

## Compte rendu de la 11<sup>ème</sup> journée du Club des biologistes en hémostasie

Cette réunion s'est tenue le 3 juin 2016 et a rassemblé 28 biologistes.

### 1. Pharmacocinétique de population : quel intérêt dans l'hémophilie? Claire Pouplard (Tours)

La pharmacocinétique (PK) de population est un nouvel outil mis à notre disposition pour évaluer les nouveaux traitements de substitution anti-hémophiliques. Depuis longtemps, nous utilisons pour nos patients une PK individuelle qui nécessite de nombreux prélèvements, ces derniers ne devant être réalisés ni trop tôt ni trop tard.

L'équation mathématique pour le calcul d'une demi-vie est simple :

$$t_{1/2} = \ln 2 / K_e \text{ avec } K_e = \frac{\ln C_1 - \ln C_2}{t_2 - t_1}$$

Un logiciel simple validé par Bayer (OPTIMS<sup>®</sup>) permet de saisir simplement les concentrations mesurées aux différents temps pour calculer les demi-vies. Le logiciel calcule également la récupération, clairance et aire sous la courbe.

En plus des modèles individuels auxquels nous sommes habitués, il existe aussi la "pharmacocinétique de population" ou "régression non linéaire à effet mixte". Dans cette approche, l'analyse des données porte d'emblée sur l'ensemble des individus, d'où le terme de population.

Une PK de population doit posséder deux phases : tout d'abord la construction d'un **modèle structural**. Celui-ci sera réalisé à partir des données obtenues chez de nombreux patients (50 à 200). Cette population doit être hétérogène en termes d'âge, de poids, etc ... Le nombre de prélèvements par individu peut être faible et très espacé dans le temps. Ainsi, pour un même individu des temps obtenus 4 h, 8 h ou 24 h après injections, peuvent être prélevés après des injections différentes. Cependant, sur l'ensemble de la population, les points obtenus doivent recouvrir le profil complet de la PK.

Le **modèle de PK** de population va donc prendre en compte tous les individus simultanément. Il s'agira du **modèle structural** qui sera enrichi par les modèles des **co-variables** qui intègrent les caractéristiques physiologiques, biologiques et pharmacologiques du patient (âge, poids, sexe, fonction rénale, fonction hépatique, alimentation, tabac, etc ...).

La **variabilité inter-individuelle** constituera un autre paramètre à prendre en compte dans la construction d'un modèle de PK de population. Elle représente l'écart entre la valeur d'un paramètre de PK chez un sujet  $i$  ( $CL_i$ ) et la valeur moyenne de ce même paramètre dans la population ( $CL_{pop}$ ). Cette variabilité inter individuelle, comme toutes les co-variables, suivent une loi normale centrée sur zéro. Enfin, la **variabilité intra-individuelle** (ou **erreur résiduelle**) sera également prise en compte. Celle-ci est due aux erreurs analytiques et pré-analytiques (CV du dosage, heure de prélèvement, temps d'acheminement, etc ...).

Ainsi la modélisation mathématique du **modèle structural + modèle des co-variables + modèle inter-individuel + erreurs résiduelles**, permettront la construction d'un modèle de PK de population pour un médicament donné.

La construction d'un tel modèle va permettre dans un second temps d'obtenir pour un patient qui reçoit ce médicament des données de PK avec un nombre très limité de

points de PK (données pauvres) qui, sans une approche de PK de population, ne nous aurait pas permis de calculer les paramètres de pharmacocinétique.

Il est important de souligner que le modèle de PK de population est construit pour un type de médicament. Ainsi, une PK de population décrite pour un FVIII recombinant non délété ne peut être utilisée chez un patient traité un rFVIII B délété de demi-vie prolongé ou non. A ce jour, un consortium canadien WAPPS – HEMO (Mc Master University, Hamilton) piloté par Alfonso Lorio propose un réseau international (WAPPS – NETWORK) pour enrichir les modèles de PK de population construites avec les différents produits anti-hémophiliques (FVIII, FIX) long acting ou non.

La participation à ce réseau permet à chacun, à la fois d'enrichir la base de données avec ses données mais aussi de bénéficier de modèles de PK construits pour obtenir des données de PK pour un patient avec des données pauvres.

## **2. Une histoire de facteur V. Martine Alhenc Gelas (HEGP)**

FV East Texas (*Quang SQ et al Blood 2001;97: 1549; Vincent LM et al J Clin Invest 2013; 123: 3777*)

Cette anomalie génétique a été mise en évidence dans une famille qui présentait une symptomatologie hémorragique modérée, de transmission autosomale dominante. La mutation responsable se situe dans l'exon 13 du gène *F5* et entraîne l'apparition dans le plasma d'un FV tronqué résultant d'un épissage alternatif. Ce FV tronqué circule associé au TFPI et inhibe la génération de thrombine ; de plus le TFPI plasmatique est augmenté, ce qui peut expliquer le risque hémorragique accru. Le bilan initial de coagulation des sujets symptomatiques ne révélait aucune anomalie excepté TP et TCA anormaux. Les auteurs ont alors réalisé des TGT (à faible concentration de FT, 1.4pM; 10uM PL) dont les profils étaient anormaux. Les études complémentaires génétiques et plasmatiques (immunoblots, TGT sur mélanges etc..) ont permis de comprendre les mécanismes mis en jeu.

FV Amsterdam (*Cunha MLR et al Blood 2015; 125: 1822*)

Une autre mutation du FV, très proche de la première, est susceptible d'expliquer (par les mêmes mécanismes) la symptomatologie hémorragique modérée observée dans une deuxième famille. Le TGT (CAT 1pmFT, 4uM PL) a là encore eu une place primordiale dans l'exploration des patients.

