

Université de Montréal

**Contribution des kinines dans le syndrome d'embolie de
liquide amniotique : Proposition de la lapine gravide comme
modèle animal**

par

Benoît RANNOU

Département de pathologie et de microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (MSc)
en sciences vétérinaires
option Pathologie

Août 2010

© Benoît RANNOU, 2010

Université de Montréal
Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

**Contribution des kinines dans le syndrome d'embolie de liquide
amniotique Proposition de la lapine gravide comme modèle animal**

présenté par

Benoît RANNOU

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Marilyn Dunn, présidente-rapporteuse

Dr Christian Bédard, directeur de recherche

Dr Michel Desnoyers, membre du jury

Résumé

Le syndrome d'embolie de liquide amniotique (SELA) est une complication rare et souvent catastrophique de l'accouchement chez la femme caractérisée classiquement par une hypotension sévère, un arrêt cardiorespiratoire et une coagulation intra-vasculaire disséminée. Malheureusement, sa physiopathologie est encore mal connue. Le rôle des kinines n'a notamment pas été étudié. L'objectif de notre projet était de développer un modèle animal de SELA et d'étudier le rôle éventuel des kinines dans ce syndrome. Douze lapines en fin de gestation ont été incluses dans l'étude. Pour chacune d'entre-elles, le liquide amniotique était aspiré de chaque sac amniotique après une laparotomie. Six lapines recevaient un bolus de liquide amniotique injecté via la veine auriculaire alors que les six autres recevaient un bolus de saline. Parallèlement, les effets *in vitro* de liquide amniotique sur la coagulation étaient évalués par thrombelastographie (TEG) et comparés aux effets de la saline. L'injection de liquide amniotique n'a pas permis de reproduire les signes cliniques de SELA, n'a pas entraîné la génération de bradykinine, et n'a pas eu d'effet sur le temps de prothrombine, le temps de thromboplastine partielle activée, et l'activité du facteur VIII de. Une thrombocytopénie sévère et transitoire a cependant été notée 5 minutes après l'injection de liquide amniotique. De plus, en additionnant *in vitro* de liquide amniotique au sang on a observé un tracé de TEG hypercoagulable comparé à celui obtenu avec la saline. Le modèle n'ayant pas pu reproduire le SELA, le rôle des kinines dans ce syndrome reste à déterminer.

Mots-clés : Liquide amniotique, embolie, modèle, lapin, bradykinine, kinines, thrombelastographie, coagulation, obstétrique.

Abstract

Amniotic fluid embolism (AFE) is a rare but catastrophic complication of parturition characterized by severe hypotension, cardiovascular collapse, and massive consumptive coagulopathy. Its pathophysiology remains obscure. In particular, the potential role of bradykinin in hypotension is unknown. The objective of this study was to develop a suitable animal model of AFE and to study the effects of amniotic fluid injection on bradykinin release in this model. Twelve rabbits in late gestation (25 days) were used. For each rabbit, amniotic fluid was collected from foetal amniotic sacs by laparotomy. For six rabbits, the amniotic fluid was then injected as a bolus via the left auricular vein, whereas the six other rabbits received saline (control group). In parallel, the *in vitro* effects of amniotic fluid on coagulation was assessed by thrombelastography (TEG) and compared to the effects of saline. Injection of amniotic fluid did not reproduce clinical signs of AFE, did not provoke bradykinin generation and had no effect on prothrombin time, the activated partial thromboplastin time, nor Factor VIII activity. However, a significant thrombocytopenia was observed five minutes after amniotic fluid administration. This thrombocytopenia resolved within 60 minutes. *In vitro* addition of amniotic fluid to blood resulted in accelerated clotting on TEG tracings as compared to the effect of saline. As we were not able to reproduce AFE with our model, the role of kinins in this syndrome remains to be determined.

Keywords : Amniotic fluid, embolism, animal model, rabbit, bradykinin, kinins, thrombelastography, coagulation, obstetrics.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières	iii
Liste des tableaux	vi
Liste des figures	vii
Liste des sigles et abréviations	viii
Remerciements.....	x
Introduction.....	1
CHAPITRE 1 – RECENSION DE LA LITTERATURE	4
1. LE SYNDROME D’EMBOLIE DE LIQUIDE AMNIOTIQUE	4
1.1 Incidence	4
1.2 Clinique	6
1.2.1 Circonstances de survenue et facteurs de risque	6
1.2.2 Signes cliniques.....	7
1.3 Physiopathologie.....	8
1.3.1 Physiologie normale du liquide amniotique.....	8
1.3.2 L’état de choc.....	9
1.3.3 Troubles de l’hémostase.....	12
1.3.4 Troubles neurologiques.....	14
1.4 Diagnostic	15
1.5 Traitement	16
2. LA BRADYKININE ET LE SYSTEME DES KININES	17
2.1 Métabolisme des kinines	19
2.1.1 Synthèse des kinines	19

2.1.2 Dégradation des kinines	23
2.2 Récepteurs des kinines	25
2.3 Kinines et hypotension	27
2.4 Bradykinine et SELA	28
3. LES MODELES ANIMAUX DE SELA DANS LA LITTERATURE	29
4. BUT DU PROJET	34
CHAPITRE 2 – PROJET PILOTE	35
1. OBJECTIFS DU PROJET PILOTE	35
2. RÉALISATION DU PROJET PILOTE	37
2.1 Modèle proposé	37
2.1.1 Procédure expérimentale	37
2.1.1.1 Anesthésie et monitoring	37
2.1.1.2 Induction de la détresse foetale	38
2.1.1.3 Prélèvement et injection du liquide amniotique	41
2.1.1.4 Suivi des paramètres cardiovasculaires et de l'hémostase	41
2.1.1.5 Dosage de la bradykinine	42
2.1.1.6 Mesure des paramètres de l'hémostase	44
2.1.1.7 Nécropsie	44
2.1.2 Résultats du projet pilote	45
2.1.2.1 Détresse foetale	45
2.1.2.2 Ponction et analyse du liquide amniotique	46
2.1.2.3 Effet clinique de l'injection de liquide amniotique	47
2.1.2.4 Génération de bradykinine	49
3. AJUSTEMENT DU PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	50
CHAPITRE 3 – ARTICLE	55
ABSTRACT	55
INTRODUCTION	57

MATERIAL AND METHODS	59
RESULTS	63
DISCUSSION	65
ACKNOWLEDGMENTS.....	70
REFERENCES.....	70
FIGURES	73
CHAPITRE 4 – CONCENTRATIONS EN BRADYKININE	77
1. RÉSULTATS DE L’ETUDE <i>IN VIVO</i>	77
2. RESULTATS DE L’ETUDE <i>IN VITRO</i>	79
CHAPITRE 5 - DISCUSSION GENERALE.....	81
Conclusion	89
Bibliographie	90

Liste des tableaux

Tableau 1 : Structure primaire des kinines	19
Tableau 2 : Modèles animaux de SELA publiés (d'après Hankins et al., 1993).....	31

Liste des figures

Figure 1 : Système kallibréine-kinine.	18
Figure 2 : Structure primaire de kininogène de haut poids moléculaire	21
Figure 3 : Schématisation de la procédure de détresse foetale	40
Figure 4 : Évolution de la fréquence cardiaque de deux foetus lors de l'hypoxie	46
Figure 5 : Évolution de quelques paramètres cardiovasculaires et acido-basiques	47
Figure 6 : Effet de l'injection de liquide amniotique sur le temps de thromboplastine partielle activée chez les deux lapines gestantes.....	48
Figure 7 : Effet de l'injection de liquide amniotique sur l'activité du facteur VIII chez les deux lapines gestantes.	49
Figure 8 : Effet de l'injection de liquide amniotique frais sur la concentration plasmatique en bradykinine chez deux lapines gestantes	50
Figure 9 : Concentration en bradykinine pour 3 lapines ayant reçu du liquide amniotique (échantillons traités par ajout d'éthanol absolu au plasma)	78
Figure 10 : Concentration en bradykinine pour 3 lapines ayant reçu du liquide amniotique (échantillons traités par l'ajout de l'éthanol absolu au sang total)	79
Figure 11 : Génération in vitro de bradykinine en fonction du temps	80

Liste des sigles et abréviations

aPTT : Temps de thromboplastine partielle activée
BK : Bradykinine
CaCl₂ : Chlorure de calcium
CPN : Carboxypeptidase N du plasma
CPM : Carboxypeptidase M de la membrane cellulaire
CIVD : Coagulation intra-vasculaire disséminée
ECA : Enzyme de conversion de l'angiotensine 1
EPN : Endopeptidase neutre
HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance
IECA : Inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine 1
LA : Liquide amniotique
KD : Kallidine
KBPM : Kininogène de bas poids moléculaire
KHPM : Kininogène de haut poids moléculaire
NO : Monoxyde d'azote
PGE₂ : Prostaglandine E2
PGF₂ : Prostaglandine F2
PCO₂ : Pression partielle en dioxyde de carbone
PO₂ : Pression partielle en oxygène
PTI : Index de prothrombine
TEG : Thrombelastographie
TFPI : Tissue factor pathway inhibitor
t-PA : Activateur tissulaire du plasminogène
Zn : Zinc

A Marion,

A mes parents et mes frères,

A mon Grand-père

Remerciements

Au Dr Christian Bédard, mon directeur de recherche, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce projet de recherche et pour son soutien et son amitié tout au long de ces cinq dernières années.

Aux Drs Georges Rivard, Malcolm Gains et Louis Thibault pour leur aide précieuse tout au long de la réalisation de ce projet.

Aux Drs Marilyn Dunn et Michel Desnoyers, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de faire partie de mon jury de maîtrise. Merci aussi au Dr Michel Desnoyers pour son amitié tout au long de ces cinq dernières années

Au Dr Yves Rodenay pour son aide à la réalisation du protocole anesthésique.

À Maxim Moreau, pour son aide avec toutes les analyses statistiques de ce projet.

Aux Dres Virginie Allégret et Carolyn Gara-Boivin pour leur aide au cours des expérimentations.

Introduction

En 1926, Meyer décrivait pour la première fois la présence de débris fœtaux dans les vaisseaux pulmonaires d'une mère morte soudainement au moment de l'accouchement (Meyer, 1926). Mais il faudra attendre 1941 pour que Steiner et Lushbaugh utilisent le terme de syndrome d'embolie de liquide amniotique (SELA) pour décrire les résultats d'autopsie de 8 femmes mortes soudainement au moment du travail et chez qui on retrouvait du matériel compatible avec du liquide amniotique au niveau des vaisseaux pulmonaires (Steiner et al., 1941). Depuis cette date plusieurs cas ont été rapportés dans la littérature, plusieurs registres nationaux (anglais, américains, chinois notamment) ont été établis et quelques études épidémiologiques basées sur de larges cohortes ont été publiées. Malgré cela, le syndrome d'embolie de liquide amniotique demeure encore à ce jour une énigme.

Nous verrons en effet dans la première partie de ce mémoire que sa physiopathologie, ses facteurs de risques, et les mesures préventives et thérapeutiques qui pourraient être prises pour contrer ses effets néfastes sont encore à ce jour très mal connus. Concernant sa physiopathologie, s'il est maintenant admis que c'est probablement un mécanisme humoral qui est à l'origine des signes cliniques cardiorespiratoires, la ou les substances à l'origine de ces signes n'ont pas été identifiées de façon certaine.

Parmi la longue liste des substances suspectées comme pouvant contribuer de manière significative à la physiopathologie du SELA, on retrouve notamment la bradykinine. Celle-ci pourrait en effet être à l'origine de l'hypotension sévère très fréquemment observée lors de ce syndrome. Cette hypothèse découle de l'observation du cas d'une patiente ayant présenté un SELA au centre hospitalier universitaire Sainte-Justine de Montréal (Robillard et al., 2005). L'équipe du Dr Rivard a en effet démontré chez cette patiente une incapacité sévère à générer de la bradykinine au moment même où elle devenait sévèrement hypotensive alors qu'elle présentait une capacité normale moins de deux jours après le choc. Parallèlement, le précurseur de la bradykinine (kininogène de haut poids moléculaire) n'était plus détectable au moment du choc alors qu'il était à nouveau mis en évidence 9 jours après le choc. Tout ceci était en faveur d'un épuisement des capacités à générer de la bradykinine secondairement à une production massive de bradykinine. Comme nous le verrons dans la première partie de ce mémoire, la bradykinine est un puissant hypotenseur qui pourrait facilement se former à la surface des cellules kératinisées contenues dans le liquide amniotique.

Le but de notre projet était de d'étudier la contribution des kinines, et en particulier de la bradykinine, dans le SELA en développant un modèle animal de ce syndrome. Afin de vérifier la faisabilité de ce projet, une étude pilote a été préalablement menée et est présentée dans la deuxième partie de ce mémoire. L'article inclus dans ce mémoire présente le modèle définitif utilisé dans ce projet ainsi que les résultats que nous avons

obtenu à l'exception de ceux concernant la bradykinine qui sont présentés dans la partie suivant celle de l'article.

CHAPITRE 1 – RECENSION DE LA LITTERATURE

1. LE SYNDROME D'EMBOLIE DE LIQUIDE AMNIOTIQUE

Le syndrome d'embolie de liquide amniotique (SELA) est une complication rare, imprévisible et catastrophique de l'accouchement chez la femme qui est secondaire à l'entrée de liquide amniotique dans la circulation sanguine maternelle. Dans sa forme classique, une dyspnée intense est suivie d'un état de choc avec arrêt cardiorespiratoire, et est parfois associée à des convulsions et une coagulation intra-vasculaire disséminée (CIVD) (Moore et al., 2005). Elle conduit fréquemment à la mort de la mère. Elle est rapportée comme la troisième cause de mortalité maternelle au Canada (Kramer et al., 2006).

1.1 Incidence

Déterminer l'incidence précise du SELA est impossible en raison notamment de la rareté et de la variété de ses symptômes. Afin de collecter des informations plus précises, standardisées et systématiques de ce syndrome, Clark et al aux Etats-Unis (Clark et al., 1995) et Tuffnell au Royaume-Uni (Tuffnell, 2005) ont créé et organisé un registre national

pour tous les cas probables de SELA. Plusieurs études sur de grandes populations ont également été menées.

Suivant ces études, l'incidence du SELA varie d'une naissance sur 8000 et à une naissance sur 80 000 (Clark et al., 1995; Tuffnell, 2005; Gist et al., 2009). Deux études plus récentes, l'une réalisée au Canada (Kramer et al., 2006) et l'autre aux Etats-Unis (Abenhaim et al., 2008) rapportent respectivement une incidence de 1 naissance sur 9600 et 1 naissance sur 13000. Les études les plus anciennes rapportent un taux de mortalité chez la mère pouvant atteindre 60% (Clark et al., 1995) alors que les études plus récentes rapportent un taux de mortalité variant entre 15 et 20% (Kramer et al., 2006; Abenhaim et al., 2008). Les différences entre les études plus anciennes et plus récentes pourraient être secondaires à une meilleure prise en charge des patientes présentant un SELA ou à un diagnostic plus précis de cette pathologie.

Pour le nouveau-né, le pronostic est également sombre avec un taux de mortalité qui atteint 20 à 25% dans certaines études (Clark et al., 1995; Tuffnell, 2005) et des séquelles neurologiques chez 50% des survivants (Clark et al., 1995).

1.2 Clinique

1.2.1 Circonstances de survenue et facteurs de risque

Le SELA survient de façon imprévisible généralement au moment de l'accouchement ou dans les premières heures post-partum. De rares cas ont été décrits après une césarienne, une amniocentèse, un trauma externe, ou suite à un avortement survenu dans le premier ou le second trimestre (Clark et al., 1995; Moore et al., 2005; Tuffnell, 2005). La rupture des membranes semble être directement liée à la survenue de l'embolie de liquide amniotique, qu'elle soit spontanée, artificielle, au cours d'une césarienne (Tramoni et al., 2004), lors de la pose de cathéter intra-amniotique ou au cours d'amnio-infusion (Maher et al., 1994). Le passage de liquide amniotique dans la circulation maternelle se fait via les veines endocervicales, un site d'attachement placentaire ou le site d'un trauma utérin (O'Shea et al., 2007).

Jusqu'à maintenant, aucun facteur de risque n'a été clairement établi même si plusieurs ont été proposés. Pour Clark, la présence d'un fœtus mâle, des antécédents d'atopie ou d'allergie à des médicaments seraient des facteurs de prédisposition alors que la contamination du liquide amniotique par du méconium ou la présence d'un fœtus mort seraient des facteurs aggravant le pronostic (Clark et al., 1995). La présence de méconium comme facteur aggravant semble confirmée par les modèles animaux (Hankins et al., 1993; Petroianu et al., 1999). L'induction médicale du travail, de multiples grossesses, une

détresse fœtale, un âge maternel avancé (Kramer et al., 2006) de même qu'une pré-éclampsie, un *abruptio placentae*, et l'utilisation de forceps (Abenhaim et al., 2008) ont également été rapportés comme facteurs de risque.

Dans toutes les études, les patientes ayant présenté un SELA ne diffèrent ni par leur race, ni par leurs antécédents médicaux, ni par leur poids ou leur tension artérielle de la population générale des services d'obstétrique.

1.2.2 Signes cliniques

La présentation clinique classiquement décrite du SELA comprend une hypotension aiguë, profonde et inattendue, suivie très rapidement d'un choc cardiovasculaire qui conduit rapidement à un arrêt respiratoire. Ensuite, si la patiente survit à l'événement initial, elle développe rapidement une coagulopathie de consommation massive qui peut elle-même contribuer à l'état de choc par exsanguination. Des signes neurologiques comme des convulsions ou une altération de l'état mental peuvent également être présents (Clark et al., 1995; Moore et al., 2005; Gist et al., 2009). Ainsi dans l'étude de Clark, une hypotension et une détresse fœtale étaient notées dans 100% des cas, un œdème respiratoire ou une détresse respiratoire dans 93% des cas, un arrêt cardiorespiratoire dans 87% des cas, une coagulopathie dans 83% des cas et des crises convulsives dans 48% des cas. Ces proportions varient d'une étude à l'autre. Dans le cas de la coagulopathie par exemple, Morgan et al. (Morgan, 1979) rapportent dans leur

étude que seulement 49% des patientes présentaient un syndrome hémorragique. De plus il est également admis que tous ces signes cliniques ne sont pas forcément présents et pas toujours dans le même ordre. Ainsi, dans certains cas, des saignements utérins sévères peuvent être le principal signe clinique présent (Tramoni et al., 2004; Sinicina et al., 2009).

Ceci témoigne de l'hétérogénéité clinique du SELA et de la difficulté à diagnostiquer cliniquement un SELA. C'est en fait un diagnostic d'exclusion

1.3 Physiopathologie

1.3.1 Physiologie normale du liquide amniotique

Durant les 4 à 5 premiers mois de grossesse, le liquide amniotique est un ultrafiltrat du plasma maternel à travers le placenta et les membranes, et du plasma fœtal à travers la peau. Sa composition se modifie avec l'âge gestationnel (Modena et al., 2004). En fin de grossesse, il est hypotonique et riche en cellules de desquamation du fœtus (vernix caseosa), en lanugo (duvet fœtal), en mucine et parfois en méconium (Underwood et al., 2005; Poggi et al., 2009)

Le liquide amniotique contient également de nombreux composants intervenant dans la cascade de coagulation. Il contient notamment une quantité abondante de facteur tissulaire (Lockwood et al., 1991; Uszynski et al., 2001). Il a également été démontré qu'il contenait du facteur VII, IX, et X mais à des concentrations beaucoup faibles que dans le

sang maternel (Lockwood et al., 1991; Uszynski et al., 2001). De faibles concentrations d'inhibiteurs de la coagulation comme la protéine C, la protéine S et le l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (tissue factor pathway inhibitor, TFPI) ont également été détectées (Uszynski et al., 2001; Uszynski et al., 2006).

Le liquide amniotique est également riche en prostaglandine PGE2 dès le début de la grossesse, et présente une concentration élevée en PGF2 et PGE2 au moment du travail (Lee et al., 2008).

Pour certains auteurs, il y aurait passage physiologique de liquide amniotique pendant la grossesse et l'accouchement (Kuhlman et al., 1985) mais cette affirmation est contestée par d'autres (Sinicina et al., 2009). Si effectivement, du liquide amniotique peut passer dans la circulation maternelle de façon physiologique, on ne sait pas encore exactement ce qui fait passer ce passage d'une forme silencieuse à un tableau clinique catastrophique, hormis peut-être l'importance du volume de liquide amniotique qui passe dans la circulation maternelle.

1.3.2 L'état de choc

En raison de la rareté du SELA, de son apparition imprévisible et de ses difficultés diagnostiques, la physiopathologie de l'état de choc est, encore à ce jour, mal connue. De nombreuses études sur des modèles animaux ont été réalisées sans qu'aucune ne permette de reproduire complètement les signes cliniques du SELA. Ces études, associées

aux rapports de cas de SELA, ont néanmoins permis de préciser l'origine de l'état de choc ; elle serait double : hémodynamique par obstruction mécanique des capillaires pulmonaires, et surtout inflammatoire ou lésionnelle déclenchée par la composition même du liquide amniotique libéré dans la circulation pulmonaire puis systémique.

