

Compte rendu de la 16^{ème} journée du Club des biologistes en hémostase

Cette réunion s'est tenue le 22 Novembre 2018 et a rassemblé 34 biologistes.

1. Présentation des propositions pour les dosages des FVIII et FIX chez les patients hémophiles substitués. Rapporteurs pour l'ensemble des rédacteurs : *E. Jeanpierre, D. Lasne, C. Nougier, Claire Pouplard*

Des propositions concernant le dosage des FVIII et FIX, chez les patients hémophiles substitués ont été rédigées et soumises au vote par l'ensemble des membres du collège des biologistes. Elles sont en cours de publication dans les Annales de Biologie Clinique et seront mises en ligne sur le site du GFHT et de la COMETH.

2. Retour sur les journées ECAT : *Emmanuelle Jeanpierre (Lille)*

Lors de la 11^{ème} réunion de l'ECAT, un symposium satellite consacré aux dosages des FVIII et FIX à demi-vie prolongée était organisé.

D. Lillicrap, reprenant les nouveaux traitements de l'Hémophilie, a présenté quelques données du rFVIII_{FC}-VWF-XTEN (BIVV001), FVIII recombinant qui repose sur la technologie de fusion avec le fragment Fc et en ajoutant une région du facteur Willebrand ainsi que des polypeptides XTEN. Sa demi-vie est d'environ 37h. De par sa structure, le dosage de l'activité de ce produit sera probablement un nouveau challenge pour nos laboratoires.

Après une intervention d'**E. Gray** sur les titrages des produits, qui nous a confirmé qu'ADYNOVI[®] est titré par test chromométrique aux USA et chromogénique en Europe, **S. Tiefenbacher** s'est intéressé aux dosages des rFVIII-EHL. Il a précisé que les tests utilisés en laboratoire pour le dosage de l'activité FVIII chez les patients substitués devaient être réalisés avec la même technique que celle ayant servi au titrage des flacons. En revanche, **S. Kitchen** a proposé des tests adaptés pour chacune des molécules rFIX-EHL, en fonction des données disponibles actuellement même si celles-ci sont parfois limitées.

Jennings a ensuite présenté les résultats de l'Etude UK NEQAS/RCPA-QAP/ECAT. Deux échantillons (6 UI/dL et 60UI/dL) de Benefix[®], Idelvion[®], Alprolix[®] et Refixia[®] étaient proposés. Au total 164 laboratoires ont répondu (84, 17 et 63 par UK NEQAS, RCPA-QAP et ECAT respectivement) avec 14 réactifs différents. Les résultats obtenus sont en accord avec les propositions qui seront prochainement publiées par le club des bios. **P. Mejer** a présenté les résultats de cette étude obtenus spécifiquement par les 63 participants de l'ECAT. Ces résultats mettent en évidence que, dans ce contexte particulier, certains couples réactifs automatiques pouvant donner des résultats soit sous-estimés soit surestimés, la présentation habituelle de l'ECAT (comparaison par rapport à la moyenne des résultats obtenus par le groupe de pairs, appelé consensus) n'est probablement pas adaptée. La cible attendue est le paramètre à utiliser pour la comparaison. Les résultats obtenus pour l'Alprolix[®] à 60UI/dL avec le SynthasIL sont pris en exemple.

| % déviation par rapport à | Si valeur obtenue = 40UI/dL | Si valeur obtenue = 60 UI/dL |
|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| « consensus » (= 49.8 UI/dL) | -19.7% | 20.5% |
| « target » (=60 UI/dL) | -33.3% | 0 |

Un questionnaire a été envoyé pour connaître le besoin en EEQ pour EHL FVIII et FIX. 157 personnes ont répondu : 27% sont intéressés par un contrôle spécifique pour les EHL ; 65% préfèrent des EEQ avec produits connus et donc spécifique à chaque produit mais 35% préféreraient des échantillons avec EHL inconnu.