## **3. Valeurs de référence des tests globaux de coagulation chez les enfants de moins de 12 mois : données de la littérature et projet d'étude. Marie Françoise Hurtaud (Robert Debré) et Dominique Lasne (Necker)**

Les laboratoires de biologie médicale doivent utiliser des intervalles de référence biologique déterminés localement ou issus d'études bibliographiques pour permettre l'interprétation des résultats et la prise de décisions cliniques. Ces valeurs de référence adaptées à l'âge doivent figurer sur les comptes rendus de résultats. Dans le cadre de l'homogénéisation de nos pratiques à l'Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (AP-HP), nous avons réalisé une revue de la littérature internationale pour mettre à jour et harmoniser dans nos laboratoires les valeurs de références chez l'adulte (sujets de plus de 15 ans) pour les tests globaux et pour le dosage des principaux facteurs de la coagulation (facteurs pro-coagulants et inhibiteurs) (présentation affichée SFH 2013). Le même travail a été entrepris chez l'enfant de moins de 16 ans. Les données de la littérature permettent de définir les valeurs de référence pédiatriques pour les facteurs de la coagulation (tableau 1). En revanche, les données sont insuffisantes pour les tests globaux (TP, TCA) chez l'enfant de

moins de 12 mois et les pratiques concernant le choix des tests à réaliser et l'interprétation des résultats sont hétérogènes. Les études réalisées chez l'enfant mettent en avant les difficultés dans la réalisation et l'interprétation d'un bilan d'hémostase en période néonatale et chez le jeune enfant. Compte tenu de ces difficultés d'interprétation des bilans d'hémostase en pédiatrie et particulièrement durant la période néonatale, seuls les bilans d'hémostase utiles pour la prise en charge immédiate du patient doivent être réalisés. Il est également indispensable de tenir compte des difficultés de prélèvement et des particularités pré-analytiques comme les hémocrites élevés en période néonatale pour l'interprétation des résultats. Les dernières recommandations pour le prélèvement d'hémostase du GFHT précisent les conditions de prélèvement recommandées en pédiatrie ([site.geht.org/site/Groupes-de-travail/Les-Groupes-de-travail/Accreditation-en-hemostase-et-pre-analytique-/Revision-des-recommandations-pre-analytiques-en-hemostase-octobre-2015\\_114\\_870.html](http://site.geht.org/site/Groupes-de-travail/Les-Groupes-de-travail/Accreditation-en-hemostase-et-pre-analytique-/Revision-des-recommandations-pre-analytiques-en-hemostase-octobre-2015_114_870.html)).

Les tests globaux de l'hémostase sont importants en pédiatrie dans le cadre d'un bilan préopératoire qui reste obligatoire chez l'enfant avant l'âge de la marche (*Recommandations formalisées d'experts SFAR 2012: Examens pré-interventionnels systématiques*) ou devant un syndrome hémorragique, notamment pour guider la transfusion. C'est pourquoi nous allons réaliser une étude prospective ayant pour objectif principal de déterminer les valeurs de référence des tests globaux de coagulation chez les enfants sains de 0 à 12 mois et pour objectif secondaire de déterminer l'influence du couple « analyseur/réactifs » sur les résultats. Les tranches d'âge étudiées seront les suivantes : 0 à 7 jours ; 8 à 30 jours ; 1 à 3 mois ; 3 à 6 mois ; 6 à 12 mois. Les examens réalisés seront le TP, le TCA, le fibrinogène et les DDimères. Seront inclus les enfants prématurés ou nés à terme, de moins de 12 mois, sains, devant bénéficier d'un bilan d'hémostase, prélevés dans les services de Néonatalogie et consultations d'Anesthésie des hôpitaux Robert Debré, Necker, Bicêtre, Trousseau et la fondation Rothschild. Nous travaillerons sur « des fonds de tubes ». Une lettre d'information sera remise aux titulaires de l'autorité parentale avant de leur faire signer un consentement éclairé. L'objectif est d'avoir au minimum 20 échantillons dans chaque tranche d'âge comme le recommande le *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, C28A3 guideline).

**Tableau 1 : articles analysés**

Andrew M, Blood 1987	Nné à terme
Andrew M, Blood 1988	Nné préma.
Andrew M. Blood 1992	1 à 16 ans
De Saint Blanquat. Paed Anesth 2002	144 prématurés
Le Roux. Pediatr anaesthesia 2002	751/958 enfants
Salonvaara, Thromb Haemost, 2004	Nné (petit poids)
Flanders MM, Clin. Chem. 2005	7 à 17 ans
Flanders MM, J Pediatrics 2006	7 à 17 ans (cptl étude de 2005)
Monagle P. Thromb Haemost 2006	0 à 16 ans
Mitsiakos G. Thrombosis Research, 2010	Nné à terme
Appel IM. J Thromb Haemost 2012	1 à 18 ans
Attard C. J Thromb Haemost 2013	0 à 16 ans (cptl Monagle 2006)
Neary E. Neonatology 2013	Nné préma
Christensen RD, Transfusion 2014	Nné préma
Toulon P, Thromb Haemost, 2016	15 jours à 17 ans

#### 4. Conductrice d'hémophilie A : Yes or No ? Catherine Costa (Cochin), Claire Flaujac (Versaille)

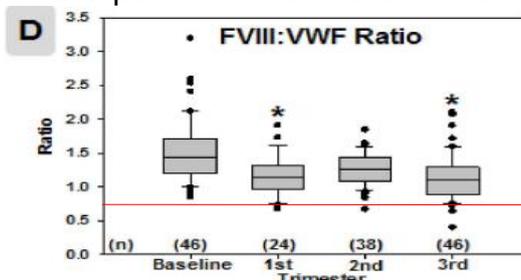
Cette présentation fait suite aux questions suscitées par différents cas cliniques :