Les modifications hémodynamiques liées à l'état de choc apparaissent comme biphasiques (Clark, 1990). La première phase est rapide et transitoire et se caractérise par une hypertension pulmonaire et une insuffisance du ventricule droit. Cette hypertension a surtout été démontrée par Hankins et al. sur un modèle animal (Hankins et al., 1993) mais son développement a également été mis en évidence dans de récents cas chez la femme (Stanten et al., 2003; McDonnell et al., 2007). Hankins et al qui ont utilisé la chèvre gestante comme modèle, ont rapporté l'étude la plus détaillée sur les effets immédiats de l'injection du liquide amniotique sur le système cardiorespiratoire. Très rapidement après l'injection de liquide amniotique contaminé par du méconium, on observe dans leur modèle une augmentation significative de la pression artérielle systémique et pulmonaire. Cette augmentation atteint son apogée 10 minutes après l'injection puis diminue ensuite rapidement pour revenir à une valeur identique à celle de base 30 minutes après l'injection. Cette réponse initiale et transitoire pourrait être secondaire à un phénomène purement mécanique avec obstruction mécanique des capillaires pulmonaires par les éléments solides contenus dans le liquide amniotique (squames, vernix, mucine, cheveux, voire méconium) associée à une vasoconstriction pulmonaire provoquée par l'endothéline

et d'autres substances telles que des leucotriènes ou la thromboxane A₂. Une augmentation rapide et significative de la concentration sérique en endothéline après l'injection de liquide amniotique a en effet clairement été mise en évidence par El Maradny et al. (el Maradny et al., 1995) dans un modèle expérimental utilisant des lapines gravides et non-gravides. L'endothéline est reconnue comme étant un vasoconstricteur puissant ayant un effet, entre autres, sur les artères coronaires et pulmonaires. Le rôle des leucotriènes a été proposé par Azegami et al. (Azegami et al., 1986) après qu'ils aient démontré une augmentation de la concentration en leucotriène D₄ dans les poumons de lapins 30 minutes après l'injection de liquide amniotique ; ces résultats n'ont cependant pas été confirmés par d'autres études et le liquide amniotique injecté était celui de femme.

La seconde phase a été parfaitement décrite chez la femme et se caractérise par l'évolution vers une insuffisance ventriculaire gauche et une hypotension sévère et persistante. D'un point de vue hémodynamique, l'insuffisance ventriculaire gauche pourrait être secondaire à l'insuffisance cardiaque droite (par déviation du septum interventriculaire) et à l'hypoxie sévère provoquées par la première phase d'hypertension pulmonaire. L'endothéline par son action inotrope négative pourrait également participer au développement de l'insuffisance ventriculaire. D'autres facteurs humoraux pourraient également intervenir, notamment l'histamine, des prostaglandines, et la bradykinine. Tous ces éléments sont impliqués plus généralement dans les chocs anaphylactiques.

Clark et al. ont été les premiers à évoquer la possibilité d'une réaction anaphylactique comme cause de l'état de choc (Clark et al., 1995). Ils basaient leur hypothèse entre autres sur la similarité des signes cliniques entre le syndrome d'embolie de liquide amniotique et le choc anaphylactique et le fait que 41% des femmes du Registre national américain avaient des antécédents atopiques ou allergiques (Clark et al., 1995). Les taux sériques élevés en tryptase (Nishio et al., 2002) et une augmentation du nombre de mastocytes pulmonaires (Fineschi et al., 1998) dans certains cas de SELA vont également dans ce sens. Le rôle de la bradykinine comme responsable de l'hypotension sévère a été proposé par Robillard et al. (Robillard et al., 2005) après qu'ils aient fortement suspecté la génération massive de bradykinine chez une patiente présentant un SELA.

1.3.3 Troubles de l'hémostase

Le syndrome hémorragique fréquemment observé lors de SELA est très probablement secondaire à une coagulopathie de consommation massive déclenchée par les facteurs de coagulation présents dans le liquide amniotique. Plusieurs études utilisant la thrombéléastographie (TEG) ont en effet mis en évidence que l'addition de liquide amniotique à du sang accélère la formation du caillot mais sans évidence de fibrinolyse secondaire (Liu et al., 2000; Harnett et al., 2005). De plus, comme nous l'avons vu, le liquide amniotique contient plusieurs activateurs de la coagulation (notamment du facteur tissulaire) capables d'activer la coagulation. Récemment, Zhou et al ont de plus démontré

que les cellules présentes dans le liquide amniotique exprimaient à leur surface de la phosphatidylsérine, un phospholipide chargé négativement permettant l'assemblage des complexes enzymatiques tenase et prothrombinase et conférant ainsi au liquide amniotique une activité procoagulante (Zhou et al., 2009).

Une étude réalisée chez des mini-cochons de Göttingen va également dans le sens d'une coagulopathie de consommation. Petroianu et al. ont étudié ainsi l'effet de l'injection de liquide amniotique contaminé ou non par du méconium sur les paramètres de coagulation chez des truies miniatures gestantes (Petroianu et al., 1999). Les effets les plus significatifs étaient observés avec le liquide amniotique contaminé par du méconium.

On observait notamment :

- une diminution significative du nombre de plaquettes. Leur nombre diminuait très rapidement pour atteindre une valeur de 30% par rapport à la valeur de base moins de 10 minutes après l'administration de liquide amniotique et remontait à une valeur de 50% de la valeur de base environ 50 minutes après l'administration de liquide amniotique
- Un prolongement significatif de l'aPTT (temps de thromboplastine partielle activée) : Près de 2 fois la valeur de base juste après l'injection de liquide amniotique.

- Un raccourcissement du PTI (prothrombin index) ce qui correspond à un allongement du PT.

Pour certains auteurs, le syndrome hémorragique serait secondaire, au moins dans certains cas, à une fibrinolyse (Biron-Andreani et al., 2003). Les arguments en faveur de cette hypothèse sont notamment la concentration élevée en activateur tissulaire du plasminogène (t-PA), la faible concentration en inhibiteur de la plasmine dans le liquide amniotique (Estelles et al., 1990), et le rapport d'un cas d'une patiente présentant un SELA chez qui les désordres hémostatiques étaient compatibles avec une fibrinolyse marquée : comptage plaquettaire normal, concentration en fibrinogène et activité du facteur V très basses associées à des activités en facteur II, VII et X normales, absence de fibrine soluble, taux élevé de produits de dégradation de la fibrine, taux faible d'inhibiteur de la plasmine et élevé de t-PA (Biron-Andreani et al., 2003).

1.3.4 Troubles neurologiques

L'encéphalopathie est une complication fréquente du SELA. Elle serait secondaire à l'hypoxie sévère du cerveau. Les crises convulsives, souvent présentes, aggraveraient les lésions cérébrales, notamment lorsqu'elles sont associées à une hypoxie sévère.

La possibilité que le liquide amniotique contienne une substance agissant directement sur le cerveau a été suggérée mais pas prouvée à ce jour (Moore et al., 2005).

1.4 Diagnostic

En raison notamment de l'hétérogénéité de la présentation clinique du SELA, aucune démarche diagnostique standardisée n'a pu être proposée à ce jour. Le diagnostic de SELA est plutôt établi par exclusion des autres conditions caractérisées par un choc cardiorespiratoire ou un syndrome hémorragique sévère dans la période péripartum ; notamment une embolie pulmonaire, un choc anaphylactique, une éclampsie, ou un infarctus du myocarde (Davies, 2001). Dépendant des signes cliniques, des tests classiques (hémogramme, paramètres de coagulation, imagerie médicale, etc.) seront entrepris de manière à exclure ces hypothèses.

Des tests plus spécifiques ont été proposés et sont utilisés de manière aléatoire dans les rapports de cas publiés. Les plus fréquemment cités sont la recherche d'éléments fœtaux dans la circulation maternelle ou dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire, le dosage de la coproporphyrine Zn et l'examen histopathologique de l'utérus lors d'hystérectomie.

La recherche d'éléments du liquide amniotique (cellules, mucine, méconium) repose sur différentes techniques. Comme nous l'avons dit précédemment, pour certains auteurs la présence de cellules épithéliales squameuses dans la circulation maternelle n'est pas diagnostique d'un SELA car des cellules identiques d'origine maternelle pourraient se retrouver chez des femmes qui ne présentent pas de SELA. La présence d'un grand

nombre de cellules doit cependant faire fortement suspecter un SELA (Masson, 1992) . Plusieurs techniques d'histochimie et d'immunohistochimie ont été proposées afin de différencier les cellules d'origine fœtale des cellules d'origine maternelle mais sont surtout décrites pour des coupes histologiques réalisées après la mort de la patiente (Ishiyama et al., 1986; Lunetta et al., 1996; Kobayashi et al., 1997; Tramoni et al., 2004). Chez une patiente intubée, ventilée et dans un état stable, un lavage broncho-alvéolaire peut être réalisé pour rechercher des cellules fœtales (Tramoni et al., 2004). La corproporphyrine Zn est un élément caractéristique du méconium ; Kanayama et al. ont mis en évidence que sa concentration plasmatique était plus élevée chez les femmes atteintes de SELA que les autres femmes (enceintes ou non) (Kanayama et al., 1992) . L'examen histopathologique de l'utérus peut mettre en évidence des embolies de liquide amniotique (possiblement contaminé par du méconium) dans les veines utérines.

Lors de décès de la patiente, une autopsie associée à l'examen histopathologique de tissus permet généralement d'obtenir un diagnostic de certitude.

1.5 Traitement

La prise en charge d'une patiente atteinte de SELA doit être rapide et agressive et comprend toutes les techniques de réanimation visant à maintenir une bonne oxygénation des tissus et un débit cardiovasculaire convenable ainsi qu'à limiter les saignements lors de coagulopathie.

Outre les traitements classiques, certains auteurs ont utilisé de l'aprotinine (Stroup et al., 2006), du facteur VII recombinant et activé (Lim et al., 2004), et des inhalations de monoxyde d'azote (NO) (McDonnell et al., 2007) pour traiter la coagulopathie ou les troubles hémodynamiques.

Comme on le voit, le syndrome d'embolie amniotique est une complication grave qui reste néanmoins mal connue du fait de sa rareté, de son imprévisibilité et de son pléomorphisme clinique. Sa physiopathologie reste notamment encore obscure. Parmi les récentes hypothèses proposées pour explorer les bouleversements hémodynamiques rencontrés, le rôle de la bradykinine n'a été que peu étudié. Or si son implication était confirmée, cela pourrait ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques.

2. LA BRADYKININE ET LE SYSTEME DES KININES

Le système des kinines, ou plus précisément le système kallibréine-kininogène-kinine, est un système peptidergique en cascade comprenant les enzymes de synthèse appelées kallibréines, leur substrats appelés kininogènes, et les peptides vasoactifs appelés kinines (figure 1). Ces derniers sont des médiateurs importants impliqués dans une variété d'effets biologiques incluant l'homéostasie cardiovasculaire, l'inflammation et la nociception. Leur effets sont relayés par deux types de récepteur : le récepteur B2 qui est constitutif et un récepteur B1 qui est inductible. C'est via le récepteur B2 que les kinines

participent à la phase aigue de l'inflammation et démontrent leurs effets sur le système cardiovasculaire. Le récepteur B1 intervient dans la phase chronique des processus inflammatoire et jouerait notamment un rôle dans les maladies à forte composante immune comme l'arthrite rhumatoïde (Moreau et al., 2005) .

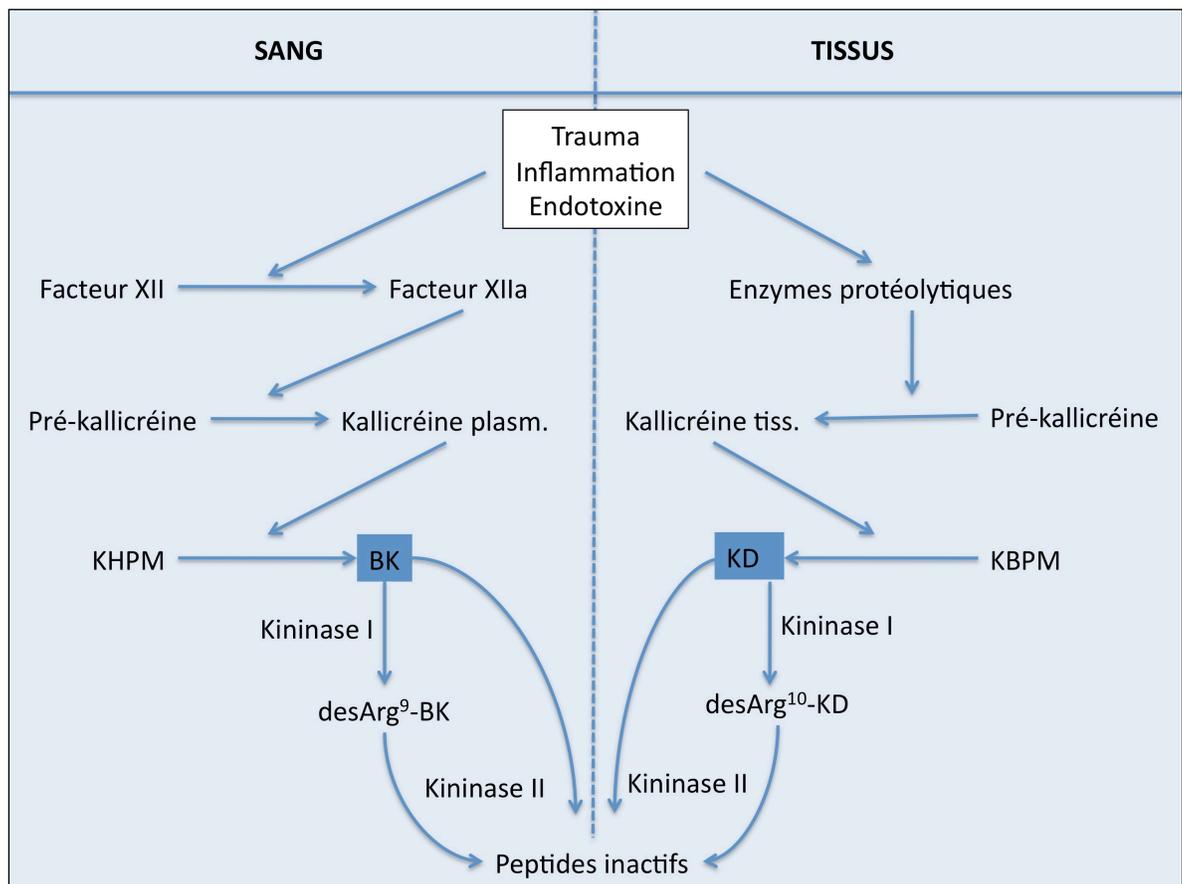


Figure 1 : Système kallibréine-kinine. *KHPM* : kininogène de haut poids moléculaire, *KBPM* : kininogène de bas poids moléculaire, *BK* : Bradykinine, *KD* : Kallidine

2.1 Métabolisme des kinines

2.1.1 Synthèse des kinines

Les kinines sont des peptides de 9 à 11 acides aminés et sont composés de la bradykinine (BK), de la kallidine (KD ou Lys-BK), de la T-kinine (Ile-Ser-BK), la Met-T-kinine et de leur métabolites actifs dépourvus d'arginine en position carboxy-terminale (métabolites des-Arg) (Moreau et al., 2005) (tableau 1). La T-kinine et la Met-T-kinine n'ont été rapportées que chez le rat (Okamoto et al., 1983; Davis et al., 2002). La BK et la KD sont les produits de deux voies biochimiques, l'une sanguine et l'autre tissulaire.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9			
Bradykinine	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe	Arg	OH		
Kallidine	Lys	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe	Arg	OH	
T-Kinine	Ile	Ser	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe	Arg	OH
desArg ⁹ -BK	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe		OH		
desArg ¹⁰ -KD	Lys	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe		OH	
Met-T-kinine	Met	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe	Arg		

Tableau 1 : Structure primaire des kinines

La BK est essentiellement issue du clivage du kininogène de haut poids moléculaire (KHPM) par la kallibréine plasmatique alors que la kallidine est essentiellement issue du clivage du kininogène de bas poids moléculaire (KBPM) par la kallibréine tissulaire (figure 1). Le KHPM et le KBPM sont des protéines circulant dans le sang, composées d'une chaîne légère et d'une chaîne lourde et possédant toutes les deux une séquence de 12 acides aminés débutant dans leur chaîne lourde et contenant la séquence des 9 acides aminés de la bradykinine.

Le KHPM est, plus précisément, une α -globuline formée de six domaines aux fonctions distinctes (figure 2): le domaine 3 permet notamment la fixation aux plaquettes et aux cellules endothéliales (Jiang et al., 1992), le domaine 6 possède des sites de liaison à la pré-kallibréine et au facteur XI (Tait et al., 1987), et enfin le domaine 5, riche en histidine, proline et lysine, se lie aux surfaces chargées négativement comme les composants de la matrice cellulaire (collagène, protéoglycanes, héparine) ou d'autres particules chargées négativement (urates, phospholipides membranaires, lipopolysaccharides) (Moreau et al., 2005).

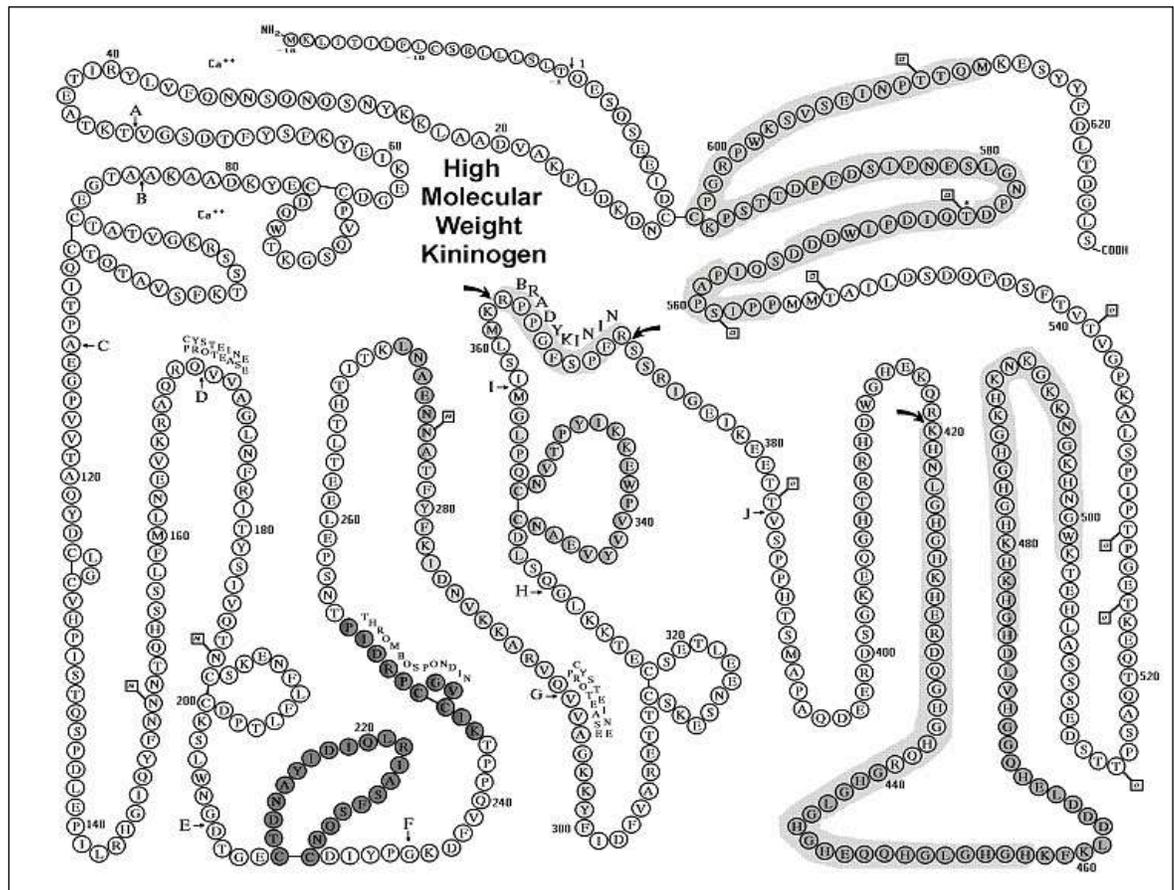


Figure 2 : Structure primaire de KHPM (tiré de Haemostasis and Thrombosis, Basic principles and clinical practice, chapitre 11, Colman et al., Lippincott, 3^{eme} édition). Lettres A à J : jonctions intron/exon

Ainsi le KHPM circule dans le sang en étant lié à la pré-kallicréine ainsi qu'au facteur XI et se concentre sur les surfaces chargées négativement. Au contact de ces surfaces chargées, se concentre également le facteur XII qui est en plus est activé au contact de ces surfaces ; une fois activé, il transforme la pré-kallicréine en kallicréine. Cette dernière clive

alors le KHPM et libère ainsi la BK. La kallibréine est aussi capable d'activer le facteur XII permettant ainsi un rétrocontrôle positif sur la réaction. Par ailleurs, le facteur XI étant lié au complexe KHPM-pré-kalibréine, il y a en plus activation du facteur XI. Ainsi le KHPM en permettant la concentration dans un même site de la pré-kalibréine, du facteur XI et du facteur XII agit comme un cofacteur non-enzymatique permettant la formation de BK et l'activation de la voie intrinsèque de la cascade de coagulation (Blais et al., 2000). Notons enfin qu'en plus de participer à la cascade de coagulation, la kallibréine plasmatique intervient également dans le système de fibrinolyse en transformant le plasminogène en plasmine (Cruden et al., 2005). L'activité fibrinolytique des kinines est renforcée par la bradykinine qui stimule la relâche de t-PA des cellules endothéliales (Brown et al., 1999).

