa in the treatment of bleeding disorders. *Blood* 2004; **104**:3858–3864.
- Mangano DT, Tudor IC, Dietzel C. The risk associated with aprotinin in cardiac surgery. *N Engl J Med* 2006; **354**:353–365.
- Fergusson DA, Hebert PC, Mazer CD, et al. A comparison of aprotinin and lysine analogues in high-risk cardiac surgery. *N Engl J Med* 2008; **358**:2319–2331.
- Hardy JF, Belisle S, Van der Linden P. Efficacy and safety of recombinant activated factor VII to control bleeding in nonhemophilic patients: a review of 17 randomized controlled trials. *Ann Thorac Surg* 2008; **86**:1038–1048.
- Stanworth SJ, Birchall J, Doree CJ, Hyde C. Recombinant factor VIIa for the prevention and treatment of bleeding in patients without haemophilia. *Cochrane Database Syst Rev* 2007:CD005011.
- Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001; **344**:699–709.
- Baudo F, Caimi TM, de Cataldo F, et al. Antithrombin III (ATIII) replacement therapy in patients with sepsis and/or postsurgical complications: a controlled double-blind, randomized, multicenter study. *Intensive Care Med* 1998; **24**:336–342.
- Reiter K, D'Intini V, Bordoni V, et al. High-volume hemofiltration in sepsis. Theoretical basis and practical application. *Nephron* 2002; **82**:251–258.
- Fox K. Experience dependent plasticity mechanisms for neural rehabilitation in somatosensory cortex. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2009; **364**:369–381.
- Schreiber MA, Holcomb JB, Rojjaer R. Preclinical trauma studies of recombinant factor VIIa. *Crit Care* 2005; **9** (Suppl 5):S25–S28.
- Folts J. An in vivo model of experimental arterial stenosis, intimal damage, and periodic thrombosis. *Circulation* 1991; **83**:IV3–IV14.
- Vincent JL, Rossaint R, Riou B, et al. Recommendations on the use of recombinant activated factor VII as an adjunctive treatment for massive bleeding: an European perspective. *Crit Care* 2006; **10**:R120.
- Rossaint R, Bouillon B, Cerny V, et al. Management of bleeding following major trauma: an updated European guideline. *Crit Care* 2007; **14**:R52.
- Durand M, Godier A, Lecompte T, et al. Modified Folts models in the rabbit: variations on a well worn theme. *Eur J Anaesthesiol* 2009; **26**:344–345.
- Warr TA, Rao LV, Rapaport SI. Disseminated intravascular coagulation in rabbits induced by administration of endotoxin or tissue factor: effect of antitissue factor antibodies and measurement of plasma extrinsic pathway inhibitor activity. *Blood* 1990; **75**:1481–1489.
- Fridberg MJ, Hedner U, Roberts HR, Ehardtson E. A study of the pharmacokinetics and safety of recombinant activated factor VII in healthy Caucasian and Japanese subjects. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2005; **16**:259–266.
- Boffard KD, Riou B, Warren B, et al. Recombinant factor VIIa as adjunctive therapy for bleeding control in severely injured trauma patients: two parallel randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trials. *J Trauma* 2005; **59**:8–15; discussion 8.
- Gill R, Herbertson M, Vuylsteke A, et al. Safety and efficacy of recombinant activated factor VII: a randomized placebo-controlled trial in the setting of bleeding after cardiac surgery. *Circulation* 2009; **120**:21–27.
- Sapsford W, Watts S, Cooper G, Kirkman E. Recombinant activated factor VII increases survival time in a model of incompressible arterial hemorrhage in the anesthetized pig. *J Trauma* 2007; **62**:868–879.
- McMullin NR, Hedner U, Ezban M, et al. Recombinant factor VIIa reduces rebleed hemorrhage volume in a swine aortotomy model: a randomized double-blinded study. *Shock* 2008; **29**:703–708.
- Viuff D, Lauritzen B, Pusateri AE, et al. Effect of haemodilution, acidosis, and hypothermia on the activity of recombinant factor VIIa (NovoSeven). *Br J Anaesth* 2008; **101**:324–331.

Discussion générale

Les travaux regroupés dans cette thèse plaident pour une place du rFVIIa dans l'arsenal thérapeutique en CCV comme agent hémostatique d'exception en situation d'hémorragie non contrôlée.

Intérêt clinique

La méta-analyse de la *Cochrane Database* de 2007 concernant l'utilisation du rFVIIa hors hémophilie (14 essais prophylactiques avec 1137 patients et 11 essais thérapeutiques avec 2366 patients) a conclu à l'absence de preuve de l'efficacité dans ces deux situations et à la nécessité de limiter son usage hors AMM aux essais cliniques⁹⁰. Cette analyse est globale, regroupant les études dans des situations très variées : chirurgie, traumatologie, neurologie, saignement digestif, intracrânien... Cette conclusion est prudente mais nous paraît trop restrictive en ce qui concerne la CCV.

A ce jour, 9 études ont été publiées concernant l'utilisation prophylactique de rFVIIa en chirurgie hors hémophilie⁹. La seule ayant montré une diminution de la quantité de saignement et de transfusion a été réalisée en urologie par Friederich *et coll.* en 2003⁹¹. Cette rigoureuse étude prospective randomisée en double aveugle mono-centrique réalisée chez 36 patients a étudié deux doses de rFVIIa, 20 et 40 µg/kg. Le saignement post-opératoire est passé de 2,7 L (placebo) à 1,1 L (groupe 40 µg/kg) $p < 0,05$; cela a attesté de l'efficacité du médicament sur le saignement. Cependant, la perte d'une demi-masse sanguine pour ce type d'intervention programmée a laissé bon nombre d'experts dubitatifs quant à l'expertise de l'équipe médico-chirurgicale et par voie de conséquence sur la validité des conclusions de l'article. Deux études ont été réalisées en chirurgie cardiaque. En 2005, Diprose *et coll.* ont randomisé 20 adultes pour recevoir une injection de 90 µg/kg de rFVIIa *versus* placebo après neutralisation de l'HNF par la protamine lors de chirurgie

cardiaque complexe⁹². La seconde étude a enrôlé 76 jeunes patients opérés de cardiopathies congénitale par Ekert *et coll.* avec des posologies inférieures (40 µg/kg post-protamine, répété si besoin)⁹³. Dans ces 2 travaux, avec un nombre limité de patients, aucune différence n'a été trouvée en termes de quantité de saignement, de transfusions et de complications thrombotiques. En conséquence, il ne semble donc pas y avoir de place pour le rFVIIa en chirurgie en prophylaxie du saignement.

La seule étude prospective randomisée d'administration thérapeutique (devant un saignement jugé anormal) en chirurgie cardiaque a été publiée récemment⁹⁴. Dans cette étude multicentrique de phase II en escalade de dose, 172 patients ont été randomisés. Les groupes ont été constitués de la manière suivante : placebo (n=68), 40 µg/kg (n=35) et 80 µg/kg (n=69). Il faut noter qu'initialement, un groupe à 160 µg/kg devait être étudié, mais l'étude n'a pas été étendue à cette plus forte dose en raison de la survenue d'ET dans le groupe faible dose (40 µg/kg). Pour l'inclusion le seuil de saignement retenu a été d'au moins 200 mL/h pendant une heure post-opératoire ou de plus de 2 mL/kg/h pendant deux heures. Ces seuils correspondent à un saignement modérément exagéré plutôt que grave⁴⁶. Rappelons que dans l'observatoire français, le drainage médiastinal recueilli en réanimation (figure 2 de l'observatoire) dans les premières heures précédant l'injection était de l'ordre de 300 mL/h ce qui correspond à un saignement réellement préoccupant. Le saignement de 200 mL pendant la première heure de retour du bloc opératoire est celui des patients ayant reçu le rFVIIa au bloc opératoire (figure 3 de l'observatoire). Malgré ces seuils bas, Gill *et coll.* n'ont pu inclure que 172 patients sur plus de 2600 consentants (6,6 %). Cela montre bien la difficulté première de ce type d'étude. Il faut également noter que parmi les critères d'exclusion se trouvaient : les assistances circulatoires et les pontages aorto-coronaires premiers sans ou avec une monothérapie antiplaquettaire pré-opératoire, ce qui limite encore la portée des résultats. Les conclusions sur les ETs sont très prudentes. Aucune