- problème d'interprétation des taux de FVIII, des ratios FVIII/VWF :Ag surtout en cours de grossesse chez des femmes pour lesquelles l'histoire familiale est inconnue ou il n'y a pas d'hémophilie connue dans la famille
- problème de l'homogénéité des informations biologiques et cliniques à transmettre lors de l'envoi des études de gène *F8* et sensibilisation de nos collègues biologistes pour transmettre les informations à posteriori lorsque les résultats sont disponibles!
- quelques éléments sur les corrélations génotypes/phénotypes chez les femmes conductrices d'hémophilies

Diagnostic de conductrice hémophilie : Préférable d'avoir l'information en dehors de la grossesse :

- Forte charge émotionnelle
- Difficulté d'interprétation des phénotypes lorsque la grossesse est débutée
- Accès au conseil génétique
- Il est recommandé de génotyper tous les patients hémophiles quel que soit leur sévérité car le génotypage est indispensable pour le conseil génétique d'une maladie de transmission récessive liée à l'X (*ukcdo.org*)
- Un taux normal de FVIII n'élimine pas un diagnostic de conduction d'hémophilie puisque 1/3 des conductrices ont une hémostase normale. Les taux moyen de FVIII en dehors de la grossesse sont de 60% avec des extrêmes de 5-219% selon *Plug et al (Blood 2006)* ou 70 % avec des écarts interquartiles de 51-103% selon *Ay et al. (Hemophilia 2010)*.
- Les taux de FVIII sont multipliés par 2 environ entre le début de la grossesse et la fin de la grossesse chez les femmes non conductrices (*Sie et al. BJH 2003 ; Drury-Stewart et al. PLOS ONE, nov 2014*)
- Peu de données dans la littérature, mais on retrouve des données similaires pour les femmes conductrices (*Angela Pereira et al. abstract WOM15, ISTH 2015*) ou *étude locale au centre hospitalier de Versailles (C.Flaujac, E de Raucourt et A. Rafowicz)* (n=90 femmes conductrices, 38 grossesses analysées) : Avant grossesse FVIII moyen =35% [15-78] et au 3<sup>ème</sup> T (30SG) FVIII moyen =95% [35-162].

→ Le FVIII augmente pendant la grossesse mais un FVIII <120% au troisième trimestre doit peut être attiré l'attention des biologistes?



- Le ratio FVIII/VWF:Ag diminue au cours de la grossesse chez une femme non conductrice (*Drury-Stewart et al. PLOS ONE, nov 2014*) avec un ratio pouvant être <0.6. Au cours de la grossesse le taux de VWF augmente ainsi que sa demi-vie.

- Doit-on continuer de rendre le ratio FVIII/VWF :Ag sur les CR du laboratoire chez les femmes enceintes ? La majorité des biologistes présents lors de la réunion le font, certains ne le font plus exemple Rouen, d'autres ne l'ont jamais fait. Ne pas rendre les ratios au 3<sup>ème</sup> T évite peut être un stress pour la femme et les équipes médicales amenées à prendre en charge les patients si les taux de FVIII sont satisfaisants. Les recos des anesthésistes sont de ne plus faire de bilan « pré-péridurale » mais il reste encore des équipes très attachées à ces bilans. Un travail de juste prescription des analyses reste à faire.

### **Corrélations phénotypes/génotypes et limites du génotypage.**

Le laboratoire de génétique reçoit régulièrement des demandes d'étude génétique du gène *F8* pour des patientes présentant des taux diminués de FVIII :C, des antécédents « nébuleux » d'hémophilie, des antécédents de saignements familiaux...ces patientes sont parfois enceintes.

Sont présentés les résultats de l'étude génotypique réalisée chez 80 patientes, dont 36 femmes enceintes 36/80 = 45%. Le génotypage n'est finalement réalisé que chez 71 patientes car 9 patientes présentent : VWD 2N (5) VWD (1) def V+VIII (1) autre (1)

- Le bilan de l'étude génétique des 71 patientes montre une **étude génétique positive chez 45% et une étude génétique négative chez 55%.** La question posée est alors : **l'étude est négative car la patiente n'est pas conductrice ou bien l'analyse n'a pas permis d'identifier la mutation délétère ?** Pour mémoire dans les formes sévères l'étude génétique permet d'identifier 98% des mutations responsables et ce taux passe environ à 90 et 85% dans les formes modérées et mineure.
- La répartition des indications d'étude et du taux de positivité montre que l'étude génétique est positive surtout dans 3 indications principales.

Indications	Nbre de patientes étudiées	Nbre de patientes avec mutation identifiée	
Femme seule à taux bas avec ATCD	8	7/8 (87.5%)	<b>On trouve surtout</b>
Femme seule taux bas + discordance FVIII/VWF :Ag et sans ATCD	17	11/17 (65%)	
Femme seule discordance FVIII/VWF :Ag avec ATCD	6	3/6 (50%)	
Femme seule à taux bas sans ATCD	33	10/33 (30%)	Zone grise
Femme seule avec ATCD Taux NI	6	1/6 (16%)	
Femme seule avec ATCD A ou B Taux NI	6	0	<b>On ne trouve pas</b>
Femme seule avec ATCD possible Taux NI	2	0	
Femme seule avec ATCD Taux inconnu	2	0	
Femme seule Willebrand à taux bas sans ATCD	1	0	

