

Compte rendu de la 18^{ème} journée du Groupe d'Etude de la biologie des maladies hémorragiques (BIMHO)

Cette réunion s'est tenue en conférences zoom les 25 septembre et 8 octobre 2020 et a rassemblé 35 biologistes.

Un projet hors de nos frontières, taux des FVIII et FIX et allongement du TCA (Anne Ryman, Bordeaux/ Claire Poupard Tours)

Dans le cadre du programme de l'AFATH auquel participent plusieurs membres du groupe BIMHO, nous nous sommes aperçus lors de nos différentes missions que la validation biologique d'un FVIII ou d'un FIX n'était pas toujours simple dans ces pays en raison d'un manque de recul vis-à-vis de la relation entre l'importance de l'allongement du TCA et le taux de ces facteurs. Dans ce contexte nous nous sommes demandé si il était possible d'écrire quelques recommandations qui permettraient aux techniciens et biologistes de mieux appréhender ce point critique. Notre objectif était d'établir des seuils d'alerte et de transmettre des messages simples sur une éventuelle incohérence entre ces 2 paramètres pour leur éviter de rendre des résultats erronés

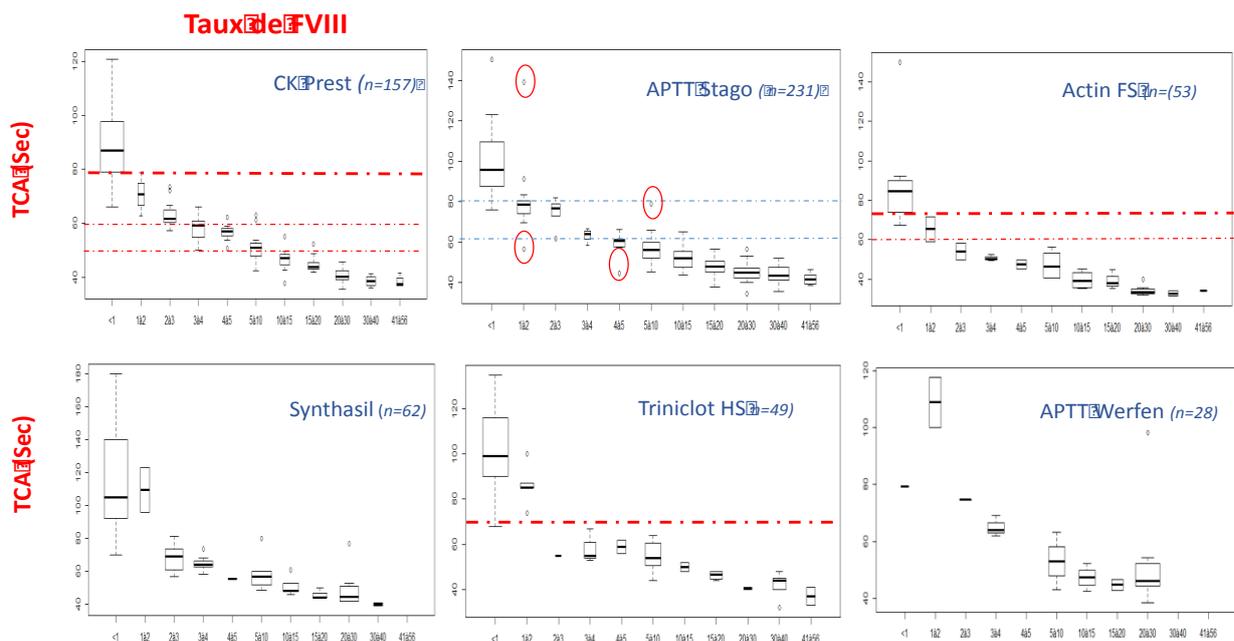
Avec certain nombre de laboratoires du groupe BIMHO, nous avons ainsi recueilli de façon rétrospective les taux de FVIII ou FIX et le TCA mesurés chez les hémophiles A ou B en l'absence de tout traitement substitutif. Dans chaque centre nous avons relevé le type de réactif utilisé pour le TCA.

