

Cette réunion s'est tenue le 5 Juin 2015 et a rassemblé 36 biologistes.

1. Biologie délocalisée (Rotem-TEG) et syndrome hémorragique : Anne Bauters (Lille)

Dans certaines unités de soins intensifs, la mesure des propriétés viscoélastiques du sang total au cours de la coagulation est devenue une alternative aux tests plasmatiques conventionnels. Le principe de la thromboélastographie repose sur le changement de viscosité du sang lorsqu'il coagule. Actuellement, 2 instruments utilisent cette technologie, le TEG[®]5000 (Haemonetics Corp., Braintree, MA, USA) et le ROTEM[®]delta (TEM International GmbH, Munich, Allemagne). Le principe de ces analyseurs de deuxième génération repose sur l'utilisation d'activateurs et/ ou d'inhibiteurs spécifiques associée à un outil informatique performant permettant d'évaluer rapidement la coagulation sur sang total et au lit du patient. L'utilisation de ces automates est recommandée par la société européenne d'anesthésiologie pour la prise en charge des hémorragies massives péri opératoires (*Kozek-Langenecker S.A, 2014*).

Principes de la thromboélastographie

Elle repose sur la mesure de la variation de viscosité au cours de la formation du caillot fibrino-plaquettaire. Le sang total est déposé dans une cuve dans laquelle plonge un piston, le niveau de formation du caillot et sa force élastique affectent l'amplitude du mouvement du piston. Le TEG et le ROTEM, bien que de principe similaire, présentent des différences minimales principalement d'ordre mécaniques. Les différents acteurs du processus de formation du caillot sont ainsi mesurés: la génération de thrombine, le fibrinogène, les plaquettes, et la dissolution du caillot (fibrinolyse). Les paramètres mesurés par les deux systèmes sont identiques mais désignés différemment :

- 1- Temps de coagulation : R pour le TEG et CT pour le ROTEM
- 2- Formation du caillot : K pour le TEG et CFT pour le ROTEM
- 3- Niveau de polymérisation : α / angle pour les 2 instruments
- 4- Fermeté du caillot : MA pour le TEG et MCF pour le ROTEM
- 5- Force élastique de caillot : G pour les 2 instruments
- 6- Lyse du caillot Ly pour le TEG et LI pour le ROTEM

Chacune de ces constantes peut être comparée en principe, à des valeurs de référence (qui sont à définir pour chaque contexte médical ou chirurgical) afin de détecter un déficit en facteur (augmentation du R ou de CT), un déficit en fibrinogène (diminution de l'angle et du MA ou du MCF), un déficit en plaquettes (diminution du MA ou du MCF), une fibrinolyse. La thromboélastographie offre une vue d'ensemble du processus de coagulation et permet de détecter, en principe, des anomalies identifiables par les tests conventionnels (déficit en facteurs) mais aussi des anomalies plus difficilement identifiables (cinétique anormale de

formation du caillot associée à un défaut de génération de thrombine, à un défaut en fibrinogène ou en plaquettes, ou à une hyperfibrinolyse).

Intérêts cliniques du TEG ?

Les premiers algorithmes de transfusion basés sur la thromboélastographie ont été élaborés pour la transplantation hépatique (*Kang Y, 1995*). Ce test a été largement utilisé dans cette indication en raison de sa capacité à détecter la fibrinolyse aiguë (*Kang Y, 1987, Steib A, 1994*). La surveillance de la coagulation et l'utilisation d'algorithmes transfusionnels basés sur la thromboélastométrie ont, ensuite, été étendues à d'autres procédures invasives associées à une coagulopathie comme la chirurgie cardiaque, ou la prise en charge du patient polytraumatisé (*Rahe-Meyer N, 2009 ; Schochl H, 2010; Coakley M, 2006, Shore-Lesserson L, 1999*). Au cours de ces études, l'utilisation d'algorithmes associés à la thromboélastométrie ont montré une réduction à la fois des saignements et des besoins transfusionnels. Néanmoins, adapter la transfusion à l'aide d'un algorithme sans surveillance biologique permet déjà de réduire les besoins transfusionnels (*Nuttall G, 2001; Steiner M.E, 2007*). Une méta-analyse de 33 essais randomisés regroupant 1913 patients visant à définir les méthodes pour réduire les saignements et les transfusions au cours de la transplantation hépatique, a identifié un bénéfice global à l'administration d'antifibrinolytique et/ou de FVIIa, à l'utilisation de la thromboélastométrie et à la diminution de la pression veineuse centrale (*Gurusamy K.S, 2012*). Les auteurs n'ont, toutefois, pas été capables de défendre ou de réfuter aucun de ces différents facteurs, faute d'études bien conçues. Une autre méta-analyse de 9 essais randomisés (776 patients) comparant la transfusion basée sur le TEG ou le ROTEM à la transfusion sur des critères cliniques ou biologiques standards n'a pas mis en évidence de bénéfices à l'utilisation de la thromboélastométrie, sur la survie des patients (*Afshari A, 2011*). Enfin, une étude récente prospective a évalué l'impact de la thromboélastométrie sur la transfusion et le saignement au cours de la transplantation hépatique. L'utilisation d'un algorithme basée sur la thromboélastométrie ne permet de réduire ni la transfusion ni le nombre de patients transfusés (*Roullet S, 2015*).

La thromboélastométrie est particulièrement sensible à la formation du caillot fibrinoplaquettaire, et donc aux variations de la concentration en fibrinogène. Cela en fait un outil potentiel pour la détection des coagulopathies de dilution au cours desquelles fibrinogène et plaquettes chutent rapidement (*Hiippala S.T, 1995*). Néanmoins, l'administration précoce de fibrinogène ne permet pas de réduire la mortalité liée à l'hémorragie en chirurgie programmée (*Wikkelso A, 2013*). Le fibrinogène est également un marqueur précoce de coagulopathie au cours de l'hémorragie du post partum (HPP) (*Cortet M, 2012; Charbit B, 2007*). En raison des délais associés à l'obtention des résultats de biologie standard, la mesure rapide du fibrinogène par thromboélastographie permettrait d'améliorer la prise en charge de l'HPP. En effet la concentration en fibrinogène mesurée au

lit du patient est associée à la sévérité de l'hémorragie et semble prédictive des besoins transfusionnels, du volume de saignement et du recours aux procédures invasives (*Collins P.W, 2014*). Pour autant, faut-il que la thromboélastométrie soit intégrée à l'exploration de la coagulation en salle d'accouchement ? Il y a plusieurs arguments contre cette attitude.

