

## Compte rendu de la 8<sup>ème</sup> journée du Club des biologistes en hémostase

Cette réunion s'est tenue le 21 Novembre 2014 et a rassemblé 33 biologistes.

### 1. Quand rechercher un anticorps anti-facteur Willebrand ? Le point sur la littérature. Quid de la méthodologie ? C. Caron, C. Pouplard, C. Ternisien

#### C. Pouplard : le point sur le syndrome de Willebrand acquis et diagnostic biologique

Le syndrome de Willebrand acquis (SWA) se définit par l'apparition d'un syndrome hémorragique cutanéomuqueux en l'absence d'antécédents personnels ou familiaux de saignement. Cette symptomatologie est associée à une exploration perturbée du facteur Willebrand.

Le SWA est une pathologie rare dont la prévalence est évaluée à 0,04 % dans la population générale. On dénombre environ 300 cas rapportés dans la littérature, mais l'incidence de cette pathologie est très probablement sous-estimée en raison de la difficulté de son diagnostic.

Cette pathologie touche principalement les adultes (âge moyen au diagnostic = 60 ans) mais peut également survenir chez l'enfant, et notamment chez les enfants présentant des cardiopathies (Case report : *Karine Nubret, J. Thorac Cardiovasc, 2013*).

Les contextes physiopathologiques associés au SWA sont bien connus, et la connaissance des mécanismes physiopathologiques de ce syndrome va nous permettre de mieux cibler les tests biologiques nécessaires au diagnostic biologique. Il est important de souligner qu'en dehors de l'hypothyroïdie qui induit une diminution de synthèse du VWF, et donc l'apparition d'un déficit en VWF de type 1, la majorité des SWA sont classiquement de type 2.

Au cours des syndromes lymphoprolifératifs, tels que MGUS ou myélomes multiples, les auto-anticorps anti-VWF peuvent interagir avec le site de liaison du VWF au collagène ou interagir avec un site non fonctionnel du VWF et augmenter ainsi la clairance de la protéine. Ces derniers anticorps sont difficiles à mettre en évidence par des tests biologiques.

Les SWA peuvent également apparaître lors de pathologies tumorales au cours desquels le VWF, et plus particulièrement les multimères de hauts poids moléculaires sont absorbés sur les cellules malignes.

Le SWA peut enfin survenir lorsqu'il existe une augmentation des forces de cisaillement induisant une protéolyse accrue du VWF par ADAMTS 13 et une perte des multimères de haut poids moléculaire. Ces conditions de flux sont retrouvées lors de sténose des valves aortiques ou lors d'assistance ventriculaire.

Le diagnostic biologique du SWA est souvent difficile, et seule l'association du contexte clinique et la perturbation de tests explorant le VWF permettra de poser le diagnostic. D'après les travaux de Tiede (JTH 2008), l'analyse des multimères serait le test de référence pour diagnostiquer un SWA. Ainsi, une étude rétrospective portant sur 35 cas de SWA montre que la perturbation des tests biologiques est différente selon la physiopathologie du SWA. Les cas de SWA associés à une gammopathie sont fréquemment caractérisés par une diminution des taux de FVIII, VWF:Ag, VWF:RCo et VWFCB, avec un ratio VWFCB/VWF:Ag < 0,8. Le ratio VWF:RCo/VWF :Ag semble moins discriminant. Dans ce groupe de patients, les auteurs montrent également une augmentation du ratio VWF propeptide/VWF : Ag. A l'inverse, les patients pour lesquels un SWA, a été diagnostiqué dans un contexte de cardiopathie, présentent souvent des taux de FVIII, VWF :RCo et VWF :Ag normaux, voire même très élevés et seul le profil des multimères permet de poser le diagnostic. Dans ce travail, le PFA 100 (très bon marqueur de la présence ou non des multimères de haut poids moléculaire) n'a pas été réalisé.

La conclusion de ce travail souligne l'importance d'avoir plusieurs tests pour diagnostiquer un SWA. Ainsi, un VWF :Ag < 50 % associé à un ratio VWF : RCo/VWF :Ag < 0,7 et à un ratio VWF CB/VWF :Ag < 0,8 permettent d'atteindre une sensibilité de 86 %. La place des tests plus spécifiques, tels que la recherche d'anticorps, le dosage du propeptide, et l'étude des multimères, dépend du contexte clinique.