différence de mortalité n'a été identifiée. Des accidents vasculaires cérébraux ont été trouvés dans les groupes traités (2 cas dans chaque) et aucun dans le groupe contrôle. En revanche, le seul infarctus du myocarde a été recensé dans le groupe contrôle. Aucune embolie pulmonaire n'a été diagnostiquée et trois autres ETs ont été mentionnés : deux infarctus mésentériques (un dans chaque groupe rFVIIa) et une thrombose veineuse superficielle (groupe 80 µg/kg). L'imputabilité du produit est difficile à affirmer et les différences ne sont pas statistiquement significatives, ce qui est plutôt rassurant quant à la sécurité du produit à ces doses.

Les travaux de traumatologie ne sont pas concluants, et les récentes publications ne sont toujours pas en faveur de son intérêt⁹⁵. Nous ne sommes pas en mesure de définir les critères définissant la population de patients pouvant bénéficier du traitement dans les situations de traumatologie. Les conséquences du poly-traumatisme (coagulopathie, choc, hypothermie, crush syndrome...) sont possiblement trop avancées chez ces patients. La population de CCV est différente, mieux évaluée sur les plans cliniques et biologiques. Une piste d'explication pour l'intérêt du rFVIIa en CCV pourrait impliquer le TFPI. Effectivement, ce dernier – dans sa forme libre- est augmenté significativement et transitoirement (24 h) après une CEC⁹⁶. Or, la plupart des hémorragies réfractaires en CCV interviennent en post –opératoire immédiat. Le TFPI libre couplé au Xa (TFPI-Xa) inhibe le complexe FT-FVIIa après formation d'un complexe quaternaire. Cette réaction est facilitée par la protéine S⁹⁷. Nous émettons l'hypothèse que le rFVIIa administré durant cette phase pourrait permettre de contrer l'effet pro-hémorragique de cette augmentation de TFPI libre.

Comme nous l'avons précédemment évoqué, le rFVIIa est supposé agir en tout site d'exposition du FT et notamment dans toute plaque rompue d'athérosclérose voire dans le sang circulant. Cela doit être pris en compte selon la situation chez ces patients à risque. Cependant, l'importance et le rôle du FT circulant ne sont pas encore clairement élucidés.

Des travaux expérimentaux de Giesen *et coll.* ont montré sa présence dans les leucocytes circulants et leur effet thrombotique *in vitro*¹³. Le pool de FT circulant est réparti en forme soluble (inactif), lié aux membranes cellulaires (actif) et contenu dans des microparticules circulantes (actif mais masqué). Bien qu'il soit possible que ce contingent de FT puisse participer à la coagulation, il n'est pas du tout démontré qu'il puisse en être le déclencheur d'un processus systémique (CIVD). Par ailleurs, plusieurs travaux, dont le plus récent de Steppich *et coll.*, montrent que l'activité du FT circulant est un facteur prédictif de mortalité dans l'infarctus du myocarde⁹⁸. Par extension, on peut émettre l'hypothèse que le rFVIIa puisse participer de manière péjorative au cortège des complications thrombotiques concomitantes à l'élévation de l'activité du FT plasmatique.

Les assistances circulatoires combinent des facteurs de risque pro-hémorragiques conséquents : nécessité d'anticoagulation importante et prolongée, chirurgie urgente et défaillance viscérale avec coagulopathie acquise. La complication thrombotique reste la plus redoutée : c'est pourquoi l'utilisation du rFVIIa dans ce domaine est encore plus réduite. Cependant, l'assistance circulatoire peut aussi être considérée comme un 'modèle' exemplaire de situation à haut risque d'ET. L'étude de ces cas permet donc une évaluation de la sécurité d'utilisation du rFVIIa. Dans l'observatoire français, nous n'avons trouvé aucune complication majeure du circuit pour les 37 cas (29 ECMO®, 7 Thoratec® et 2 CardioWest®) avec des doses proches de 70 µg/kg. Dans une lettre, Warren *et coll.* ont appelé à la prudence notamment en ce qui concerne le rôle non établi mais redouté du FT plasmatique⁹⁹. La littérature sur le rFVIIa et les assistances n'est pas fournie. De 2002 à 2010, 6 « case reports » ont été publiés chez l'adulte¹⁰⁰⁻¹⁰⁵. Les saignements rapportés étaient impressionnants : plus 1 L/h, voire plus d'1,5 L/h, impossibilité de fermeture du thorax, plus de 500 mL/15 min. En revanche, la neutralisation de l'HNF ne paraît pas avoir été assurée pour les 3 premiers cas. D'une part, la neutralisation de l'héparine par la

protamine est un pré-requis à l'utilisation du rFVIIa. D'autre part, cela reflète bien la crainte de la thrombose du circuit. Les doses employées ont varié : 20+30, 120+60, 35+35, 90 et 120 µg/kg. L'efficacité sur le saignement a été constatée à chaque fois. Mais dans l'avant-dernier cas, le patient est décédé de mort cérébrale dans les suites d'une défaillance hépatorénale ; dans ce cas l'imputabilité du produit n'est pas exclue. Un autre cas, qui est le seul avec thrombose d'oxygénateur, a été décrit en 2002¹⁰⁶. La thrombose est survenue dans les suites de l'administration de CCP activés. L'association de ces deux produits est déconseillée. Le dernier cas¹⁰⁵, décrit une thrombose cardiaque (oreillettes droite puis gauche sur les zones de suture greffon receveur) chez un patient en défaillance cardiaque sous ECMO post-transplantation. Le saignement a été rapidement contrôlé mais la thrombose rapidement détectée, d'abord de l'oreillette droite puis de la gauche. L'issue a été rapidement fatale après une tentative infructueuse de thrombolyse. Le contexte était particulier : transplantation cardiaque orthotopique après 3 mois d'assistance mécanique et endocardite à *Candida albicans*. Une transfusion massive (39 culots globulaires, 54 culots de plasma frais congelés, 6 unités de concentrés plaquettaires) a précédé l'injection de rFVIIa, associé à l'administration de 6 g de fibrinogène et de 1800 UI de CCP activés... La séquence entre l'injection du médicament et la survenue de la thrombose est un argument fort pour une relation de causalité. Néanmoins, nous notons encore dans ce cas l'association de CCP activés et du rFVIIa.