19 centres ont participé à cette étude, permettant de recueillir les données pour 580 hémophiles A (142 sévères, 127 modérés et 150 mineurs) et 309 Hémophiles B (38 sévères, 121 modérés et 150 mineurs). 6 réactifs différents étaient utilisés: APTT Stago, CK Prest, Actin FS, Synthasil, Trinicot et APTT Werfen.

Il est important de souligner que seulement 3 de ces réactifs sont actuellement utilisés dans les pays d'Afrique francophone : APTT Stago, CKPrest et Actin FS.

L'analyse des données pour ces 3 réactifs a permis de retenir les messages suivants :

Corrélation TCA et taux de FVIII :



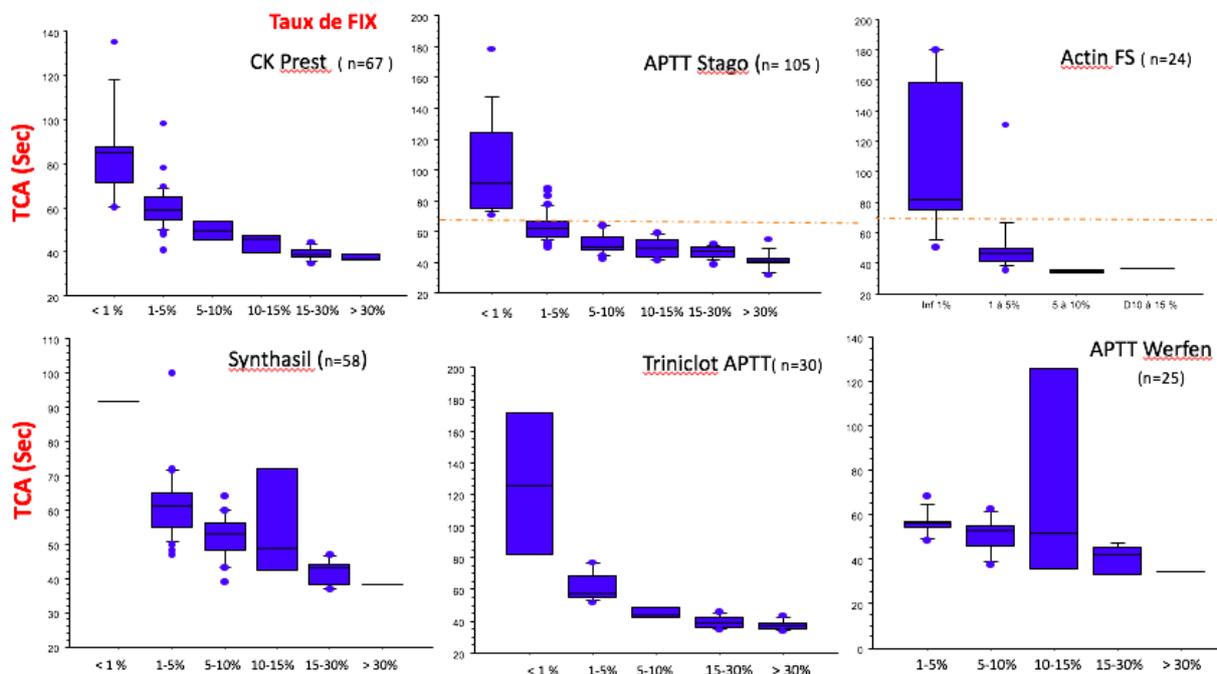
- Tous les hémophiles, quel que soit le degré de sévérité du déficit et le réactif utilisé, ont un TCA > 30 sec
- Un TCA > 80 sec (*APTT Stago et CK Prest*) ou > 72 sec (*Actin FS*) est très en faveur d'une hémophilie sévère ou parfois modérée jusqu'à 2- 3%
- Il n'est pas possible de rendre un FVIII < 1 % (*APTT et CK Prest*) ou 2 % (*Actin FS*) si le TCA est < 60 sec

Il n'a pas été retenu d'interprétation selon le ratio de TCA, la notion de temps témoin étant encore difficile à instaurer dans ces pays.