La thromboélastométrie est adaptée pour la surveillance du fibrinogène dans le contexte de l'HPP (*Huissoud C, 2009*). Dans l'étude de Collins et al, seul le fibrinogène mesuré en thromboélastométrie restait associé, dans un modèle d'analyse multivariée, au pronostic de l'HPP et aux besoins transfusionnels, contrairement au fibrinogène coagulant mesuré par la technique de Clauss (*Collins P.W, 2014*). Ceci pourrait suggérer que dans la phase précoce de l'HPP, d'autres facteurs de coagulation pourraient être impliqués dans la formation du caillot. Dans ce contexte, le fibrinogène n'est-il qu'un indicateur de sévérité de l'HPP ou est-il responsable de son évolution péjorative ?

Pour que la mesure du fibrinogène en thromboélastométrie devienne un marqueur pronostique de l'HPP, il faut définir un modèle multivarié associant la mesure du fibrinogène par thromboélastométrie avec les indicateurs pronostiques de l'HPP déjà identifiés associés à d'autres caractéristiques cliniques. Après validation externe, le modèle sera pertinent si l'impact clinique est positif, c'est-à-dire si ce modèle apporte une aide au diagnostic, améliore la survie des patientes et réduit les coûts (*Steyerberg E.W, 2013*). Mais au préalable, il faut définir le bénéfice d'une administration précoce de fibrinogène sur l'évolution de l'HPP. Une étude prospective randomisée en double aveugle est en cours actuellement afin de mesurer l'impact d'une administration précoce de fibrinogène sur la prise en charge transfusionnelle des patientes au cours de l'HPP (ISRCTN46295339).

La thromboélastométrie a également été utilisée dans d'autres domaines, comme outil d'exploration de l'hypercoagulabilité (*O'Donnell J, 2004*) ou plus récemment comme technique d'exploration des déficits constitutionnels en facteurs de coagulation (*Sorensen B, 2004; Young G, 2006*).

Quel que soit le domaine d'utilisation, la thromboélastométrie ne fournit aucune analyse quantitative d'un facteur coagulant ou anticoagulant et demeure un outil de recherche. Les deux automates TEG et Rotem, bien que de méthodologie similaire, ne sont pas identiques et dans l'attente de procédures de standardisation, les résultats fournis par les 2 automates ne sont pas interchangeables. Les recommandations d'utilisation des fournisseurs doivent être respectées afin d'assurer la qualité des résultats. La thromboélastométrie fait partie des examens de biologie médicale délocalisée (EBMD) qui doivent satisfaire aux exigences de la norme (AFSP1315018A).

Précautions à l'utilisation de la thromboélastométrie

Les EBMD sont encadrés par les exigences de la norme EN ISO 22870 et de la réforme de la biologie médicale qui les placent sous la responsabilité des biologistes. L'application des

exigences de cette norme est en de nombreux points très proche de celle de la norme ENISO 15189 au sein d'un laboratoire de biologie médicale (<http://www.cofrac.fr>). Comme pour tout examen de biologie médicale les étapes préanalytiques, comme le choix de l'anticoagulant (sang natif ou citraté), les modalités du prélèvement, le délai d'analyse de l'échantillon, conditionnent la qualité des résultats. Les étapes de pipetage manuel et de mélange des réactifs sont également susceptibles d'influencer la qualité des résultats. Face à cette variabilité pré-analytique et analytique, la question du rendu en thromboélastométrie de résultats standardisés et reproductibles est posée. Le NEQAS (UK National External Quality Assessment Scheme) a évalué à l'aide d'un contrôle externe de qualité, les résultats rendus par 18 utilisateurs de TEG et 10 utilisateurs de ROTEM (*Kitchen DP, 2010*). Les résultats de cette étude montrent une variation considérable des mesures pour les deux automates, avec des coefficients de variation en fonction des centres, allant de 7.1 à 39.9% pour le TEG, et de 7.0 à 83.6% pour le ROTEM. Certains centres ont rendu des résultats suffisamment différents de ceux obtenus par les autres participants, pour prédire une prise en charge thérapeutique inadaptée (*Kitchen DP, 2010*). Un groupe de travail international (TEG-ROTEM working group) regroupant 9 laboratoires de 6 pays a publié les résultats de la première étude de standardisation de la thromboélastographie sur plasma riche en plaquette (*Chitlur M, 2011*). Cette étude, a montré une variation significative des résultats entre les laboratoires et les instruments, indiquant que la variabilité liée à l'opérateur n'était pas négligeable. En comparaison, les évaluations externes de la qualité des laboratoires de biologie médicale européens (ProBioQual), montrent pour des tests de routine comme le TCA et le TQ, des CV à moins de 5% pour la majorité des combinaisons automates/réactifs dans plus de 800 laboratoires. Ces données de la littérature confirment, s'il le fallait encore, qu'il faut réserver l'utilisation de la thromboélastométrie à des opérateurs dédiés et justifient de soumettre ces automates à la norme EN ISO 22870 des analyses de biologie délocalisée, détaillant les exigences concernant la qualité et la compétence. En effet, c'est par un personnel expérimenté et au cours d'une étude multicentrique (6 centres) que les valeurs normales pour les différents paramètres du ROTEM ont été définies (*Lang T, 2005*). Cette étude a montré des valeurs de référence comparables entre les différents centres. Un dernier point qui reste à préciser est la définition des valeurs de référence en thromboélastométrie.

2. Test de génération de thrombine et syndrome hémorragique: Valérie Proulle (Bicêtre) et Jérôme Duchemin (Poitiers)

Exposé de Jérôme Duchemin

Le test de génération de thrombine (TGT) permet d'estimer le système de la coagulation dans sa globalité. L'utilisation d'un substrat fluorogénique réagissant lentement avec la

thrombine permet une mesure en continu de la génération de thrombine et rend possible l'utilisation non seulement de plasma pauvre en plaquettes (PPP) mais aussi de plasma riche en plaquettes (PRP). La génération de thrombine sera réalisée en présence de facteur tissulaire (FT) (à la concentration de 1 pM le plus souvent), de phospholipides (sauf en PRP) et de calcium. Trois paramètres sont fréquemment utilisés pour interpréter un profil de TGT : le potentiel thrombine endogène (PTE), la hauteur du pic thrombine et le temps de latence. Un quatrième paramètre, la vélocité, peut aussi être calculé. L'influence des différents facteurs de la coagulation sur les paramètres du TGT est variable. On peut cependant considérer que le PTE est principalement influencé par les facteurs II et X ; la hauteur du pic par les facteurs II, VIII, IX et X ; le temps de latence par les facteurs II, V, VII et X. Le fibrinogène représente un cas particulier car, contrairement aux autres facteurs d'influence, l'augmentation de sa concentration se traduira par un allongement du temps de latence (*Duchemin J, 2008*). Dans les conditions habituelles, le TGT n'est pas sensible au facteur XI. Cependant, l'utilisation d'une faible concentration de FT (0,2 pM voire 0 pM) rend le test sensible à ce facteur (*Al Dieri R, 2002*).