En 2006, O'Connell *et coll.* ont rapporté et analysé les cas déclarés de complications (ET et autres) après utilisations hors AMM de rFVIIa aux Etats Unis d'Amérique¹⁰⁷. Parmi 431 cas d'effets indésirables volontairement déclarés de 1999 à 2004, 168 ont décrit 183 ETs dont 10 ont concerné des systèmes extra-corporels (assistances, systèmes d'hémodiafiltration et tubes endotrachéaux). La gravité de ces événements n'est pas précisée. Malgré les réserves de ce type d'analyse, il est très intéressant de noter que l'incidence des événements

indésirables est nettement plus importante dans les cas d'utilisation isolée par rapport à celle des études cliniques. L'autre information intéressante est la médiane de survenue de ces évènements qui est proche de 24h. En 2007, Gandhi *et coll.* ont publié une série rétrospective de 14 cas d'utilisation de rFVIIa avec des assistances¹⁰⁸. Les doses se sont échelonnées de 24 à 189 µg/kg. Les ETs ont été recensés dans 4 cas (aucune thrombose de circuit) et 5 décès ont été rapportés (2 post ET). Ces résultats sont en accord avec les données de l'observatoire. Or, le papier le plus récent prend le contre-pied en rapportant une autre série texane rétrospective de 62 cas d'utilisation du rFVIIa et en analysant les évènements indésirables¹⁰⁹. Dans ce groupe, 14 thromboses ont été relevées, la plupart dans les 48 premières heures. Deux groupes ont été constitués pour l'analyse, l'un faible dose (10 à 20 µg/kg, n=32) et l'autre forte dose (30 à 70 µg/kg, n=30). Après cette répartition arbitraire, les auteurs ont identifié une fréquence de thromboses plus importante dans le groupe forte dose. Les conclusions de ce récent rapport sont à prendre avec précaution. Sachant que l'incidence des ETs chez les patients porteurs d'assistances circulatoires varie de 5 à 47 %¹¹⁰, et qu'aucun papier ne démontre l'imputabilité directe du rFVIIa dans les ETs, il est raisonnable de conclure que le rFVIIa peut avoir un intérêt pour le contrôle de l'hémorragie réfractaire chez des patients porteurs ou non d'assistances circulatoires. Cependant l'association de thérapeutiques pro-thrombotiques (en premier plan les PCC activés) doit être évitée afin de minimiser le risque thrombotique.

L'observatoire suggère qu'une dose proche de 80 µg/kg est associée à une évolution favorable. Cette dose est proche de celles décrites dans la littérature et notamment le récent travail de Masud *et coll.*¹¹¹. Dans cette analyse rétrospective de dose, 93 patients ont reçu dans leur institution du rFVIIa pour une hémorragie réfractaire. Lors des premières utilisations de rFVIIa dans notre centre nancéien, la dose visée était de 60 µg/kg. Le conditionnement du rFVIIa était alors en flacons de 1,2-2,4 et 4,8 mg. Dans la pratique, les

patients ont reçu la totalité des flacons commandés, ce qui peut expliquer les variations de doses prescrites et reçues.

Une telle posologie de 80 µg/kg est très proche de celle proposée initialement pour l'hémophilie, et qui avait été établie sur des bases essentiellement empiriques. La base rationnelle était évidemment de déclencher une génération 'suffisante' de thrombine de manière indépendante de la 'ténase' intrinsèque (constituée des facteurs anti-hémophiliques). En théorie le facteur limitant serait la saturation du facteur tissulaire (FT) par la forme activée du facteur VII, mais la concentration *in situ* de FT est mal connue et de plus l'existence d'un effet indépendant du FT, survenant à la surface des plaquettes activées, a été suggérée (*vide supra*). Il est admis qu'après une dose de 80 – 90 µg/kg, la proportion de forme active du facteur passe de 1 à au moins 50 % au pic de concentration²⁴.

La durée pendant laquelle une concentration 'efficace' de rFVIIa doit être présente n'est pas établie.

Modèle animal

Notre travail expérimental a permis de fournir la preuve du concept de l'effet hémostatique du rFVIIa sur une brèche artérielle macroscopique en condition d'hémostase non altérée. Nous avons pour cela mis en place un modèle original, fiable et pertinent pour étudier un saignement majeur d'origine artérielle. Nous avons précédemment mis au point un protocole d'anesthésie stable et efficace autorisant des manipulations de l'animal en situation hémodynamique stable pendant la durée requise.

Des publications antérieures avaient documenté des effets du rFVIIa humain chez le lapin¹¹²⁻¹¹⁴. Nous avons pu constater par nos expériences une accélération de la coagulation du plasma de lapin par le rFVIIa humain en présence de FT de lapin.

Une des limites de notre étude concerne le risque thrombotique et a été la suivante : l'analyse des effets pro-thrombotiques a dû être limitée aux études macroscopiques de la carotide commune et microscopiques de fragments de foie et de rein. Idéalement nous aurions pu étendre l'analyse au cœur et au cerveau de l'animal, ces deux organes étant au centre des préoccupations cliniques lors de l'utilisation du rFVIIa. Mais nous ne les avons pas étudiés. D'une part l'analyse du myocarde n'aurait pas pu renseigner sur la survenue d'évènement coronaire chez un animal sain à moins de réaliser un modèle de Folts concomitamment. Or, nous avons déjà réalisé cette étude randomisée contrôlée avec 15 lapins et étudiant deux doses (15 et 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$) sans détecter d'augmentation significative des VCF (travail de master 2, non publié). De plus, l'étude des deux carotides concomitantes présente un risque pour l'animal et l'expérimentation. D'autre part, l'analyse des cerveaux des animaux nous aurait confrontés à des problèmes méthodologiques notamment pour analyser d'éventuelles lésions ischémiques dues à une baisse de débit de perfusion de la carotide.

D'une manière plus générale, lors de la conception d'un protocole d'expérimentation animale d'un modificateur de l'hémostase, se pose la question du nombre de paramètres qui peuvent être étudiés chez le même animal sans compromettre le modèle et en gardant une cohérence temporelle (toutes les explorations ne pouvant pas être réalisées simultanément) : pour les paramètres biologiques, le facteur limitant est la déperdition sanguine liée au nombre et au volume des prélèvements ; pour l'hémorragie la détermination du temps et/ou du volume de saignement en des sites multiples (bord de l'oreille ; parenchymes hépatique et splénique...) ; pour la thrombose artérielle le modèle de Folts par exemple, la thrombose veineuse jugulaire par exemple, l'obstruction microcirculatoire par des thrombi et/ou des embols... Au cours de notre travail de thèse nous avons pu d'abord réaliser une version classique combinant saignement à l'oreille et thrombose artérielle de type Folts. Pour la

question originale du saignement par lésion artérielle, nous avons dû concentrer l'expérimentation *in vivo* sur cette seule lésion et nous avons aussi mesuré quelques paramètres biologiques.

Dans nos expérimentations, nous n'avons jamais altéré la compétence hémostatique des lapins. Or, en situation clinique l'hémostase n'est jamais normale. Mais nous ne voulions pas alourdir l'expérience et risquer de perdre la simplicité de l'analyse par une altération du modèle. L'extrapolation qui nous paraît pouvoir être faite à l'homme est que, pour escompter un effet bénéfique sur un saignement de ce type, une correction minimale (seuils à définir) est nécessaire ; il en va d'ailleurs de même vis-à-vis du saignement micro-vasculaire.

La stabilité des paramètres vitaux durant l'expérience et la comparabilité des groupes après déclenchement du saignement par la brèche artérielle avant le traitement rendent le modèle robuste. Une des difficultés lors de la mise en place du modèle a été de trouver une méthode reproductible de limitation de l'hémorragie permettant la survie de l'animal par limitation des pertes sanguines associée au maintien du flux sanguin au travers de la carotide avec une comptabilisation des pertes. L'utilisation du poids en métal et de la compresse boule a pu paraître rustique mais ils ont parfaitement rempli leur fonction. La simplicité de l'artifice a été une assurance de sa reproductibilité.

Comme cela a été discuté dans l'article concernant les lapins¹¹⁵, la question de la pertinence de l'équivalence de doses entre humains et lapins est difficile à établir, notamment en raison de la différence de cinétique des systèmes hémostatiques. Nous avons utilisé les doses de 80 et 200 µg/kg. Pour des raisons de sécurité, l'intérêt clinique du produit doit être établi avec la dose minimale nécessaire. Or, dans nos travaux sur le modèle d'hémorragie artérielle, l'effet hémostatique est significativement observé dès 80 µg/kg.