Une étude pilote est en place, avec le BAY 94-9027. Il est possible de commander, gratuitement, des échantillons pour participer à cette étude. <http://www.ecat.nl/information/assay-project-bay94-9027/>

Au final, cette session a montré l'enjeu des nouveaux traitements de l'hémophilie pour les organismes fournisseurs d'EEQ portés, mais a surtout permis de confirmer nos positions quant aux dosages des rFVIII et rFIX à demi-vie prolongée.

3. Intérêt de la standardisation mathématique des fonctions de calibration dans le dosage de l'ALPROLIX : une méthode alternative aux calibrations standards ? » Felipe Guerrero (Toulouse)

Nous travaillons au CHU de Toulouse à l'adaptation d'outils mathématiques pour la caractérisation et la résolution de problèmes de biologie. Un des aspects de ce travail est de mieux comprendre les facteurs qui influencent la variabilité des résultats, indépendamment de leur nature. Les calibrations issues du dosage d'un plasma d'étalonnage ne permettent pas dans de nombreux cas de corriger les dérives qui résultent de certains facteurs de variabilité. Afin d'améliorer les capacités de la calibration à corriger la variabilité dans les résultats nous avons développé un modèle mathématique pour optimiser la fonction de calibration.

Le traitement par ALPROLIX[®] constitue un facteur de variabilité reconnu qui induit une dérive dans les résultats du facteur IX, notamment quand la méthode de dosage utilise le CK Prest de STAGO. Devant ce problème bien connu, les cliniciens du centre de traitement de l'hémophilie de l'hôpital nous ont demandé de mettre en place un dosage fiable. Nous avons étudié les capacités de notre approche mathématique de standardisation pour améliorer la qualité des résultats de facteur IX dans ce contexte.

En pratique la dérive dans la fonction de calibration est estimée à partir d'échantillons de référence (plasmas spikés fournis par SOBI[®]). Le logiciel calcule la fonction de calibration optimale, compte tenu de l'automate et du lot de chaque réactif utilisé. Les valeurs de cette fonction de calibration optimale sont ensuite saisies sur l'automate par l'opérateur et vérifiées par un autre opérateur. Les plasmas de SOBI sont mesurés à nouveau pour s'assurer que la valeur d'origine est retrouvée.

Suite aux résultats favorables observés sur les plasmas de SOBI, nous avons fait une étude sur des échantillons plasmatiques de patients traités par l'ALPROLIX[®]. Pour cela nous avons comparé les résultats obtenus avant et après standardisation (avec le réactif CK Prest sur des automates STAR - STAGO) avec les résultats obtenus avec le réactif Synthasil sur un ACL TOP 350 CTS (WERFEN).

Les résultats ont été présentés sous la forme d'un poster lors du dernier ECTH à Marseille (poster accessible sur demande). Ces résultats montrent que la standardisation mathématique de la calibration en utilisant la méthode de STAGO permet de corriger la dérive initiale par rapport à la méthode de WERFEN.

Au vu de ces résultats favorables nous souhaitons valider cette approche par une étude multicentrique dont l'objectif sera de tester si l'utilisation d'un logiciel adapté et

sécurisé permet de reproduire les résultats observés dans l'étude préliminaire toulousaine. Ce logiciel est en cours de développement et sera prochainement évalué sur les aspects d'ergonomie et d'utilisation à Toulouse. Il pourra probablement être diffusé aux centres participants dans les mois à venir.

Cette étude multicentrique reposera principalement sur la constitution d'une double plasmathèque issue des patients hémophiles B traités par ALPROLIX® recrutés dans chaque centre. Une aliquote sera utilisée pour le dosage du facteur IX par la ou les méthodes choisies par chaque centre, avant et après standardisation mathématique. L'autre aliquote sera envoyée à Toulouse pour le dosage centralisé du facteur IX par une méthode considérée comme référence (probablement le Synthasil sur ACL TOP). Les informations de diagnostic et thérapeutiques (dose, date et heure de la dernière prise et date et heure du prélèvement) seront relevées.