En 2005, sur une population d'hémophiles, *Dargaud et al.* montraient une influence du taux de facteur VIII ou IX sur le PTE et le pic thrombine mais pas sur le temps de latence. Par ailleurs, les hémophiles avec un tableau clinique sévère présentaient un PTE plus faible que ceux avec un tableau clinique modéré (*Dargaud Y, 2005*). *Beltran-Miranda et al.* confirmaient ces observations mais considéraient le pic thrombine comme un meilleur discriminant de la sévérité clinique. Enfin, l'influence du taux de facteur VIII sur le TGT s'exerçait surtout pour des valeurs inférieures à 50% avec une grande variation inter-individuelle (*Beltran-Miranda CP, 2005*). La classification des hémophiles en sévères, modérés ou mineurs est parfois compliquée par l'existence d'une discordance entre les dosages chromométrique (dit en 1 temps) et colorimétrique (dit en 2 temps). Sur une cohorte de 36 hémophiles A mineurs, *Trossaert et al.* ont montré que le TGT était mieux corrélé au dosage chromogénique d'une part, et à la sévérité du tableau clinique d'autre part (*Trossaert M, 2014*). De leur côté, sur une cohorte de 76 hémophiles A et B sévères, *Santagostino et al.* ont montré que la tendance hémorragique des patients dépendait non pas de l'activité coagulante du facteur VIII ou IX mais du type de la mutation identifiée et qu'il existait encore une fois une bonne corrélation entre le tableau clinique et le profil du TGT obtenu sur PRP (*Santagostino E, 2010*).

Dans la maladie de Willebrand, *Rugeri et al.* ont montré que le TGT était essentiellement dépendant du taux de Facteur VIII et non de celui du facteur Willebrand (VWF), aussi bien sur PPP que sur le PRP. Cependant, un pic thrombine bas (<55 nM sur PRP ; < 188 nM sur PPP) était associé à un risque hémorragique élevé (*Rugeri L, 2007*). Récemment, en travaillant sur PRP avec un mutant « gain de fonction »2B, *Pelmans et al*

ont mis en évidence, une certaine sensibilité du TGT à l'état d'activation du VWF (*Pelkmans L, 2015*).

Enfin sur une population de patients déficitaires en facteur XI, *Rugeri et al*, ont mis en évidence sur PRP une altération des différents paramètres du TGT chez les patients présentant un syndrome hémorragique marqué alors que le profil du TGT était identique à celui du groupe contrôle chez les patients ne saignant pas (*Rugeri L, 2010*).

Le TGT pourrait également être utilisé pour choisir l'agent by-passant le plus efficace chez un patient donné. Ainsi, l'adjonction de Feiba[®] au plasma d'un patient atteint d'hémophilie A acquise permet une normalisation des paramètres du TGT pour des concentrations finales allant de 0,7 (PTE et pic thrombine) à 1 U/ml (temps de latence) avec un maximum d'activité obtenu entre 15 et 30 minutes (*Váradí K, 2003*). En cas de tolérance immune, l'addition *in vitro* de rFVIIa permet de potentialiser l'action du facteur VIII sur le TGT et de définir des bons et des mauvais répondeurs. L'utilisation concomitante des deux produits chez les bons répondeurs s'est traduite par une réduction significative des accidents hémorragiques (*Livnat T, 2013*). Enfin, lors de chirurgie sous agent by-passant chez des hémophiles A sévères avec inhibiteur, *Dargaud et al.* ont proposé un protocole en 3 étapes basé sur le TGT pour déterminer le produit à utiliser, la dose nécessaire et assurer le suivi per- et post-opératoire (*Dargaud Y, 2010*).

L'utilisation du TGT à une large échelle nécessite sa standardisation. L'adjonction de CTI lors du prélèvement afin de s'affranchir du risque d'activation de la phase contact n'a de sens que si la concentration de FT est faible ($\leq 0,5$ pM) (*Spronk HMM, 2009*). Le prélèvement doit être effectué par ponction veineuse directe (pas de « butterfly ») à l'aide d'une aiguille de 18 à 21 gauge. Le préchauffage de la plaque à 37°C n'améliore pas la reproductibilité inter-laboratoire mais permet de mieux homogénéiser les pratiques. Par contre, la normalisation des résultats du TGT par rapport à un plasma de référence améliore fortement cette variabilité inter-laboratoire (*Dargaud Y, 2012*).

Valérie Proulle : intérêt du TGT dans l'évaluation de la tendance hémorragique des patients présentant des anomalies acquises ou constitutionnelles de l'hémostase

L'expérience de Bicêtre a été rapportée à travers plusieurs cas cliniques (HA mineure, auto ac anti thrombine, auto anti FVIII, VWD acquis).

3. Les thrombopathies héréditaires en agrégométrie optique : Marie Christine Alessi (Marseille)

Les thrombopathies correspondent à un groupe hétérogène d'anomalies dont le diagnostic met très souvent en première ligne l'interprétation des résultats de l'agrégation plaquettaire réalisée *in vitro* sur un plasma riche en plaquettes (PRP) citraté.

I- Thrombopathies constitutionnelles de mécanisme établi.

A. Défaut d'agrégation en réponse à l'ensemble des agonistes excepté la ristocétine

Le syndrome hémorragique est en règle générale sévère. Le défaut est lié à une absence ou à une forte réduction de la liaison du fibrinogène à son récepteur plaquettaire, la GPIIb/IIIa.

Le déficit quantitatif de GPIIb/IIIa à la surface des plaquettes constitue la thrombasthénie de Glanzmann et est facilement confirmé par la mesure de la GPIIb/IIIa en Cytométrie.