Les lapins coagulent plus vite que l'homme (cf. Quick pré traitement). Bien que l'on n'ait pas d'idée de la quantité de FVIIa circulant chez le lapin, les dosages de la forme activée chez l'animal dans nos travaux (cf. tables 3 de la thèse et dans la publication 4) sont élevés dans la même mesure que chez l'homme. Après l'injection du produit, les temps de Quick sont raccourcis probablement à la limite minimale du test utilisé et l'effet persiste à 1 heure dans le groupe à 200 µg/kg. La demi-vie du produit chez l'humain est d'une heure¹¹⁵. Chez le lapin, les rares données ainsi que notre expérience, la situent autour de 1h-1h30¹¹². De récentes données suggèrent l'internalisation du médicament dans les couches endothéliales et sous-endothéliales avec une possibilité de redistribution tardive et donc d'effet prolongé (étude *in vitro*)¹¹⁶. Deux articles sur modèle expérimental animal d'hémorragie artérielle majeure ont à ce jour été publiés. Les saignements ont été induits au niveau de l'aorte de cochons. Cependant deux points majeurs nous éloignent de ces travaux. Pour le premier, Stapsford *et coll.* ont ajouté des facteurs confondants via les manœuvres de réanimation et notamment de remplissage⁸⁷. Pour le second, Mac Mullin *et coll.*, ont utilisé le rFVIIa en traitement prophylactique, c'est-à-dire avant la réalisation de la lésion⁸⁸. L'intérêt du modèle animal était de s'approcher d'une situation clinique « limite » dont la gravité doit être constatée avant l'utilisation du traitement (donc utilisation de type thérapeutique).

Au total nous avons pu apporter la preuve du concept que l'administration systémique de rFVIIa pouvait favoriser le colmatage d'une brèche artérielle et il se trouve que la dose déterminée efficace chez le lapin était la même que celle associée dans l'observatoire à une évolution clinique favorable, à savoir 80 µg/kg.

Rappelons que par cet observatoire nous avons pu mettre en évidence que pour un certain nombre de saignements qualifiés de type chirurgical, au moins en partie, l'administration de rFVIIa s'était suivie d'une amélioration voire d'un arrêt du saignement.

Conclusions et perspectives

Dans ce travail nous avons rassemblé nos travaux cliniques et expérimentaux concernant l'usage du rFVIIa en CCV. Ces derniers sont en faveur de son intérêt clinique et de l'efficacité expérimentale dans le contrôle de l'hémorragie réfractaire en chirurgie cardiaque y compris lorsqu'une lésion vasculaire est suffisamment importante pour relever en première intention d'une correction chirurgicale. Dans l'observatoire des cas cliniques un certain nombre de malades avaient une assistance circulatoire, et aucune coagulation dans le dispositif n'a été notée.

Nos conclusions sont les suivantes :

Le rFVIIa est un agent hémostatique puissant qui nous semble avoir sa place dans l'arsenal thérapeutique en CCV malgré l'absence de preuve formelle de son efficacité. Cependant, son usage doit être encadré et doit rester exceptionnel (thérapeutique d'ultime recours).

L'utilisation du produit peut être discutée en cas de saignement menaçant et non ou difficilement accessible à une correction chirurgicale, et après compensation des pertes sanguines (Ht > 25 %, Pq > 50 G/L, TP > 40 %), neutralisation de l'HNF, corrections du pH et de l'hypothermie et après usage de toutes les thérapeutiques classiques.

La dose à administrer semble devoir s'approcher de 80 µg/kg.

La survenue d'évènements thrombotiques artériels et veineux doit être étroitement surveillée afin de les reconnaître précocement, les compter, les comprendre et les traiter.

La balance bénéfice risque d'une ré-intervention chirurgicale doit être évaluée lorsque cette dernière requiert une nouvelle procédure de CEC plus ou moins hypothermie ou arrêt circulatoire.

L'association avec d'autres hémostatiques activés (CCP activés) doit être évitée.

Tous les cas d'utilisation hors AMM devraient continuer à être colligés dans des observatoires nationaux afin de suivre l'évolution des pratiques et la sécurité d'emploi.

En ce qui concerne l'expérimentation animale, nous avons apporté la preuve du concept de l'effet hémostatique du rFVIIa pour le contrôle d'un saignement artériel macroscopique. Nous envisageons de comparer d'autres thérapeutiques hémostatiques *versus* rFVIIa sur le modèle d'hémorragie artérielle aiguë.

En effet l'intérêt du fibrinogène en chirurgie cardiaque a été suggéré récemment par une étude pilote¹¹⁷. Vingt patients ont reçu en aveugle 2 g de fibrinogène ou de placebo en préopératoire de revascularisation myocardique, ce qui a réduit le saignement postopératoire de 32 %. La concentration minimale de fibrinogène recommandé en cas d'hémorragie grave est encore relativement bas à 1 g/L^{118, 119}. Il est possible que ce seuil soit sous-évalué. Un travail réalisé en gynécologie par Charbit *et coll.* a montré qu'une concentration de fibrinogène inférieur à 2 g/L est un facteur prédictif de saignement majeur en post-partum⁵⁰.

L'intérêt des CCP pour le saignement en chirurgie cardiaque n'est pas démontré¹²⁰. Les indications actuelles sont limitées aux surdosages en AVK et aux déficits constitutionnels en facteurs II et X¹²¹. Or, ces hémostatiques puissants pourraient avoir un intérêt dans les situations d'hémorragie réfractaires en chirurgie cardiaque. Une seule étude rétrospective est disponible⁶³. Parmi les 24 cas d'administrations de CCP, 7 concernaient des patients post-chirurgie cardiaque. Une amélioration du saignement et une réduction des transfusions de PSL a été rapidement constatée chez 6 patients et aucun ET n'a été noté. Ces quelques données sont intéressantes et encourageantes.

La prise en charge de l'hémorragie réfractaire dans cette spécialité est difficile malgré l'existence de recommandations et d'algorithmes transfusionnels. Bien que les preuves scientifiques de grade A ne soient pas disponibles, l'utilisation du rFVIIa dans des

situations d'hémorragie réfractaire grave en chirurgie cardiaque est maintenant relativement bien documentée (pubmed juillet 2010 : 129 articles dont 24 revues). L'utilisation du rFVIIa dans cette situation est de grade C dans les recommandations européennes de 2008⁵³. Et les conditions d'utilisation ont été clairement définies par la société européenne d'anesthésie en 2006⁷⁰. La neutralisation de l'HNF doit être rigoureuse et vérifiée, de même que les compensations de PSL. L'administration de rFVIIa ne doit pas se substituer à une reprise chirurgicale. Cependant, comme l'ont montré Moulton *et coll.* dans une importante étude rétrospective avec analyse multi-variée (6100 patients en 7 ans), la ré-intervention pour saignement est un facteur de risque de complications graves : décès, insuffisance rénale, ventilation prolongée, sepsis, syndrome de détresse respiratoire de l'adulte et fibrillation atriale¹²². C'est pourquoi, en cas de ré-intervention à haut risque pour le malade, étant donné que le rFVIIa semble capable de contrôler un saignement majeur, son utilisation doit être envisagée.