- L'identification d'une mutation est importante car elle permet de poser un diagnostic vis-à-vis d'un éventuel statut de conductrice d'hémophilie et surtout permet de définir la sévérité associée. Dans cette étude ont été identifiées :
  - 23/33 mutations déjà répertoriées dans les bases de données internationales ou dans la cohorte du réseau GENOSTASE. Neuf mutations associées à une forme sévère et 14 identifiées dans des formes modérées, modérées/mineures ou mineures.
  - 10/33 mutations nouvelles dont le caractère délétère et la forme de l'hémophilie associée est difficile à prédire. 7/10 sont identifiées chez des femmes enceintes. Quel impact pour le conseil génétique ?
- L'étude des caractéristiques phénotypiques des patientes de cette étude permet-elle de définir des valeurs seuils ? Mais toutes les données ne sont pas renseignées et il est difficile de faire une exploitation rigoureuse et surtout d'en tirer des conclusions.

Etude globale		
Etude Génétique	FVIII : C moyenne	Ratio FVIIIc/vWF
Positive	34 (n=24/34)	0,48 (n=12/34)
Négative	41 (n=21/44)	0,54 (n=11/44)
Femmes enceintes		
Etude Génétique	FVIII : C moyenne	Ratio FVIIIc/vWF
Positive n=13	35 (n=9/13)	0,49 (n=5/13)
Négative n=24	62 (n=11/24)	0,54 (n=8/24)
		0,55 n=11/24
Femmes hors grossesse		
Etude Génétique	FVIII : C moyenne	Ratio FVIIIc/vWF
Positive n=21	34 (n=16/21)	0,48 (n=7/21)
		0,51 (n=12/21)
Négative n=23	36 (n=14/23)	0,53 (n=4/23)
		0,67 (n=7/23)

- Ce que l'on sait :
  - 30% des conductrices ont une hémostase normale
  - L'inactivation du chromosome X :  
Inactivation équilibrée au hasard 50%/50%.  
Il existe un biais modéré chez environ 8% de la population générale 80%/20%.  
L'inactivation est hautement biaisée chez environ 1 à 5% des femmes de moins de 50 ans et 20 à 30% chez les femmes de plus de 60 ans : Le biais augmente avec l'âge.  
Attention le biais varie dans un sens ou un autre...
  - L'influence du groupe sanguin O
  - L'influence de la grossesse
  - Sensibilité de l'étude génétique dans les formes sévères 98%, mais dans les formes modérées et mineures ~90% et ~ 85%.

- Selon la discussion il est impératif que la feuille de renseignements cliniques comportant les données rappelées ci-après soit complètement remplie. Dans le service de génétique nous sommes bien conscients que ces renseignements ne sont pas disponibles au moment de l'envoi de la demande d'étude génétique, mais ceux-ci doivent nous être communiqués dès que possible pour nous permettre d'interpréter nos résultats.
- Une étude de ces renseignements sur deux cohortes distinctes de patientes conductrices et d'apparentées négatives serait nécessaire en tenant compte du statut de grossesse et du terme.
- Rappel des informations minimales à transmettre pour étude génétique :
  - Hémophilie? arbre généalogique?
  - Groupe sanguin: ..... (intérêt pour l'interprétation avant le 3<sup>ème</sup> T)
  - Grossesse : oui /non ; terme de la grossesse:.....
  - Sexe de l'enfant attendu:.....
  - Taux FVIII: .....%
  - Taux VWF:Ag: .....%
  - Taux VWF:RCo ou Act : .....%
  - Ratio FVIII/VWF :Ag: intérêt si avant le 3<sup>ème</sup> T?
  - Liaison FVIII/VWF :Ag :.....%

## **5. Intérêts pratiques et réglementaires d'une stratégie bayésienne de gestion des résultats des CQI au long cours. Frédéric Sobas (Lyon) avec la collaboration de Panagiotis Tsiamyrtzis et Kostas Bourazas (Université Athènes)**

Cette présentation s'est faite en deux volets. La première partie a porté sur une relecture critique des chapitres 5.6.2.2 et 5.6.2.3 de la norme concernant la gestion des contrôles de qualité interne (CIQ) en LABM pour conduire à la redéfinition d'un cahier des charges. Le second volet de la présentation a été l'illustration pratique que la logique bayésienne au long cours répond au cahier des charges d'un plan efficient de CIQ.

Dans les chapitres 5.6.2.2 et 5.6.2.3 de la norme sont notifiées des exigences de comportement le plus fidèle possible des matériaux de CIQ par rapport aux échantillons des patients de façon à pouvoir éviter des erreurs cliniques significatives. Ces chapitres notifient une exigence de détection de défaillance du contrôle qualité et de détection des tendances. Le principe de commutabilité entre les matériels de CIQ et les échantillons de patients est difficile à respecter. Par ailleurs, les panels de CIQ proposés par les industriels ne peuvent répondre de façon exhaustive à la complexité des contextes physiopathologiques. Les laboratoires doivent ainsi en priorité maîtriser leurs méthodes au sens des principes de la maîtrise statistique des procédés (MSP) et des postulats qui leur sont associés. Cela débute par une gestion des matériels de CIQ et de réactifs assurant une distribution gaussienne stable des points de CIQ pour une méthode considérée en état de contrôle statistique (Condition indispensable pour éviter la survenue de faux rejets). En approche conventionnelle, les cartes de contrôle sont construites à l'aide de deux grandeurs que sont SD de fidélité intermédiaire (FI) et valeur cible établies respectivement lors de la phase de vérification de méthode et lors des phases probatoires. Débute alors la phase de production avec l'obligation de détecter idéalement les OUTLIERS (dérives ponctuelles de grande amplitude de la cible de la carte de contrôle) et les TENDANCES (« Trends ») qui impactent de façon persistante les méthodes. Il est important de noter qu'il faut être idéalement en capacité de détecter des TENDANCES sur la valeur cible de la carte de contrôle ET sur la variance (fidélité intermédiaire) de la