L'existence d'un défaut d'agrégation à tous les agonistes avec une expression normale de GPIIb/IIIa en cytométrie de flux oriente vers trois possibilités :

- une anomalie qualitative de la GPIIb/IIIa qui l'empêche de se lier au fibrinogène constituant le variant de thrombasthénie de Glanzmann.
- une GPIIb/IIIa normale mais incapable de s'activer en raison d'un défaut de signalisation « inside out » par déficit en kindline 3 ou en CalDAG-GEF1.
 - o La kindline 3 s'associe à la GPIIb/IIIa et est requise pour son activation (Figure 1). L'agrégation plaquettaire est absente à la plupart des agonistes excepté le TRAP qui, à forte dose induit une agrégation de bas niveau (30%). Ce défaut s'accompagne d'un déficit immunitaire sévère par défaut d'activation des intégrines leucocytaires identifié sous le nom de LADIII, ce qui permet de le distinguer d'un variant de thrombasthénie de Glanzmann.
 - o CalDAG-GEF1 est un facteur d'échange de la GTPase monomérique, Rap1 (Figure 1). L'agrégation plaquettaire est fortement réduite lorsque les plaquettes sont stimulées par de faibles doses d'agonistes (ADP, TRAP, adrénaline). La voie de CalDAG-GEF1 est compensée si de fortes doses de TRAP (50µM) ou d'ADP (100µM) sont utilisées ou lors d'activation directe de la PKC.

B. Défaut spécifique de réponse à un agoniste

B.1. Défaut d'agrégation au collagène

Ce défaut oriente majoritairement vers un déficit constitutionnel ou acquis (autoanticorps) en GPVI ou de la voie de signalisation en aval de GPVI (Figure 2). L'agrégation plaquettaire peut être totalement absente, ou seulement réduite. Le CRP ou peptide activateur issu du collagène et la convulxine (venin de serpent) sont des agonistes spécifiques de la GPVI permettant d'évaluer la voie GPVI sans mettre en jeu la GpIa/IIa. Les défauts constitutionnels ou acquis en GPIa-IIa et ceux en rapport avec les voies de signalisation en aval de GPVI sont exceptionnels. Toutefois, de nouvelles thérapeutiques ciblées (inhibiteurs de Src, de Syk, ou de Btk) utilisées dans le traitement d'hémopathies malignes inhibent l'agrégation au collagène en interférant avec les voies de signalisation.

B.2 Défaut de réponse à la ristocétine

Les thrombopathies par anomalie du récepteur au facteur Willebrand (complexe Gplb/V/IX) s'accompagnent d'un défaut de réponse à la ristocétine et d'une thrombopénie macrocytaire en raison d'un rôle important joué par la Gplb/V/IX dans la formation des proplaquettes.

- Dans la maladie de Bernard et Soulier, de transmission autosomique récessive, le complexe Gplb/V/IX n'est plus exprimé à la surface de la plaquette, l'agrégation à la ristocétine (>1,2 mg/ml) est absente. Le diagnostic est facilement confirmé en Cytométrie. Il existe de rares cas de thrombopénies par anomalies du complexe Gplb/V/IX de transmission autosomique dominante caractérisées par une diminution très modeste de l'agrégation induite par la ristocétine et du niveau de l'expression du complexe Gplb/V/IX à la surface des plaquettes.
- Le pseudo-Willebrand plaquettaire est dû à des mutations qui augmentent l'affinité de la Gplb α pour le facteur Willebrand normal, l'agrégation à la ristocétine à faible dose (\leq 0,6 mg/ml) est présente. Le diagnostic différentiel avec un variant 2B de maladie de Willebrand est réalisé par l'épreuve croisée (persistance de l'agrégation à la ristocétine faible dose du mélange plaquettes du patient et plasma normal).

C. Défaut complexe prédominant sur la réponse à un agoniste

C.1 Anomalie du récepteur à l'ADP, P2Y12

Les plaquettes expriment plusieurs récepteurs purinergiques (Figure 3). L'agrégation induite par l'ADP explore la voie P2Y1/Gq, voie «starter» à l'origine d'une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire et d'un changement de forme des plaquettes et la voie d'activation/amplification P2Y12/Gi. L'activation de P2Y12 inhibe aussi les voies de rétrocontrôle négatif de l'agrégation plaquettaire, essentiellement médiées par l'AMPc produit par l'adénylate cyclase (AC) (Figure 3). Ce rétrocontrôle est impliqué dans la croissance du thrombus *in vivo* mais n'est pas exploré par l'agrégation plaquettaire en PRP. L'ADP sécrété des granules δ est un amplificateur de l'activation plaquettaire induite par des concentrations sous-optimales d'autres agonistes. A fortes concentrations d'agonistes la boucle d'amplification de l'ADP n'est plus utile pour induire une agrégation optimale *in vitro*. Chez les patients porteurs d'une mutation délétère de P2Y12 à l'état homozygote ou hétérozygote composite, le défaut est présent aux très fortes doses d'ADP (100 μ M). L'agrégation est réduite en réponse à de faibles doses de collagène, soulignant le rôle amplificateur important de l'ADP dans des conditions de faible stimulation. Ce phénomène n'est pas observé avec de fortes doses de collagène ou de TRAP. Le porteur de mutation à l'état hétérozygote présentera, en général, un tableau intermédiaire avec une agrégation quasi normale ou qui s'améliore à fortes doses. La détection des hétérozygotes peut nécessiter la réalisation de méthodes plus sensibles.

C.2 Défaut sur la voie du Thromboxane A2 (TXA2)

Le TXA2 produit par la transformation de l'acide arachidonique (aa) endogène ou exogène exerce son effet via un récepteur spécifique (TP α) couplées aux protéines Gq et G12/13 (Figure 4). Cette voie correspond à un mécanisme d'amplification essentielle pour obtenir l'agrégation aux faibles concentrations de nombreux agonistes, notamment à l'adrénaline et à l'ADP. Le défaut de réponse à l'aa est le plus souvent lié un défaut de conversion de l'aa exogène en TXA2 dû à la prise d'inhibiteurs de COX1 comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens ou l'aspirine. Il n'a pas été reporté à ce jour d'anomalie des gènes de COX1 ou prostaglandin G/H synthase 1 (PTGHS). Les mutations décrites touchent le récepteur TP α . L'utilisation d'analogues du TXA2 comme l'U46619 et le dosage du TXB2 (métabolite stable du TXA2) dans le sérum permettent de distinguer ces deux mécanismes. Dans le premier cas, l'agrégation induite par les analogues du TXA2 est normale et le TXB2 sérique est très bas. Dans le deuxième cas l'agrégation induite par l'U46619 est profondément affectée.