Références

- 1 Marietta M, Facchini L, Pedrazzi P, Busani S, Torelli G. Pathophysiology of bleeding in surgery. *Transplant Proc* 2006; **38**:812-4.
- 2 Mannucci PM, Levi M. Prevention and treatment of major blood loss. *N Engl J Med* 2007; **356**:2301-11.
- 3 Hein OV, Birnbaum J, Wernecke KD, Konertz W, Jain U, Spies C. Three-year survival after four major post-cardiac operative complications. *Crit Care Med* 2006; **34**:2729-37.
- 4 Hedner U, Kisiel W. Use of human factor VIIa in the treatment of two hemophilia A patients with high-titer inhibitors. *J Clin Invest* 1983; **71**:1836-41.
- 5 Majumdar G, Phillips JK, Lavalley H, Savidge GF. Acquired haemophilia in association with type III von Willebrand's disease: successful treatment with high purity von Willebrand's factor and recombinant factor VIIa. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1993; **4**:1035-7.
- 6 Martinowitz U, Holcomb JB, Pusateri AE, Stein M, Onaca N, Freidman M, Macaitis JM, Castel D, Hedner U, Hess JR. Intravenous rFVIIa administered for hemorrhage control in hypothermic coagulopathic swine with grade V liver injuries. *J Trauma* 2001; **50**:721-9.
- 7 Hedner U. Recombinant activated factor VII as a universal haemostatic agent. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998; **9 Suppl 1**:S147-52.
- 8 Liem AK, Biesma DH, Ernst SM, Schepens AA. Recombinant activated factor VII for false aneurysms in patients with normal haemostatic mechanisms. *Thromb Haemost* 1999; **82**:150-1.
- 9 Hardy JF, Belisle S, Van der Linden P. Efficacy and safety of activated recombinant factor VII in cardiac surgical patients. *Curr Opin Anaesthesiol* 2009; **22**:95-9.
- 10 Maillet M. Histologie des organes: Academic Press; 1980.
- 11 Tuddenham EG, Pemberton S, Cooper DN. Inherited factor VII deficiency: genetics and molecular pathology. *Thromb Haemost* 1995; **74**:313-21.

- 12 Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol* 1989; **134**:1087-97.
- 13 Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roque M, Fallon JT, Badimon JJ, Hember J, Riederer MA, Nemerson Y. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**:2311-5.
- 14 Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry* 1991; **30**:10363-70.
- 15 Macfarlane RG. An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and Its Function as a Biochemical Amplifier. *Nature* 1964; **202**:498-9.
- 16 Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting. *Science* 1964; **145**:1310-2.
- 17 Monroe DM, Hoffman M. What does it take to make the perfect clot? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; **26**:41-8.
- 18 Wiwanitkit V. Thrombohemostatic Disease Research. Wiwanitkit V, editor: Nova Biomedical; 2007.
- 19 Hagen FS, Gray CL, O'Hara P, Grant FJ, Saari GC, Woodbury RG, Hart CE, Insley M, Kisiel W, Kurachi K, et al. Characterization of a cDNA coding for human factor VII. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; **83**:2412-6.
- 20 D'Andrea D, Ravera M, Golino P, Rosica A, De Felice M, Ragni M, Cirillo P, Vigorito F, Corcione N, Tommasini P, Gargiulo A, Piro O, Calabro P, Chiariello M. Induction of tissue factor in the arterial wall during recurrent thrombus formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; **23**:1684-9.
- 21 Abshire T, Kenet G. Recombinant factor VIIa: review of efficacy, dosing regimens and safety in patients with congenital and acquired factor VIII or IX inhibitors. *J Thromb Haemost* 2004; **2**:899-909.

- 22 van 't Veer C, Golden NJ, Mann KG. Inhibition of thrombin generation by the zymogen factor VII: implications for the treatment of hemophilia A by factor VIIa. *Blood* 2000; **95**:1330-5.
- 23 Lisman T, Mosnier LO, Lambert T, Mauser-Bunschoten EP, Meijers JC, Nieuwenhuis HK, de Groot PG. Inhibition of fibrinolysis by recombinant factor VIIa in plasma from patients with severe hemophilia A. *Blood* 2002; **99**:175-9.
- 24 Sié P. Mécanisme d'action pro-hémostatique du facteur VIIa recombinant. *Hématologie* 2003; **9**:203-12.
- 25 Reichert JM, Paquette C. Therapeutic recombinant proteins: trends in US approvals 1982 to 2002. *Curr Opin Mol Ther* 2003; **5**:139-47.
- 26 Monroe DM, Hoffman M, Oliver JA, Roberts HR. Platelet activity of high-dose factor VIIa is independent of tissue factor. *Br J Haematol* 1997; **99**:542-7.
- 27 Lisman T, Moschatsis S, Adelmeijer J, Nieuwenhuis HK, De Groot PG. Recombinant factor VIIa enhances deposition of platelets with congenital or acquired alpha IIb beta 3 deficiency to endothelial cell matrix and collagen under conditions of flow via tissue factor-independent thrombin generation. *Blood* 2003; **101**:1864-70.
- 28 Lisman T, Adelmeijer J, Heijnen HF, de Groot PG. Recombinant factor VIIa restores aggregation of alphaIIbbeta3-deficient platelets via tissue factor-independent fibrin generation. *Blood* 2004; **103**:1720-7.
- 29 Durand M, Lecompte T, Hacquard M, Carreaux JP. Heparin-induced thrombocytopenia and cardiopulmonary bypass: anticoagulation with unfractionated heparin and the GPIIb/IIIa inhibitor tirofiban and successful use of rFVIIa for post-protamine bleeding due to persistent platelet blockade. *Eur J Cardiothorac Surg* 2008; **34**:687-9.
- 30 Weeterings C, de Groot PG, Adelmeijer J, Lisman T. The glycoprotein Ib-IX-V complex contributes to tissue factor-independent thrombin generation by recombinant factor VIIa on the activated platelet surface. *Blood* 2008; **112**:3227-33.
- 31 Kendall AG, Lowenstein L. Alterations in blood coagulation and hemostasis during extracorporeal circulation. I. *Can Med Assoc J* 1962; **87**:786-90.

- 32 Kendall AG, Lowenstein L. Alterations in blood coagulation and hemostasis during extracorporeal circulation. II. *Can Med Assoc J* 1962; **87**:859-64.
- 33 Phillips LL, Malm JR, Deterling RA, Jr. Coagulation defects following extracorporeal circulation. *Ann Surg* 1963; **157**:317-26.
- 34 Hunt BJ, Parratt RN, Segal HC, Sheikh S, Kallis P, Yacoub M. Activation of coagulation and fibrinolysis during cardiothoracic operations. *Ann Thorac Surg* 1998; **65**:712-8.
- 35 Weiss M, Yver J, Samama MM, Dubost C. Effets dissociés d'un nouvel antifibrinolytique (acide epsilon-amino-caproïque) injecté in vivo sur les épreuves in vitro de fibrinolyse. *Presse Méd* 1963; **71**:1879-80.
- 36 Gouin I, Lecompte T, Morel MC, Lebrazi J, Modderman PW, Kaplan C, Samama MM. In vitro effect of plasmin on human platelet function in plasma. Inhibition of aggregation caused by fibrinogenolysis. *Circulation* 1992; **85**:935-41.
- 37 Lu H, Soria C, Li H, Soria J, Lijnen HR, Perrot JY, Caen JP. Role of active center and lysine binding sites of plasmin in plasmin-induced platelet activation and disaggregation. *Thromb Haemost* 1991; **65**:67-72.
- 38 Levi M, Cromheecke ME, de Jonge E, Ptins MH, de Mol BJM, Briët E, Büller HR. Pharmacological strategies to decrease excessive blood loss in cardiac surgery: a meta-analysis of clinically relevant end points. *Lancet* 1999; **354**:1940-7.
- 39 Lu H, Du Buit C, Soria J, Touchot B, Chollet B, Commin PL, Conseiller C, Echter E, Soria C. Postoperative hemostasis and fibrinolysis in patients undergoing cardiopulmonary bypass with and without aprotinin therapy. *Thromb Haemost* 1994; **72**:438-43.
- 40 Lecompte T, Carteaux JP, Regnault V, De Maistre E, Collet JY, Villemot JP. Is it possible and worth to use another anticoagulant than (unfractionated) heparin during cardiopulmonary bypass for cardiac surgery? *ITBM-RBM* 2003; **24**:45s-53s.
- 41 George JN. Platelet surface glycoproteins. Studies on resting and activated platelets and platelet membrane microparticles in normal subjects, and observations in patients during adult respiratory distress syndrome and cardiac surgery. *J Clin Invest* 1986; **78**:340-8.