L'amélioration de la variabilité sera évaluée par la comparaison des résultats avant/après standardisation par rapport à la méthode de référence. Avec les données thérapeutiques il sera possible d'évaluer l'impact de la standardisation sur les paramètres pharmacocinétiques (modèle PKPOP).

Pour cette étude, nous ferons un appel aux centres qui souhaitent participer via le club des biologistes. Nous avons également demandé le soutien du SSC de l'ISTH (Factor VIII, factor IX & Rare Coagulation Disorders) ainsi que le soutien du groupe des protocoles multicentriques du GFTH.

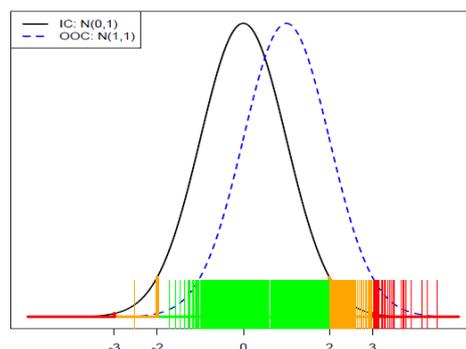
4. Cas cliniques : *Hubert Galinat (Brest) et Valérie Eschwege (Nancy)*

5. Des nouveautés dans le traitement des z-scores : congrès ECAT 2018 *Frédéric Sobas (Lyon)*

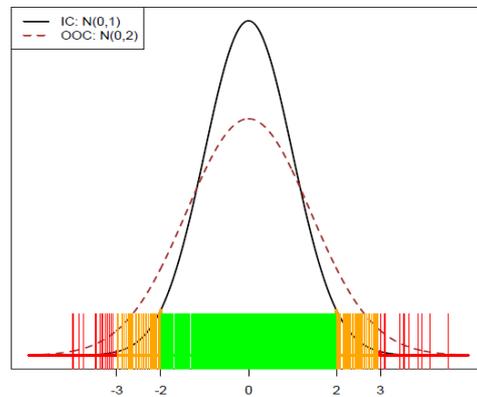
A l'occasion du congrès ECAT 2018, le Pr Panagiotis Tsiamirtzis a fait une présentation (préparée avec Frédéric Sobas) ayant pour objet de redéfinir tout ce qu'il est possible de tirer comme information des valeurs de z-scores produits par les organismes d'EEQ comme ECAT. Frédéric Sobas a présenté une exégèse de cette présentation en 4 points :

1^{er} point : définition – son calcul s'adosse à l'hypothèse fondamentale en statistique de la distribution normale des données quantifiant l'écart standardisé par rapport à la consensus value ; respectivement 68 %, 95 % et 99 % des valeurs comprises sous 1σ , 2σ et 3σ . En d'autres termes 4.28 % de chance et 0.27 % (risque α) de chance d'avoir respectivement un carton orange ($2 < z\text{-score} < 3$) et un carton rouge ($z\text{-score} > 3$) alors que le système est en état de contrôle statistique. Le signe et la valeur du z-score renseigne sur la nature du problème :

Biais :