D. Anomalies de l'agrégation plaquettaire par défaut des granules denses

Ces défauts se caractérisent par une réduction de l'agrégation plaquettaire aux faibles doses d'agonistes en accord avec une réduction des rôles amplificateurs de l'ADP. Mais quelques caractéristiques sont à souligner: le défaut d'agrégation à l'ADP 10 μ M est en règle générale modéré laissant supposer que la sécrétion influence peu l'agrégation induite par l'ADP lui-même. La réponse au collagène faible dose est par contre fortement réduite. La réponse aux faibles doses d'épinéphrine est très souvent anormale. Les formes syndromiques sont des désordres autosomiques récessifs facilement évoqués car ils s'accompagnent d'un albinisme. Les déficits en granules denses non syndromiques sont plus fréquents et probablement sous-estimés car le syndrome hémorragique est en général modéré. Il est important de souligner que l'agrégation plaquettaire peut être normale ou peu perturbée. Une batterie de tests complémentaires pourra être mise en œuvre pour consolider ce type de diagnostic avec en particulier la quantification de composants intragranulaires et le comptage des granules denses en microscopie électronique à transmission.

E. Défaut touchant une voie d'inhibition de l'activation plaquettaire : Déficit en G alpha s

Une tendance aux saignements a été décrite chez des patients présentant une hyperactivité de la voie Gs correspondant à une insertion de 36pb dans le gène codant pour la sous unité extralarge de Gs. La transmission est uniquement paternelle. Ces cas sont associés à un retard mental, une épilepsie et des anomalies modérées du squelette. L'agrégation plaquettaire est normale alors que le temps de saignement est fortement allongé. Le

diagnostic de ces cas passe par la mise en évidence d'une inhibition majorée de l'agrégation plaquettaire par la PGI2 et la PGE1.

II Thrombopathies constitutionnelles de mécanisme incertain.

Défaut isolé de réponse à l'épinéphrine

Le défaut de deuxième vague en réponse à l'épinéphrine serait présent chez 10 à 15% des sujets normaux en rapport avec un nombre réduit de récepteurs $\alpha 2A$. Ce défaut a également été décrit au cours du syndrome Québec sans que le mécanisme ne soit élucidé.

Déficit en G alpha q (figure 4)

Un déficit de 25% de G α q a été mis en évidence dans une famille mais n'a pas, pour l'instant, été associé à une anomalie moléculaire.

Défaut de phospholipase C beta

Pour ces patients l'agrégation plaquettaire était réduite pour la plupart des agonistes. Aucune anomalie moléculaire n'est venue étayer cette hypothèse.

Défaut portant sur le récepteur P2X1

Une forme dominante négative du récepteur s'associerait à un défaut sélectif d'agrégation à l'ADP sans anomalie de l'agrégation à l'acide arachidonique, au TRAP14 et à la ristocétine. Les tracés d'agrégation plaquettaire du patient porteur de l'anomalie n'ont pas été rapportés dans la publication relative à ce cas.

*Figure 1 : Représentation schématique de la voie de signalisation impliquée dans l'activation des intégrines CalDAG-GEFI, un facteur d'échange GDP/GTP spécifique des petites protéines G, Rap. L'interaction Rap1*GTP avec RLAM (non montré) stimule la fixation de la taline sur la beta intégrine. Les domaines de liaison de la Taline et de la Kindline sont représentés sous forme de sphères. D'après Malinin*

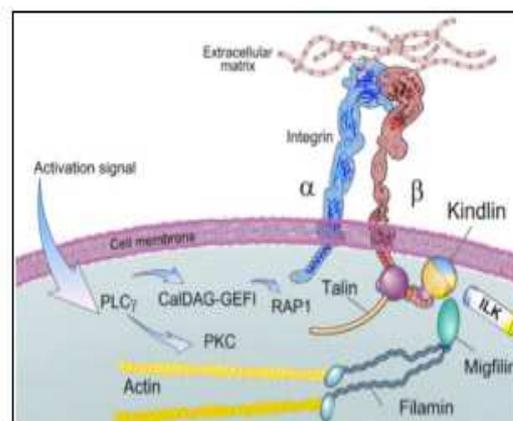


Figure 2: voie de signalisation GPII d'après Lecut et Jandrot Perrus Figure 3: Voies de signalisation empruntées par l'ADP d'après M Cattaneo

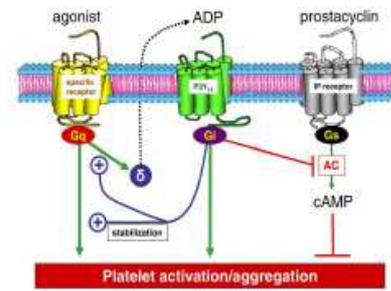
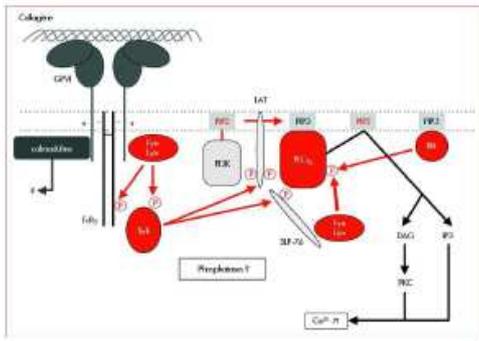


Figure 4 : Rôle des protéines G hétérotrimériques dans l'activation plaquettaire en réponse aux médiateurs solubles ou au stimuli adhésifs

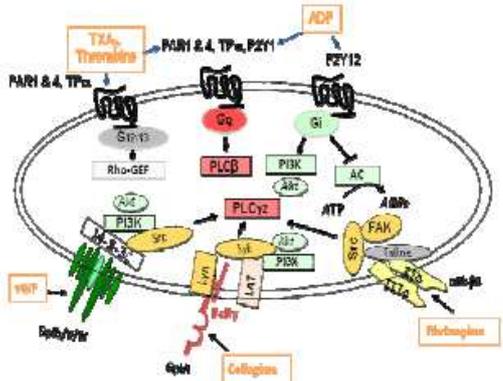
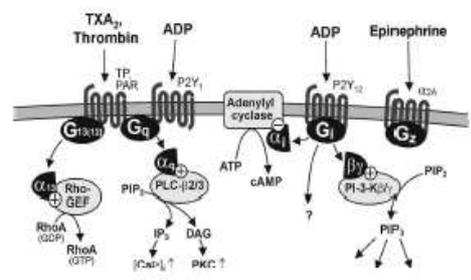


Figure 5 : Principales voies de l'activation plaquettaire (Payrastre)