La synthèse de bradykinine pourrait également se produire à la surface de cellules comme les leucocytes, les plaquettes, et les cellules endothéliales (Zhao et al., 2001; Moreau et al., 2005). En effet, le KHPM peut lier un complexe présent sur les plaquettes, les granulocytes et les cellules endothéliales via le domaine 3 et le domaine 5 par un mécanisme réversible dépendant du zinc. Ce complexe est composé d'au moins la cytokératine 1, le gC1qR (récepteur du C1q du complément) et de l'u-PAR (urokinase plasminogen activator receptor) et peut également se lier au facteur XII. La liaison du KHPM aux cellules entraînerait donc une activation du facteur XII et de la kallibréine et ainsi une génération de bradykinine (Moreau et al., 2005).

Dans les tissus, des enzymes protéolytiques libérées lors de dommages tissulaires activent la kallibréine tissulaire qui agit sur le KBPM pour former la KD. Le KBPM est une β -globuline plasmatique qui a en commun avec le KHPM une chaîne lourde et une séquence précurseur de kinines mais qui en diffère par la chaîne légère qui permet au KHPM la liaison avec la pré-kallibréine et au facteur XI (Moreau et al., 2005). La KD peut elle-même être transformé en BK par des aminopeptidases (Sharma, 2006).

2.1.2 Dégradation des kinines

Les kinines sont très rapidement transformées dans la circulation : en 30 secondes chez le lapin et un peu moins de 50 secondes chez l'homme (Decarie et al., 1996). Elles subissent une dégradation métabolique par des amino-, carboxy- et endopeptidases appelées kininases que l'on retrouve dans le sang, les tissus et les liquides biologiques. Cette dégradation aboutit à la production de plusieurs métabolites actifs et inactifs.

Quatre métalloprotéinases dépendantes du zinc sont particulièrement impliquées dans le métabolisme des kinines : l'enzyme de conversion de l'angiotensine-I (ECA), l'endopeptidase neutre (EPN, également appelée enképhalinase), la carboxypeptidase N du plasma (CPN), et la carboxypeptidase M de la membrane cellulaire (CPM). Les deux premières enzymes sont également appelées kininases de type II alors que les deux dernières sont appelées kininases de type I (Moreau et al., 2005). L'importance relative de ces enzymes varie suivant l'espèce animale, le milieu biologique, et le contexte

pathophysiologique. Par exemple, la BK est détruite à 94% par l'ECA chez le lapin alors qu'elle l'est à 76% chez l'homme (Decarie et al., 1996).

La CPN et la CPM sont deux enzymes qui clivent l'arginine ou la lysine en position carboxy-terminale. Elles transforment ainsi la BK en desArg⁹-BK et la KD en desArg¹⁰-KD qui sont deux métabolites actifs ayant un effet sur les récepteurs B1. Ces deux enzymes ont donc une importance biologique particulière. Par contre, ce sont les kininases de type II et notamment l'ECA qui métabolisent la majorité de la BK et de la KD (Decarie et al., 1996) ; le rôle des kininases de type I reste donc limité.

L'ECA est connue pour catalyser la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II. Cependant l'ECA présente une plus grande affinité (Km d'approximativement 0,18 µM) pour la BK que pour l'angiotensine I (Km d'approximativement 16 µM). On peut donc également considérer l'ECA comme une kininase. L'ECA clive en premier lieu le dipeptide Phe⁸-Arg⁹ en position carboxy-terminale, puis le dipeptide Ser⁶-Pro⁷ laissant ainsi 3 peptides inactifs. L'ECA peut également métaboliser la desArg⁹-BK en retirant le tripeptide Ser⁶-Pro⁷-Phe⁸. L'EPN est, elle, capable de retirer le dipeptide Phe⁸-Arg⁹ en position carboxy-terminale à la BK (Moreau et al., 2005).

En plus de ces 4 principales kininases, l'aminopeptidase intervient dans le métabolisme des kinines en catalysant l'hydrolyse de la lysine amine (N)-terminale de la

KD et de la desArg¹⁰-KD et permettant ainsi leur transformation en BK et desArg⁹-BK (Moreau et al., 2005).

2.2 Récepteurs des kinines

L'injection de kinines dans des tissus humains ou animaux produit les quatre signes cardinaux de l'inflammation : rougeur, chaleur locale, douleur et tuméfaction (Marceau et al., 1998). Les kinines exercent en grande partie ces effets via le récepteur B2 (constitutif) et le récepteur B1 (inductible). La BK et la KD agissent surtout sur le récepteur B2 alors que leurs métabolites dépourvus d'arginine (desArg⁹-Bk et desArg¹⁰-KD) agissent sur le récepteur B1 (Blais et al., 2000). L'homme et le lapin présentent des récepteurs relativement identiques (Regoli et al., 2001).

Ces deux récepteurs possèdent sept domaines trans-membranaires et appartiennent à la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G utilisant les voies de signalisation de l'adénylate cyclase, de la guanylate cyclase, et des phospholipases A₂, C et D (Moreau et al., 2005). L'activation de ces récepteurs aboutit notamment à la production de monoxyde d'azote (NO) et de prostaglandines (notamment la prostacycline) par les cellules endothéliales (Busse et al., 1996; Moreau et al., 2005).

Le récepteur B2 est constitutif et responsable de la majorité des effets pharmacologiques des kinines observés lors de la phase aiguë de l'inflammation ou de la

douleur (Couture et al., 2001). Il est distribué de manière ubiquitaire et est présent, entre autres, sur les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, les cellules mésangiales et épithéliales, certains neurones, les astrocytes et les neutrophiles (Couture et al., 2001). En se fixant sur le récepteur B2, les kinines provoquent une dilatation artérielle, une veinoconstriction par contraction des muscles lisses, une augmentation de la perméabilité vasculaire par contractions des cellules endothéliales et l'augmentation de la pression capillaire, et de la douleur par activation des fibres nerveuses sensorielles terminales (Couture et al., 2001). Plusieurs équipes ont par ailleurs démontré que les animaux transgéniques dépourvus de récepteur B2 présentent une hypertension sévère quand ils sont exposés à des régimes alimentaires riches en sel ce qui démontre un effet natriurétique des kinines via leur récepteur B2 (Alfie et al., 1996). Les kinines, via le récepteur B2, semblent enfin avoir un effet anti-angioprolifératif (Farhy et al., 1992).

Le récepteur B1 est inductible et se lie principalement à la desArg¹⁰-KD. Sa synthèse est augmentée lors d'inflammation, de sepsis ou d'autres formes de trauma tissulaire (comme par exemple l'isolation et l'incubation de tissus musculaires) (Marceau et al., 1998). Ainsi leur synthèse semble accrue lors de présence d'IL-1, une cytokine connue pour ses effets pro-inflammatoires (Davis et al., 1994). Les effets des métabolites des kinines via le récepteur B1 sont relativement similaires à ceux provoqués par les kinines via le récepteur B2. Il semble donc que les récepteurs B1 induits lors d'inflammation, plus

généralement lors d'atteinte tissulaire, amplifient les effets dus aux récepteurs B2 (Blais et al., 2000).

2.3 Kinines et hypotension

L'effet hypotenseur des kinines est connu depuis plusieurs décennies. En 1964, De Freitas et al. ont démontré que l'injection de bradykinine par voie intra-veineuse (la dose variait de 0,38 à 1,58 μ g/kg/min) entraînait une diminution marquée de la pression artérielle systémique et de la résistance vasculaire périphérique (de Freitas et al., 1964). D'autre part, comme indiqué plus haut, plusieurs équipes ont démontré que les animaux transgéniques dépourvus de récepteur B2 présentent une hypertension sévère quand ils sont exposés à des régimes alimentaires riches en sel (Alfie et al., 1996; Duka et al., 2001). De plus, des souris transgéniques dépourvues de récepteurs B2 démontrent une hypertension lorsqu'on leur injecte des antagonistes du récepteur B1 et démontrent, à l'inverse, une hypotension, lorsqu'on leur injecte des agonistes des récepteurs B1 (Duka et al., 2001). Il est enfin démontré qu'au moins une partie des effets hémodynamiques des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IECA) sont secondaires à la bradykinine (Cruden et al., 2004). Il a ainsi été rapporté que la concentration plasmatique en BK augmentait après l'administration d'IECA (Pellacani et al., 1994) et que cette même administration entraînait une dilatation de l'artère brachiale chez l'homme (Hornig et al., 1997) ainsi

qu'une vasodilatation de l'avant-bras et des coronaires (Benjamin et al., 1989; Kuga et al., 1997).

Cette vasodilatation est secondaire à la synthèse et à la libération de monoxyde d'azote et de prostacycline par les cellules endothéliales stimulées par les kinines via leur récepteur B2 (Brown et al., 2000; Wotherspoon et al., 2005). L'acteur hyperpolarisant dépendant de l'endothélium (ou EDHF, endothelium-derived hyperpolarizing factor) jouerait également un rôle dans la vasodilatation médiée par les kinines par l'ouverture des canaux de potassium (Honing et al., 2000). L'hypotension serait enfin aussi en partie secondaire à l'effet natriurétique des kinines (Alfie et al., 1996).

2.4 Bradykinine et SELA

La bradykinine en tant qu'agent hypotenseur et molécule au carrefour des systèmes de coagulation et du complément pourrait participer à la phase hypotensive du SELA ainsi qu'aux troubles de l'hémostase qui s'installent souvent ensuite. La mise en évidence chez une patiente souffrant de SELA de la consommation massive des capacités à générer de la bradykinine au moment de l'épisode hypotensif démontrée par Robillard et al. semble aller dans ce sens (Robillard et al., 2005). Le liquide amniotique contenant de nombreuses cellules épithéliales kératinisées pourrait agir comme surface de contact permettant l'activation de la pré-kallicréine puis, en conséquence, la génération de bradykinine.

3. LES MODELES ANIMAUX DE SELA DANS LA LITTERATURE

Depuis la description du premier cas de SELA en 1926 par Meyer, au moins 18 études utilisant un modèle animal ont été publiées (Meyer, 1926; Hankins et al., 1993). Ces modèles ont été essentiellement développés pour comprendre la physiopathologie du SELA. En effet, comme l'embolie de liquide amniotique est une complication rare qui apparaît de manière soudaine et imprévisible, il est presque impossible d'obtenir des données claires sur sa physiopathologie à partir des cas individuels rapportés dans la littérature.

A ce jour, le syndrome d'embolie de liquide amniotique n'a été rapporté dans aucune espèce mammifère autre que l'Homme. Si ce syndrome existe dans une autre espèce, il faudrait que son incidence soit relativement élevée pour être utilisable à titre de modèle animal. Comme cela semble en contradiction avec la survie de cette espèce, il est très peu probable qu'un modèle animal « naturel » existe. Les modèles animaux de SELA qui ont été rapportés dans la littérature sont donc des modèles dans lesquels le liquide amniotique est recueilli puis injecté dans la circulation sanguine, généralement par voie veineuse. Le but de ces modèles n'est donc pas d'étudier la manière dont le liquide amniotique pénètre dans la circulation maternelle mais plutôt ses effets sur l'organisme maternel.

Dans un article publié en 1993, Hankins et ses collaborateurs résumaient dans un tableau les 16 études alors publiées. Depuis cette date deux nouveaux modèles (en comptant celui de Hankins et al.) ont été publiés. Le tableau ci-dessous (tableau 2) reprend les principaux résultats du tableau présentés par Hankins et al auxquels ont été rajoutées les données des deux derniers modèles publiés (Hankins et al., 1993; Petroianu et al., 1999).

Auteurs	Espèce (nombre)	Anesthésie / Gravide	Liquide amniotique	Volume (ml/kg)	Effets
Steiner, 1941	Lapin (9)	Non/Non	Frais/Humain	1-30 ^a	Aucun
	Chien (11)	Non/Non		4-7	Aucun
Cron, 1952	Lapin (14)	Variable/Non	Stocké/Humain	1-8.8	Aucun
Schneider, 1955	Chien (10)	Non/Non	Stocké/Humain	NP	Hémostase
Jaques, 1960	Chien (9)	Oui/Non	Frais ou stocké/Humain ou canin	9-50 ^a	Cardiovasculaire
Halmagyi, 1962	Mouton (7)	Oui/Non	Stocké/Humain	1-2	Cardiovasculaire
Attwood, 1965	Chien (44)	Oui/Non	Frais/Humain	1.7-5.0	Cardiovasculaire Hémostase
Stolte, 1967	Singe (12)	Oui/Oui	Frais/Humain ou simien	2.9-9.2	Aucun
MacMilan, 1968	Lapin (12)	Non/Non	NP/Humain	1-10 ^a	Hémostase (2/12)
Reis, 1969	Mouton (10)	Oui/Oui	Frais/Ovin	<2.5	Cardiovasculaire
Dutta, 1970	Lapin (34)	Oui/Non	Frais/Humain	2.5	Aucun
Adamsons1971	Singe (9)	Oui/Oui	Frais/Simien	<5	Cardiovasculaire
Kitzmilller, 1972	Chat (NP)	Oui/Non	NP/Humain	3	Cardiovasculaire
Spence, 1974	Lapin (26)	Non/Oui	Frais/Lapin	2,5	Aucun
Reeves, 1974	Veau (14)	Non/Non	Stocké/Bovin	0.04/0.07	Cardiovasculaire
Azegami, 1986	Lapin (36)	Non/Non	Stocké/Humain	6.4-9.9	Aucun
Hankins, 1993	Chèvre (21)	Oui/Oui	Frais/Caprin	2.5	Cardiovasculaire
Petroianu, 2005	Mini-cochon (18)	Oui/Oui	Frais/Porcine	2-10	Hémostase

Tableau 2 : Modèles animaux de SELA publiés (d'après (Hankins et al., 1993)).

NP: non précisé ; ^a : volume en millilitres.

Comme on peut le voir dans ce tableau, plusieurs espèces animales (chien, chat, lapin, singe, bovin) ont été utilisées pour développer un modèle du syndrome d'embolie de liquide amniotique. Certaines n'ont pas du tout permis de reproduire les symptômes du syndrome d'embolie de liquide amniotique (Steiner et al., 1941; Cron et al., 1952; Stolte et al., 1967; Dutta et al., 1970; Azegami et al., 1986). Dans d'autres études, au contraire, l'injection de liquide amniotique a entraîné l'apparition de signes cliniques cardiovasculaires (Jaques et al., 1960; Halmagyi et al., 1962; Attwood et al., 1965; Reis et al., 1969; Adamsons et al., 1971; Kitzmiller et al., 1972; Reeves et al., 1974; Hankins et al., 1993) et parfois des troubles de la coagulation (Schneider, 1955; Attwood et al., 1965; MacMillan, 1968; Petroianu et al., 1999). Les signes cardiovasculaires observés étaient une augmentation de la pression artérielle pulmonaire (6 études), de la résistance vasculaire pulmonaire (4 études), et une diminution de la pression sanguine (3 études) et du débit cardiaque (2 études). Les troubles de la coagulation rapportés étaient une augmentation du temps de saignement (Attwood et al., 1965), une hypofibrinogénémie transitoire (Jaques et al., 1960), une thrombocytopénie transitoire (MacMillan, 1968) associée dans une étude à une augmentation des temps de coagulation (Petroianu et al., 1999).

Malheureusement, nombre de ces études présentaient plusieurs limitations qui rendent leurs résultats difficilement interprétables et sujet à caution. En premier lieu, dans la majorité d'entre-elles, c'est du liquide amniotique humain, et donc hétérologue, qui a été injecté. Ce liquide pouvant contenir des molécules non connues du système

immunitaire de l'espèce utilisée dans le modèle d'étude, il est possible que les signes observés soient la conséquence d'une hypersensibilité de type I. Deuxièmement, dans plusieurs cas, le liquide n'a pas été injecté frais mais après avoir été stocké (généralement réfrigéré ou congelé) pendant une durée variable. Ceci a pu faire disparaître ou altérer la ou les molécules à l'origine du SELA ou, au contraire, faire apparaître de nouvelles substances non reconnues par l'organisme à qui on les injecte. Enfin, dans plusieurs études les sujets utilisés étaient des mâles ou des femelles non gestantes ; la gestation entraînant de nombreuses modifications physiologiques et hormonales, cela peut également avoir un impact sur les effets de l'injection de liquide amniotique.

En tout seules 6 études ont utilisées des femelles gestantes chez qui du liquide amniotique autologue était injecté. Les femelles utilisées étaient la lapine (Spence et al., 1974), la guenon (Stolte et al., 1967; Adamsons et al., 1971), la brebis (Reis et al., 1969), la chèvre (Hankins et al., 1993) et la femelle mini-cochon (Petroianu et al., 1999). Les études effectuées chez la chèvre et la femelle mini-cochon ont permis d'observer respectivement des perturbations cardiovasculaires et des déséquilibres hémostatiques. Ces résultats ont été présentés précédemment (paragraphe 1.3). En utilisant la brebis, Reis et al. ont observé une augmentation significative de la pression veineuse centrale, de la pression artérielle pulmonaire, et de la résistance vasculaire pulmonaire associée à une diminution significative de la pression artérielle moyenne, du débit cardiaque et de la résistance vasculaire systémique ; ces perturbations cardiovasculaires étaient observées dans les dix

premières minutes suivant l'injection de liquide amniotique (Reis et al., 1969). Les deux études effectuées chez la guenon et celle effectuée chez la lapine n'ont pas permis de reproduire les signes cliniques de SELA.

Concernant plus précisément l'étude effectuée par Spence et Manson sur la lapine gravide, le liquide amniotique était récupéré après hystérectomie. Vingt-deux lapines entre 25 et 30 jours de gestation recevaient un bolus de 2,5ml/kg injecté via la veine fémorale. Les paramètres cardio-vasculaires (fréquences cardiaques et respiratoires, pression, artériel, gaz sanguins) étaient mesurés 5, 15, 30, 45, 60 90, et 120 minutes après l'administration du liquide amniotique. L'hémostase n'était pas évaluée.

4. BUT DU PROJET

Le but de notre projet était de déterminer si la bradykinine joue un rôle dans la physiopathologie du syndrome d'embolie de liquide amniotique. Plus précisément, nous souhaitons développer un modèle animal du SELA capable de reproduire les signes cliniques cardiorespiratoires et les troubles de l'hémostase afin de déterminer si ces signes cliniques, et notamment l'hypotension sévère fréquemment observée, s'accompagnent ou sont précédés d'une génération massive de bradykinine.

CHAPITRE 2 – PROJET PILOTE

1. OBJECTIFS DU PROJET PILOTE

Comme nous l'avons vu dans la première partie, aucun modèle animal n'a, à ce jour, été complètement concluant même si les résultats obtenus chez la chèvre et le mini-cochon sont encourageants. Dans ces modèles les signes cliniques étaient plus évidents lorsque le liquide amniotique était contaminé par du méconium. La présence de méconium dans le liquide foetal est généralement un marqueur de stress foetal. Même si la présence de méconium dans le liquide amniotique n'est pas clairement établie comme un facteur de risques d'après les études épidémiologiques, sa présence serait un facteur aggravant. De plus, une détresse foetale est souvent notée lors de SELA.

Les modèles développés avec la lapine n'ont pas montré de résultats concluants à ce jour mais une seule étude a été développée avec des lapines gestantes, et dans ce cas ni les effets sur la coagulation, ni les effets du stress foetal n'ont été étudiés. La lapine gravide restait donc à nos yeux un modèle de SELA à explorer.

La réalisation du projet pilote visait donc plusieurs objectifs :

- Mettre au point le modèle de SELA à partir de la lapine gravide avec stress foetal
- Déterminer les effets de l'injection de liquide amniotique sur l'hémostase chez la lapine gravide
- Déterminer la faisabilité de la mesure de la bradykinine chez le lapin

La mise au point du modèle de SELA visait notamment à déterminer la meilleure méthode pour récolter le liquide amniotique et à standardiser les mesures des paramètres cardio-vasculaires et de l'hémostase.

2. RÉALISATION DU PROJET PILOTE

2.1 Modèle proposé

2.1.1 Procédure expérimentale

Deux lapines en fin de gestation (25^{ème} jour de gestation) ont été incluses dans le projet pilote.

2.1.1.1 Anesthésie et monitoring

Les deux lapines (lapine 1 et lapine 2) ont été soumises à une diète hydrique 12h avant l'expérimentation. Après un examen pré-anesthésique général, l'animal était prémédiqué à l'aide de Buprénorphine (Buprenex® 0,03mg/kg par voie intra-musculaire) et Midazolam (Versed®, 0,5mg/kg par voie intra-musculaire). Vingt minutes plus tard, une pré-oxygénation de 5 minutes au masque puis une induction à l'isoflurane au masque étaient réalisées. L'animal était ensuite intubé et maintenu anesthésié à l'aide d'un moduflex (dispomed) distribuant de l'isoflurane tout au long de l'expérience. Plus précisément, le mélange gazeux était caractérisé par une FiO₂ de 50%, 0,4% à 1% d'isoflurane et environ 50% d'oxyde nitreux.

Une fois l'animal anesthésié, il était monitoré et placé sous fluidothérapie (solution NaCl 0,9%, 10 ml/kg/heure). Le monitoring de l'animal était composé d'un oxymètre de

pouls, d'un capnographe, et d'un électrocardiographe qui permettaient de suivre l'ensemble des paramètres cardiorespiratoires tout au long de l'expérience.

Une ligne artérielle dans l'artère auriculaire centrale (cathéter 22 gauge) et une ligne veineuse dans la veine marginale de l'oreille droite (cathéter 22gauge) étaient posées afin de réaliser des gaz sanguins et des ponctions veineuses (pour mesure des paramètres de coagulation).