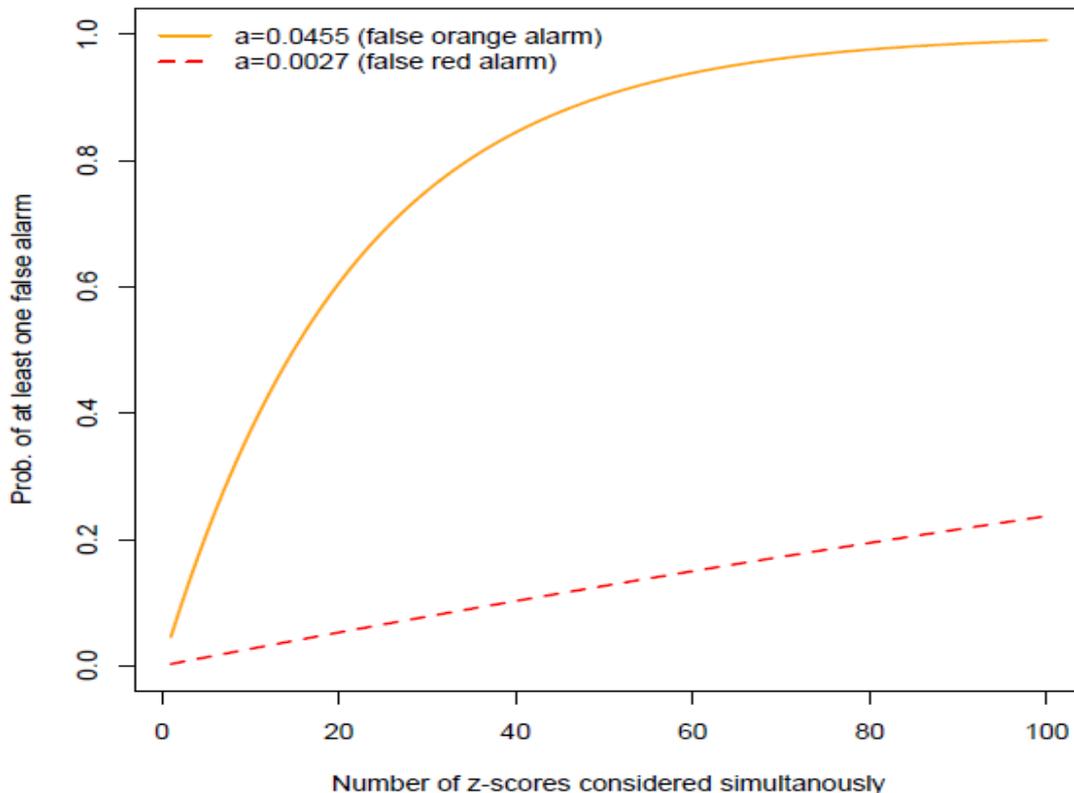


Accroissement de la variance :



2^{ème} point : sensibilisation à l'importance de l'analyse multistatistique des z-scores – Les taux de faux rejets sont donnés par le risque $\alpha = 0.0428$ et 0.0027 pour respectivement un carton **orange** et un carton **rouge** en étant « in control » ceci pour un examen réalisé par **un** automate. L'analyse statistique multiple stipule que le **nombre** de faux rejets s'accroît en multipliant sur l'exemple des laboratoires le nombre de résultats d'EEQ rendus **simultanément** à l'organisme d'EEQ :

Overall type I error in multiple testing



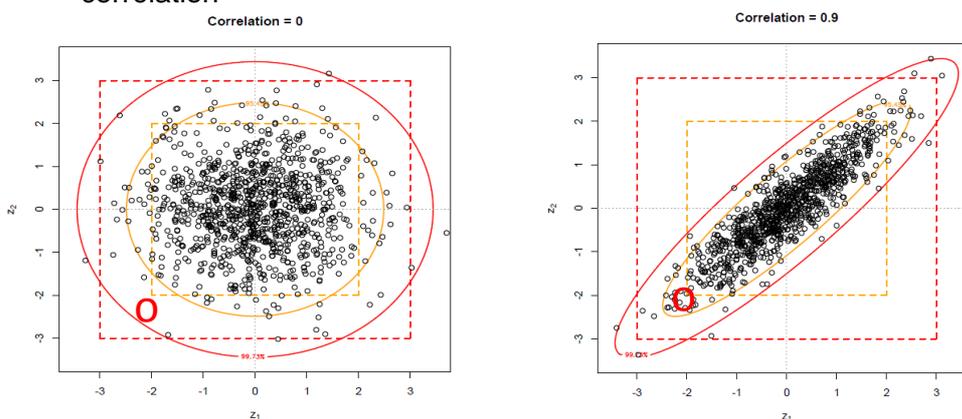
Conséquence pratique : il faut pondérer les limites conventionnellement posées à 2 et 3 de z-score par le nombre d'automates :