4. Grossesse et Fibrinogène : Motalib Smahi (Eaubonne)

Un état d'hypercoagulabilité est rapporté en fin de grossesse du fait d'une part de l'augmentation de certains facteurs (Fibrinogène, Facteur Willebrand) et d'autre part par la diminution des inhibiteurs de coagulation et de la capacité fibrinolytique. Les hémorragies obstétricales restent la première cause de mortalité et morbidité maternelles en France (10 décès directs/an). Dans de grandes séries rapportant des hémorragies catastrophiques du post partum (HPP), les auteurs (Pfanner 2006, Huissoud 2009, Ducloy 2007, Bell 2010, Annecke 2010) soulignent la part importante de l'hypocoagulabilité et de l'hypofibrinogénémie dans la survenue des manifestations hémorragiques. Dans d'autres séries d'HPP, le taux de fibrinogène est retrouvé inversement proportionnel à l'abondance du saignement (Lloyd, 2011). Il est également établi qu'un taux de Fibrinogène < 2 g/dl est un marqueur de gravité de l'HPP (Gayat, 2011). Le fibrinogène est, toujours, le premier facteur à atteindre des concentrations critiques (Levy 2012, Singbartl 2003, Mittermayr 2007) ; c'est donc un marqueur précoce des hémorragies sévères et enfin le seul paramètre indépendant qui prédit une évolution sévère de l'HPP avec une VPP=100% si fg < 2 g/dl et une VPN=80% si fg > 4g/dl (Charbit 2007). En pratique, il faut donc monitorer le fibrinogène au moment du diagnostic de l'hémorragie et au cours des

transfusions afin de compenser les hypofibrinogénémies sachant que le taux de fibrinogène à maintenir se situe, probablement, entre 1,5 et 2 g/dl.

5. Evaluation multicentrique de la variabilité analytique du titrage des ac anti FVIII : C. Nougier (Lyon), C. Crampé (St Etienne) et R. Marlu (Grenoble)

Le dépistage et le titrage des inhibiteurs anti-FVIII sont réalisés grâce à des techniques fonctionnelles qui reposent sur la neutralisation du FVIII par l'inhibiteur. Actuellement la méthode de Bethesda est la plus largement utilisée en Europe (65% des laboratoires) par rapport à la technique de Nijmegen (30% des laboratoires) (*Mejer, 2010*). La technique de Nijmegen est, pourtant, la technique de référence préconisée par l'ISTH depuis 1996. Elle fait suite à la description par l'équipe de Verbruggen d'une fréquence élevée d'inhibiteurs de titre faible sans corrélation clinique lorsque la méthode de Bethesda est utilisée. L'explication est une élévation de pH dans le mélange plasmatique durant l'incubation de 2h à 37°C qui entraîne une dégradation du FVIII. Une différence de concentration protéique entre le mélange contrôle (pool+ tampon) et le mélange malade (pool+ plasma malade) est aussi à l'origine de faux positifs. Deux modifications ont donc été apportées à la méthode traditionnelle de Bethesda : l'utilisation d'un pool tamponné à pH=7.4 et l'utilisation d'un plasma déficient en FVIII pour la réalisation du mélange contrôle. Néanmoins pour des raisons pratiques et de coût la méthode de Nijmegen reste moins utilisée que la technique de Bethesda. Enfin environ 5% des laboratoires utilisent des techniques hybrides puisqu'une seule des 2 modifications a été apportée à la méthode de Bethesda.

La variabilité inter-laboratoire du titrage des anti-FVIII est largement documentée. D'abord par le retour des évaluations externes de la qualité (CV inter de l'ordre de 37% pour un titre moyen de 4 UB/mL) mais également par de nombreuses publications qui montrent un CV proche de 40% pour des titres compris entre 1 et 3 UB/mL (*Mejer, 2010*). La variabilité est également inversement corrélée au titre de l'inhibiteur (CV inter plus élevé pour les titres faibles). Les raisons à cette variabilité importante entre les laboratoires sont l'hétérogénéité des méthodes utilisées (Bethesda, Nijmegen, hybrides), la variabilité intrinsèque au dosage de facteur VIII (estimée entre 10 et 20% pour des taux entre 100 et 20%), les réactifs et les protocoles utilisés (source de FVIII « maison » ou commerciale tamponnée ou non, le diluant utilisé, les dilutions utilisées pour déterminer le titre). La variabilité intra laboratoire est moins bien connue car peu de laboratoires utilisent actuellement des CIQ pour le titrage des inhibiteurs et peu d'études ont été publiées. Seule l'étude de P. Mejer en 2010 fait état de variations moyennes de l'ordre de 30% sur 2 séries de mesures sur un plasma analysé à 2 reprises à 6 mois d'intervalle. Le NASCOLA rapporte également un CV intra de l'ordre de 56% pour un titre moyen de 15 UB/mL (exercice 2005).

Afin de mieux **évaluer la variabilité au sein d'un laboratoire** une étude dans 3 laboratoires des centres de Lyon, Grenoble et Saint Etienne a été réalisée. Les objectifs étaient :

- de connaître le CVintra dans chaque laboratoire
- de déterminer à quel titre la variabilité était maximale
- de savoir s'il existait une méthode plus robuste (Bethesda, Nijmegen....)
- d'identifier les sources principales de variations analytiques
- de tenter de standardiser le titrage des inhibiteurs
- d'identifier les points critiques et de proposer des axes d'amélioration

L'étude s'est déroulée en 2014 sur les 3 centres. Une phase préalable a permis de déterminer les titres par la technique de référence (Nijmegen) pour les plasmas à tester. Une fois ces plasmas produits à grande échelle par la société Cryopep, chaque centre a analysé ces plasmas sur 20 séries indépendantes avec la technique courante utilisée dans chaque laboratoire. Un panel de 6 plasmas titrés à 0, 0.6, 1, 5, 10 et 70 UB/mL par la technique de Nijmegen a été envoyé à chaque laboratoire.

Un plasma dit de « référence » est titré à 1 UB/mL a également été envoyé et analysé dans chaque série par les 3 centres. Enfin une fiche de renseignement collectant le type de matériel, la méthode, les réactifs utilisés et le nombre d'opérateurs a été envoyée à chaque centre.

Les résultats de cette étude montrent une variabilité intra laboratoire hétérogène entre les 3 laboratoires (A, B et C). Les CV moyens étaient de 15%, 25% et 11% pour les centres A, B et C respectivement. Le CV intra tend à augmenter sur les titres extrêmes (0.6 UB/mL et 70UB/mL). Pour le plasma à 0 UB/m, aucun résultat positif n'a été détecté ; en revanche, le pourcentage de résultats faussement négatifs, pour le plasma 0.6 UB, était de 0% pour le centre C, de 20% pour le centre A et de 80% pour le centre B. Pour le centre A le CVintra minimum était de 7.5% (1UB/mL) et le CVintra maximum était de 23.5% (0.6UB/mL). Pour le centre B le CVintra minimum était de 21.4% (10 UB/mL) et le CVintra maximum était de 27.2% (70 UB/mL). Enfin le centre C présentait les meilleurs CV : minimum à 7.8% (10 UB/mL) et maximum à 15.8% (5 UB/mL). Tous les résultats étaient considérés significativement différents entre les centres à l'exception du titre à 70 UB/mL.