- 42 De Somer F. Tissue factor as the main activator of the coagulation system during cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; **123**:951-8.
- 43 Despotis G, Eby C, Lublin DM. A review of transfusion risks and optimal management of perioperative bleeding with cardiac surgery. *Transfusion* 2008; **48**:2S-30S.
- 44 Mochizuki T, Olson PJ, Szlam F, Ramsay JG, Levy JH. Protamine reversal of heparin affects platelet aggregation and activated clotting time after cardiopulmonary bypass. *Anesth Analg* 1998; **87**:781-5.
- 45 Kirklin JWB-BBG. Cardiac surgery. Sons JWa, editor. New York 1986.
- 46 Belisle S, Hardy JF. Hemorrhage and the use of blood products after adult cardiac operations: myths and realities. *Ann Thorac Surg* 1996; **62**:1908-17.
- 47 Deng Y, Byth K, Paterson HS. Age and left ventricular impairment predict reopening for bleeding. *Asian Cardiovasc Thorac Ann* 2003; **11**:147-52.
- 48 Crowther MA, Warkentin TE. Managing bleeding in anticoagulated patients with a focus on novel therapeutic agents. *J Thromb Haemost* 2009; **7 Suppl 1**:107-10.
- 49 Ciavarella D, Reed RL, Counts RB, Baron L, Pavlin E, Heimbach DM, Carrico CJ. Clotting factor levels and the risk of diffuse microvascular bleeding in the massively transfused patient. *Br J Haematol* 1987; **67**:365-8.
- 50 Charbit B, Mandelbrot L, Samain E, Baron G, Haddaoui B, Keita H, Sibony O, Mahieu-Caputo D, Hurtaud-Roux MF, Huisse MG, Denninger MH, de Prost D. The decrease of fibrinogen is an early predictor of the severity of postpartum hemorrhage. *J Thromb Haemost* 2007; **5**:266-73.
- 51 Hemker HC, Giesen PL, Ramjee M, Wagenvoort R, Beguin S. The thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma. *Thromb Haemost* 2000; **83**:589-91.
- 52 Tucci G, Tomai F. [the Use of Thromboelastography in the Study of Blood Coagulation during Extracorporeal Circulation. Preliminary Contribution.]. *Ann Ital Chir* 1963; **40**:1112-29.

- 53 Dunning J, Versteegh M, Fabbri A, Pavie A, Kolh P, Lockowandt U, Nashef SA. Guideline on antiplatelet and anticoagulation management in cardiac surgery. *Eur J Cardiothorac Surg* 2008; **34**:73-92.
- 54 Wasowicz M, Meineri M, McCluskey SM, Mitsakakis N, Karkouti K. The Utility of Thromboelastography for Guiding Recombinant Activated Factor VII Therapy for Refractory Hemorrhage After Cardiac Surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2009.
- 55 Aziz KA, Masood O, Hoschitzky JA, Ronald A. Does use of the Hepcon point-of-care coagulation monitor to optimise heparin and protamine dosage for cardiopulmonary bypass decrease bleeding and blood and blood product requirements in adult patients undergoing cardiac surgery? *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2006; **5**:469-82.
- 56 Mammen EF, Alshameeri RS, Comp PC. Preliminary data from a field trial of the PFA-100 system. *Semin Thromb Hemost* 1995; **21 Suppl 2**:113-21.
- 57 Alstrom U, Granath F, Oldgren J, Stahle E, Tyden H, Siegbahn A. Platelet inhibition assessed with VerifyNow, flow cytometry and PlateletMapping in patients undergoing heart surgery. *Thromb Res* 2009.
- 58 Ngaage DL, Bland JM. Lessons from aprotinin: is the routine use and inconsistent dosing of tranexamic acid prudent? Meta-analysis of randomised and large matched observational studies. *Eur J Cardiothorac Surg* **37**:1375-83.
- 59 Laupacis A, Fergusson D. Drugs to minimize perioperative blood loss in cardiac surgery: meta-analyses using perioperative blood transfusion as the outcome. The International Study of Peri-operative Transfusion (ISPOT) Investigators. *Anesth Analg* 1997; **85**:1258-67.
- 60 Levi M, Cromheecke ME, de Jonge E, Prins MH, de Mol BJ, Briet E, Buller HR. Pharmacological strategies to decrease excessive blood loss in cardiac surgery: a meta-analysis of clinically relevant endpoints. *Lancet* 1999; **354**:1940-7.
- 61 Ozier Y, Schlumberger S. Pharmacological approaches to reducing blood loss and transfusions in the surgical patient. *Can J Anaesth* 2006; **53**:S21-9.

- 62 Pernod G, Godier A, Gozalo C, Tremey B, Sie P. French clinical practice guidelines on the management of patients on vitamin K antagonists in at-risk situations (overdose, risk of bleeding, and active bleeding). *Thromb Res* **126**:e167-74.
- 63 Bruce D, Nokes TJ. Prothrombin complex concentrate (Beriplex P/N) in severe bleeding: experience in a large tertiary hospital. *Crit Care* 2008; **12**:R105.
- 64 Godier A, Susen S, Samama CM. Treatment of massive bleeding with prothrombin complex concentrate: Argument against. *J Thromb Haemost*.
- 65 Durand M, Godier A, Lecompte T, Hardy JF, David O, Carreaux JP, Samama CM. Modified Folts models in the rabbit: variations on a well worn theme. *Eur J Anaesthesiol* 2009; **26**:344-5.
- 66 Durand M, Godier A, Notet V, Hacquard M, Collignon O, Corbonnois G, Plenat F, Carreaux JP, Lecompte T. Recombinant activated factor VII attenuates major arterial bleeding in noncoagulopathic rabbits. *Eur J Anaesthesiol*.
- 67 Mangano DT, Tudor IC, Dietzel C. The risk associated with aprotinin in cardiac surgery. *N Engl J Med* 2006; **354**:353-65.
- 68 Fergusson DA, Hebert PC, Mazer CD, Fremes S, MacAdams C, Murkin JM, Teoh K, Duke PC, Arellano R, Blajchman MA, Bussieres JS, Cote D, Karski J, Martineau R, Robblee JA, Rodger M, Wells G, Clinch J, Pretorius R. A comparison of aprotinin and lysine analogues in high-risk cardiac surgery. *N Engl J Med* 2008; **358**:2319-31.
- 69 Poon MC, d'Oiron R. Recombinant activated factor VII (NovoSeven) treatment of platelet-related bleeding disorders. International Registry on Recombinant Factor VIIa and Congenital Platelet Disorders Group. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2000; **11 Suppl 1**:S55-68.
- 70 Vincent JL, Rossaint R, Riou B, Ozier Y, Zideman D, Spahn DR. Recommendations on the use of recombinant activated factor VII as an adjunctive treatment for massive bleeding--a European perspective. *Crit Care* 2006; **10**:R120.
- 71 Dement'eva, II, Sandrikov VA, Charnaia MA, Morozov Iu A, Trekova NA, Eremenko AA. [Use of "NovoSeven" (rFVIIa) hemostatic in patients operated with extracorporeal blood circulation]. *Anesteziol Reanimatol* 2004; 11-3.