méthode. Dans une approche conventionnelle au long cours se pose ensuite le problème de la gestion du caractère STATIQUE des cartes de contrôle (valeurs cible et SD de FI constantes dans la carte) avec la nécessité de réviser en priorité la valeur cible et les risques associés d'absorber des valeurs aberrantes au cours de ces révisions (Introduction to statistical quality control 6<sup>ème</sup> édition Douglas C Montgomery). Un travail préliminaire (Use of prior manufacturer specifications with Bayesian logic eludes preliminary phase issues in quality control: An example in a hemostasis lab Blood Coagul Fibrinolysis 2015, 26: 590-596) a montré qu'il est possible d'éviter la phase probatoire avec la logique bayésienne. Ce premier outil nommé PCC (Predictive Control Chart) a vocation à détecter en priorité les OUTLIERS. Pour une utilisation du PCC au long cours, il lui a été associé deux autres outils bayésiens ayant vocation à détecter respectivement des TENDANCES sur la moyenne et sur la FI avec démonstration par simulations mathématiques de leur efficacité. Le dénominateur conceptuel commun entre ces trois outils est le suivant :

Les distributions prévues (« Predictive Control Chart et Predictive Residual Cusum ») identifient où 95 % des valeurs de CIQ qui arrivent doivent être tant que le système analytique est dans un état de contrôle statistique. En dehors de cette région « prédictive » à 95 % il est fort probable qu'il y ait un problème sous-jacent. Lors de chaque nouvelle intégration de résultats de CIQ il y a révision automatique des informations a priori qui fait que le système bayésien ne cesse jamais d'apprendre jusqu'à donner de plus en plus de poids à l'environnement du laboratoire par rapport aux données fournisseurs initiales (à la grande différence de l'approche conventionnelle STATIQUE par essence !).

Au cours de la deuxième partie de la réunion F Sobas a montré un tableur Excel contenant les trois outils bayésiens capables de détecter des OUTLIERS, des DECENTRAGES de carte de CIQ et des TENDANCES sur la valeur cible et la variance de la méthode. Disposer d'une carte de contrôle apte à détecter une perte de précision des méthodes (accroissement de la FI) permet d'éviter également la nécessité de calcul à intervalles réguliers de la FI pour vérifier que la méthode demeure acceptable sur le long cours.

Une publication dans une revue de quality engeneering est en cours avec des développements à venir. Après ce pré requis il pourra être envisagé une mise à disposition à l'ensemble des membres via un site internet. F Sobas se propose de refaire un point à la prochaine réunion du club des biologistes en hémostasie.

## **6. Référentiel des actes Innovants Hors Nomenclature (RIHN) Claudine Caron (Lille), Catherine Ternisien (Nantes), Nathalie Hézard (Reims), Christophe Nougier (Lyon)**

Automne 2013 : toilettage du référentiel Montpellier V5.2 des actes HN avec classification en 5 catégories (actes obsolètes, briques élémentaires, actes de recherche = disparition ; actes courants = éligibilité à la NABM ; actes innovants = éligibilité au RIHN)

Août 2015 : publication par la DGOS de la liste des actes obsolètes, de la liste complémentaire des actes à évaluer par l'HAS pour prise en charge par la collectivité, du RIHN (60 analyses en hémostasie)

Janvier-avril 2016 : formalisation de dossiers d'évaluation pour 42 analyses du RIHN

Ces dossiers devaient être construits sur le modèle PHRC, l'objectif étant de valider l'intérêt clinique de l'analyse par un recueil prospectif de données sur une

période de 3 ans (+2). Les investigateurs auront pour mission d'étudier la pertinence des indications de chaque analyse en terme de diagnostic, prise en charge et suivi des patients, l'état de la littérature, les niveaux de preuve et de faire un recueil des activités.

Les membres du Club des biologistes sont co-investigateurs de plusieurs dossiers concernant, le bilan Willebrand (E043, E044, E046, E112, E130, E131), le bilan hémorragique (E056, E057, E077, E081, E082, E084, E107) et les anticorps antifacteurs (E063, E064). Concernant l'exploration plaquettaire (E051, E054, E093, E099, E136), le dossier a été soumis par Nathalie Hézard. Des actions concertées avec les investigateurs principaux de chaque dossier, la filière MHEMO et le GFHT devraient être proposées.

## **7. Le point sur les protocoles**

### **– Validation des FVIII et FIX chromogènes Hyphen Biomed (Claudine Caron)**

Les résultats sont en cours d'analyse chez Hyphen. Une réunion de synthèse avec l'ensemble des participants à l'étude devrait être organisée en septembre.

### **– Sollicitations pour évaluations de réactifs chromogéniques du FVIII (Claudine Caron)**

#### **i. FVIII chromogène Siemens**

##### Objectifs :

Evaluer les performances du réactif Siemens Facteur VIII chromogénique dans le suivi des hémophiles A traités avec les molécules rFVIII B-délétés actuellement sur le marché français: ReFacto AF<sup>®</sup> (Pfizer), NovoEight<sup>®</sup> (Novo Nordisk), Nuwiq<sup>®</sup> (Octapharma), sur systèmes Sysmex CS<sup>®</sup> et Siemens BCS XP<sup>®</sup>, dans 2 à 4 centres par comparaison à la méthode chromométrique (réactif Actin FS<sup>®</sup> Siemens) et à la méthode chromogénique avec le réactif Biophen FVIII<sup>®</sup> Hyphen.