Ainsi dans un contexte de maladie lymphoproliférative, myélomes multiples, pathologie tumorale ou de lupus, la recherche d'un SWA doit s'accompagner, en dehors des tests conventionnels et du PFA, de la recherche d'anticorps anti- facteur Willebrand et du dosage du propeptide. Dans un contexte de valvulopathie, il sera recommandé d'effectuer une analyse des multimères et un dosage de l'activité VWFCB.

### **C. Ternisien et C. Caron : recherche d'un ac anti - VWF**

Il existe deux types d'anticorps anti- VWF : les allo-ac et les auto-ac.

**Les alloanticorps** surviennent chez les VWD de type 3 (*James PD et al. Blood 2013*). Leur première description a été faite en 1974 par Sarj KE (*Proc Natl Acad Sci*). Environ 3 à 9.5% des patients type 3 peuvent développer un alloanticorps entraînant une inefficacité du traitement substitutif et susceptible de provoquer des réactions d'intolérance de type anaphylactique. Ce sont essentiellement les patients présentant une délétion partielle ou complète du gène du VWF ou plus rarement certaines mutations non-sens qui peuvent développer un ac anti-VWF d'où l'intérêt du génotypage pour identifier les patients à risque. Une histoire familiale positive d'ac anti VWF constitue un facteur de risque de développer un ac. Cet alloac est, le plus souvent, une IgG dirigée contre différents épitopes du VWF. Il n'existe pas de relation nette entre le titre de l'ac et la quantité de produits transfusés.

**Les auto-anticorps** représentent l'un des mécanismes à l'origine d'un VWD acquis. Il s'agit le plus souvent d'une IgG dirigée contre un domaine fonctionnel (site de liaison à la GPIb ou au collagène) ou non fonctionnel du VWF. Les pathologies sous-jacentes associées à la survenue de cet auto-ac sont, dans environ 50% des cas, les syndromes lymphoprolifératifs (*Federici, Thromb haemost 2000*).

Concernant la recherche d'un anti VWF, il n'existe, à ce jour, aucun consensus pour la standardisation de cette recherche (*C. Caron, Hématologie 2014*). Celle-ci peut faire appel à des techniques de neutralisation basées sur l'incubation entre 15 minutes et 2 h à 37°C d'un mélange du plasma à tester et d'un plasma normal avec mesure de l'activité VWF résiduelle par un dosage de VWF :RCo et/ou du VWF :CB. L'association de ces deux mesures permet d'améliorer la sensibilité par le dépistage d'inhibiteurs de spécificités différentes (*Coleman R, J Thromb Haemost 2006*). Par analogie avec la méthode Bethesda, le titre de l'inhibiteur est calculé à partir de la dilution du plasma du patient inhibant 50% du VWF :RCo ou du VWF :CB d'un pool normal dilué au 1/2 comparé au mélange contrôle. Le titre est exprimé en unités Bethesda. Les limites de cette technique : un résultat négatif n'exclut pas la présence d'un anticorps ; en effet, cette technique ne permet pas la détection des ac non neutralisants mais cliniquement délétères car ils accélèrent la clairance du VWF de la circulation.

Les tests Elisa offrent une plus grande sensibilité mais une faible spécificité (faux positifs). A ce jour, aucune étude n'a montré la signification clinique des ac anti-VWF détectés par Elisa. Il n'existe pas de trousse commerciale disponibles. Trois techniques « maisons » sont rapportées dans la littérature (*Siaka C et al, Haemophilia 2003, Tiede A et al, J Thromb Haemost 2008, Franchi F et al, Thromb Res 2014*). L'interprétation du résultat doit tenir compte du groupe sanguin du patient car des faux positifs sont rapportés chez le sujet de groupe O si le substrat utilisé dans le test est un VWF d'origine plasmatique. Chaque laboratoire doit établir à partir d'une population de sujets sains ses seuils de positivité pour la DO cut-off ou encore le pourcentage d'activité résiduelle.