- 72 Bowman LJ, Uber WE, Stroud MR, Christiansen LR, Lazarchick J, Crumbley AJ, 3rd, Kratz JM, Toole JM, Crawford FA, Jr., Ikonomidis JS. Use of recombinant activated factor VII concentrate to control postoperative hemorrhage in complex cardiovascular surgery. *Ann Thorac Surg* 2008; **85**:1669-76; discussion 76-7.
- 73 Siller-Matula JM, Plasenzotti R, Spiel A, Quehenberger P, Jilma B. Interspecies differences in coagulation profile. *Thromb Haemost* 2008; **100**:397-404.
- 74 Golino P, Ambrosio G, Pascucci I, Ragni M, Russolillo E, Chiariello M. Experimental carotid stenosis and endothelial injury in the rabbit: an in vivo model to study intravascular platelet aggregation. *Thromb Haemost* 1992; **67**:302-5.
- 75 Godier A, Mazoyer E, Cymbalista F, Cupa M, Samama CM. Recombinant activated factor VII efficacy and safety in a model of bleeding and thrombosis in hypothermic rabbits: a blind study. *J Thromb Haemost* 2007; **5**:244-9.
- 76 Charbonneau S, Girard F, Boudreault D, Ruel M, Blais N, Hardy JF. Recombinant human activated factor VII is thrombogenic in a rabbit model of cyclic flow reduction and does not reduce intra-abdominal bleeding. *Thromb Haemost* 2007; **97**:296-303.
- 77 Carteaux JP, Gast A, Tschopp TB, Roux S. Activated clotting time as an appropriate test to compare heparin and direct thrombin inhibitors such as hirudin or Ro 46-6240 in experimental arterial thrombosis. *Circulation* 1995; **91**:1568-74.
- 78 Samama CM, Bonnin P, Bonneau M, Pignaud G, Mazoyer E, Bailliart O, Maffrand JP, Viars P, Caen JP, Drouet LO. Comparative arterial antithrombotic activity of clopidogrel and acetyl salicylic acid in the pig. *Thromb Haemost* 1992; **68**:500-5.
- 79 Hanson SR, Harker LA. Baboon models of acute arterial thrombosis. *Thromb Haemost* 1987; **58**:801-5.
- 80 Roux S, Carteaux JP, Hess P, Falivene L, Clozel JP. Experimental carotid thrombosis in the guinea pig. *Thromb Haemost* 1994; **71**:252-6.
- 81 Folts J. An in vivo model of experimental arterial stenosis, intimal damage, and periodic thrombosis. *Circulation* 1991; **83**:IV3-14.

- 82 Himber J, Kirchhofer D, Riederer M, Tschopp TB, Steiner B, Roux SP. Dissociation of antithrombotic effect and bleeding time prolongation in rabbits by inhibiting tissue factor function. *Thromb Haemost* 1997; **78**:1142-9.
- 83 Quaknine-Orlando B, Samama CM, Riou B, Bonnin P, Guillosson JJ, Beaumont JL, Coriat P. Role of the hematocrit in a rabbit model of arterial thrombosis and bleeding. *Anesthesiology* 1999; **90**:1454-61.
- 84 Godier A, Flaujac C, Horellou MH, De Mesmay M, Becanne X, Parisot M, Gauzit R, Samama CM. Argatroban and renal replacement therapy in a morbidly obese patient with heparin-induced thrombocytopenia: a case report. *Thromb Res* **126**:e141-3.
- 85 Dellamonica J, Mazoyer E, Rosa JP, Cymbalista F, Samama C. Abrupt oxygen decrease influences thrombosis and bleeding in stenosed and endothelium-injured rabbit carotid arteries. *Eur J Anaesthesiol* 2008; **25**:1002-8.
- 86 Sondeen JL, Pusateri AE, Hedner U, Yantis LD, Holcomb JB. Recombinant factor VIIa increases the pressure at which rebleeding occurs in porcine uncontrolled aortic hemorrhage model. *Shock* 2004; **22**:163-8.
- 87 Sapsford W, Watts S, Cooper G, Kirkman E. Recombinant activated factor VII increases survival time in a model of incompressible arterial hemorrhage in the anesthetized pig. *J Trauma* 2007; **62**:868-79.
- 88 McMullin NR, Hedner U, Ezban M, Lauritzen B, Prince MD, Holcomb JB, Sondeen JL. Recombinant factor VIIa reduces rebleed hemorrhage volume in a swine aortotomy model: a randomized double-blinded study. *Shock* 2008; **29**:703-8.
- 89 Boffard KD, Riou B, Warren B, Choong PI, Rizoli S, Rossaint R, Axelsen M, Kluger Y. Recombinant factor VIIa as adjunctive therapy for bleeding control in severely injured trauma patients: two parallel randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trials. *J Trauma* 2005; **59**:8-15; discussion -8.
- 90 Stanworth SJ, Birchall J, Doree CJ, Hyde C. Recombinant factor VIIa for the prevention and treatment of bleeding in patients without haemophilia. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; CD005011.

- 91 Friederich PW, Henny CP, Messelink EJ, Geerdink MG, Keller T, Kurth KH, Buller HR, Levi M. Effect of recombinant activated factor VII on perioperative blood loss in patients undergoing retropubic prostatectomy: a double-blind placebo-controlled randomised trial. *Lancet* 2003; **361**:201-5.
- 92 Diprose P, Herbertson MJ, O'Shaughnessy D, Gill RS. Activated recombinant factor VII after cardiopulmonary bypass reduces allogeneic transfusion in complex non-coronary cardiac surgery: randomized double-blind placebo-controlled pilot study. *Br J Anaesth* 2005; **95**:596-602.
- 93 Ekert H, Brizard C, Eyers R, Cochrane A, Henning R. Elective administration in infants of low-dose recombinant activated factor VII (rFVIIa) in cardiopulmonary bypass surgery for congenital heart disease does not shorten time to chest closure or reduce blood loss and need for transfusions: a randomized, double-blind, parallel group, placebo-controlled study of rFVIIa and standard haemostatic replacement therapy versus standard haemostatic replacement therapy. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2006; **17**:389-95.
- 94 Gill R, Herbertson M, Vuylsteke A, Olsen PS, von Heymann C, Mythen M, Sellke F, Booth F, Schmidt TA. Safety and Efficacy of Recombinant Activated Factor VII. A Randomized Placebo-Controlled Trial in the Setting of Bleeding After Cardiac Surgery. *Circulation* 2009.
- 95 Wade CE, Eastridge BJ, Jones JA, West SA, Spinella PC, Perkins JG, Dubick MA, Blackburne LH, Holcomb JB. Use of recombinant factor VIIa in US military casualties for a five-year period. *J Trauma* **69**:353-9.
- 96 Donahue BS, Gailani D, Mast AE. Disposition of tissue factor pathway inhibitor during cardiopulmonary bypass. *J Thromb Haemost* 2006; **4**:1011-6.
- 97 Hackeng TM, Maurissen LF, Castoldi E, Rosing J. Regulation of TFPI function by protein S. *J Thromb Haemost* 2009; **7 Suppl 1**:165-8.
- 98 Steppich BA, Braun SL, Stein A, Demetz G, Groha P, Schomig A, von Beckerath N, Kastrati A, Ott I. Plasma TF activity predicts cardiovascular mortality in patients with acute myocardial infarction. *Thromb J* 2009; **7**:11.

- 99 Warren OJ, Darzi AW, Athanasiou T. Recombinant activated factor VII in cardiac surgery - first, do no harm. *J Cardiothorac Surg* 2007; **2**:50.
- 100 Zietkiewicz M, Garlicki M, Domagala J, Wierzbicki K, Drwila R, Pfitzner R, Dziatkowiak A. Successful use of activated recombinant factor VII to control bleeding abnormalities in a patient with a left ventricular assist device. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; **123**:384-5.
- 101 Potapov EV, Pasic M, Bauer M, Hetzer R. Activated recombinant factor VII for control of diffuse bleeding after implantation of ventricular assist device. *Ann Thorac Surg* 2002; **74**:2182-3.
- 102 Kogan A, Berman M, Kassif Y, Raanani E, Stamler A, Ben Gal T, Stein M, Erez E, Vidne BA, Sahar G. Use of recombinant factor VII to control bleeding in a patient supported by right ventricular assist device after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2005; **24**:347-9.
- 103 Flynn JD, Camp PC, Jr., Jahania MS, Ramaiah C, Akers WS. Successful treatment of refractory bleeding after bridging from acute to chronic left ventricular assist device support with recombinant activated factor VII. *ASAIO J* 2004; **50**:519-21.
- 104 Heise D, Brauer A, Quintel M. Recombinant activated factor VII (Novo7) in patients with ventricular assist devices: case report and review of the current literature. *J Cardiothorac Surg* 2007; **2**:47.
- 105 Syburra T, Lachat M, Genoni M, Wilhelm MJ. Fatal outcome of recombinant factor VIIa in heart transplantation with extracorporeal membrane oxygenation. *Ann Thorac Surg* **89**:1643-5.
- 106 Bui JD, Despotis GD, Trulock EP, Patterson GA, Goodnough LT. Fatal thrombosis after administration of activated prothrombin complex concentrates in a patient supported by extracorporeal membrane oxygenation who had received activated recombinant factor VII. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; **124**:852-4.
- 107 O'Connell KA, Wood JJ, Wise RP, Lozier JN, Braun MM. Thromboembolic adverse events after use of recombinant human coagulation factor VIIa. *JAMA* 2006; **295**:293-8.