En ce qui concerne les 3 autres réactifs utilisés par nos centres :

- Trinicot HS : fourchette très large des TCA pour les hémophiles A sévères, beaucoup plus resserrée pour les modérés, permettant cependant de retenir qu'un TCA > 70 sec est en faveur d'un déficit < 2% et qu'un TCA < 67 sec ne peut pas avoir un déficit en FVIII <1%
- Synthasil : peu discriminant pour les valeurs entre <1 et 2% sur cette étude
- APTT Werfen : pas de conclusion à tirer des résultats car effectif trop faible

Corrélation TCA et taux de FIX :



- CK Prest : peu discriminant entre hémophiles B sévères et modérés
- APTT Stago : un patient avec un TCA < 70 sec ne peut pas avoir un FIX <1%
- Actin FS : un TCA >74 sec est en faveur d'une hémophilie B sévère

Les résultats de cette étude portant sur un nombre relativement significatif de données, au moins pour l'hémophilie A, nous seront utiles dans la rédaction, pour nos collègues biologistes africains, d'une petite tablette facile d'utilisation reprenant :

- les notions de base sur le prélèvement et la conservation des échantillons et des réactifs, point souvent critique, dans ces pays où les pannes d'électricité sont fréquentes
- le principe du TCA
- le principe du dosage du FVIII et FIX
- les notions de base pour la validation biologique avec, selon le réactif utilisé, des seuils d'alerte entre le TCA obtenu en sec et le taux de FVIII ou IX attendu leur permettant un regard critique sur les résultats.

Validation de méthode du dosage des FVIII:C ultra-bas (Clémentine Wahl et Marc Trossaërt, Nantes)

La nomenclature définit la gravité de l'hémophilie A en fonction du niveau d'activité coagulante du facteur VIII (FVIII:C). Pour un FVIII:C < 1 %, l'hémophilie est classée comme « sévère » et pour des valeurs comprises entre 1 et 5 %, elle est classée comme hémophilie « modérée ». Il est souvent difficile de conclure pour des valeurs proches de 1,0 % alors que l'indication systématique d'un traitement prophylactique peut varier en fonction du diagnostic de sévérité de l'hémophilie.

L'objectif de cette étude est de valider la méthode du FVIII:C sur des valeurs très faibles.

La reproductibilité intra-laboratoire a été évaluée sur 6 plasmas spikés sur 10 jours consécutifs. Le biais a été évalué par comparaison inter-laboratoire sur 4 plasmas spikés, réalisée dans 8 laboratoires d'hémostase français.

En ce qui concerne la reproductibilité, pour les plasmas (0,0 ; 0,3 ; 0,7 ; 1,0 ; 1,5 et 3,0 %), les résultats (moyenne [intervalle], coefficient de variation) étaient respectivement : 0,00 % [0,00-0,00], incalculable ; 0,18 % [0,10-0,30], 43,82% ; 0,60 % [0,40-0,80], 19,25% ; 0,95 % [0,80-1,10], 10,23%, 1,33 % [1,10-1,70], 16,64%, 2,64 [2,00-3,70], 17,69%.

En ce qui concerne la détermination du biais, les résultats (moyenne, biais) pour chaque plasma (0,0, 0,5, 1,0 et 1,5 %) étaient respectivement : 0,19 %, 5,3% ; 1,01 %, 5,9% ; 1,90 %, 8,9% ; 2,60 %, 6,5%. Selon le niveau de FVIII:C, l'incertitude de mesure était de : $0,6 \pm 0,25$ % ; $1,33 \pm 0,48$ % ; $2,64 \pm 0,94$ %.