Echantillons : 30 plasmas par molécule et 30 plasmas de sujets sains

##### Déroulement de l'étude :

Mars à juin 2016: constitution des plasmathèques

Juillet à septembre 2016: réalisation des analyses

Septembre 2016: abstract pour le GFHT

Novembre 2016: présentation des résultats au GFHT et au Club des biologistes; préparation d'une publication

#### **ii. Nouveau réactif FVIII chromogène Stago**

##### Objectifs :

Evaluer les performances analytiques de ce nouveau réactif (répétabilité, fidélité intermédiaire, stabilité de la calibration)

Comparer les 3 réactifs de FVIII chromogénique: Siemens sur système CS, Hyphen sur STAR ou STAR Max, Stago sur STAR ou STAR Max

##### Echantillons :

10 plasmas avec FVIII <15% ; 20 plasmas avec FVIII entre 15% et 40%; 20 plasmas avec FVIII entre 40% et 80%; 10 plasmas avec FVIII >80%

##### Déroulement de l'étude :

Début de l'étude: septembre 2016

Durée: 2 mois

– **Enquêtes de pratiques. Claudine Caron**

**i. Recherche et titrage d'un anti FV (registre RAVI)**

Rappel : Projet présenté par Annabelle Dupont lors du GEHT de Grenoble dans le groupe de travail Protocoles multicentriques. Les équipes porteuses sont les services de médecine interne et d'hématologie biologique de l'hôpital Bichat, Paris et le service d'hémostase et transfusion du CHRU de Lille.

Ce registre qui comportera une échantillothèque, est une opportunité pour travailler à une méthode Bethesda « standardisée » en complément de l'étude chauffage déjà réalisée.

Analyse des 30 réponses reçues : en 2015, 170 recherches ont été réalisées au total, dont 116 pour suspicion d'anti FV acquis donnant 51 résultats positifs pour 21 patients. Globalement la méthodologie suivie est calquée sur celle de l'anti FVIII et tient compte dans près de 75% des centres, des préconisations émises en novembre 2014 par le Club des biologistes sur les modalités de chauffage du plasma à tester (chauffage si taux  $\geq$  5%, 30 min à 58°C, suivi d'une centrifugation  $\geq$  2500g pendant 15 min). Néanmoins des interrogations subsistent : la durée d'incubation du mélange plasma de référence/plasma à tester (10 min à 2h ?), le choix du seuil de positivité (0.4- 0.6 – 1 UB ?), le besoin de contrôles ?

Perspectives : Adresser à chaque laboratoire qui aura réalisé une inclusion dans le registre RAVI un même échantillon de plasma connu avec anti FV pour titrage comparatif méthode locale/méthode commune.

**ii. Test VWF :FVIII B**

Objectifs : Examen inscrit sur la liste complémentaire publiée par la DGOS en août 2015, donc à terme potentiellement remboursable après avis de l'HAS. Dans cette perspective, l'accréditation de ce paramètre sera nécessaire, ce qui exigera une EEQ (qui n'existe pas actuellement). Le but de l'enquête était de confronter nos pratiques et recenser les centres qui pourraient être intéressés par l'organisation d'une CIL.

Analyse des 30 réponses reçues : 10 laboratoires pratiquent le test (6 avec le coffret Stago, 4 par une méthode « home-made ») ; en 2015, 553 tests ont été réalisés (n=12-205 par centre). Vingt laboratoires transmettent leurs demandes (n=1 à 33, total=164) à 5 laboratoires.

Perspectives : Organiser en septembre-octobre une CIL entre les 10 laboratoires (logistique assurée par Lille, analyse assurée par ProBioQual).

- **Intérêt du TGT sur les anomalies acquises ou constitutionnelle rares de la coagulation (Valérie Proulle)**

- Deux cas d'anomalies acquises de la coagulation similaires ont été étudiés en TGT à Bicêtre et à St Etienne. Il s'agit de patients présentant des désordres lymphoprolifératifs et un syndrome hémorragique dû à de probables anticorps anti-thrombine (allongement du temps de thrombine, persistant sur les mixtures M+T, sans autre déficit en facteurs de la coagulation sous-jacent). Le TGT a montré un effondrement de la quantité de thrombine générée en PPP, ainsi qu'un allongement du temps de latence, qui se corrigent partiellement sur les mixtures M+T.
- Le TGT effectué sur les plasmas de patients atteints de VWD acquise, ainsi que sur les mixtures M+T, montre une diminution du pic de thrombine générée, dont il

faut explorer le mécanisme. La corrélation clinique (tendance hémorragique) / anomalies du TGT (pic de thrombine générée/ETP/phase de latence) doit aussi être faite pour cette pathologie acquise. Il serait intéressant que les autres centres effectuant des TGT puissent effectuer le même test sur des plasmas de patients comparables, afin de mettre en commun les résultats.

- TGT et hémophilie A « particulière ». Certains HA mineurs ne présentent pas de tendance hémorragique notable en comparaison avec d'autres hémophiles mineurs. Notamment, la mutation p.Tyr365Cys (Ex8), qui entraîne une discordance sur les dosages FVIII en chromométrie et en chromogénie. Un patient du Dr R d'Oiron porteur de cette mutation et étudié à Bicêtre, présente un TGT comparable à un témoin, mais différent d'autres HA mineurs.

Une étude serait utile pour étudier les patients porteurs de cette mutation en France, ainsi que d'autres mutations intéressant le domaine de clivage de la thrombine du FVIII : Arg391, Glu739, Arg759 et Arg1708.