## **2. De l'intérêt de la portée A dans la gestion des contrôles de qualité interne. F. Sobas**

La mise sous contrôle d'une méthode avec un nouveau lot de contrôle impose la réalisation d'une phase probatoire ayant vocation à définir la valeur cible avec a minima 20 valeurs de contrôle (SHGTA6 du Cofrac et C24A3 du CLSI). Avec cette valeur cible estimée et la valeur du SD de fidélité intermédiaire (FI) déterminée préalablement au cours de la phase de vérification / validation de méthode ( $n = 30$ ), il est alors possible de construire les cartes de contrôle. Cette étape consomme au sens large beaucoup de ressources au regard du panel important d'examens réalisés au sein d'un laboratoire. Ceci est d'autant plus vrai pour les examens dont les séries sont rarement réalisées avec nécessité de réaliser des périodes de chevauchement très lourdes à gérer. Il y a possibilité d'éluder cette phase probatoire d'un point de vue théorique en utilisant la logique bayésienne et d'un point de vue pratique parce que les fournisseurs d'automates et de réactifs fournissent des matériels de contrôle titrés (Valeur cible et ou « range » dans la notice du CIQ). Par ailleurs, ces mêmes fournisseurs d'automates et de réactifs indiquent dans les notices techniques de leurs méthodes une valeur maximale acceptable de SD de fidélité intermédiaire. Avec un outil Excel qui a été diffusé aux membres du « club des biologistes » et qui sera mis à disposition de tous les participants aux programmes ECAT (téléchargeable sur le site), il est possible de mettre sous contrôle sa méthode en y saisissant trois valeurs : La valeur cible a priori du matériel de contrôle, la valeur du SD maximum acceptable donnée par le fournisseur de la méthode en portée A et la valeur du SD de fidélité intermédiaire déterminée lors de la

phase de vérification de méthode. A l'issue de cette collecte sous contrôle de résultats de CIQ (les Outliers étant détectés et non pris en compte dans le calcul de la moyenne et du SD), l'outil Excel calcule la valeur moyenne cible qu'il est alors possible d'implémenter dans les cartes de contrôle conventionnelles. Par ailleurs, dès 30 valeurs de CIQ l'estimation du SD de FI est acceptable. L'outil Excel permet ainsi également de vérifier qu'il n'y a pas d'évolution significative du SD de FI notamment lors d'un changement de lots de CIQ. Les modalités de calculs propres à ce tableur Excel découlent d'un travail préliminaire publié en 2014 : Sobas F, Tsiamyrtzis P, Benattar N, Lienhart A, Négrier C. *A comparison of the  $1_{2s}$  rule and Bayesian approach for quality control: Application to one-stage clotting factor VIII assay. Blood Coagul Fibrinolysis 2014; 25:634-43.* Ce travail a été décliné spécifiquement autour de la problématique de la gestion de la phase de démarrage des méthodes : Tsiamyrtzis P., Sobas F. *Phase I management using Normal predictive control charts. Poster Presentation at Joint Research Conference 2014, Seattle, WA.* Cette approche alternative de gestion des CIQ a le mérite de lisser les inconvénients et points faibles de l'approche conventionnelle ainsi de gagner en efficacité. Frédéric Sobas tient à la disposition de la communauté une instruction qui décrit comment il est possible d'implémenter cette approche alternative avec cet outil.

**3. Etablissement des valeurs de référence en hémostase pédiatrique. Résultats d'une étude multicentrique : Pierre Toulon<sup>1</sup>, Micheline Berruyer<sup>2</sup>, François Grand<sup>3</sup>, Neila De Pooter<sup>4</sup>, Dominique Lasne<sup>5</sup>, et Marie Brionne-François<sup>6</sup>** <sup>1</sup>Laboratoire d'hématologie, CHU Pasteur, Nice, <sup>2</sup>Laboratoire d'hématologie, GH Est, Bron, <sup>3</sup>Laboratoire d'hématologie, CHU, Angers, <sup>4</sup>Laboratoire d'hématologie, CHR, Mulhouse, <sup>5</sup>Laboratoire d'hématologie, CHU Necker, Paris, et <sup>6</sup>Laboratoire d'hématologie, CHU, Caen.