2.1.1.2 Induction de la détresse foetale

Une fois l'animal anesthésié et monitoré, une détresse foetale était induite par ischémie/hypoxie de l'utérus grâce au gonflement d'un ballonnet intra-aortique placé en position proximale aux artères utérines (figure 3). Pour ce faire, un cathéter de Fogarty de 4 French était placé dans l'artère fémorale droite après incision cutanée et dissection des tissus entourant l'artère fémorale. Il était inséré d'une distance de 10 cm de manière à se situer en position crâniale par rapport aux artères utérines et à la bifurcation de l'aorte.

Un cathéter artériel classique (22 gauge) était placé dans l'artère fémorale gauche de manière à s'assurer que l'occlusion aortique était complète (mesure par doppler). Comme pour le cathéter de Fogarty, une incision cutanée et dissection des tissus sous-jacents étaient réalisées de manière à individualiser l'artère fémorale.

L'induction de l'hypoxie était réalisée en gonflant le ballonnet du cathéter de Fogarty avec 400 μ L de solution saline. Le ballonnet était maintenu ainsi gonflé pendant 30 minutes.

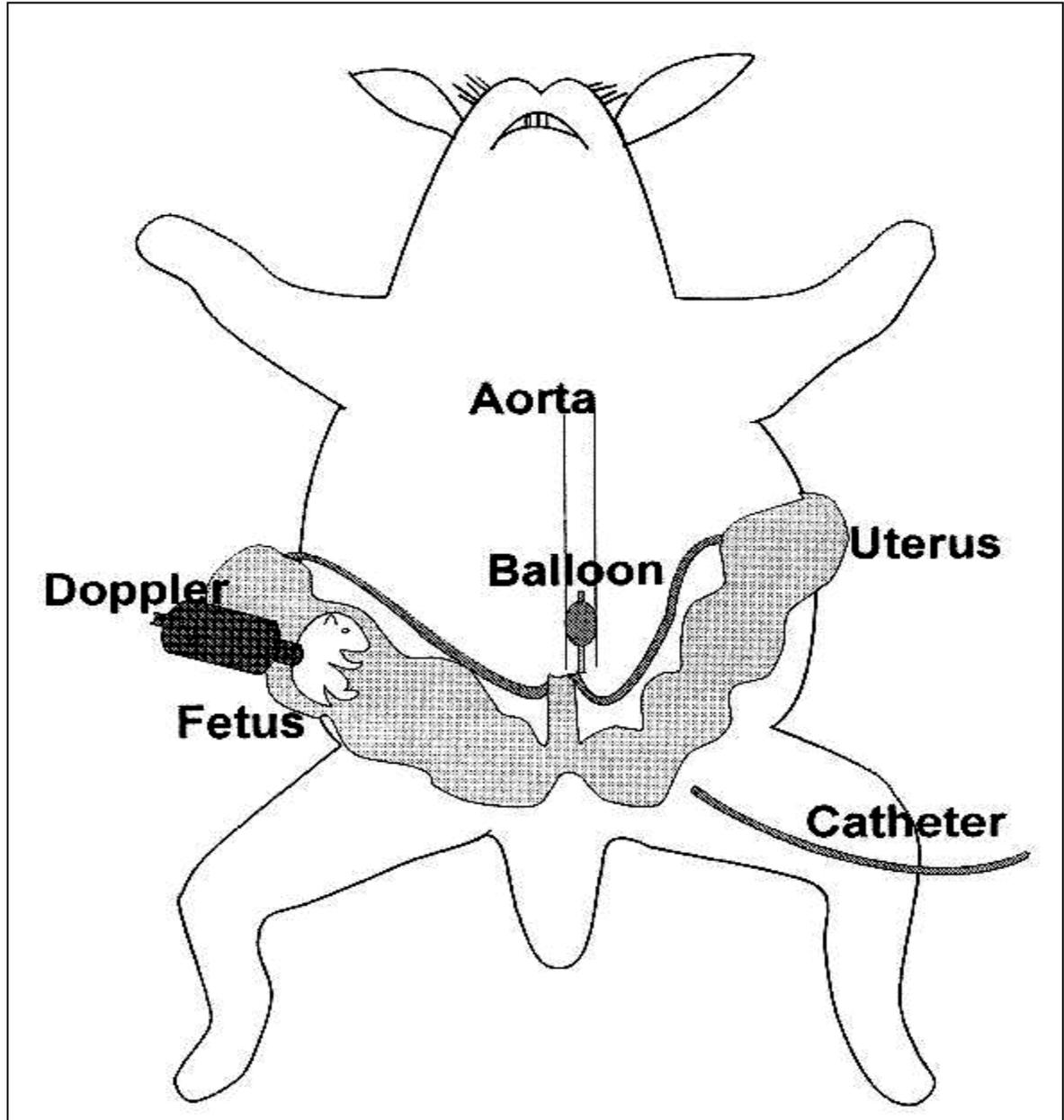


Figure 3 : Schématisation de la procédure de détresse foetale d'après (Tan et al., 1996)

Classiquement une souffrance foetale se traduit par l'apparition d'une bradycardie foetale, une augmentation des mouvements des fœtus et une libération du méconium dans le liquide amniotique par relâchement du sphincter anal et augmentation du péristaltisme intestinal. De façon à objectiver cette souffrance foetale, un suivi échographique de deux fœtus chez chaque lapine était donc effectué pendant toute la période d'hypoxie.

2.1.1.3 Prélèvement et injection du liquide amniotique

Après normalisation des signes cliniques et biologiques maternels post hypoxie (fréquence cardiaque, PO₂, PCO₂ revenues aux valeurs de base), une ponction du liquide amniotique était réalisée sous guidance échographique. Pour chaque liquide amniotique recueilli, un examen cytologique (sur 100 uL de liquide) était réalisé pour déterminer si il y avait présence de méconium. Tous les liquides amniotiques étaient ensuite mélangés ensemble de manière à obtenir suffisamment de liquide pour l'embolie.

Un bolus de 2,5mL/Kg de liquide amniotique devait ensuite être injecté par voie veineuse (veine marginale de l'oreille).

2.1.1.4 Suivi des paramètres cardiovasculaires et de l'hémostase

Des mesures de la pression artérielle, de la fréquence cardiaque, de la fréquence respiratoire, de la PO₂, de la PCO₂ ainsi que des paramètres acido-basiques étaient

effectuées tout au long de l'expérience. Des prélèvements sanguins (2mL placés sur tube citraté) étaient réalisés pour le suivi des paramètres hématologiques (hémogramme) et hémostatiques (temps de prothrombine (PT), temps de thromboplastine partielle activée (aPTT), concentration en D-dimères et en fibrinogène et activité du facteur VIII) ainsi que pour le dosage des bradykinine. Les prélèvements étaient effectués après l'induction anesthésique, après la période d'hypoxie puis 5, 10, 15, 30, et 60 minutes après l'injection de liquide amniotique. Un maximum de 10% du volume sanguin de l'animal a été prélevé au total lors de l'expérience.

2.1.1.5 Dosage de la bradykinine

La bradykinine étant très rapidement métabolisée par les kininases de type I et II, le sang prélevé doit très rapidement être traité pour inactiver ces enzymes. Pour ce faire, le sang ou le plasma citraté est très rapidement mélangé à d'éthanol absolu sur glace fondante. Pour les deux lapines, le traitement de l'échantillon a été différent de manière à déterminer la technique la plus adaptée. Pour la lapine 1, le sang a immédiatement été centrifugé (3000g pendant 10 minutes), puis 1ml de plasma a été mélangé à 4 ml d'éthanol absolu. Ce mélange était ensuite gardé sur la glace fondante pendant 30 à 60 minutes puis transféré dans des tubes hermétiques à -80°C jusqu'au jour du dosage. Pour la lapine 2, deux millilitres de sang citraté ont immédiatement été mélangés à 4 ml d'éthanol absolu. Ce mélange était ensuite gardé sur la glace fondante pendant 30 à 60

minutes puis centrifugé à 3000g pendant 10 minutes. Le surnageant éthanolique était ensuite conservé dans des tubes hermétiques à -80°C jusqu'au jour du dosage.

La mesure de la bradykinine a été réalisée par le service recherche et développement du Dr Louis Thibault à Héma-Québec. La mesure a été effectuée par technique ELISA compétitive avec un système un système biotin-streptavidine-peroxydase. Cette technique a été décrite par Moreau et al. dans un article portant sur la génération de bradykinine lors de la préparation et le stockage de plasma riche en plaquette. (Moreau et al., 2007)

Plus précisément, la phase éthalonée des échantillons a tout d'abord été évaporée et les lyophilisats obtenus ont ensuite été remis en suspension dans une solution tampon (50 mM Tris-HCl + 100 mM NaCl + 0,05% de Tween-20 pH 7,4). Concernant la technique ELISA, les puits de plateaux à 96 puits ont été enrobés à 4°C avec un anti-lapin IgG Fc. Après l'enrobage, les puits ont été lavés et bloqués avec le tampon (50 mM Tris-HCl + 100 mM NaCl + 0,05% de Tween-20 pH 7,4). Chaque échantillon de plasma a été dosé à partir de 5 dilutions (1, 1/4, 1/32, 1/128, 1/256) en triplicata et comparé à une courbe étalon de BK. Un anticorps anti-BK ainsi que de la BK biotinylée ont été ajoutés et les échantillons ont été incubés à $22 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 2 heures. Après un lavage, de la streptavidine-peroxydase a été ajoutée et le plateau a été incubé 1 heure à 37°C. Après un dernier lavage, la révélation du plateau a été effectuée par l'ajout de TMB et la réaction a été

arrêtée avec du H₂SO₄ 1N. L'absorbance a été mesurée à 450 nm avec un lecteur de microplaque et la concentration de BK a été calculée à partir de la courbe étalon.

2.1.1.6 Mesure des paramètres de l'hémostase

Le comptage plaquettaire a été déterminé automatiquement par un appareil ADVIA 120 (Siemens, Toronto, Canada) et confirmé par un comptage manuel (moyenne du nombre de plaquettes sur 10 champs à 1000x)

Les paramètres de coagulation (PT, aPTT, fibrinogène, D-dimères, facteur VIII) ont été mesurés avec un STATCompact Coagulation Analyser (Stago, Asnières, France). Pour ce faire, 1 mL de sang citraté a été centrifugé à 3000g pendant 10 minutes, et le surnageant a ensuite été conservé dans des tubes hermétiques à -80°C jusqu'au jour du dosage.

2.1.1.7 Nécropsie

Les deux lapines étaient euthanasiées 60 minutes après l'injection du liquide amniotique. Une nécropsie complète était réalisée sur chacune des lapines et sur 2 fœtus dans chaque groupe. On s'est intéressé particulièrement au système cardio-respiratoire des lapines. Plusieurs coupes histologiques des poumons ont notamment été examinées afin de mettre en évidence d'éventuels thrombi et micro-thrombi, et d'éventuels embolus de liquide amniotique ou de méconium.

2.1.2 Résultats du projet pilote

2.1.2.1 Détresse fœtale

La mise en place du cathéter de Fogarty a pu être réalisée pour les deux lapines. Cependant sa mise en place a été difficile en raison notamment de la petite taille de l'artère fémorale des deux lapines. Le gonflement du ballon du cathéter a permis une occlusion complète de l'aorte, objectivée par la disparition du pouls dans l'artère fémorale gauche.

L'occlusion de l'aorte a entraîné rapidement l'apparition d'une bradycardie fœtale allant pour un des fœtus examiné jusqu'à l'arrêt cardiaque 30 minutes après l'occlusion. La figure 4 présente l'évolution cardiaque des deux fœtus examinés pour une des deux lapines (lapine 2); un des deux fœtus n'avait plus de battement cardiaque détectable après l'hypoxie. Cette bradycardie marquée disparaît lorsque l'occlusion de l'aorte est levée. Ceci confirme que l'occlusion provoquée par le gonflement du cathéter de Fogarty a bien entraîné une souffrance fœtale. Néanmoins, aucune augmentation des mouvements fœtaux n'a été observée et aucune trace de méconium (présence de matériel amorphe verdâtre) n'a été observée à l'examen cytologique des liquides amniotiques prélevés.

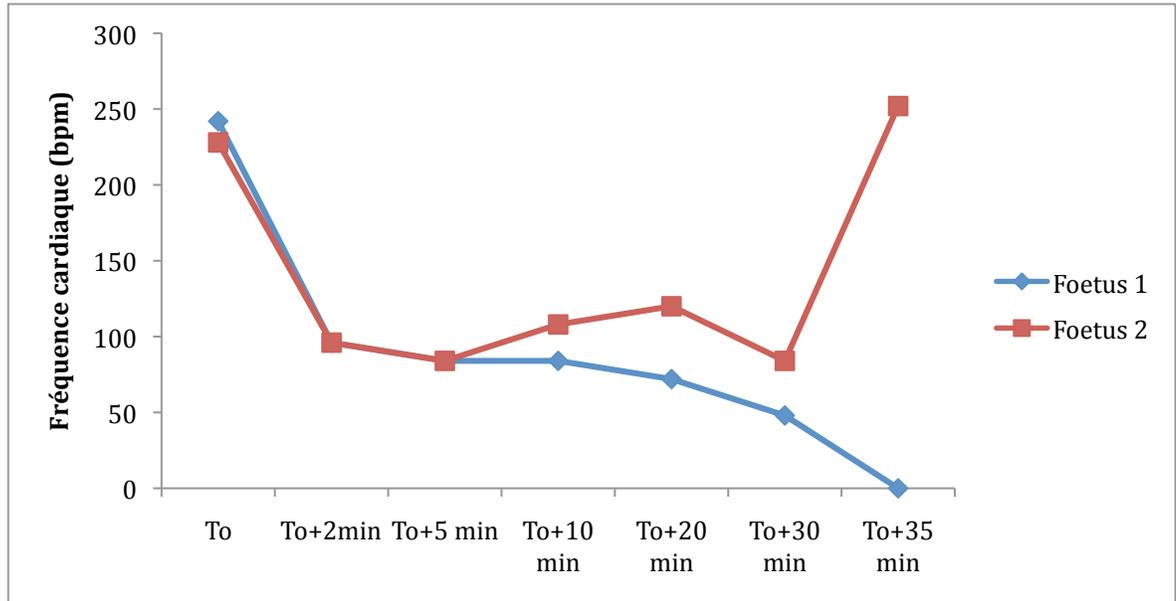


Figure 4 : Évolution de la fréquence cardiaque de deux foetus lors de l'hypoxie (lapine 2).

To : Gonflement du ballonnet du cathéter de Fogarty et début de l'hypoxie. To+30 : Dégonflement du ballonnet et fin de l'hypoxie.

2.1.2.2 Ponction et analyse du liquide amniotique

La ponction de liquide amniotique s'est avérée difficile et longue en raison notamment de la difficulté à bien identifier tous les sacs amniotiques et au collapse entre la paroi du sac amniotique et l'aiguille lors de l'aspiration. La ponction sous contrôle échographique a permis de recueillir en tout 4,5 ml et 7 ml de liquide amniotique, à partir respectivement des fœtus de la lapine 1 et des fœtus de la lapine 2.

Pour une lapine (lapine 1) le liquide amniotique était trouble et de couleur jaune foncé, et pour la seconde lapine (lapine 2), le liquide était légèrement trouble et de couleur verte. Dans les deux cas, l'analyse cytologique du liquide a révélé la présence de

nombreuses cellules épithéliales pavimenteuses, quelques neutrophiles, quelques macrophages et une quantité légère à modérée de globules rouges. Il n'y avait pas évidence de méconium, même dans le liquide amniotique de la lapine 2 qui était de couleur verdâtre. Cette couleur verdâtre a été attribuée à des saignements anciens.

2.12.3 Effet clinique de l'injection de liquide amniotique

La faible quantité de liquide recueilli n'a permis d'injecter respectivement que 1ml/kg et 1,5 ml/Kg de liquide amniotique à la lapine 1 et à la lapine 2.

Pour les deux lapines, l'injection de liquide amniotique n'a pas eu d'effet significatif sur les paramètres cardiovasculaires et acido-basiques mesurés (figure 5).

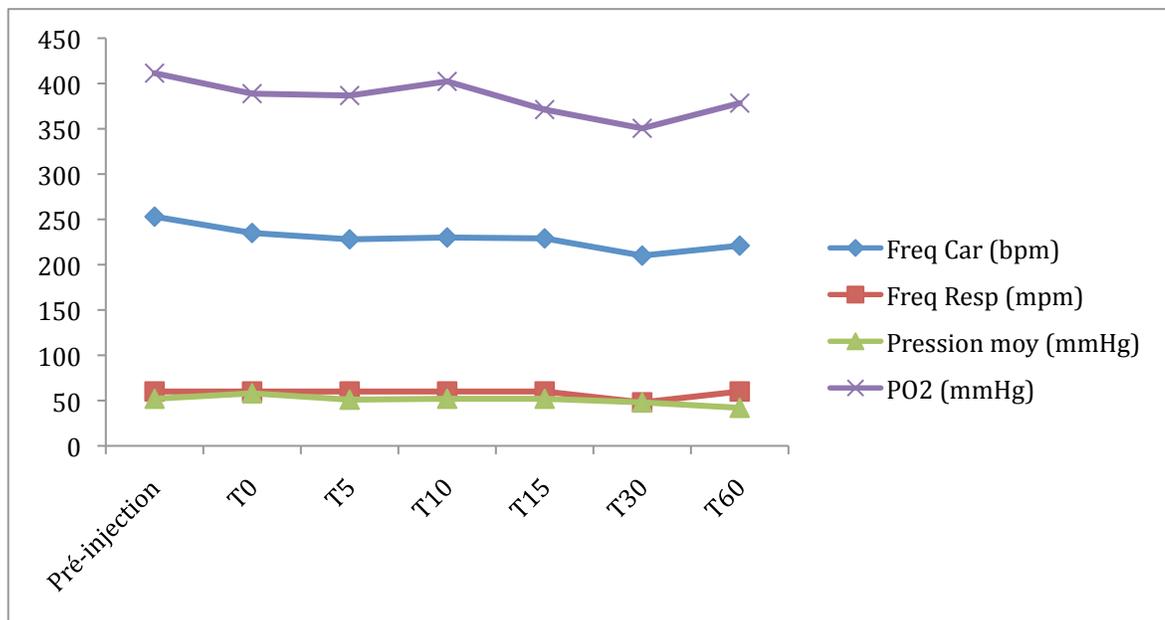


Figure 5 : Évolution de quelques paramètres cardiovasculaires et acido-basiques (lapine 1).

L'injection de liquide amniotique n'a pas eu non plus d'effet significatif sur les concentrations en fibrinogène et en D-dimères, le comptage plaquettaire et le temps de prothrombine. Par contre, on observe une augmentation marquée et significative de l'aPTT dix minutes après l'injection chez les deux lapines avec une diminution concomitante de l'activité du facteur VIII, surtout marquée chez la lapine 1 (figures 6 et 7). Après 10 minutes, l'aPTT diminue mais reste cependant élevé.

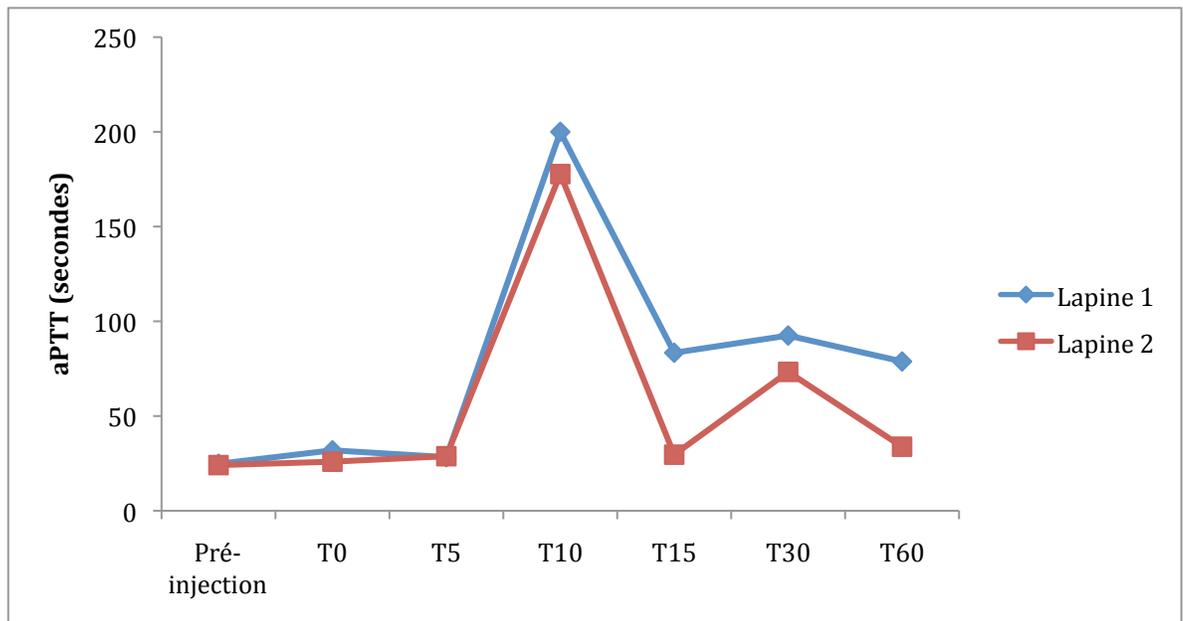


Figure 6 : Effet de l'injection de liquide amniotique sur le temps de thromboplastine partielle activée chez les deux lapines gestantes

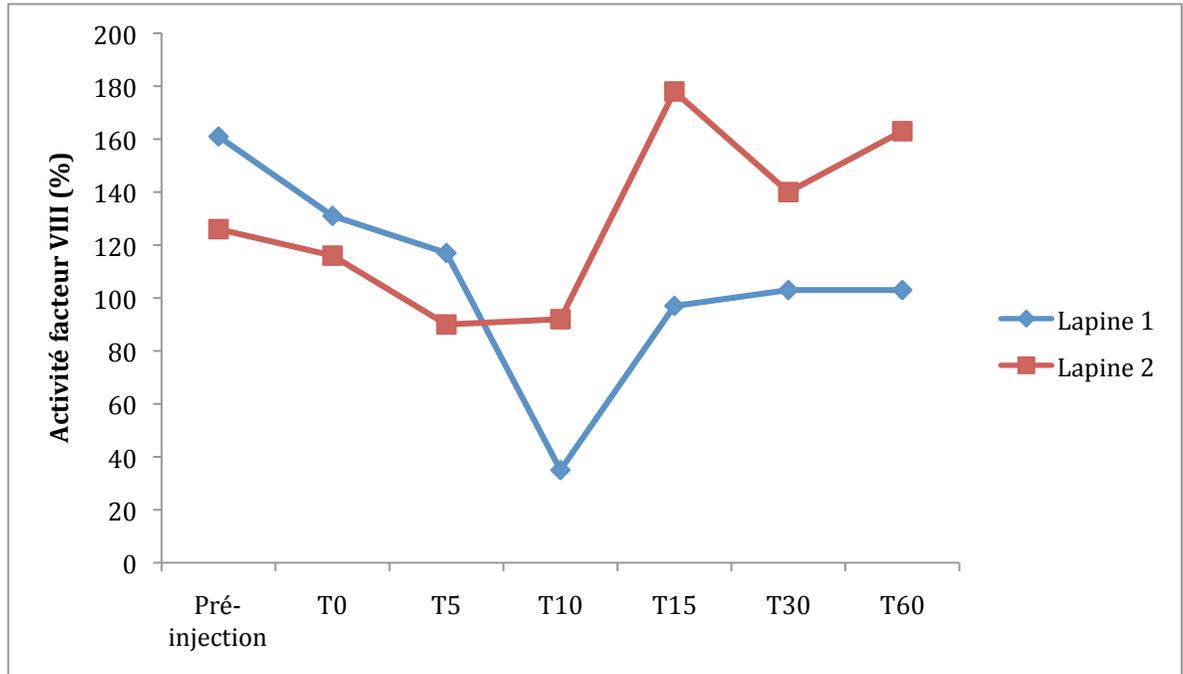


Figure 7 : Effet de l'injection de liquide amniotique sur l'activité du facteur VIII chez les deux lapines gestantes.