| Number of # automates | Orange Zone Limits | Red Zone Limits |
|--------------------------|-----------------------|--------------------|
| 1 | ±2.00 | ±3.00 |
| 2 | ±2.28 | ±3.21 |
| 3 | ±2.43 | ±3.32 |
| 4 | ±2.53 | ±3.40 |
| 5 | ±2.61 | ±3.46 |
| 6 | ±2.67 | ±3.51 |
| 7 | ±2.72 | ±3.55 |
| 8 | ±2.77 | ±3.58 |
| 9 | ±2.80 | ±3.62 |
| 10 | ±2.84 | ±3.64 |

Il apparaît ainsi la notion d'évaluation ponctuelle du laboratoire en termes d'**organisation** dès qu'il y a plus d'un automate réalisant un examen – **Ex** : le responsable qualité du processus analytique avec **8** automates quantifiera la performance au regard de limites en z-score à +/- 2.77 et +/- 3.55.

Attention ! Il y a certes augmentation du **nombre** de faux rejets à l'échelle d'une organisation mais au niveau d'un automate le **pourcentage** de faux rejets ne change pas – Ainsi, la survenue de 2 cartons orange consécutifs (2 exercices consécutifs) sur un automate faisant partie d'un parc de 8 automates, avec un z-score à 2.5, ne peut correspondre à l'expression d'un faux rejet qu'à une probabilité de 0.2 % !

3^{ème} point : l'analyse bivariée des retours d'EEQ en prenant en compte les phénomènes de corrélation entre les deux échantillons d'EEQ – c'est un autre moyen de réduire le taux de faux rejets au niveau de chaque automate en passant de la représentation de Youden classique au T2 de Hotelling : on passe ainsi de limites représentées en carrés à des limites en ellipse – ci-dessous un exemple qui montre la réduction du taux de faux de rejets en prenant en compte les phénomènes de corrélation



De « questionnable » le retour d'EEQ devient « acceptable » en prenant en compte les phénomènes de corrélation entre les deux échantillons d'EEQ.

4^{ème} point : l'analyse longitudinale des retours d'EEQ – future approche Bayésienne et importance de disposer d'un plan de CIQ apte à détecter les dérives persistantes à la fois sur la valeur cible (Ex : EWMA) et sur la variance des méthodes (Ex : utilisation longitudinale de la règle 1_3s : plus de 3 alarmes 1_3s non

consécutives sur 30 points sont compatibles avec un accroissement de la variance de la méthode)

Les points 2 et 3 seront implémentés par ECAT dès 2019 dans les rapports envoyés aux participants à ses programmes.

6. La zone grise de la maladie de Willebrand : Camille Paris et Emmanuelle Jeanpierre (Lille)

La zone grise dans la Maladie de Willebrand (MW) correspond à la frange de la population qui présente des taux abaissés en facteur Willebrand (VWF), compris entre 30 et 50 UI/dL, taux qui ne correspondent pas aux critères retenus pour parler d'authentique Maladie de Willebrand de type 1 selon les critères du réseau RFC France Coag et du Centre de Référence de la Maladie de Willebrand (CRMW). Sadler, dans sa revue de 2003 (1), rappelle la prévalence élevée des signes hémorragiques dans la population générale, et considère que 0.4% de la population normale a un phénotype de MW du fait du hasard.