Pour valider définitivement une limite d'incertitude de mesure acceptable, nous avons mis en place un contrôle de qualité externe national dans 24 laboratoires d'hémostase français.

Les résultats de ce premier CQ externe montre que, pour 3 plasmas avec des valeurs de FVIII :C < 2%, les résultats (valeur attendue, médiane [intervalle], coefficient de variation) étaient : Plasma 1 : 0.0%, 0.50% [0.1-0.7], 45% - Plasma 2 : 0.7%, 0.95% [0.5-1.7], 32% - Plasma 3 : 1.4%, 1.7% [1.0-2.9], 29%. La variabilité des réactifs et des automates pouvait probablement expliquer les variabilités des résultats observés.

Pour confirmer et préciser ces résultats, il a été décidé de mettre en place un second CQ externe, avec 3 nouveaux plasmas avec des valeurs de FVIII ultra-basses qui seront envoyés durant l'automne 2020 aux Centres souhaitant participer à ce travail. Ces nouveaux résultats devraient être disponibles pour le 1^{er} trimestre 2021.

Critères d'inclusions des patients dans le CRMW (Emmanuelle Jeanpierre, Lille)

Jusqu'à récemment, les critères d'inclusion dans le CRMW étaient :

TYPE 3 :

- VWF:Ag et VWF:RCo < 5%

TYPE 2 :

- Pour une suspicion de 2A ou de 2M :
 - ✓ Agrégation plaquettaire en présence de ristocétine (RIPA) diminuée pour des concentrations de 1,2 à 1,5 mg/ml
 - ✓ et/ou VWF:RCo/VWF:Ag < 0,7
- Pour une suspicion de 2B :
 - ✓ Thrombopénie inexplicée
 - ✓ et/ou RIPA positive < 0,8 mg/ml (quel que soit le ratio VWF:RCo/VWF:Ag)
- Tout patient avec un ratio VWF:CB/VWF:Ag < 0,7
- Pour une suspicion de 2N : FVIII:C/VWF:Ag < 0,5 ; cependant, le centre de référence de la maladie de Willebrand n'a pas vocation à réaliser le VWF:FVIIIIB chez tous les patients pour lesquels se pose le diagnostic différentiel hémophilie A et maladie de Willebrand de type 2N, et le VWF:FVIIIIB peut être réalisé par plusieurs laboratoires en dehors du centre de référence ; par contre celui-ci a vocation à confirmer le diagnostic par une étude de génétique moléculaire.

TYPE 1 :

- VWF:Ag < 30% (en l'absence des critères précédents)

Dans la littérature, la répartition des différents types de Maladie de Willebrand (VWD) est respectivement de 75% pour le type 1, 17% pour le type 2 et 8% pour le type 3 (*James PD, Blood 2007 et Genet Med 2011*). Dans la cohorte CRMW, si les types 3 représentent également 8% des VWD, la proportion de type 1 et de type 2 est inversée (respectivement 26% et 66%) (*Veyradier A, Medecine (Baltimore) 2016*). Le seuil de 30% d'antigène pour l'inclusion des type1 en est, probablement, la cause. Peake en 2007, reprenant 3 études majeures sur la VWD, montrait qu'une mutation était détectée dans environ la moitié des cas de VWD type1. Dans notre cohorte, une mutation est détectée dans 96% des cas. Pour être en adéquation avec les critères de version 3 de France Coag, parce qu'il peut exister un réel willebrand modéré avec une variation de séquence (cf topo Low Willebrand C Paris 16^{ème} réunion) mais également parce que le PNDS recommande une consultation spécialisée pour un taux de VWF : Ag<50%, le CRMW a décidé de modifier le seuil du taux de VWF :Ag et d'accepter l'inclusion pour un VWF :Ag <40%.