La nécropsie n'a pas mis en évidence d'anomalie significative.

2.1.2.4 Génération de bradykinine

Une génération de bradykinine a été observée pour la lapine 1 mais pas pour la lapine 2 (figure 8). Plus précisément pour la lapine 1, la concentration en bradykinine a augmenté jusqu'à T15 puis a diminué jusqu'à T60. La concentration en bradykinine a toujours été plus élevée pour la lapine 1 que pour la lapine 2 quelque soit le temps de l'expérience. En raison du bris de tubes lors de la congélation, la concentration à T0 n'a pas pu être déterminée pour la lapine 1.

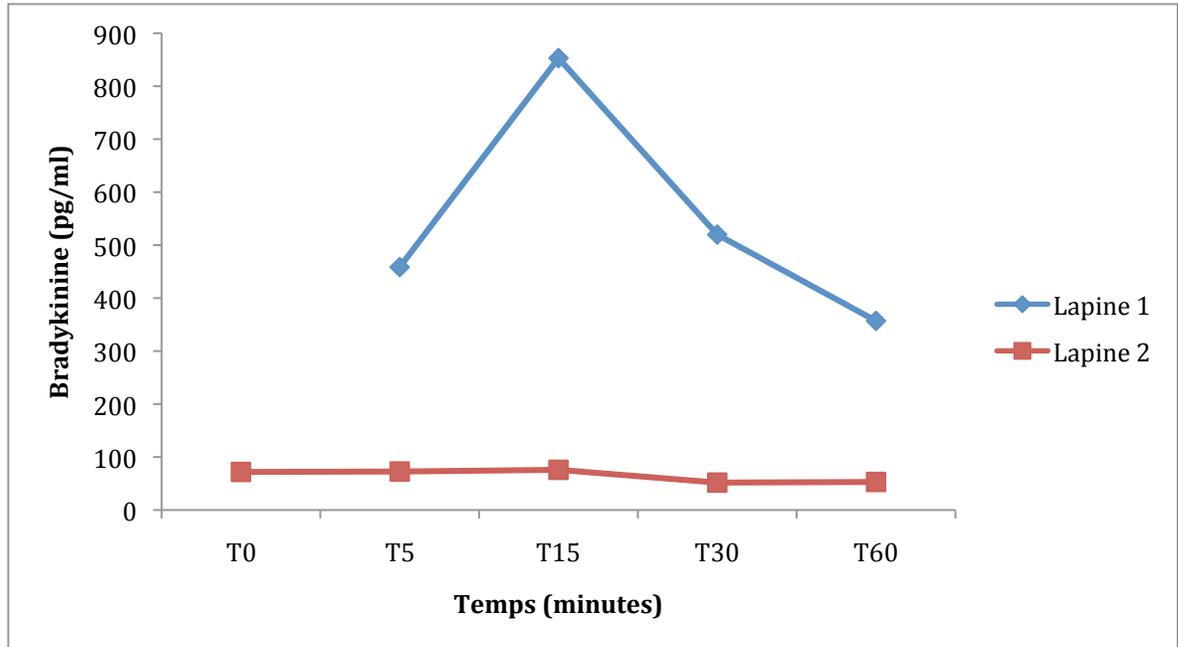


Figure 8 : Effet de l'injection de liquide amniotique frais sur la concentration plasmatique en bradykinine chez deux lapines gestantes.

3. AJUSTEMENT DU PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Le modèle de notre projet pilote n'a pas permis de reproduire les signes cliniques cardiovasculaires classiquement observés lors de syndrome d'embolie de liquide amniotique.

Cependant, suite à l'injection de liquide amniotique, une génération de bradykinine a été observée chez la lapine 1 même si elle n'a pas été accompagnée de l'hypotension marquée attendue. La concentration en bradykinine à partir de laquelle une hypotension significative apparaît chez la lapine n'est pas connue. Néanmoins, si on se base sur les

résultats obtenus chez l'homme, la concentration seuil à partir de laquelle une hypotension clinique apparaît est probablement beaucoup plus élevée que celles observées chez la lapine 1. En effet, Bönner et al. ont démontré que la dose nécessaire pour qu'un bolus de bradykinine injecté par voie intraveineuse provoque un effet hypotenseur significatif chez un homme sain est compris entre 0.8 et 1.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Bonner et al., 1990). En extrapolant ces résultats à une lapine de 4kg, le bolus devrait contenir 3,2 à 4,8 μg de bradykinine alors que les concentrations observées chez la lapine 1 étaient un peu inférieures à 0,001 $\mu\text{g}/\text{mL}$, soit une quantité de 0,28 μg si on considère que le volume sanguin de cette lapine est de 70 ml/kg. On est donc bien en dessous des concentrations nécessaires pour provoquer une hypotension.

La raison pour laquelle aucune génération de bradykinine n'a été observée pour la lapine 2 n'est pas établie de façon certaine. Cependant, il est possible qu'il s'agisse uniquement d'un problème technique lors du traitement de l'échantillon sanguin visant à doser la bradykinine. L'équipe du Dr Thibault (Héma-Québec) a été établi a posteriori qu'il aurait fallu ajouter 8 ml d'éthanol absolu (et non pas 4ml) aux 2ml de sang citraté pour complètement neutraliser les kininases. Il est donc probable qu'une activité kininase était encore présente pour tous les tubes ayant servis au dosage de la bradykinine pour la lapine 2.

Le mode de prélèvement par échographie n'a pas permis de recueillir une quantité importante de liquide amniotique puisque la quantité de liquide injectée n'a pas dépassé

1,5 ml/kg. En nous basant sur les études de Hankins et al. et Petroianu et al. qui avaient observé des signes cliniques en injectant au moins 2,5 ml/kg de liquide amniotique, nous avions espéré au moins recueillir et injecter 2,5 ml/kg de liquide amniotique (Hankins et al., 1993; Petroianu et al., 1999). L'objectif de 2,5 ml/kg paraissait réaliste puisque chez la lapine New Zealand White chaque sac amniotique contient en moyenne 2,2ml au 25^{ème} jour de gestation (Karnak et al., 1999) et que nous avons observé respectivement 11 et 8 fœtus chez les lapines 1 et 2. La faible quantité de liquide pouvait expliquer pourquoi nous n'avions pas observé de signes cliniques cardiovasculaires et pas obtenu une génération de bradykinine suffisante pour entraîner une hypotension.

Le modèle a par ailleurs permis d'entraîner une détresse fœtale clairement objectivée par une bradycardie marquée. Par contre, cette détresse fœtale n'a pas eu pour conséquence une contamination du liquide amniotique par du méconium. Malgré cela, l'injection de liquide amniotique a entraîné la génération de bradykinine chez une des deux lapines.

Enfin ce projet pilote a mis en évidence que l'injection de liquide amniotique chez la lapine modifiait les paramètres de l'hémostase puisque nous avons observé rapidement un prolongement significatif de l'aPTT associé à une baisse de l'activité du facteur VIII. Ces résultats rejoignent ceux observés par Petroianu et al. avec le mini-cochon (Petroianu et al., 1999).

Basé sur l'ensemble de ces résultats, il nous est apparu que la lapine gravide restait un modèle animal envisageable pour étudier le rôle de la bradykinine dans le syndrome d'embolie de liquide amniotique. Puisque la présence de méconium dans le liquide amniotique ne semblait pas nécessaire pour entraîner une génération de bradykinine et que la mise en place du cathéter de Fogarty s'était avérée difficile, la réalisation d'une détresse fœtale n'a pas été maintenue pour le projet principal. De même, l'amniocentèse sous contrôle échographique n'a pas été retenue en raison de la difficulté à récolter une grande quantité de liquide ; de manière à en obtenir plus, il a été décidé de réaliser la ponction de liquide après laparotomie et extériorisation de l'utérus. Pour maximiser les effets possibles de l'injection de liquide amniotique, il a également été décidé d'injecter la quantité totale de liquide amniotique recueilli.

Après discussions avec l'équipe du docteur Thibault, il a été planifié que les prélèvements utilisés pour doser la bradykinine seraient traités de deux manières différentes : en ajoutant directement 8ml d'éthanol à 2 ml de sang total citraté et en ajoutant 4 ml d'éthanol à 1ml de plasma citraté (après centrifugation de 10 minutes à 3000g). Même si le traitement du plasma obtenu après centrifugation a semblé adéquat pour le dosage de la bradykinine, le traitement avec du sang total a été maintenu car nous pensions qu'il était possible que pendant le temps de centrifugation nécessaire à l'obtention du plasma une partie de la bradykinine soit métabolisée par les kininases et donc entraîne une sous-estimation de la concentration en bradykinine. Cependant,

comme l'ajout de 4ml d'éthanol à 2ml de sang citraté n'était pas apparu suffisant, il a été décidé d'ajouter 8 ml d'éthanol absolu plutôt que 4 millilitres.

Afin de préciser l'effet du liquide amniotique sur la génération de bradykinine, nous avons ajouté une expérience in vitro au projet principal. Celui-ci visait à déterminer si l'ajout de liquide amniotique à du sang citraté entraînait la génération in vitro de bradykinine. Pour ce faire, 400 μ l de sang citraté total prélevés chez 5 lapines avant l'injection de liquide amniotique ont été mélangés avec 100 μ l de liquide amniotique frais et 25 μ l de CaCl_2 . Ce mélange a été incubé à 37°C et la réaction était arrêtée à différents temps : immédiatement et 10, 30 et 60 minutes après l'addition de liquide amniotique. La réaction était stoppée par l'addition de 2ml d'éthanol absolu. Après 30 minutes sur glace fondante, les échantillons étaient centrifugés à 4°C pendant 15 minutes à 3000g. Les surnageants étaient placés dans des tubes hermétiques à -80°C jusqu'au moment de l'analyse.

CHAPITRE 3 – ARTICLE

INTRA-VENOUS INJECTION OF AUTOLOGOUS AMNIOTIC FLUID INDUCES TRANSIENT THROMBOCYTOPENIA IN A GRAVID RABBIT MODEL OF AMNIOTIC FLUID EMBOLISM

B. Rannou¹, G-E. Rivard², M. Gains¹ and C. Bédard¹

¹Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Canada, and ² Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, Montréal, Canada

ABSTRACT

Amniotic fluid embolism (AFE) is a rare but catastrophic complication of pregnancy characterized by severe hypotension, cardiovascular collapse, and massive consumptive coagulopathy. Several animal models of this syndrome have been proposed but most of them have yielded inconclusive results. The objective of this study was to develop a suitable animal model of AFE. Twelve rabbits in late gestation (25 days) were used. Amniotic fluid was collected from the fetal amniotic sacs after laparotomy and injected into six rabbits, via the left auricular vein. Six other rabbits received saline (control group).

The *in vitro* effect of amniotic fluid on coagulation was assessed by thrombelastography (TEG) and compared to the effect of saline. Injection of amniotic fluid did not reproduce clinical signs of AFE and had no effect on activated partial thromboplastin time (aPTT), prothrombin time (PT) or Factor VIII activity. However, a significant thrombocytopenia was observed five minutes after amniotic fluid administration. This thrombocytopenia resolved in 60 minutes. *In vitro* addition of amniotic fluid to blood resulted in accelerated clotting on TEG tracings when compared to the effect of saline. In this model, injection of autologous amniotic fluid induced a transient and severe thrombocytopenia. Moreover, results of TEG demonstrated that amniotic fluid could accelerate clotting. However other clinical signs of AFE were not reproduced. Other factors such as the presence of meconium in amniotic fluid may be needed to provoke more severe clinical signs.

Key words : Animal Models, Amniotic fluid, Coagulation, Embolism, , Rabbit, TEG

Corresponding author : B. Rannou, Faculté de médecine vétérinaire, Département de pathologie et microbiologie, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, tel : 450 773-8521, Fax : 450 778-8102.

INTRODUCTION

Amniotic fluid embolism (AFE) is a rare but catastrophic complication of pregnancy in woman that typically occurs during labor and delivery or in the immediate postpartum period.¹ It is initiated by the entry of amniotic fluid into the maternal circulation and is generally characterized by the sudden onset of severe dyspnea, tachypnea and cyanosis.^{2,3} These clinical signs are provoked by severe hypotension and cardiovascular collapse that may lead to cardiac arrest and death.^{4,5} If the patient survives this initial event, bleeding frequently occurs secondary to massive consumptive coagulopathy.^{2,6} Other symptoms such as an altered mental status and convulsions have also been reported and may be the first clinical signs present.^{2,3} No specific prodromes or risk factors have been clearly identified.^{2,3,7,8}

Several epidemiologic studies have been conducted to determine incidence of AFE and its overall morbidity and mortality rates. However, given the rarity of its occurrence, estimates of such parameters are difficult to obtain. Earlier studies were based on case reports or uncontrolled case registry and reported an incidence rate ranging from 1 in 8000 to 1 in 80 000 deliveries.^{2,5,9} Two recent population-based cohort studies reported an incidence of 1 in 13 000 and 1 in 16 000 deliveries.^{7,10} Older studies reported maternal mortality rates as high as 60% associated with high morbidity with only 15% of survivors neurologically intact,² whereas more recent data obtained by population-based studies

give a lower mortality rate around 15 and 20%.^{7,10,11} Fetal outcome is also poor with a mortality rate around 20% with permanent neurologic injury in 30 to 50% of survivors.⁵

The pathophysiology of AFE is also poorly known and understood. Although historically, cardiovascular clinical signs were thought to be secondary to embolization of amniotic cells and amorphous elements of amniotic fluid or meconium, many studies have suggested that those clinical signs resulted from biochemical mediators that are released after the embolization occurs. Leukotrienes, endothelin, bradykinin have been notably suspected as mediator of this syndrome.¹²⁻¹⁴

Given the unpredictable nature and the rarity of the AFE, pathogenesis and treatment of AFE cannot be fully explored with human studies and therefore, several animal models have been developed. Nevertheless, many models have failed to reproduce the syndrome. Use of male animals and nonpregnant females, as well as injection of heterologous (usually human) or not freshly collected amniotic fluid could explain those results. Both interesting and promising results have been obtained using goat and Göttingen mini-pig models. However, those models are expensive and need adapted experimental facilities compared to more common laboratory species such as rabbits or mice. Only one study has used pregnant rabbits with the injection of fresh autologous amniotic fluid as a model of AFE. The amniotic fluid did not significantly alter the cardiorespiratory function or acid-base balance. However, this model did not explore the effect of amniotic fluid on coagulation and the hysterotomy performed with removal of fetus could have influenced some results.

The purpose of this study was to perform a detailed analysis of the effects on cardiovascular and coagulation systems of amniotic fluid embolism using a pregnant rabbit model without hysterotomy and fetus removal.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Twelve rabbits in late gestation (25 days) were used and divided into an experimental (n=6) and a control group (n=6). For the experiment, the rabbits were premedicated with an intramuscular injection of Torbugesic[®] (butorphanol, 0.3 mg/kg) and anesthetized with isoflurane in oxygen by a facial mask. A 22ga catheter was inserted into a marginal ear vein for fluid administration (NaCl, 0.9% at 10 ml/kg/h). A second 22ga catheter was inserted into the auricular artery of the contralateral ear for direct blood pressure measurement and blood sampling. For each rabbit, the uterus was externalized after standard laparotomy and amniotic liquid from each fetal amniotic sac was collected using a 25ga needle connected to a 5 ml syringe. A bolus of amniotic fluid (experimental group) or of saline (control group) was injected via the left auricular vein. At the end of the experimental procedure, the rabbits were euthanized using pentobarbital. A board certified veterinary pathologist (MG) immediately performed a complete necropsy. Care and use of animals were conducted in accordance with the Canadian Council on Animal Care.

Blood collection

During the experiment, arterial blood samples were taken for blood gas, platelet counts, and coagulation analysis. Samples were taken just prior to the amniotic fluid/saline bolus (T0), and 5, 10, 15, 30, and 60 minutes after bolus infusion. A total of 6 ml of blood was collected at each time point and immediately transferred into 3.2% citrated tubes in a ratio blood: anticoagulant of 9:1. Plasma was collected after centrifugation at 3000 g during 10 minutes and stored at -80°C until analysis.

Platelets counts and coagulation parameters

Platelet counts were performed using an ADVIA120 (Siemens, Toronto, Canada) with the multispecies configuration. Platelet counts were confirmed by blood smear examination. Coagulation parameters, including activated partial thromboplastin time (aPTT), prothrombin time (PT), factor VIII activity and antithrombin (AT) were measured using a STACompact coagulation analyzer (Stago, Asnières, France) and Stago reagents.

Cardiovascular parameters

Systolic and diastolic pressure, heart rate, respiratory frequency as well as hemoglobin saturation and end-tidal CO₂ were recorded during the experiments.

In vitro effect of amniotic fluid on hemostasis

In order to evaluate the in vitro effect of amniotic fluid on hemostasis, thrombelastography (TEG; Haemoscope, Niles, IL, USA) analysis was performed on citrated whole blood collected from 5 rabbits. TEG analysis was performed in duplicate by mixing in the reaction cupules 320 μ l of citrated whole blood with 20 μ l of CaCl_2 (0.2M) and 20 μ l of amniotic fluid or 20 μ l of NaCl 0.9%. Reaction time (r), kinetic time (k), alpha angle (α) and maximum amplitude (MA) were recorded. Tracings with amniotic fluid and with NaCl were compared.

Necropsy

The rabbits were euthanized and immediately subjected to a complete post-mortem examination. Tissues were fixed by immersion in 10% neutral buffered formalin for 7 days, then trimmed, embedded in paraffin and sections were cut 5 μ m thick and stained with hematoxylin and eosin. Sections of the brain (basal ganglia, cerebral cortices, thalamus, mesencephalon, cerebellum and brainstem), lungs (left cranial lobe, left caudal lobe, right cranial lobe, right middle lobe and right caudal lobe), as well as the left and right kidneys were examined.

Data analysis

To document changes in cardiovascular parameters, in coagulation parameters and in platelet counts recorded overtime and between groups, repeated measures general linear model ANOVAs were performed using Group and Time as between and within factors, respectively. When significant level was reached, a priori contrasts were performed using Dunnett's two-tailed tests versus a control (Control group or T0). Assumption for normality of data expression and equal variance matrix were ensured using Shapiro-Wilk W and Box's M tests, respectively. Geisser-Greenhouse epsilon probability level was used as an adjustment to correct for non-circularity in the covariance matrix.

When normality was still absent after having log transformed the data, a non parametric approach was used. At each time session, Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks followed by Kruskal-Wallis multiple-comparison Z-value test were used to allow comparison between groups. Changes overtime in each group was done using Friedman test followed by Tukey-Kramer multiple-comparison test. Significant level was set at an α level of 0.05. Data are reported as mean \pm standard deviation (SD).

RESULTS

Animals

Female New-Zealand White rabbits (Charles-River Canada, St-Constant, Canada) at 25 days of gestation and weighing between 4.0 and 4.7 kg (4.3 ± 0.2) were used in this study. The number of fetus per female ranged between 8 and 12 (10 ± 1.2). Surgery, anesthesia and instrumentation of animals were all performed without any significant complication.