Les cohortes britannique (2), européenne (3), canadienne (4) et américaine (5) étudiant spécifiquement les malades atteints de MW de type 1, ont des critères d'inclusion très différents de l'une à l'autre (cf Tableau), avec des critères de diagnostic très larges pour la cohorte européenne qui contient en réalité un tiers de patients de type 2. Elles montrent que si on retrouve un variant pathogène dans le gène *VWF* dans 75 à 95% des cas chez les patients de type 1, ce chiffre descend à 20 à 70% des cas quand on s'intéresse aux patients de la zone grise ou avec des taux normalisés au moment de l'inclusion. La cohorte allemande de MW de tout type (6) retrouve un variant pathogène chez 100% des patients de type 1 contre 55% si les taux de VWF sont supérieurs à 30UI/dL.

| Cohorte | N | Avantages | Inconvénients | % mutations | | | | | |
|---------------------------------------|--------|--|---|-------------|----|-------------|----|-------------|----|
| | | | | <30% | | 30-50% | | >50% | |
| 2006 Cumming UK | 32 | Type 1 et déficit historique <50% | Pas de BS | 80 | | 70 | | 42 | |
| 2007 Goodeve Tosetto MCMDM-1 | 93/144 | Apparentés atteints non atteints BS : Tosetto simplifié (corrélation inverse BS/ taux) | Type 1 sans critères 1/3 type 2 et type 1 >50% | 88 | | 69 (<45) | | 50 (>45) | |
| 2007 James Canada | 123 | Type 1 et déficit <50% | Pas de BS | 75 | | 49 | | - | |
| 2016 Flood US | 482 | Type 1 <30/ 30-50/ historique (36%) BS : ISTH BAT (pas de corrélation BS/ taux>5%) | pas de rech déf modéré/ fonctions plaq | 91 | 95 | 74 | 58 | 64 | 20 |

Une étude italienne (7) publiée en 2015 propose d'établir les marqueurs prédictifs de MW chez des sujets avec un taux limite de VWF, qui devront être explorés avec des tests de second niveau (VWF :CB, VWF MM, liaison FVIII, RIPA). Ils concluent que la probabilité d'avoir une MW est très haute chez les sujets avec des VWF :Act entre 30 et 40 UI/dL, et pour les femmes de groupe non-O entre 41 et 50 UI/dL, justifiant la réalisation de tests de second niveau chez ces patients. La probabilité est faible de trouver une MW chez les hommes présentant des taux entre 51 et 60 UI/dL et les hommes de groupe O entre 41 et 50 UI/dL. Tous les autres sous-groupes sont classés en probabilité intermédiaire, avec des tests de second niveau à réaliser au cas par cas (femmes de groupe O 41 à 50 UI/dL, femmes de 51 à 60 UI/dL, hommes de groupe non O 41 à 50 UI/dL). La cohorte irlandaise LoVIC (8,9) étudie spécifiquement les patients

présentant des taux bas de VWF (30 à 50 UI/dL) avec une histoire hémorragique personnelle significative qui correspond à la population que l'on cherche à identifier en consultation et qui doit relever d'une prise en charge spécifique (desmopressine) en cas de gestes invasifs. Un variant pathogène est retrouvé dans 40% des cas dans le gène VWF. Le score ISTH BAT est significatif chez 77% des patients, sans différence entre les sous-groupes 30-39UI/dL et 40 à 50UI/dL.

On observe une normalisation des taux de VWF dans 45% des cas à 5 ans, avec une augmentation de VWF :Act de 1.5 UI/dL/an. Cette sous population de 476 patients avec des taux bas qui ont des manifestations hémorragiques est à mettre en balance avec les 115000 irlandais qui ont des taux inférieurs à 50 UI/dL (2.5% de la population normale). Cette sous population d'intérêt représente les 0.4% de la population décrits par Sadler en 2003. Cette étude confirme que la desmopressine est efficace dans cette population, et qu'elle peut être utilisée sans test thérapeutique au préalable mais en confirmant simplement son efficacité lors de sa première utilisation. Les femmes sont particulièrement représentées, en effet les scores hémorragiques de cette population sont positifs principalement du fait des ménométrorragies, présentes dans 89% des cas.