- 108 Gandhi MJ, Pierce RA, Zhang L, Moon MR, Despotis GJ, Moazami N. Use of activated recombinant factor VII for severe coagulopathy post ventricular assist device or orthotopic heart transplant. *J Cardiothorac Surg* 2007; **2**:32.
- 109 Bruckner BA, DiBardino DJ, Ning Q, Adeboyeun A, Mahmoud K, Valdes J, Eze J, Allison PM, Cooley DA, Gregoric ID, Frazier OH. High incidence of thromboembolic events in left ventricular assist device patients treated with recombinant activated factor VII. *J Heart Lung Transplant* 2009; **28**:785-90.
- 110 Chumnanvej S, Wood MJ, MacGillivray TE, Melo MF. Perioperative echocardiographic examination for ventricular assist device implantation. *Anesth Analg* 2007; **105**:583-601.
- 111 Masud F, Bostan F, Chi E, Pass SE, Samir H, Stuebing K, Liebl MG. Recombinant factor VIIa treatment of severe bleeding in cardiac surgery patients: a retrospective analysis of dosing, efficacy, and safety outcomes. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2009; **23**:28-33.
- 112 Tranholm M, Rojkjaer R, Pyke C, Kristensen AT, Klitgaard B, Lollike K, Blajchman MA. Recombinant factor VIIa reduces bleeding in severely thrombocytopenic rabbits. *Thromb Res* 2003; **109**:217-23.
- 113 Fattorutto M, Tourreau-Pham S, Mazoyer E, Bonnin P, Raphael M, Morin F, Cupa M, Samama CM. Recombinant activated factor VII decreases bleeding without increasing arterial thrombosis in rabbits. *Can J Anaesth* 2004; **51**:672-9.
- 114 Chan S, Kong M, Minning DM, Hedner U, Marder VJ. Assessment of recombinant factor VIIa as an antidote for bleeding induced in the rabbit by low molecular weight heparin. *J Thromb Haemost* 2003; **1**:760-5.
- 115 Fridberg MJ, Hedner U, Roberts HR, Erhardtsen E. A study of the pharmacokinetics and safety of recombinant activated factor VII in healthy Caucasian and Japanese subjects. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2005; **16**:259-66.
- 116 Lopez Vilchez IT, J. Hedner, U. Altisent, C. Escolar, G. Galan, AM. Traffic of rFVIIa through Endothelial Cells and Redistribution into Subendothelium: Implications for a Prolonged Hemostatic Effect. *Journal of Coagulation Disorders* 2009.

- 117 Karlsson M, Ternstrom L, Hyllner M, Baghaei F, Flinck A, Skrtic S, Jeppsson A. Prophylactic fibrinogen infusion reduces bleeding after coronary artery bypass surgery. A prospective randomised pilot study. *Thromb Haemost* 2009; **102**:137-44.
- 118 Practice guidelines for perioperative blood transfusion and adjuvant therapies: an updated report by the American Society of Anesthesiologists Task Force on Perioperative Blood Transfusion and Adjuvant Therapies. *Anesthesiology* 2006; **105**:198-208.
- 119 Stainsby D, MacLennan S, Thomas D, Isaac J, Hamilton PJ. Guidelines on the management of massive blood loss. *Br J Haematol* 2006; **135**:634-41.
- 120 Samama CM. Prothrombin complex concentrates: a brief review. *Eur J Anaesthesiol* 2008; **25**:784-9.
- 121 Godier AP, G. Sié, P. Chirurgie ou actes invasifs
Sang Thrombose et Vaisseaux 2008; **20**:84-102.
- 122 Moulton MJ, Creswell LL, Mackey ME, Cox JL, Rosenbloom M. Reexploration for bleeding is a risk factor for adverse outcomes after cardiac operations. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996; **111**:1037-46.

RESUME

Contexte : L'hémorragie en chirurgie cardiaque est une complication non exceptionnelle et aux conséquences graves. Le facteur VII recombinant activé (rFVIIa) est un agent hémostatique puissant dont l'intérêt est discuté chez le patient non hémophile. Les études cliniques prospectives randomisées sont de réalisation difficile dans ces situations critiques. L'expérimentation animale est pertinente pour modéliser ces situations.

Matériel et méthode : Dans ce travail sont recensés en détail ; d'une part, un observatoire prospectif national conduit de 2005 à 2007 dans les centres de chirurgie cardiaque français et d'autre part une démarche d'expérimentation animale de modélisation de saignement majeur chez le lapin.

Résultats : Dans l'observatoire, le rFVIIa a été associé à un contrôle du saignement (arrêt 43 %, diminution 37 % persistance du saignement 20 %) et une meilleure survie à 28 jours (60 %) parmi les 109 patients inclus. La dose d'utilisation dans cette étude a été de 80 µg/kg. Aucune complication thrombotique majeure n'a été rapportée, notamment pour les 37 cas d'assistance circulatoire (pas de thrombose de circuit).

Chez l'animal normotherme et non coagulopathe, le rFVIIa a permis de contrôler un saignement artériel majeur aux doses de 80 et 200 µg/kg sans signe de thrombose locale ou disséminée *versus* contrôle.

Discussion : Dans des situations d'exception avec hémorragie majeure engageant le pronostic vital, après épuisement des ressources thérapeutiques et compensation des pertes sanguines, le rFVIIa peut être utilisé à visée hémostatique. Une dose proche de 80 µg/kg devrait être étudiée dans une étude prospective.

Mots clefs : chirurgie cardiaque, rFVIIa, coagulation, modèle animal, hémorragie

ABSTRACT

Background: Bleeding in cardiovascular surgery is a non exceptional complication with significant consequences. Recombinant activated factor VII (rFVIIa) is a powerful haemostatic agent of off-label use in non hemophiliac patients. Prospective randomized controlled trial is difficult to conduct in critical situations. Animal models allow relevant experimentation of such situations.

Material and method: In this work we have collected works regarding the use of rFVIIa in: the prospective national registry of French practices in cardiac surgery from 2005 to 2007 and experimentations applied to an original rabbit model of acute arterial bleed.

Results: In the registry, rFVIIa was associated with bleed control (stop 43 %, decrease 37 % ongoing bleed 20 %) and a better 28 day survival (60 %) among the 109 patients. In this study, the dose of rFVIIa was around 80 µg/kg. No major thrombotic event was found, noteworthy among the 37 patients with assisting devices (no thrombosis of the system).

In non coagulopathic and normothermic rabbits, rFVIIa *versus* control could promote the sealing of an arterial wound at the doses of 80 and 200 µg/kg with no evidence of local or disseminated thrombosis.

Conclusion: In dramatic situations of massive bleed with vital risk and after appropriate blood product compensation, rFVIIa rescue therapy can be performed with a seemingly acceptable safety at a dose around 80 µg/kg.

Keywords: cardiac surgery, rFVIIa, coagulation, animal model, hemorrhage