Amniotic fluid analysis

The amount of amniotic fluid collected per animal ranged between 5 and 10,5 ml ($8,1 \pm 2.6$) with cells counts between 0.0022 and 0.66 cells $\times 10^9$ /L (0.18 ± 0.22), Cytologically, the amniotic fluid was composed of large mononuclear cells, epithelial cells and red blood cells most likely secondary to iatrogenic hemorrhage. There was no evidence of meconium. The amount of amniotic fluid injected per rabbit ranged between 1.04 and 2.56 ml/kg (1.83 ± 0.64). The amount of saline injected per rabbit was 2.50 ml/kg.

Cardiovascular parameters

There was a significant decrease in systolic pressure ($p < 0.01$), diastolic pressure ($p < 0.01$) and mean arterial pressure ($p < 0.01$) values recorded overtime (Fig. 1). This effect was characterized by a constant decrease from T0 to T60 for all three parameters. This effect

was attributed to anesthesia, as significant differences between study groups were not observed.

Platelet counts and coagulation parameters

Group ($p=0.023$) and Time ($p<0.01$) had a significant effect on platelet counts (Fig. 2). In addition, the interaction term (Time*Group effect) was significant ($p=0.010$).

At T0, platelet count was not significantly different between groups. In the control group, platelet counts did not differ overtime, remaining stable throughout the experiment. In the experimental group, a significant decrease in platelet count was observed at T5 when compared to the control group, followed by a slow and progressive increase overtime. At T60 the platelet count was not significantly different between groups.

When the data from each distinct group was analyzed, the following parameters differed significantly overtime: in the control group, there was PTT ($p<0.001$, T0, T5 and T10 vs. T30) and AT ($p=0.042$, T0 vs. T5-60). In the group that received amniotic fluid there was PT ($p=0.038$) and PTT ($p=0.017$), T0 vs. T30. Overtime difference may be attributed to the surgical procedure. There was no significant difference for PTT, PT, fibrinogen, Factor VIII and AT values recorded between groups.

Necropsy results

There were no significant pathological changes macroscopically and on histology. Numerous foci of congestion of variable severity were present in the lungs of all rabbits in

the study. None of the changes noted macroscopically or microscopically in the study were considered to be related to the administration of the saline or amniotic fluid. The congestion noted macroscopically was considered to be related to the anesthetic procedure.

In vitro experiment

In vitro, addition of amniotic fluid to citrated whole blood had a significant effect on TEG tracings (Fig. 4), resulting in significant shorter r ($p=0.040$) and k ($p=0.040$), and in a significant increase in α ($p=0.040$) and MA ($p=0.040$) compared to results obtained with saline alone (Fig. 5).

DISCUSSION

In our model, the injection of fresh, autologous amniotic fluid in anesthetized pregnant rabbits did not induce significant cardiorespiratory clinical signs that are classically described with amniotic fluid embolism in women. The results are similar to those obtained by Spence and Manson¹⁵ who used conscious pregnant rabbits as a model but differ from those obtained by Petroianu et al.¹⁶ and by Hankins et al.¹⁷ who respectively used pregnant mini-pigs and pregnant goat as animal models. Petroianu et al. noted severe hemodynamic disturbances characterized by a great variance in arterial pressure in

mini-pigs that received fresh and autologous amniotic fluid contaminated by meconium. Those hemodynamic disturbances were observed during the first 20 minutes after amniotic liquid infusion. In their study, Hankins et al reported that intravenous injection of fresh and autologous amniotic fluid to pregnant goats provoked central hemodynamic and respiratory effects 10 minutes after amniotic fluid embolism; the effects were consistently greater when amniotic fluid was contaminated with meconium.

The pathogenesis of AFE still remains partially unknown. A few decades ago, it was believed that clinical signs were secondary to amniotic fluid cells and debris embolism into maternal circulation.^{4,5} However, based on usual absence of pulmonary vessel obstruction and the variety of clinical signs (such as bleeding), this view has been forsaken in favor of a humoral mechanism.⁵ It is hypothesized that the entrance of amniotic fluid in maternal circulation releases primary or secondary mediators that cause the clinical signs of amniotic fluid embolism. Many mediators have been proposed and the list notably includes leukotrienes, endothelin, and bradykinin.¹²⁻¹⁴ However, none of the mediators has been undoubtedly proved to be associated with amniotic fluid embolism.

It has also been postulated that contamination of amniotic fluid with meconium could be an aggravating factor.¹⁷ In several animal models, cardiorespiratory clinical signs and effects on coagulation were stronger when amniotic fluid was contaminated with meconium.^{16,17} In our model, none of the amniotic fluid samples that have been infused were contaminated with meconium based on macroscopic and microscopic examination. This may be one of the reasons why we did not observe any cardiorespiratory signs.

However, the presence of meconium in amniotic fluid does not appear to be essential to cause clinical signs. In fact, Hankins and Petroianu observed cardiovascular signs or effects on coagulation in animals that received amniotic fluid free of meconium. Moreover, meconium is not always present in amniotic fluid of patient with AFE² and the presence of meconium was not significantly associated with risk of amniotic fluid embolism occurrence in a recent study of forty-five cases of AFE.⁸

The amount of amniotic fluid that embolizes into maternal circulation during real AFE is unknown. In our study the volume of amniotic fluid injected ranged from 1.0 to 2.5mL/kg. It is possible that the volume of injected amniotic fluid was insufficient to result in clinical signs of AFE. However this possibility seems unlikely as clinical signs have been observed with amounts of amniotic fluid equal or less than 2.5 ml/kg in some animal models.¹⁶⁻¹⁸

The choice of rabbits as animal model could be another explanation for the absence of convincing results. As no natural model of AFE has ever been reported, a perfect animal model of AFE appears non realistic. The reason why rabbits may not be a good model for AFE is unknown. Amniotic fluid from fetal rabbit sacs may not contain the cellular or humoral mediators of AFE or pregnant rabbits may have a different physiological response to AFE than woman. Alternatively, the causative agent of AFE or a change in physiologic status of pregnant rabbits may appear after the 25th day of gestation. In our study, we chose females at 25 days of gestation to be sure to collect enough amniotic fluid because volume of amniotic fluid tends to decrease dramatically after the 25th day of gestation.¹⁹

In the present study, pregnant females were euthanized 60 minutes after injection of

amniotic fluid and thus late onset of AFE manifestations may have been missed. However our first goal was to demonstrate that our model was suitable for AFE studies. Since clinical signs of AFE tend to appear rapidly after amniotic fluid embolism, it is very unlikely that the first clinical signs of AFE would have been missed. Because the design of our study included general anesthesia, expression of cardiovascular clinical signs could have been masked. However, clinical signs associated are usually severe and it seems unlikely that they could be prevented by general anesthesia. The fact that in other animal models of AFE some animals under anesthesia express clinical signs tends to prove that general anesthesia can be used.¹⁶⁻¹⁸

Rabbits that received amniotic fluid did not reveal any significant pathologic changes at necropsy. In woman, specific macroscopic changes usually described include pulmonary edema, atelectasis, pulmonary congestion, emphysema, and evidence of thrombosis.⁵ In mini-pigs, Petroianu et al. reported the presence of microthrombi in pulmonary arterioles and in the capillary net without involvement of the larger pulmonary arteries.¹⁶ That was not observed in our experiment even if the necropsy was immediately realized after euthanasia.

Overall, the only significant change that we observed in this study was a transient yet severe thrombocytopenia with no clear effect on other coagulation parameters (PT, PTT, AT, factor VIII and fibrinogen). A mild to moderate decreased platelet count is frequently observed during AFE but is associated with increased PT and PTT as a part of disseminated intravascular coagulation (DIC).^{2,5,11} In the mini-pig model, Petroianu et al reported a

response similar to DIC characterized by moderate to severe thrombocytopenia associated with decreased fibrinogen, and prolonged PT and aPTT.¹⁶ In our study, the coagulation results were not suggestive of DIC. A transient platelet sequestration in the spleen or transient platelet aggregation could better explain the transient thrombocytopenia that was observed. The platelet sequestration may be secondary to the redistribution of platelets from the general circulation into the splenic vascular bed. During the experiment, splenomegaly or drop of the hematocrit that could have suggested splenic sequestration were not observed. Transient reversible lung platelet sequestration cannot be excluded. Reversible platelet aggregation could have been directly or indirectly induced by amniotic fluid. It is possible that amniotic fluid contains a molecule that directly activates platelets via a specific receptor and provokes transient aggregation. That molecule and the means by which it could activate platelets have not been determined. It is also possible that amniotic fluid indirectly activates platelets via the coagulation cascade. In fact, human amniotic fluid contains a high quantity of tissue factor.^{20,21} It also contains factors VII, IX and X but in lower concentrations than in maternal blood.^{20,21} Moreover, *in vitro* studies using TEG has demonstrated that the addition of human amniotic fluid to blood from pregnant woman accelerates clot formation.^{22,23} We clearly reproduced those results with our *in vitro* study as addition of amniotic fluid to blood resulted in significant hypercoagulable tracings compared to those obtained with saline alone.

In conclusion, our model has not allowed us to reproduce amniotic fluid embolism. The absence of cardiovascular clinical signs and clinical evidence of consumption coagulopathy does not permit the use of our model for further studies on AFE. However, the induction of severe but transient thrombocytopenia as well as the results obtained with TEG confirmed the ability of amniotic fluid to activate coagulation. The presence of meconium in amniotic fluid may be needed to provoke more severe clinical signs.

ACKNOWLEDGMENTS

This project was supported by a grant from Bayer Inc. Canada.

The authors would like to acknowledge Ms Anik Cormier for testing the coagulation parameters, M Maxim Moreau, Dr Carolyn Gara-Boivin, and Dr Virginie Allegret.

REFERENCES

1. Clark SL. Amniotic fluid embolism. *Clin Obstet Gynecol* 2010;53:322-328.
2. Clark SL, Hankins GD, Dudley DA, et al. Amniotic fluid embolism: analysis of the national registry. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172:1158-1167; discussion 1167-1159.
3. Tuffnell DJ. United kingdom amniotic fluid embolism register. *BJOG* 2005;112:1625-1629.
4. Clark SL. New concepts of amniotic fluid embolism: a review. *Obstet Gynecol Surv*

1990;45:360-368.

5. Conde-Agudelo A, Romero R. Amniotic fluid embolism: an evidence-based review. *Am J Obstet Gynecol* 2009;201:445 e441-413.
6. Morgan M. Amniotic fluid embolism. *Anaesthesia* 1979;34:20-32.
7. Abenhaim HA, Azoulay L, Kramer MS, et al. Incidence and risk factors of amniotic fluid embolisms: a population-based study on 3 million births in the United States. *Am J Obstet Gynecol* 2008;199:49 e41-48.
8. Spiliopoulos M, Puri I, Jain NJ, et al. Amniotic fluid embolism-risk factors, maternal and neonatal outcomes. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2009;22:439-444.
9. Steiner PE, Lushbaugh CC. Maternal pulmonary embolism by amniotic fluid as a cause of obstetric shock and unexpected deaths in obstetrics. *JAMA* 1941;117:1245-1254, 1341-1245.
10. Kramer MS, Rouleau J, Baskett TF, et al. Amniotic-fluid embolism and medical induction of labour: a retrospective, population-based cohort study. *Lancet* 2006;368:1444-1448.
11. Gilbert WM, Danielsen B. Amniotic fluid embolism: decreased mortality in a population-based study. *Obstet Gynecol* 1999;93:973-977.
12. Azegami M, Mori N. Amniotic fluid embolism and leukotrienes. *Am J Obstet Gynecol* 1986;155:1119-1124.
13. el Maradny E, Kanayama N, Halim A, et al. Endothelin has a role in early pathogenesis of amniotic fluid embolism. *Gynecol Obstet Invest* 1995;40:14-18.
14. Robillard J, Gauvin F, Molinaro G, et al. The syndrome of amniotic fluid embolism: a potential contribution of bradykinin. *Am J Obstet Gynecol* 2005;193:1508-1512.
15. Spence MR, Mason KG. Experimental amniotic fluid embolism. *Am J Obstet Gynecol* 1974;119:1073-1078.
16. Petroianu GA, Altmannsberger SH, Maleck WH, et al. Meconium and amniotic fluid embolism: effects on coagulation in pregnant mini-pigs. *Crit Care Med* 1999;27:348-355.
17. Hankins GD, Snyder RR, Clark SL, et al. Acute hemodynamic and respiratory effects of amniotic fluid embolism in the pregnant goat model. *Am J Obstet Gynecol* 1993;168:1113-1129; discussion 1129-1130.
18. Reis RL, Pierce WS, Behrendt DM. Hemodynamic effects of amniotic fluid embolism. *Surg Gynecol Obstet* 1969;129:45-48.
19. Karnak I, Muftuoglu S, Cakar N, et al. Organ growth and lung maturation in rabbit fetuses. *Res Exp Med (Berl)* 1999;198:277-287.
20. Lockwood CJ, Bach R, Guha A, et al. Amniotic fluid contains tissue factor, a potent initiator of coagulation. *Am J Obstet Gynecol* 1991;165:1335-1341.
21. Uszynski M, Zekanowska E, Uszynski W, et al. Tissue factor (TF) and tissue factor pathway inhibitor (TFPI) in amniotic fluid and blood plasma: implications for the mechanism of amniotic fluid embolism. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;95:163-166.
22. Harnett MJ, Hepner DL, Datta S, et al. Effect of amniotic fluid on coagulation and

platelet function in pregnancy: an evaluation using thromboelastography. *Anaesthesia* 2005;60:1068-1072.

23. Liu EH, Shailaja S, Koh SC, et al. An assessment of the effects on coagulation of midtrimester and final-trimester amniotic fluid on whole blood by Thrombelastograph analysis. *Anesth Analg* 2000;90:333-336.

Request reprints from Dr. B. Rannou, Faculté de Médecine Vétérinaire, Département de Pathologie et Micorbiologie, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, Qc, J2S 2M2, CANADA.

FIGURES

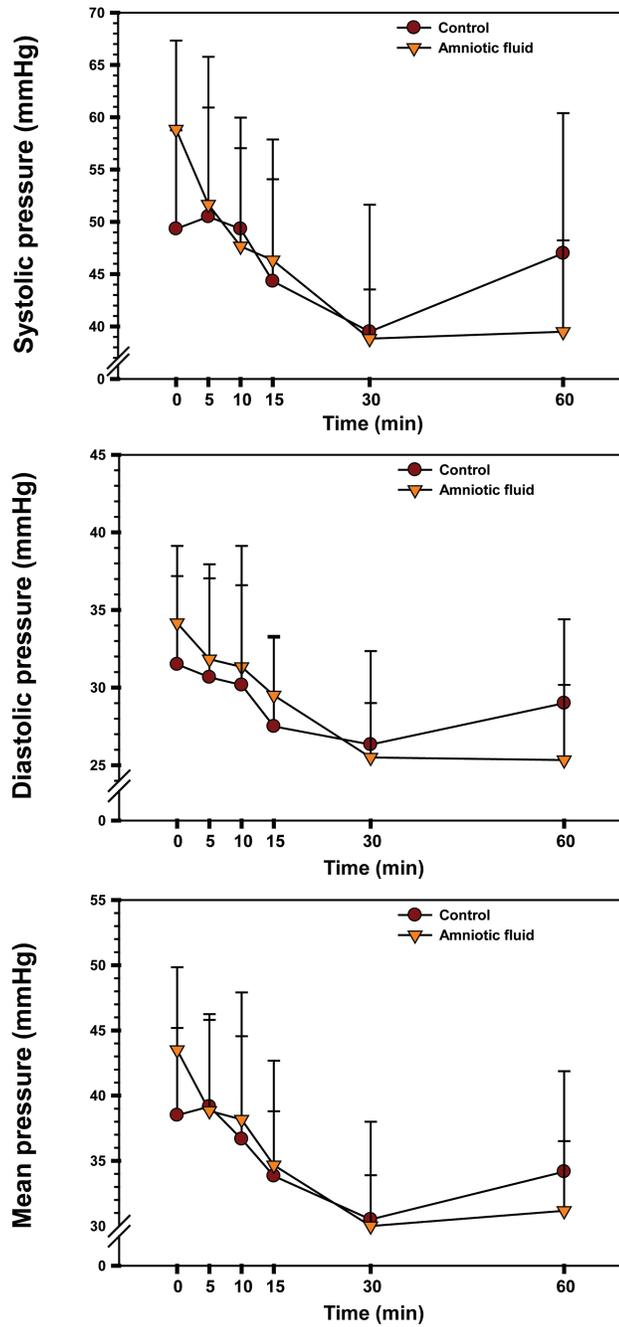


Fig. 1. Systolic, diastolic and mean arterial pressure (mean \pm SD) in female rabbits measured after administration of saline (control) or amniotic fluid.

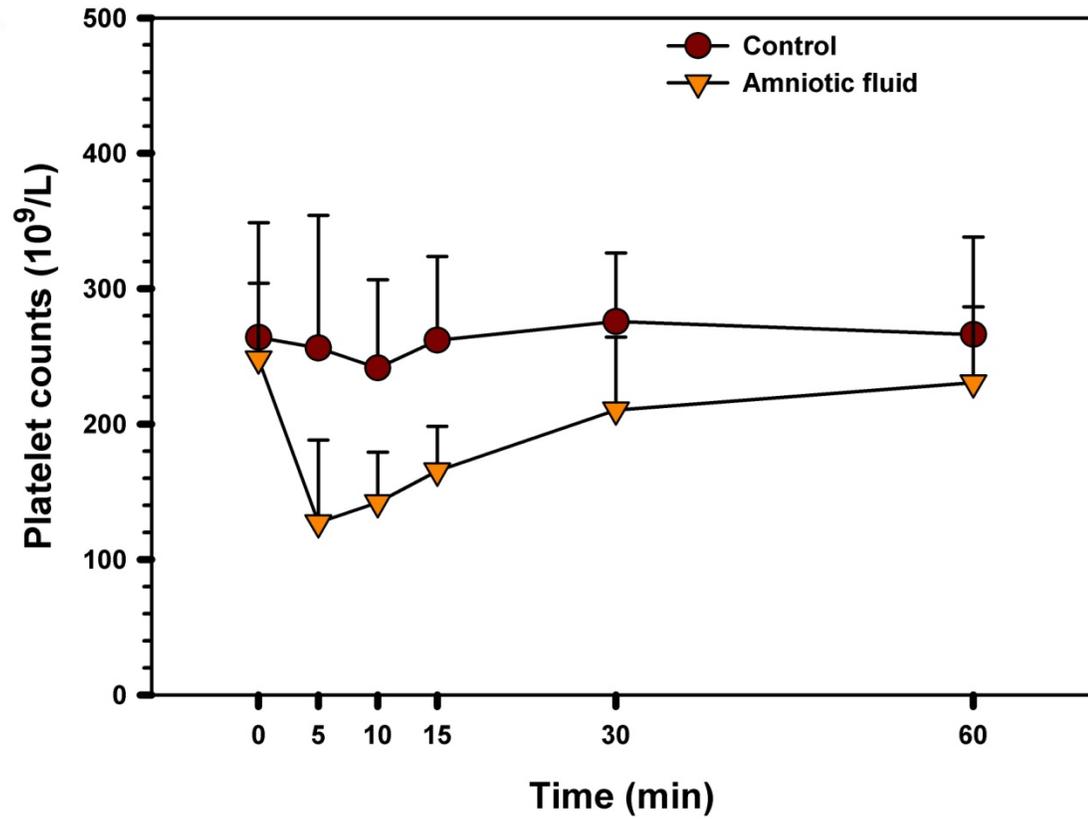


Fig. 2. Platelet counts (mean \pm SD) in female rabbits measured after administration of saline (control) or amniotic fluid.