L'effet du groupe ABO doit également être pris en compte dans cette population. Les patients de groupe O peuvent en effet avoir des taux physiologiquement < 50UI/dL sans manifestations cliniques hémorragiques. Les études sus-citées confirment toutes la prévalence d'autant moins élevée du groupe O chez les patients que les taux de VWF sont bas, avec une fréquence de variants pathogènes retrouvés beaucoup plus importante chez les sujets de groupe non O.

L'effet de l'âge est également à prendre en compte dans l'interprétation de ces bilans. En effet on observe une élévation de 1 à 1.5 UI/dL/an des taux de VWF. Un taux de VWF :Ag à 35 UI/dl n'a donc pas la même signification à 40 ans qu'à 15ans.

Au total, la découverte d'un taux de VWF inférieur à 50UI/dL nécessite le recours à une consultation d'hémostase spécialisée afin d'évaluer le score hémorragique et de rechercher des patients qui nécessiteront un traitement par la desmopressine pour encadrer les procédures invasives.

Bibliographie :

1. Sadler JE. Von Willebrand disease type 1: a diagnosis in search of a disease. *Blood*. 2003;101(6):2089-93.
2. Cumming A, Grundy P, Keeney S, Lester W, Enayat S, Guilliat A, et al. An investigation of the von Willebrand factor genotype in UK patients diagnosed to have type 1 von Willebrand disease. *Thromb Haemost*. 2006;96(5):630-41.
3. Goodeve A, Eikenboom J, Castaman G, Rodeghiero F, Federici AB, Batlle J, et al. Phenotype and genotype of a cohort of families historically diagnosed with type 1 von Willebrand disease in the European study, Molecular and Clinical Markers for the Diagnosis and Management of Type 1 von Willebrand Disease (MCMDM-1VWD). *Blood*. 2007;109(1):112-21.
4. James PD, Notley C, Hegadorn C, Leggo J, Tuttle A, Tinlin S, et al. The mutational spectrum of type 1 von Willebrand disease: Results from a Canadian cohort study. *Blood*. 2007;109(1):145-54.
5. Flood VH, Christopherson PA, Gill JC, Friedman KD, Haberichter SL, Bellissimo DB, et al. Clinical and laboratory variability in a cohort of patients diagnosed with type 1 VWD in the United States. *Blood*. 2016;127(20):2481-8.
6. Yadegari H, Driesen J, Pavlova A, Biswas A, Hertfelder H-J, Oldenburg J. Mutation distribution in the von Willebrand factor gene related to the different von Willebrand disease (VWD) types in a cohort of VWD patients. *Thromb Haemost*. 2012;108(4):662-71.
7. Bucciarelli P, Siboni SM, Stufano F, Biguzzi E, Canciani MT, Baronciani L, et al. Predictors of von Willebrand disease diagnosis in individuals with borderline von Willebrand factor plasma levels. *J Thromb Haemost JTH*. 2015;13(2):228-36.
8. Lavin M, Aguila S, Schneppenheim S, Dalton N, Jones KL, O'Sullivan JM, et al. Novel insights into the clinical phenotype and pathophysiology underlying low VWF levels. *Blood*. 2017;130(21):2344-53.

9. Lavin M, Aguila S, Dalton N, Nolan M, Byrne M, Ryan K, et al. Significant gynecological bleeding in women with low von Willebrand factor levels. Blood Adv. 2018;2(14):1784-91.

7. Le point sur le PNDS VWD : Camille Paris et Emmanuelle Jeanpierre (Lille)

Le Protocole National de Diagnostic et de Soins (PNDS) VWD a été mis en ligne en septembre 2018 (https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_2876005/fr/maladie-de-willebrand).

8. Divers.

Le club des bios en hémostase change de nom. Il devient le **Groupe Français d'Etude de la Biologie des Maladies Hémorragiques**.