Les centres de Bicêtre et Lille peuvent effectuer les TGT des plasmas de vos patients suivis par vos centres et porteurs de ces mutations. Pour cela, vous pouvez contacter : Valérie, Emmanuelle, Claudine ou Christophe.

[valerie.proulle@aphp.fr](mailto:valerie.proulle@aphp.fr)

[emmanuelle.jeanpierre@chru-lille.fr](mailto:emmanuelle.jeanpierre@chru-lille.fr)

[christophe.zawadzki@chru-lille.fr](mailto:christophe.zawadzki@chru-lille.fr)

[claudine.caron@chru-lille.fr](mailto:claudine.caron@chru-lille.fr)

– **Eude des plasmas titrés Anti-VIII : 1<sup>ère</sup> analyse des résultats (Christophe Nougier, Claire Pouplard)**

Une enquête, concernant le titrage des anti-VIII et réalisée en Juillet 2015 au niveau du club des biologistes en hémostasie, montrait une grande hétérogénéité des pratiques entre les centres. Plusieurs paramètres semblent impacter la variabilité inter-laboratoire : le tampon de dilution (tampon HEPES, Tampon imidazole, plasma déficient en FVIII, Tampon Owren Koller, pool déplété), la source de FVIII utilisée (plasma standard tamponné lyophilisé, pool tamponné congelé, contrôle normal...) et la variabilité inhérente au dosage de FVIII.

Les objectifs de l'étude anti-VIII étaient :

- d'évaluer l'influence du tampon utilisé lors de la recherche et du titrage d'un inhibiteur de faible titre
- d'évaluer l'importance de la stabilité du pH du plasma titré en FVIII

4 aliquots d'un plasma de titre en anti-VIII faiblement positif, 4 aliquots d'un plasma de titre négatif, 4 aliquots d'un pool de plasma tamponné (FVIII=98%) (RefCryocheck CCN-15) et 4 aliquots d'un pool de plasma NON tamponné (RefCryocheck CCNRP-05) ont été envoyés aux centres participants. Le dépistage et le titrage de l'inhibiteur ont été réalisés selon 4 conditions :

➤ **Condition A : Technique « home »**

Chaque centre réalise avec sa **technique habituelle** le dépistage de l'inhibiteur sur le plasma négatif (plasma testé sans dilution) et le titrage de l'inhibiteur sur le plasma positif (plasma testé sans dilution et avec une dilution au 1/2). Les dosages de FVIII sont réalisés sur les mélanges après 2h d'incubation à 37°C.

➤ **Condition B : Technique « même tampon »**

Utilisation de la technique et réactifs habituels mais le tampon de dilution utilisé pour le mélange référence (plasma titré FVIII + tampon) et la dilution au 1/2 pour le plasma positif (dilution volume à volume du plasma positif et du tampon) est le même pour tous les laboratoires: **tampon imidazole**. Les dosages de FVIII sont réalisés sur les mélanges après 2h d'incubation à 37°C.

➤ **Condition C : Technique « même tampon + même plasma titré FVIII tamponné »**

Utilisation de la technique B mais la source de FVIII titrée utilisée pour le mélange référence et le mélange plasma malade est la même pour tous les laboratoires: **pool de plasma tamponné (envoyé aux laboratoires participants : Ref Cryocheck CCN-15)**.

➤ **Condition D : Technique « même tampon + même plasma titré FVIII NON tamponné »**

Utilisation de la technique C mais la source de FVIII utilisée pour le mélange témoin et le mélange malade est la même pour tous les laboratoires: **pool de plasma non tamponné (envoyé aux laboratoires participants : RefCryocheck CCNRP-05)**

### **Résultats**

\* Au 01 Juin 2016, 24 centres ont participé à l'étude. Les terminologies suivantes seront utilisées pour l'analyse des résultats :

- Réactif utilisé comme source de FVIII : FVIII de référence.
- Mélange réalisée volume à volume avec le FVIII de référence et le tampon : mélange de référence.
- Mélange réalisée avec le plasma du patient et le FVIII de référence : mélange échantillon.
- Calcul du rapport FVIII du mélange échantillon/ FVIII du mélange de référence : FVIII résiduel corrigé.
- Seuil de sensibilité et de positivité: 0,4 ou 0,6 UB/mL. Le seuil de positivité est défini par l'ISTH à 0.6 UB/mL. Le seuil de sensibilité de la technique est cependant proche de 0.4 UB/mL. Il est cependant conseillé de rendre douteux en cas de résultat entre 0.4 UB/mL et 0.6 UB/mL.