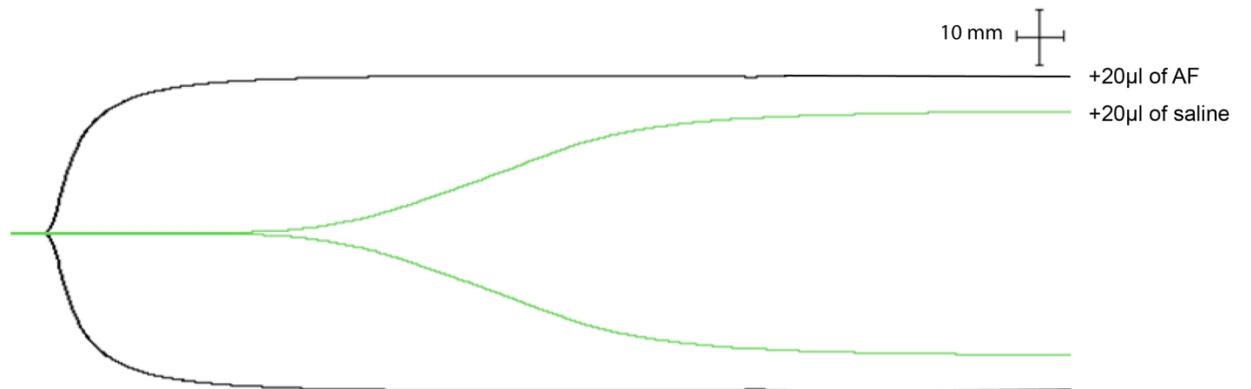


Fig. 3.: Typical thrombelastography tracings obtained after addition of CaCl_2 and saline or amniotic fluid to citrated whole blood (AF: amniotic fluid)

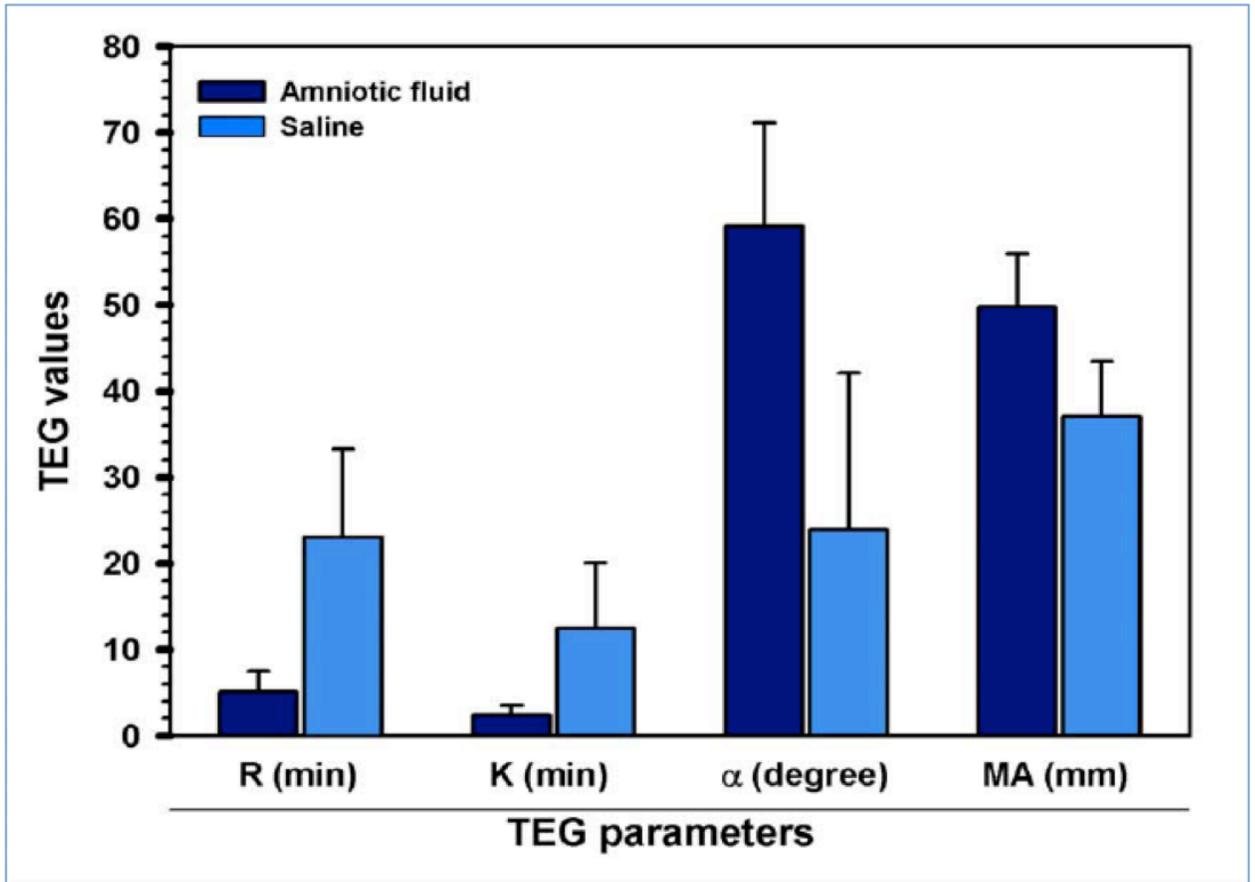


Fig. 4. Thrombelastography (TEG) parameters (mean \pm SD) obtained after addition of CaCl₂ and saline or amniotic fluid to citrated whole blood in five rabbits.

CHAPITRE 4 – CONCENTRATIONS EN BRADYKININE

Comme présenté dans le second chapitre, le projet de recherche principal incluait un dosage de la bradykinine à différents temps de l'expérimentation. Les résultats de ce dosage n'ayant pas été inclus dans l'article ils sont présentés dans ce chapitre. Nous présentons également dans ce chapitre les résultats de l'étude in vitro dont le mode opératoire a été présenté à la fin de la partie 2.2 du second chapitre.

1. RÉSULTATS DE L'ETUDE *IN VIVO*

La mesure de la bradykinine a été effectuée pour chaque temps sur les deux types d'échantillons (traitement du sang total citraté avec l'éthanol absolu et traitement du plasma citraté avec l'éthanol absolu).

Les échantillons traités avec centrifugation préalablement à l'ajout d'éthanol (figure 9) ont démontré une concentration en bradykinine plus élevée que les échantillons sans centrifugation préalable (figure 10). Cependant, quel soit le type de traitement effectué, les concentrations en bradykinine chez les lapines ayant reçu du liquide amniotique sont restées très faibles : entre 20 et 300 pg/ml avec les échantillons pour lesquels la centrifugation a été effectuée avant l'ajout d'éthanol absolu (figure 9) et entre 5 et 20 pg/ml quand l'éthanol absolu était directement ajouté au sang total citraté (figure 10). De

plus, aucune courbe compatible avec une génération de bradykinine significative n'a été observée après l'injection de liquide amniotique quelque soit le type d'échantillon traité.

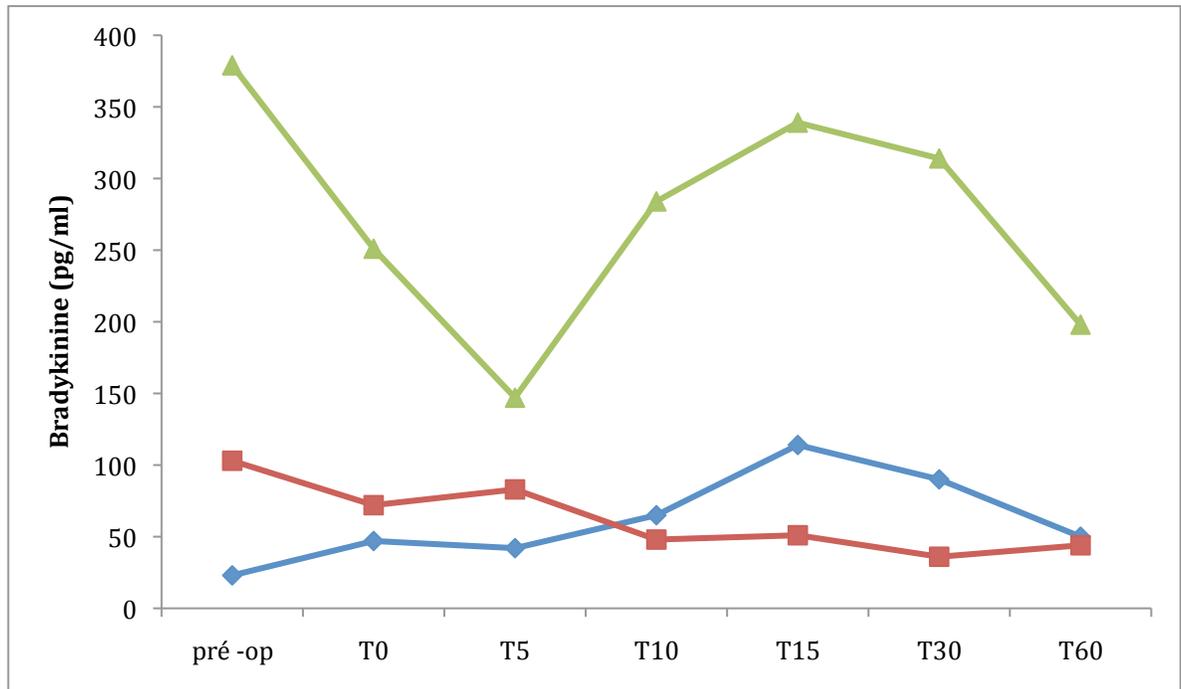


Figure 9 : Concentration en bradykinine pour 3 lapines ayant reçu du liquide amniotique (échantillons traités par ajout d'éthanol absolu au plasma)

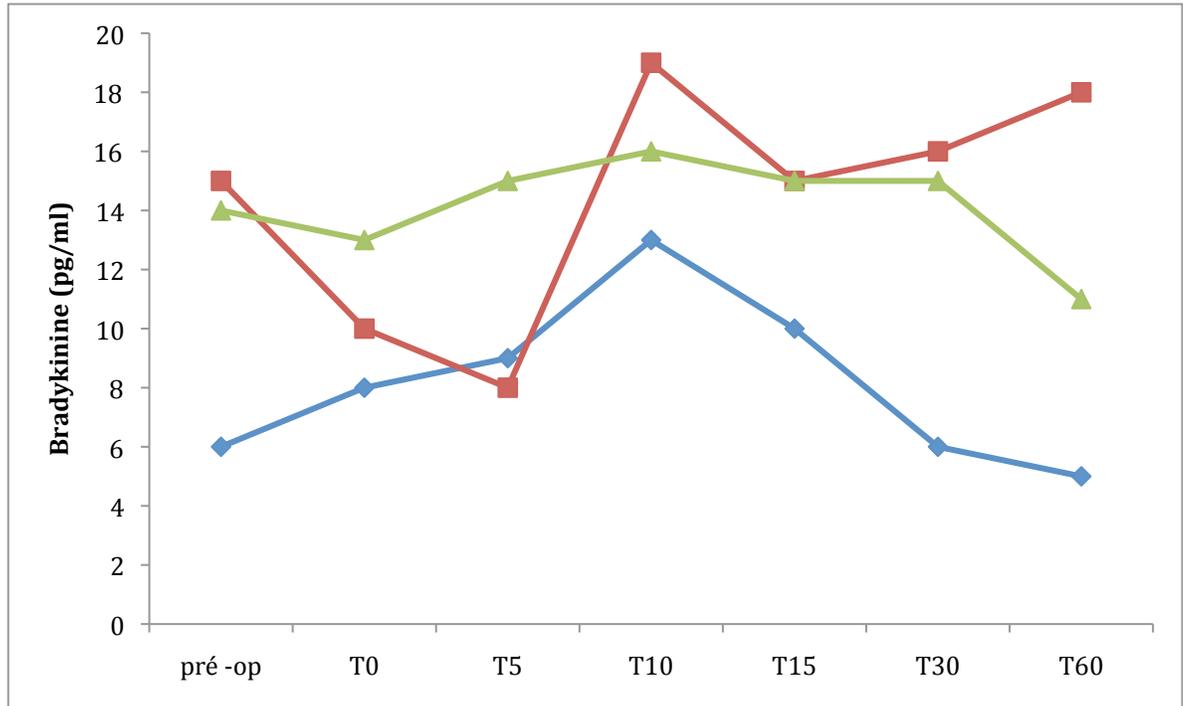


Figure 10 : Concentration en bradykinine pour 3 lapines ayant reçu du liquide amniotique (échantillons traités par l'ajout de l'éthanol absolu au sang total)

2. RESULTATS DE L'ETUDE *IN VITRO*

L'addition *in vitro* de liquide amniotique à du sang total citraté a entraîné la génération de bradykinine dès 10 minutes chez 4 des 5 lapines testées (figure 11) avec un retour aux valeurs de départ après 60 minutes. Dans ces 4 cas, la concentration maximum en bradykinine observée se situait entre 173 et 1051 pg/ml.

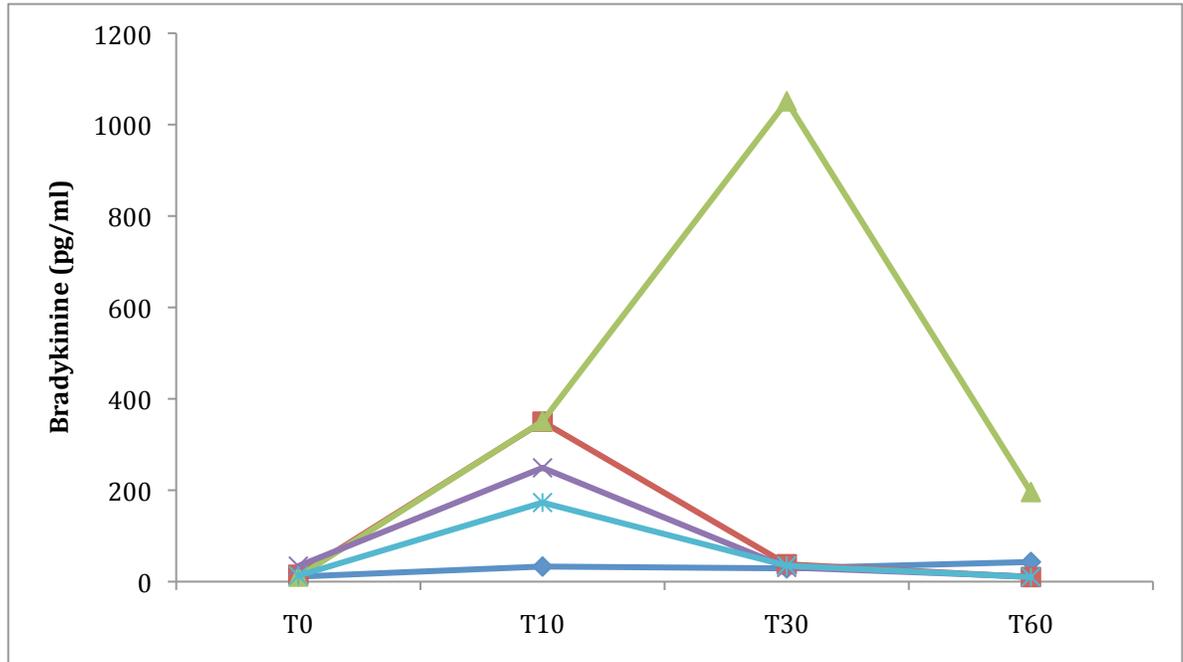


Figure 11 : Génération in vitro de bradykinine en fonction du temps après ajout de liquide amniotique et de CaCl_2 à du sang total citraté recueilli chez 5 lapines gestantes.

CHAPITRE 5 - DISCUSSION GENERALE

L'hypothèse selon laquelle la bradykinine pourrait jouer un rôle dans la physiopathologie du SELA a été formulée pour la première fois par l'équipe du Dr Rivard du centre hospitalier universitaire de Sainte-Justine à Montréal. Cette équipe avait en effet observé une consommation massive des capacités à générer de la bradykinine chez une femme présentant un SELA juste après l'apparition du choc hypotensif (Robillard et al., 2005). Dans notre étude nous n'avons pas pu reproduire les signes cliniques du SELA, ni entraîner une génération de bradykinine. Notre modèle animal utilisant la lapine gravide ne semble donc pas un bon choix pour étudier le lien possible entre les kinines et l'hypotension sévère observée lors de SELA. Néanmoins, notre étude ne permet pas d'exclure que ce lien existe lors de SELA. En effet, nous n'avons pas observé de génération massive de bradykinine chez les lapines recevant du liquide amniotique mais nous n'avons pas non plus observé d'hypotension sévère chez ces mêmes lapines.

L'absence de génération de bradykinine chez les lapines ayant reçu du liquide amniotique est étonnante puisque nous avons observé une génération de bradykinine chez une des lapines du projet pilote. La raison pour laquelle aucune cette génération n'a été notée chez les lapines de notre étude principale n'est pas clairement déterminée. La principale différence entre le projet pilote et l'étude principale est l'absence de stress foetal avant la ponction de liquide amniotique. Ce stress foetal avait été réalisé dans le but

de provoquer une contamination du liquide amniotique par du méconium mais, basé sur l'examen cytologique et l'apparence macroscopique du liquide (de couleur jaune), il semblait que ce stress n'avait pas induit de décharge de méconium. Nous avons donc décidé de ne pas inclure la phase de stress fœtal dans notre étude principal. Au vu des résultats de notre étude, il est possible que même si le stress fœtal ne semble pas entraîner une contamination du liquide amniotique par du méconium, il en ait modifié la composition ou entraîné une réponse physiologique particulière chez la mère. Ceci a pu avoir notamment pour effet de favoriser la génération de bradykinine. Il est donc possible que le stress fœtal soit une condition nécessaire ou tout du moins favorisante pour entraîner une génération de bradykinine.

Dans notre étude, les lapines étaient euthanasiées 60 minutes après l'injection de liquide amniotique. Il est donc possible que des manifestations tardives de l'embolie de liquide amniotique aient été manquées. Cependant, comme il est admis que les manifestations cardiovasculaires surviennent généralement très rapidement après l'embolie de liquide amniotique, il est peu probable que l'hypotension sévère et la génération de bradykinine qui pourrait y être associée aient été masquées par un temps d'expérimentation trop court.

La quantité de liquide amniotique qui rentre dans la circulation maternelle lors de SELA est inconnue. Dans notre étude, le volume de liquide amniotique injecté variait entre 1.0 et 2.5ml/kg. Il est possible qu'une telle quantité de liquide soit insuffisante pour

entraîner l'apparition de signes cliniques de SELA et une génération massive de bradykinine. Cependant la génération de bradykinine observée dans le projet pilote faisait suite à l'injection de 1ml/kg de liquide amniotique. De plus, chez certains modèles animaux des signes cliniques ont été observés après que moins de 2,5 ml/kg de liquide amniotique aient été injectés (Reis et al., 1969; Hankins et al., 1993; Petroianu et al., 1999).

Une autre explication possible à l'absence de génération de bradykinine dans notre étude est une différence d'espèce. Une étude a ainsi montré que le temps de demi-vie de la bradykinine était plus courte chez le lapin ($31 \pm 1s$) que chez l'homme ($49 \pm 2s$) et que la bradykinine était détruite à 94% par l'ECA chez le lapin alors qu'elle l'est à 76% chez l'homme (Decarie et al., 1996)(Decarie et al., 1996)(Decarie et al., 1996). Il est donc possible que le métabolisme des kinines, et notamment de la bradykinine, soit différent chez la femme enceinte et chez la lapine gravide. Il est également possible que le nombre ou la distribution des récepteurs à la bradykinine (B2) soient différents chez la lapine gravide et chez la femme enceinte. Enfin, le liquide amniotique de lapin peut être suffisamment différent du liquide amniotique humain pour qu'il n'induisse pas une génération suffisante de bradykinine chez la lapine pour entraîner une hypotension. Ce dernier point semble cependant moins probable car l'étude *in vitro* a clairement démontré qu'on observait une génération de bradykinine en mélangeant de liquide amniotique avec du sang total, Ces résultats sont identiques à une étude similaire utilisant

du sang humain et de liquide amniotique frais de femme et réalisée par l'équipe du Dr Rivard : dix minutes après l'ajout de 100µL de liquide amniotique à 400 µL de sang total citraté (additionné de chlorure de calcium) on observait un pic de concentration en bradykinine variant entre 700 et 2800 pg/ml (communication personnelle).

Chez la femme, on suspecte qu'il existe une prédisposition individuelle au SELA (Clark et al., 1995). Dans notre étude, il est possible que les lapines sélectionnées pour ne présentaient pas de prédisposition pour le SELA. Ceci pourrait être une explication de l'absence de génération de bradykinine et des signes cliniques observés lors de SELA.

L'étude *in vitro* sur la bradykinine de l'étude principale ainsi que les résultats obtenus chez la lapine 1 du projet pilote démontrent que la méthode de mesure de la bradykinine utilisée par l'équipe du Dr Thibault à HémaQuébec apparaît adéquate pour une mesure de la bradykinine chez le lapin. Un défaut dans la mesure de la bradykinine ne semble donc pas pouvoir expliquer l'absence de génération de bradykinine observée dans l'étude principale. Par contre, l'étude *in vivo* principale a clairement démontré que la concentration en bradykinine obtenue à partir des échantillons traités par un mélange direct du sang total avec l'éthanol absolu étaient très basses et significativement plus faibles que celles obtenues par mélange du plasma avec l'éthanol absolu. Il semble donc que le mélange direct entre le sang total et l'éthanol absolu ne soit pas la méthode adaptée pour traiter les échantillons utilisés pour doser la bradykinine. Il est possible que la présence de sang total altère l'action inhibitrice de l'éthanol sur les kininases et donc

entraîne une hydrolyse rapide et prolongée de la bradykinine. Cette hydrolyse se produit aussi probablement avec les échantillons pour lesquels l'éthanol est ajouté au plasma puisque l'éthanol est ajouté seulement un peu plus de dix minutes après la prise de sang. Les concentrations en bradykinine observées avec les échantillons obtenus après mélange du plasma avec l'éthanol absolu sont donc vraisemblablement inférieures aux réelles concentrations plasmatiques. Cependant, comme aucune courbe de concentration de bradykinine n'évoque la possibilité de génération de bradykinine même avec les échantillons traités à partir avec du plasma, il est peu probable que cela ait eu une influence suffisante pour masquer une production massive de bradykinine.

De manière à limiter l'hydrolyse rapide de la bradykinine, il aurait pu être intéressant d'ajouter dans nos tubes de prélèvements des inhibiteurs de protéases et de peptidase comme par exemple l'aprotinine. Dans leur étude portant sur le rôle de la bradykinine dans la physiopathologie de l'angioedème, Nussberger et al. récoltaient par exemple 5 ml de sang veineux de leur patients dans des tubes contenant 21 $\mu\text{mol/l}$ d'aprotinine, 73 $\mu\text{g/ml}$ d'inhibiteur de la trypsine de l'albumine de poulet, 305 $\mu\text{g/ml}$ de bromure d'hexadiméthrine, 4,5 mmol/l de 1-10 phénanthroline, et 4,5 mmol/l d'acide édétique (Nussberger et al., 1998).