Les différences observées en termes de variabilité analytique sont expliquées en partie par les différents paramètres représentés dans le tableau ci-dessous :

	A	B	C
Méthode	Nijmegen modifiée	Béthesda modifiée	Béthesda
Source de FVIII	Pool maison congelé	Plasma standard lyophilisé	Pool commercial de plasma congelé
Dilutions utilisées	De 2 à 4 adaptées selon le titre	De 1 à 2 (multiple de 2)	1 (déterminer lors de la première série)
Nombre d'opérateurs	4	11	6
Série/semaine	0 à 6	0 à 2	4 à 5
Durée (semaines)	6	21	5
Analyseur	STAGO	STAGO	STAGO
CIQ/EEQ	EEQ	EEQ et CIQ	EEQ

Les techniques, la source de Facteur VIII, les protocoles de dilutions utilisées sont différents entre les centres mais le CV moyen supérieur pour le centre B est sans doute expliqué par le nombre beaucoup plus important d'opérateurs qui ont réalisé les séries. En effet, l'étude s'est réalisée dans les conditions réelles dans ce centre sur une durée de 21 semaines alors que les 2 autres centres ont réalisées leur série sur un temps plus court avec un nombre d'opérateurs moins important ce qui diminue de façon importante la variabilité.

Le second objectif était de savoir s'il était possible de **standardiser le titrage des inhibiteurs**. L'étude de Verbruggen en 2011 reporte un essai de standardisation. 15 laboratoires ont participé à l'étude en titrant 6 plasmas (1.6, 0.8, 1.4, 0.7, 2 et 15 UB/mL). Le CV inter moyen initial était de 44.3% lorsque les participants utilisaient leur propre protocole et leurs réactifs. Lors de la deuxième session il a été demandé aux laboratoires de réaliser le titrage en utilisant uniquement la technique de Nijmegen mais avec des réactifs différents le CV moyen diminuait faiblement à 40.6%. Pour la 3ème session, les laboratoires suivent la même technique en utilisant les mêmes réactifs (pool, tampon) et la même procédure de dilution, seul les réactifs concernant le dosage de FVIII différent. Le CV moyen est alors de 13.8%. Enfin lors de la 4ème session, tous les laboratoires utilisent les mêmes réactifs (titrage et dosage de FVIII) et les mêmes protocoles, le CV moyen est alors de 8.4%, variabilité inhérente à l'automate et aux opérateurs (*Verbruggen, 2011*). Dans notre étude, nous avons souhaité utiliser un plasma défini arbitrairement comme plasma de référence (plasma « S »). Ce plasma titré par la méthode de Nijmegen à 1 UB/mL a été analysé à chaque série par chaque centre. Le résultat de ce plasma a permis de « normaliser » les résultats (si le résultat du plasma S était à 0,8 UB/mL les résultats des autres plasmas

étaient multipliés par 1,25...). Lorsque les variabilités intra-laboratoires sont comparées avant et après normalisation, les résultats montrent une diminution de cette variabilité notamment pour le centre B chez qui était détecté le CV_{intra} maximal. Si les titres des plasmas étaient significativement trouvés différents entre les centres avant normalisation, la normalisation montre une absence de différence notamment pour le plasma du titre à 1 UB/mL (Figure 1). En revanche pour les autres titres, la distribution des valeurs diminuaient mais n'aboutissaient pas à une homogénéité.

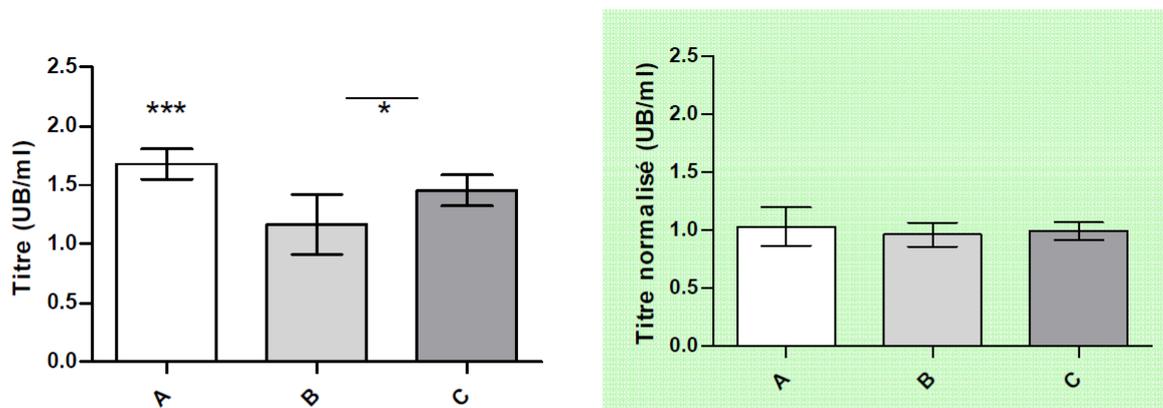


Figure 1 : résultats obtenus pour le plasma 1UB/ml pour les centres A, B ET C avant normalisation (graphe de gauche) et après normalisation (graphe de droite): Différence significative entre tous les laboratoires ($p < 0,001$)

Une des hypothèses pour améliorer cette importante variabilité serait de pratiquer une « calibration » en utilisant des plasmas de titre exact sur une large gamme de mesure. Cependant cette calibration semble difficilement réalisable en pratique car il n'existe pas actuellement de plasma étalon utilisable et que les inhibiteurs anti-VIII sont polyclonaux et très hétérogènes (cibles antigéniques différentes entre les patients). De plus cette calibration devrait être systématique à chaque série.

Cette étude a permis d'identifier **différents points critiques pour lesquels plusieurs axes d'amélioration peuvent être proposés :**

- peu de laboratoires utilisent actuellement des CIQ pour le titrage des inhibiteurs anti-VIII car peu de matériel de contrôle sont actuellement disponibles sur le marché (il existe des plasmas lyophilisés mais souvent avec des titres élevés). Il semble indispensable de disposer de CIQ : un plasma avec un titre faible (permettant de rejeter la série en cas de résultat faussement négatif) et un plasma négatif afin de limiter les résultats faussement positifs. De nouveaux réactifs de contrôles devraient bientôt apparaître sur le marché.