#### **FVIII de référence :**

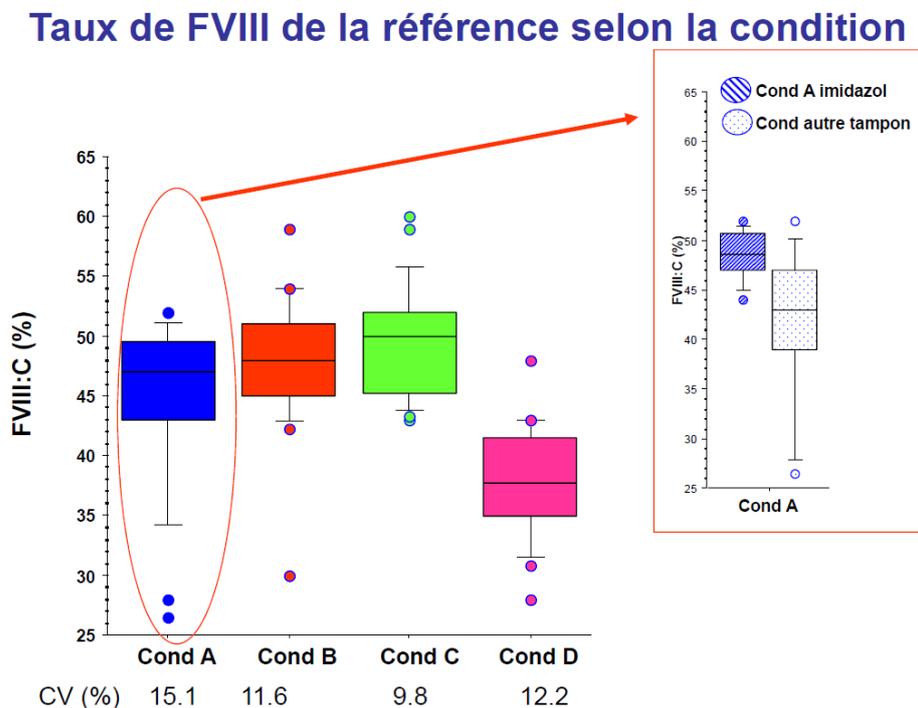
Plusieurs réactifs sont utilisés. Une majorité de centres utilisent un plasma standard tamponné (38%) ou un plasma standard non tamponné (29%). D'autres utilisent des pools de plasma congelés (17%), lyophilisés (8%) ou maison (8%). Le taux moyen du FVIII est de 96% avec un minimum à 86% et un maximum à 113%.

#### **Mélange de référence :**

L'analyse du mélange de référence dans la condition A montre des différences de stabilité de ce mélange en fonction des pratiques des laboratoires. En effet pour des

valeurs attendues proches de 50% après l'incubation de 2h à 37°C on observe que le FVIII est moins dégradé lorsque le tampon imidazole est utilisé par rapport aux utilisateurs du tampon Owren Koller ou du tampon diluant Werfen. L'utilisation du pool déplété maison montre une dégradation importante (-80%). Lorsqu'on compare les conditions A et B, il n'est cependant pas observé de différence significative au niveau du taux de FVIII alors que tous les centres utilisent le tampon imidazole dans la condition B. Les variabilités sont proche de 10% dans les conditions C et D proche du CV du dosage de FVIII. Seuls les taux sont différents en raison des FVIII de référence différents dans les 2 conditions (un plasma référence proche de 100% (98%) dans la condition C et aux alentours de 80% dans la condition D (figure 1)).

Figure 1



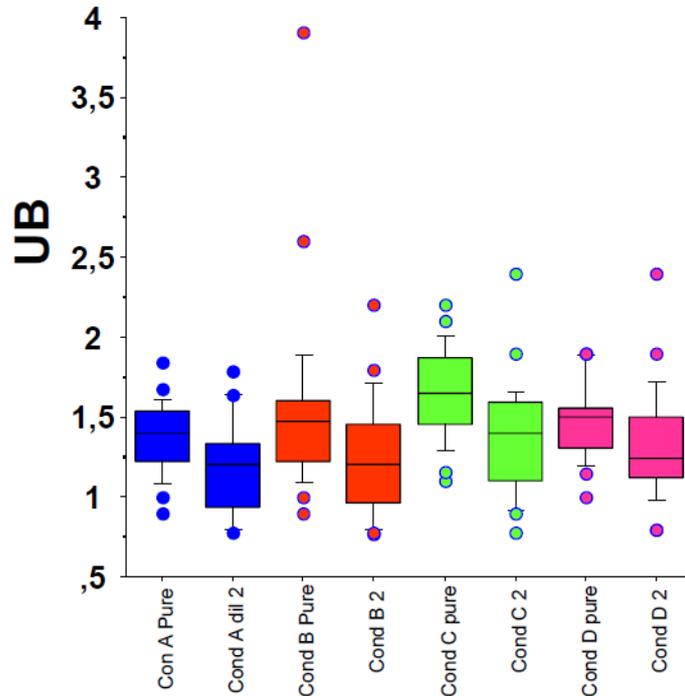
Il faut toutefois distinguer les centres qui ont les mêmes pratiques entre les 2 conditions A et B et ceux qui emploient uniquement le tampon imidazole dans la condition B. Dans ce cas, la variabilité est beaucoup plus importante lorsque le tampon imidazole n'est pas utilisé. Il est important de souligner que les utilisateurs du tampon imidazole dans la condition A sont également des utilisateurs (dans 8 cas/10) d'un plasma standard tamponné qui peut également stabiliser le FVIII dans le mélange de référence durant l'incubation. Dans la condition B où seule le FVIII de référence varie, on observe que les variations du FVIII sont moins importantes lorsque le plasma standard tamponné est utilisé.

**Echantillon négatif :**

Il n'est pas observé de résultats « faux positifs » dans la condition A et ce quelque soit le tampon utilisé. En revanche dès que le tampon imidazole est introduit de façon systématique il y a une apparition de faux positifs dans les conditions B, C et D. Une des explications à ces résultats faussement positifs serait que l'utilisation du tampon imidazole stabilise le taux de FVIII dans le mélange de référence alors que ce tampon imidazole n'est pas utilisé dans le mélange échantillon testé au pur. La

dégradation du FVIII serait donc relativement plus importante dans le mélange échantillon et entraînerait un résultat faussement positif.

**Echantillon positif :**



Tous les centres détectent la présence d'un inhibiteur antiVIII. Il n'existe pas de différence significative sur les titres rendus en fonction des conditions. A noter que l'emploi de la dilution au 1/2 pour le mélange échantillon semble diminuer le titre de l'inhibiteur et augmente également la variabilité.