### **Introduction**

L'enfant n'est pas simplement un "adulte en miniature", du moins en ce qui concerne l'hémostase. Non seulement la balance hémostatique pédiatrique est très différente de celle de l'adulte, mais elle constitue un système dynamique qui évolue avec l'âge. Ce concept développé par M. Andrew et coll. dans les années 80 (1-3), est maintenant universellement accepté car indispensable à prendre en compte pour assurer le diagnostic, le traitement ou la prévention d'une pathologie hémorragique ou thrombotique chez l'enfant (4,5). Le résultat des tests d'hémostase, en particulier le TP et le TCA, pouvant être influencé par l'automate ou les réactifs utilisés (6), il est recommandé par le Sous-Comité Scientifique (SSC) de l'ISTH que chaque

laboratoire définisse ses propres valeurs de références spécifiques à l'âge, dans son environnement technique (7).

Le but de cette étude multicentrique, regroupant six centres travaillant dans des conditions analytiques identiques, est de définir les valeurs de références spécifiques à l'âge pour la plupart des paramètres d'hémostase.

## **Patients, matériels et méthodes**

### ***Population étudiée***

A ce jour, 605 échantillons ont été obtenus de patients pédiatriques (411 garçons et 194 filles), âgés entre 2 semaines et 17 ans. Les échantillons (prélevés sur des tubes contenant du citrate 0.109 M, 1 vol./9 vol.) ont été prélevés, dans chacun des centres participants, pour des bilans d'hémostase de routine, le plus souvent dans le cadre d'un bilan préopératoire pour des pathologies non-aigües. Ils ont été classés en 6 groupes d'âge : <1 mois (médiane=3 semaines, n=11), entre 1 et 5 mois (médiane=3 mois, n=135), entre 6 et 12 mois (médiane=8.5 mois, n=73), entre 1 et 5 ans (médiane=2 ans, n=238), entre 6 et 10 ans (médiane=8 ans, n=49) et entre 11 et 17 ans (médiane=13 ans, n=99).

### ***Méthodes***

Les différents tests ont été réalisés localement dans chaque centre participant en utilisant les réactifs identiques et des analyseurs ACL TOP d'un fournisseur unique (Werfen, Bedford, MA, USA).

- TP : RecombiPlasTin 2G
- TCA : HemosIL SynthASil
- Fibrinogène (Clauss) : HemosIL Fib C
- Facteurs de la coagulation : plasmas déplétés en facteur V, VII, X, II, VIII, IX, XI, XII
- FXIII : HemosIL Factor XIII Antigen (test agglutination latex)
- Antithrombine (AT) : HemosIL Liquid Antithrombin (test chromogénique)
- Protéine C (PC) : HemosIL Protein C (test chromogénique)  
HemosIL ProClot (test coagulation)
- Protéine S (PS) : HemosIL Free Protein S (test agglutination latex)  
HemosIL Protein S Activity (test coagulation)
- Plasminogène (Pg) : HemosIL Plasminogen (test chromogénique)
- Facteur Willebrand (VWF) : HemosIL von Willebrand Factor Ristocetin Cofactor activity  
: HemosIL von Willebrand Factor Activity  
: HemosIL von Willebrand Factor Antigen
- D-dimères : HemosIL D-dimer HS 500

**Analyse statistique** : Les résultats obtenus dans les différents centres n'étant pas différents, ceux-ci ont été poolés avant d'être analysés statistiquement. La plupart des résultats, ayant une distribution normale, sont exprimés comme moyenne +/- un écart-type. Dans le cas contraire, ils sont exprimés comme valeur médiane avec les valeurs extrêmes.