- utiliser un pool de plasma tamponné comme source de FVIII. Ce pool doit être si possible congelé afin d'éviter l'étape de reconstitution des plasmas lyophilisés qui aboutissent à augmenter la variabilité (erreur métrologique). Selon les préconisations d'ECAT (2015) le taux de FVIII contenu dans ce pool doit être compris entre 95 et 105% afin de ne pas surestimer ou sous-estimer le titre de l'inhibiteur.
- utiliser la dilution du plasma la plus faible possible et qui permet d'obtenir un facteur VIII résiduel le plus proche de 50%. ECAT préconisent des dilutions à utiliser en fonction des titres : plasma pur pour des titres entre 0 et 2.0 UB/mL, plasma au 1/3 pour les titres entre 2.1 et 6.0, plasma au 1/10ème pour les titres entre 6,1 et 20 UB/mL et plasma au 1/30ème entre 20 et 160 UB/mL. Cependant ces préconisations semblent difficiles à suivre pour tous les laboratoires car les dilutions proposées ne coïncident pas forcément avec un taux de FVIII résiduel proche de 50%.
- Limiter au maximum le nombre d'opérateurs pour limiter le biais opérateur, préconisation difficilement réalisable dans certains laboratoires
- Réaliser le dosage de FVIII sur le mélange malade et le mélange témoin en double et utiliser la moyenne pour le calcul du FVIII résiduel
- Utiliser la méthode de Nijmegen qui est la technique de référence mais cette technique est plus difficile à mettre en oeuvre et plus coûteuse. Le bénéfice porte surtout sur le taux de faux positifs moins important avec cette technique mais n'améliore que très faiblement la variabilité analytique

Améliorer la performance analytique du titrage des inhibiteurs permet de répondre au mieux aux définitions des seuils cliniques :

- 0, 6 UB/mL qui est le seuil de positivité
- 5 UB/mL seuil permettant de définir un patient faible répondeur ou fort répondeur
- 10 UB/mL : titre pronostic sur la réussite de la tolérance immune

Le titre de l'inhibiteur est également utile pour calculer la dose saturante de l'inhibiteur en cas de traitement substitutif chez un patient hémophile faible répondeur. L'exactitude du titre a un impact sur la prise en charge du patient et sur le coût du traitement. Pour une incertitude de mesure estimée à 36% dans l'un des centres pour un titre moyen à 3 UB/mL la dose saturante fluctue entre 15 000 unités (soit un surcoût estimé à 4000 euros) et 7000 unités (risque de ne pas saturer correctement l'inhibiteur). La gestion de cette variabilité est incontournable afin d'améliorer la prise en charge des patients hémophiles et de répondre aux exigences nécessaires à l'accréditation de cette analyse.

6. Présentation d'un cas clinique par : C. Flaujac (Cochin) : développement d'un allo – ac chez une patiente VWD de type 3. Intérêt de l'ELISA dans sa détection

7. Le point sur l'étude multicentrique facteur XIII antigène (K-assay Factor XIII[®], Stago[®]) : C. Caron (Lille)

La société Stago a sollicité le club des biologistes en juin 2014 pour mettre en place une étude multicentrique de validation de méthode sur STAR, avec pour objectifs d'évaluer les performances analytiques et cliniques de ce nouveau réactif. Les centres participants devaient posséder un STAR et utiliser en méthode usuelle le test Berichrom FXIII Siemens.

Huit centres ont réalisé les dosages et 4 centres ont participé à l'inclusion de plasmas ; au total 147 plasmas ont été testés avec les taux suivants : <5% (10), 5 – 15% (12), 15-30% (6), 30-60% (12), 60-120% (50), >120% (57). La fiche clinique renseignée à l'inclusion des échantillons a permis de collecter les principales circonstances de la demande : hémorragie inexplicée (n=87), déficit sévère en FXIII sans ou avec substitution (n=25), hémorragie du nouveau-né (n=4), suspicion de maltraitance (n=2), avortements à répétition (n=3), afibrinogénémie (n=1), antiFXIII (n=2).

L'analyse descriptive des résultats (tableau) a été réalisée globalement et séparément pour les taux <30%, 30-60% et 60-120% avec une comparaison à l'activité fonctionnelle Berichrom (p= NS). La corrélation entre les 2 méthodes est très bonne ($r=0,917$ sur les 147 plasmas, $r=0,850$ pour les taux <30%; $p<0,0001$) ; l'agrément des méthodes évaluée par le graphe de Bland-Altman est satisfaisant (biais 12,5% sur les 147 plasmas).

Les discordances activité-antigène ont été recherchées et analysées en complétant les dosages par le test semi quantitatif de solubilité du caillot (Stago) pour les plasmas avec fibrinogène < 2 g/l ou ratio activité Berichrom/antigène Kassay <0.7. Le patient avec une afibrinogénémie se présente avec une activité Berichrom très diminuée (9%) mais des taux antigénique Kassay (112%) ou de solubilité du caillot (105%) normaux. Un seul plasma avec ratio activité Berichrom/antigène Kassay < 0.7 (60%/97% soit 0.62) est confirmé en test de solubilité du caillot (50%). L'analyse des résultats discordants va être poursuivie.

En conclusion, sur la plasmathèque testée, la mesure antigénique n'a pas été mise en défaut pour la détection des déficits sévères en FXIII et globalement la corrélation avec l'activité Berichrom est satisfaisante. Le dosage antigénique peut être un recours lorsque la mesure de l'activité fonctionnelle n'est pas possible car l'ISTH recommande en 1^{ère} intention, pour le dosage du FXIII, la réalisation d'un test fonctionnel quantitatif.

	K assay	Berichrom
(tous, n=147)		
Moyenne (ET)	92.6% (56.5%)	80.1% (44.7%)
Min-Max	<4% - 256%	<1% - 184%
(<30%, n=28)		
Moyenne (ET)	9,0% (6.8%)	10.5% (7.3 %)
Min-Max	<4% - 26.5%	<1% - 27%
(30 - 60%, n=12)		
Moyenne (ET)	46.8% (6.8%)	46.0% (8.1%)
Min-Max	36% - 56%	33% - 60%
(60-120%, n=50)		
Moyenne (ET)	95,8% (17.2%)	91% (20..5%)
Min-Max	62%-120%	59% - 131%

Questions diverses

Deux études multicentriques sont proposées par Valérie Proulle : l'une portant sur TGT et VWD acquis par auto anticorps ; l'autre sur HA mineure et TGT.