Si notre modèle n'a pas permis de reproduire les signes cliniques cardiovasculaires et d'observer de génération de bradykinine, il a démontré que l'injection de liquide amniotique entraînait des déséquilibres hémostatiques. En effet, le seul changement significatif que nous avons observé a été une thrombocytopénie sévère et transitoire. Cette thrombocytopénie n'était pas associée à des modifications significatives des autres paramètres hémostatiques mesurés (PT, aPTT, AT, Facteur VIII ou fibrinogène). Cependant, pour les deux lapines du projet pilote, nous avons observé une augmentation significative rapide et transitoire de l'aPTT et une diminution significative rapide et transitoire de l'activité du facteur VIII chez une des lapines. De plus, l'étude in vitro utilisant la TEG a clairement démontré que l'addition de liquide amniotique de lapin à du sang de lapine gravide entraîne un tracé hypercoagulable comparé au tracé obtenu avec de la saline ; ce résultat confirme ceux déjà obtenus en utilisant du sang femme enceinte avec du liquide amniotique humain (Liu et al., 2000; Harnett et al., 2005). Basé sur l'ensemble de ces observations, la cause la plus probable de la thrombocytopénie transitoire est une agrégation plaquettaire réversible induite directement ou indirectement par le liquide amniotique. Il est possible que le liquide amniotique contienne une molécule qui active directement les plaquettes via un récepteur spécifique et provoque ainsi une agrégation temporaire. Cette molécule ainsi que le mécanisme par lequel elle active les plaquettes restent à déterminer. Il est également possible que le liquide amniotique active les plaquettes via la cascade de coagulation. En effet, il a été démontré que le liquide amniotique contient une quantité abondante de facteur tissulaire

(Lockwood et al., 1991; Uszynski et al., 2001). Il contient également du facteur VII, IX et X mais en moindre concentration que dans le sang (Lockwood et al., 1991; Uszynski et al., 2001). Étonnamment cette thrombocytopénie n'a pas été observée lors du projet pilote. Cette différence est difficile à expliquer.

Malgré ces résultats intéressants concernant l'hémostase, la lapine gravide n'apparaît pas comme un bon modèle animal du SELA, notamment pour étudier le rôle éventuel des kinines dans ce syndrome. Afin d'étudier ce rôle éventuel, un autre modèle serait à développer. L'étude effectuée par Petroianu et al qui utilisait le mini-cochon a démontré des résultats intéressants concernant ce point (Petroianu et al., 1999). L'article de Petroianu et al. ayant essentiellement porté sur les conséquences hémostatiques de l'injection de liquide amniotique, les conséquences cardiovasculaires ne sont pas fortement détaillées. Cependant, les auteurs rapportent des perturbations cardiovasculaires majeures dans le groupe des femelles mini-cochon ayant reçu du liquide amniotique contaminé par du méconium alors même que le protocole anesthésique établi visait à maintenir une pression artérielle moyenne entre 60 et 120 mmHg et une fréquence cardiaque entre 60 et 120 battements/minutes. Deux femelles sur 6 de ce groupe sont mortes suite à l'injection de liquide amniotique. Les conséquences de l'injection du liquide amniotique chez le mini-cochon semblent donc plus se rapprocher des conséquences de l'embolie de liquide amniotique chez la femme enceinte. Le modèle utilisant le mini-cochon semble donc plus adéquat pour étudier le SELA. De plus, les fœtus

porcins sont particulièrement sensibles à l'anoxie ce qui augmente notamment le risque de contamination du liquide amniotique par du méconium (Alonso-Spilsbury et al., 2005). Dans leur étude Petroianu et al. ont observé que pour chaque mini-truie de leur étude au moins un sac amniotique animal contenait du liquide amniotique contaminé par du méconium, et ce, alors qu'aucun stress particulier (à part le transport des truies gestantes) n'avait été effectué (Petroianu et al., 1999). L'utilisation de mini-truies permettrait donc d'étudier plus facilement les conséquences du stress foetal et de la présence du méconium sur la génération de bradykinine.

Conclusion

Notre modèle utilisant la lapine gravide n'a malheureusement pas permis de reproduire les signes du syndrome d'embolie de liquide amniotique. Il n'a pas non plus permis d'observer une génération massive et significative de bradykinine après l'injection de liquide amniotique. Il est donc impossible de déterminer à partir de notre étude si les kinines, et notamment la bradykinine, sont oui ou non impliquées dans le syndrome d'embolie de liquide amniotique.

De nouvelles études incluant le développement d'un nouveau modèle animal apparaissent donc nécessaires pour investiguer cette hypothèse. Le mini-cochon semble une espèce prometteuse dans ce champ de recherche.

Si ces nouvelles études venaient à confirmer le rôle de la bradykinine dans le SELA, cela ouvrirait de nouvelles voies thérapeutiques dans le traitement de ce syndrome. Des inhibiteurs de la génération de bradykinine comme l'aprotinine pourraient par exemple être utilisés.

Bibliographie

Abenhaim, H. A., L. Azoulay, et al. (2008). "Incidence and risk factors of amniotic fluid embolisms: a population-based study on 3 million births in the United States." Am J Obstet Gynecol **199**(1): 49 e1-8.

Adamsons, K., E. Mueller-Heubach, et al. (1971). "The innocuousness of amniotic fluid infusion in the pregnant rhesus monkey." Am J Obstet Gynecol **109**(7): 977-84.

Alfie, M. E., X. P. Yang, et al. (1996). "Salt-sensitive hypertension in bradykinin B2 receptor knockout mice." Biochem Biophys Res Commun **224**(3): 625-30.

Alonso-Spilsbury, M., D. Mota-Rojas, et al. (2005). "Perinatal asphyxia pathophysiology in pig and human: a review." Anim Reprod Sci **90**(1-2): 1-30.

Attwood, H. D. and E. S. Downing (1965). "Experimental Amniotic Fluid and Meconium Embolism." Surg Gynecol Obstet **120**: 255-62.

Azegami, M. and N. Mori (1986). "Amniotic fluid embolism and leukotrienes." Am J Obstet Gynecol **155**(5): 1119-24.

Benjamin, N., J. R. Cockcroft, et al. (1989). "Local inhibition of converting enzyme and vascular responses to angiotensin and bradykinin in the human forearm." J Physiol **412**: 543-55.

Biron-Andreani, C., E. Morau, et al. (2003). "Amniotic fluid embolism with haemostasis complications: primary fibrinolysis or disseminated intravascular coagulation?" Pathophysiol Haemost Thromb **33**(3): 170-1.

Blais, C., Jr., F. Marceau, et al. (2000). "The kallikrein-kininogen-kinin system: lessons from the quantification of endogenous kinins." Peptides **21**(12): 1903-40.

Bonner, G., S. Preis, et al. (1990). "Hemodynamic effects of bradykinin on systemic and pulmonary circulation in healthy and hypertensive humans." J Cardiovasc Pharmacol **15** **Suppl 6**: S46-56.

Brown, N. J., J. V. Gainer, et al. (2000). "Bradykinin stimulates tissue plasminogen activator release from human forearm vasculature through B(2) receptor-dependent, NO synthase-independent, and cyclooxygenase-independent pathway." Circulation **102**(18): 2190-6.

Brown, N. J., J. V. Gainer, et al. (1999). "Bradykinin stimulates tissue plasminogen activator release in human vasculature." Hypertension **33**(6): 1431-5.

Busse, R. and I. Fleming (1996). "Molecular responses of endothelial tissue to kinins." Diabetes **45** **Suppl 1**: S8-13.

Clark, S. L. (1990). "New concepts of amniotic fluid embolism: a review." Obstet Gynecol Surv **45**(6): 360-8.

Clark, S. L., G. D. Hankins, et al. (1995). "Amniotic fluid embolism: analysis of the national registry." Am J Obstet Gynecol **172**(4 Pt 1): 1158-67; discussion 1167-9.

Couture, R., M. Harrisson, et al. (2001). "Kinin receptors in pain and inflammation." Eur J Pharmacol **429**(1-3): 161-76.

Cron, R. S., G. S. Kilkenny, et al. (1952). "Amniotic fluid embolism." Am J Obstet Gynecol **64**(6): 1360-3.

Cruden, N. L. and D. E. Newby (2005). "Clots, kinins and coronaries." Atherosclerosis **183**(2): 189-98.

Cruden, N. L., F. N. Witherow, et al. (2004). "Bradykinin contributes to the systemic hemodynamic effects of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition in patients with heart failure." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(6): 1043-8.

Davies, S. (2001). "Amniotic fluid embolus: a review of the literature." Can J Anaesth **48**(1): 88-98.

Davis, A. J. and M. N. Perkins (1994). "The involvement of bradykinin B1 and B2 receptor mechanisms in cytokine-induced mechanical hyperalgesia in the rat." Br J Pharmacol **113**(1): 63-8.

Davis, C. and G. Burgess (2002). "The pharmacology of T-kinin and des-Arg(11)-T-kinin in primary cultures of rat bladder smooth muscle cells." Eur J Pharmacol **450**(2): 123-30.

de Freitas, F. M., E. Z. Faraco, et al. (1964). "General circulatory alterations induced by intravenous infusion of synthetic bradykinin in Man." Circulation **29**: 66-70.

Decarie, A., P. Raymond, et al. (1996). "Serum interspecies differences in metabolic pathways of bradykinin and [des-Arg9]BK: influence of enalaprilat." Am J Physiol **271**(4 Pt 2): H1340-7.

Duka, I., E. Kintsurashvili, et al. (2001). "Vasoactive potential of the b(1) bradykinin receptor in normotension and hypertension." Circ Res **88**(3): 275-81.

Dutta, D., K. C. Bhargava, et al. (1970). "Therapeutic studies in experimental amniotic fluid embolism in rabbits." Am J Obstet Gynecol **106**(8): 1201-8.

el Maradny, E., N. Kanayama, et al. (1995). "Endothelin has a role in early pathogenesis of amniotic fluid embolism." Gynecol Obstet Invest **40**(1): 14-8.

Estelles, A., J. Gilabert, et al. (1990). "Plasminogen activator inhibitors type 1 and type 2 and plasminogen activators in amniotic fluid during pregnancy." Thromb Haemost **64**(2): 281-5.

Farhy, R. D., K. L. Ho, et al. (1992). "Kinins mediate the antiproliferative effect of ramipril in rat carotid artery." Biochem Biophys Res Commun **182**(1): 283-8.

Fineschi, V., R. Gambassi, et al. (1998). "The diagnosis of amniotic fluid embolism: an immunohistochemical study for the quantification of pulmonary mast cell tryptase." Int J Legal Med **111**(5): 238-43.

Gist, R. S., I. P. Stafford, et al. (2009). "Amniotic fluid embolism." Anesth Analg **108**(5): 1599-602.

Halmagyi, D. F., B. Starzecki, et al. (1962). "Experimental amniotic fluid embolism: mechanism and treatment." Am J Obstet Gynecol **84**: 251-6.

Hankins, G. D., R. R. Snyder, et al. (1993). "Acute hemodynamic and respiratory effects of amniotic fluid embolism in the pregnant goat model." Am J Obstet Gynecol **168**(4): 1113-29; discussion 1129-30.

Harnett, M. J., D. L. Hepner, et al. (2005). "Effect of amniotic fluid on coagulation and platelet function in pregnancy: an evaluation using thromboelastography." Anaesthesia **60**(11): 1068-72.

Honing, M. L., P. Smits, et al. (2000). "Bradykinin-induced vasodilation of human forearm resistance vessels is primarily mediated by endothelium-dependent hyperpolarization." Hypertension **35**(6): 1314-8.

Hornig, B., C. Kohler, et al. (1997). "Role of bradykinin in mediating vascular effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors in humans." Circulation **95**(5): 1115-8.

Ishiyama, I., M. Mukaida, et al. (1986). "Analysis of a case of generalized amniotic fluid embolism by demonstrating the fetal isoantigen (A blood type) in maternal tissues of B blood type, using immunoperoxidase staining." Am J Clin Pathol **85**(2): 239-41.

Jaques, W. E., J. W. Hampton, et al. (1960). "Pulmonary hypertension and plasma thromboplastin-antecedent deficiency in dogs. Experimental induction by infusion of amniotic fluid." Arch Pathol **69**: 248-56.

Jiang, Y. P., W. Muller-Esterl, et al. (1992). "Domain 3 of kininogens contains a cell-binding site and a site that modifies thrombin activation of platelets." J Biol Chem **267**(6): 3712-7.

Kanayama, N., T. Yamazaki, et al. (1992). "Determining zinc coproporphyrin in maternal plasma--a new method for diagnosing amniotic fluid embolism." Clin Chem **38**(4): 526-9.

Karnak, I., S. Muftuoglu, et al. (1999). "Organ growth and lung maturation in rabbit fetuses." Res Exp Med (Berl) **198**(5): 277-87.

Kitzmilller, J. L. and W. E. Lucas (1972). "Studies on a model of amniotic fluid embolism." Obstet Gynecol **39**: 626-627.

Kobayashi, H., H. Ooi, et al. (1997). "Histological diagnosis of amniotic fluid embolism by monoclonal antibody TKH-2 that recognizes NeuAc alpha 2-6GalNAc epitope." Hum Pathol **28**(4): 428-33.

Kramer, M. S., J. Rouleau, et al. (2006). "Amniotic-fluid embolism and medical induction of labour: a retrospective, population-based cohort study." Lancet **368**(9545): 1444-8.

Kuga, T., M. Mohri, et al. (1997). "Bradykinin-induced vasodilation of human coronary arteries in vivo: role of nitric oxide and angiotensin-converting enzyme." J Am Coll Cardiol **30**(1): 108-12.

Kuhlman, K., D. Hidvegi, et al. (1985). "Is amniotic fluid material in the central circulation of peripartum patients pathologic?" Am J Perinatol **2**(4): 295-9.

Lee, S. E., R. Romero, et al. (2008). "Amniotic fluid prostaglandin concentrations increase before the onset of spontaneous labor at term." J Matern Fetal Neonatal Med **21**(2): 89-94.

Lim, Y., C. C. Loo, et al. (2004). "Recombinant factor VIIa after amniotic fluid embolism and disseminated intravascular coagulopathy." Int J Gynaecol Obstet **87**(2): 178-9.

Liu, E. H., S. Shailaja, et al. (2000). "An assessment of the effects on coagulation of midtrimester and final-trimester amniotic fluid on whole blood by Thrombelastograph analysis." Anesth Analg **90**(2): 333-6.

Lockwood, C. J., R. Bach, et al. (1991). "Amniotic fluid contains tissue factor, a potent initiator of coagulation." Am J Obstet Gynecol **165**(5 Pt 1): 1335-41.

Lunetta, P. and A. Penttila (1996). "Immunohistochemical identification of syncytiotrophoblastic cells and megakaryocytes in pulmonary vessels in a fatal case of amniotic fluid embolism." Int J Legal Med **108**(4): 210-4.

MacMillan, D. (1968). "Experimental amniotic fluid infusion." J Obstet Gynaecol Br Commonw **75**(8): 849-52.

Maher, J. E., K. D. Wenstrom, et al. (1994). "Amniotic fluid embolism after saline amnioinfusion: two cases and review of the literature." Obstet Gynecol **83**(5 Pt 2): 851-4.

Marceau, F. and D. R. Bachvarov (1998). "Kinin receptors." Clin Rev Allergy Immunol **16**(4): 385-401.

Masson, R. G. (1992). "Amniotic fluid embolism." Clin Chest Med **13**(4): 657-65.

McDonnell, N. J., B. O. Chan, et al. (2007). "Rapid reversal of critical haemodynamic compromise with nitric oxide in a parturient with amniotic fluid embolism." Int J Obstet Anesth **16**(3): 269-73.

Meyer, J. (1926). "Embolia pulmonar amnio caseosa." Bra Med **2**: 301-303.

Modena, A. B. and S. Fieni (2004). "Amniotic fluid dynamics." Acta Biomed **75 Suppl 1**: 11-3.

Moore, J. and M. R. Baldisseri (2005). "Amniotic fluid embolism." Crit Care Med **33**(10 Suppl): S279-85.

Moreau, M. E., N. Garbacki, et al. (2005). "The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets." J Pharmacol Sci **99**(1): 6-38.

Moreau, M. E., L. Thibault, et al. (2007). "Generation of kinins during preparation and storage of whole blood-derived platelet concentrates." Transfusion **47**(3): 410-20.

Morgan, M. (1979). "Amniotic fluid embolism." Anaesthesia **34**(1): 20-32.

Nishio, H., K. Matsui, et al. (2002). "A fatal case of amniotic fluid embolism with elevation of serum mast cell tryptase." Forensic Sci Int **126**(1): 53-6.

Nussberger, J., M. Cugno, et al. (1998). "Plasma bradykinin in angio-oedema." Lancet **351**(9117): 1693-7.

O'Shea, A. and S. Eappen (2007). "Amniotic fluid embolism." Int Anesthesiol Clin **45**(1): 17-28.

Okamoto, H. and L. M. Greenbaum (1983). "Isolation and structure of T-kinin." Biochem Biophys Res Commun **112**(2): 701-8.

Pellacani, A., H. R. Brunner, et al. (1994). "Plasma kinins increase after angiotensin-converting enzyme inhibition in human subjects." Clin Sci (Lond) **87**(5): 567-74.

Petroianu, G. A., S. H. Altmannsberger, et al. (1999). "Meconium and amniotic fluid embolism: effects on coagulation in pregnant mini-pigs." Crit Care Med **27**(2): 348-55.

Poggi, S. H. and A. Ghidini (2009). "Pathophysiology of meconium passage into the amniotic fluid." Early Hum Dev **85**(10): 607-10.

Reeves, J. T., F. S. Daoud, et al. (1974). "Pulmonary pressor effects of small amounts of bovine amniotic fluid." Respir Physiol **20**(2): 231-7.

Regoli, D., A. Rizzi, et al. (2001). "Classification of kinin receptors." Biol Chem **382**(1): 31-5.

Reis, R. L., W. S. Pierce, et al. (1969). "Hemodynamic effects of amniotic fluid embolism." Surg Gynecol Obstet **129**(1): 45-8.

Robillard, J., F. Gauvin, et al. (2005). "The syndrome of amniotic fluid embolism: a potential contribution of bradykinin." Am J Obstet Gynecol **193**(4): 1508-12.

Schneider, C. L. (1955). "Coagulation defects in obstetric shock: meconium embolism and heparin; fibrin embolism and defibrination." Am J Obstet Gynecol **69**(4): 758-75.

Sharma, J. N. (2006). "Role of tissue kallikrein-kininogen-kinin pathways in the cardiovascular system." Arch Med Res **37**(3): 299-306.

Sinicina, I., H. Pankratz, et al. (2009). "Forensic aspects of post-mortem histological detection of amniotic fluid embolism." Int J Legal Med.

Spence, M. R. and K. G. Mason (1974). "Experimental amniotic fluid embolism." Am J Obstet Gynecol **119**(8): 1073-1078.

Stanten, R. D., L. I. Iverson, et al. (2003). "Amniotic fluid embolism causing catastrophic pulmonary vasoconstriction: diagnosis by transesophageal echocardiogram and treatment by cardiopulmonary bypass." Obstet Gynecol **102**(3): 496-8.

Steiner, P. E. and C. C. Lushbaugh (1941). "Maternal pulmonary embolism by amniotic fluid as a cause of obstetric shock and unexpected deaths in obstetrics." JAMA **117**: 1245-54, 1341-5.

Stolte, L., H. van Kessel, et al. (1967). "Failure to produce the syndrome of amniotic fluid embolism by infusion of amniotic fluid and meconium into monkeys." Am J Obstet Gynecol **98**(5): 694-7.

Stroup, J., D. Haraway, et al. (2006). "Aprotinin in the management of coagulopathy associated with amniotic fluid embolus." Pharmacotherapy **26**(5): 689-93.

Tait, J. F. and K. Fujikawa (1987). "Primary structure requirements for the binding of human high molecular weight kininogen to plasma prekallikrein and factor XI." J Biol Chem **262**(24): 11651-6.

Tan, S., Y. Y. Liu, et al. (1996). "Maternal infusion of antioxidants (Trolox and ascorbic acid) protects the fetal heart in rabbit fetal hypoxia." Pediatr Res **39**(3): 499-503.

Tramoni, G., S. Valentin, et al. (2004). "Amniotic fluid embolism during caesarean section." Int J Obstet Anesth **13**(4): 271-4.

Tuffnell, D. J. (2005). "United kingdom amniotic fluid embolism register." BJOG **112**(12): 1625-9.

Underwood, M. A., W. M. Gilbert, et al. (2005). "Amniotic fluid: not just fetal urine anymore." J Perinatol **25**(5): 341-8.

Uszynski, M., E. Zekanowska, et al. (2006). "Protein C, protein S, and thrombomodulin in amniotic fluid. A preliminary study." J Perinat Med **34**(4): 289-92.

Uszynski, M., E. Zekanowska, et al. (2001). "Tissue factor (TF) and tissue factor pathway inhibitor (TFPI) in amniotic fluid and blood plasma: implications for the mechanism of amniotic fluid embolism." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **95**(2): 163-6.

Wotherspoon, F., D. L. Browne, et al. (2005). "The contribution of nitric oxide and vasodilatory prostanoids to bradykinin-mediated vasodilation in Type 1 diabetes." Diabet Med **22**(6): 697-702.

Zhao, Y., Q. Qiu, et al. (2001). "Assembly and activation of HK-PK complex on endothelial cells results in bradykinin liberation and NO formation." Am J Physiol Heart Circ Physiol **280**(4): H1821-9.

Zhou, J., S. Liu, et al. (2009). "Procoagulant activity and phosphatidylserine of amniotic fluid cells." Thromb Haemost **101**(5): 845-51.