## Résultats

Le TP est significativement corrélé à l'âge ( $r=+0.61$ ,  $p<0.0001$ ), avec des temps de coagulation plus courts chez les plus jeunes enfants. Une corrélation positive est également trouvée pour le fibrinogène ( $r=+0.47$ ,  $p<0.0001$ ). A l'inverse, le TCA est négativement corrélé à l'âge ( $r=-0.15$ ,  $p<0.01$ ), avec des temps de coagulation plus longs chez les plus jeunes enfants (Tableau). Les taux des facteurs V, VIII, X et XIII restent à peu près inchangés au cours de l'enfance, avec des taux voisins de ceux de l'adulte. En revanche, les taux des facteurs II, VII, IX, XI et XII, significativement diminués chez les plus jeunes enfants, particulièrement ceux < 1 mois, augmentent ensuite avec l'âge pour atteindre les valeurs adultes après 10 ans. Si les taux de la protéine S sont comparables à ceux des adultes dans tous les groupes d'âge, il n'en est pas de même pour l'antithrombine, la protéine C et le plasminogène, dont les taux sont plus bas chez nourrissons de <1 mois et qui se normalisent après 1 mois, 1 an et 6 mois, respectivement. Le VWF est plus élevé à la naissance et durant les premiers mois de vie, avant de se normaliser au cours du deuxième semestre de vie. Les taux des D-dimères sont significativement plus élevés chez les enfants de moins de 6 mois et restent supérieurs aux taux adultes pendant l'enfance, avant de retrouver des valeurs voisines de celles des adultes à la puberté.

	< 1 mois	1 - 5 mois	6 - 12 mois	1 - 5 ans	6 - 10 ans	11 - 16 ans
TP (ratio)	0.96 ± 0.07	0.96 ± 0.07	0.98 ± 0.07	1.01 ± 0.08	1.06 ± 0.08	1.07 ± 0.09
TCA (ratio)	1.19 ± 0.12	1.11 ± 0.11	1.08 ± 0.13	1.07 ± 0.14	1.07 ± 0.10	1.03 ± 0.09
Fg (g/L)	2.53 ± 0.20	2.36 ± 0.52	2.46 ± 0.51	2.84 ± 0.59	2.81 ± 0.60	2.84 ± 0.58
FV (%)	106 ± 24	102 ± 29	103 ± 27	113 ± 21	114 ± 24	116 ± 23
FVII (%)	69 ± 12	93 ± 22	96 ± 23	80 ± 18	76 ± 20	73 ± 22
FX (%)	97 ± 22	92 ± 17	103 ± 17	107 ± 17	99 ± 11	94 ± 10
FII (%)	63 ± 14	74 ± 17	92 ± 14	108 ± 13	88 ± 14	95 ± 12
FVIII (%)	98 ± 41	88 ± 25	87 ± 18	86 ± 17	99 ± 17	93 ± 22
FIX (%)	47 ± 13	60 ± 18	73 ± 17	85 ± 14	85 ± 17	95 ± 19
FXI (%)	59 ± 10	69 ± 26	85 ± 20	94 ± 21	84 ± 13	89 ± 19
FXII (%)	71 ± 13	81 ± 25	110 ± 22	106 ± 21	99 ± 22	97 ± 23
FXIII (%)	83 ± 17	84 ± 18	84 ± 22	84 ± 20	77 ± 12	80 ± 19
AT (%)	76 ± 12	96 ± 22	103 ± 23	104 ± 18	102 ± 20	101 ± 22
PC chromo (%)	40 / 41	54 ± 16	77 ± 25	87 ± 14	93 ± 29	102 ± 20
PC coag (%)	30 / 38	57 ± 23	90 ± 36	98 ± 24	101 ± 35	120 ± 40
PS libre Ag (%)	84 / 111	94 ± 21	86 ± 11	82 ± 15	90 ± 15	85 ± 17
PS coag (%)	80 / 82	89 ± 17	93 ± 14	99 ± 24	102 ± 25	97 ± 14
vWF RCo (%)	89 / 100	90 ± 18	77 ± 20	78 ± 20	77 ± 16	84 ± 17
vWF Act (%)	111 / 131	120 ± 31	94 ± 40	94 ± 29	85 ± 25	95 ± 22
vWF Ag (%)	158 / 176	152 ± 52	100 ± 45	104 ± 48	84 ± 31	107 ± 48
Pg (%)	52 ± 13	67 ± 13	80 ± 15	93 ± 13	91 ± 16	89 ± 13
D-dimères (ng/mL)	495 (85-1200)	420 (90-1100)	292 (130-950)	280 (80-2100)	284 ± 124	233 ± 157

## Conclusions

Ces résultats suggèrent que, dans l'environnement technique considéré, les résultats de la plupart des paramètres de l'hémostase sont très dépendants de l'âge de l'enfant, particulièrement durant la première année de vie. Aussi, l'utilisation de valeurs de référence spécifiques à l'âge est-elle indispensable pour permettre une évaluation correcte de l'hémostase en pédiatrie.

## Références

1. Andrew M, et al. *Blood* 1987; 70: 165-72.
2. Andrew M, et al. *Blood* 1988; 72: 1651-7.
3. Andrew M, et al. *Blood* 1992; 80: 1998-2005.
4. Appel IM, et al. *J Thromb Haemost* 2012; 10: 2254-63.
5. Andrew M. et al. *Semin Thromb Hemost* 1995; 21: 341-56.
6. Lippi G, et al. *Semin Thromb Hemost* 2007; 33: 816-20.
7. Ignjatovic V, et al. and on behalf of the Perinatal and Paediatric Haemostasis Subcommittee of the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2012; 10: 298-300.

### **4. Détermination des conditions optimales de dégradation des facteurs de coagulation avant la recherche d'un inhibiteur : résultat d'une étude multicentrique. C. Flaujac, D. Lasne**

Présentation du travail multicentrique qui fait suite à l'enquête de pratique de Juin 2014 qui montrait que sur 31 laboratoires, 28 (90%) chauffent à 56°C, 2 chauffent à 58°, 1 ne chauffent pas et à l'analyse de la littérature. Le CRMH dans son référentiel (en cours de rédaction) propose un traitement thermique éventuel de l'échantillon de plasma à tester, en général 30 mn à 56°C. Kitchen et al, recommande un chauffage 90 minutes à 58°C (*Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis; 2d edition. Chapitre 12. Detecting and quantifying acquired functional inhibitors in hemostasis*).

Objectif de l'étude : comparer les taux de facteur résiduel après chauffage des plasmas à 2 températures différentes (56°C et 58°C) et pour 2 durées de chauffage différentes (30 minutes et 90 minutes), pour le fibrinogène, les facteurs II, V, VII, VIII, IX, X, XI et le facteur Willebrand. Cinq plasmas frais ou congelés par centre. 11 laboratoires ont participé à l'étude.

Résultats : 58°C fait mieux que 56°

## Synthèses et propositions :

		FVIII	FvW	Fg, FII, FV, FVII, FX,	FIX, FXI
Chauffage	T°	58°C	58°C	58°C	58°C
	Durée	30 min	90 min	30 min	90 min
	Seuil*	≥ 5 %	≥ 5 %	≥ 5% sauf Fg (qq soit la concentration)	≥ 5%
	Centri	≥ 2500 g	≥ 2500 g	≥ 2500 g	≥ 2500 g
Incubation (M+T)	Durée T°C	2 h 37 °C		10 min à 2 h 37 °C	

\* Le seuil de 5% est basé sur un calcul tenant compte des incertitudes de mesure des méthodes de dosage (*Miller et al, JTH 2012, 1055-1061*). Les immunoglobulines étant stables jusqu'à 61°C, il est possible de décider de chauffer quelque soit la concentration de facteur lorsque la recherche d'inhibiteur est réalisée par un dosage d'activité.

### **5. Cas cliniques**

Deux cas cliniques portant sur des patients VWD type 3 ayant développés des alloanticorps ont été présentés respectivement par C. Desconclois/D. Lasne et C. Ternisien/M. Sigaud.

### **6. Projet en cours : le point sur le protocole de dosage du facteur XIII (C. Pouplard)**

Pour mémoire, la société Stago a pris contact avec le club pour mettre en place une étude permettant la validation d'une méthode de dosage du FXIII Ag sur STAR. Ce travail a été proposé aux membres du Club des biologistes et une étude multicentrique a commencé. Ce travail aura pour objectifs d'étudier les performances analytiques et cliniques de ce nouveau réactif.

### **7. Questions diverses**

Une revue bibliographique sera mise en place lors des prochaines réunions