La seconde problématique ayant entraîné un changement de stratégie d'inclusion des patients dans le CRMW est celle de la variation de séquence p.D1472H (c.4414G>C, exon). Ce polymorphisme, très fréquent en particulier chez les africains et afro-américains (50.5%) altère la liaison du VWF à la ristocétine mais n'a aucun retentissement in vivo. Cependant, les résultats des VWF :RCo peuvent être faussement diminués et conduire à une inclusion de patients sur un ratio VWF :RCo/VWF :Ag <0.7. Cela s'applique également aux tests VWF :GPIbR dans lesquels la concentration en ristocétine est importante. Le VWF :GPIbR sur AcuStar n'est pas impacté.

Nous avons réalisé une étude sur les 3101 patients inclus dans le CRMW pour lesquels une caractérisation avec génotypage du VWF a été réalisée. Parmi ces 3101 patients, nous nous sommes intéressés au 1047 patients qui présentaient un ratio VWF :RCo/VWF :Ag <0.7 avec un VWF :Ag >30%, et avons retrouvé 137 patients non VWD, c'est-à-dire sans variation de séquence pathogène dans le VWF, soit 13% de la base.

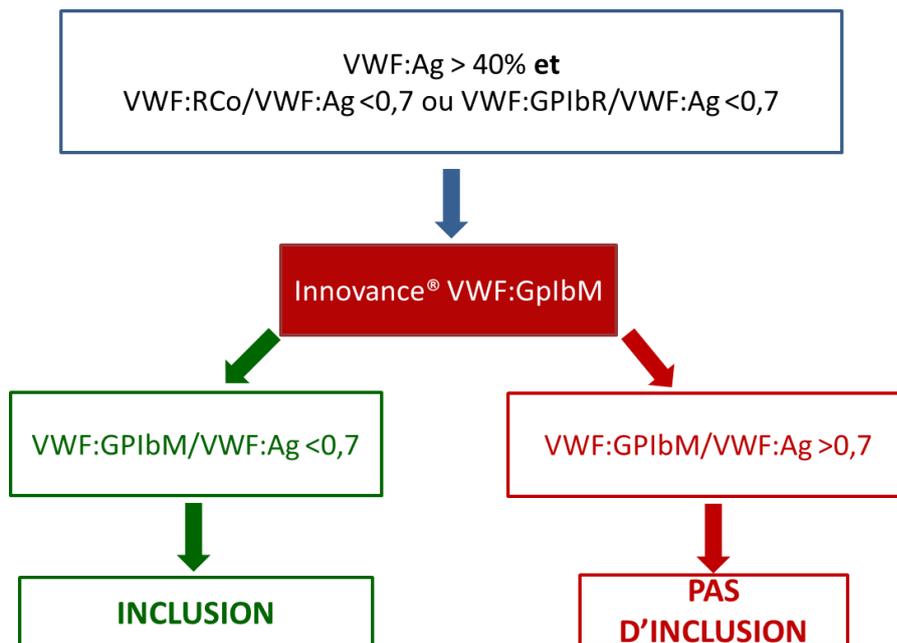
Nous avons pu retester 71 patients parmi les non VWD : 41 qui présentaient la p.D1472H et 30 qui ne présentaient aucun variant. Le test VWF :GPIbM (Innovance®), technique de dosage de l'activité du VWF que nous utilisons au laboratoire, a été réalisé chez ces patients.

62 des 71 patients retestés présentaient un ratio VWF:GPIbM/VWF:Ag normal (et VWF:Ag>30%):

- 37/41 avec le variant p.D1472H
- 25/30 sans aucun variant, pas même p.D1472H

Les tests phénotypiques complémentaires et le génotypage ont été réalisés inutilement pour ces patients, cela aurait pu être évité si le VWF:GPIbM avait été dosé.

Une nouvelle stratégie est donc mise en place lors des demandes d'inclusion.



Lorsque que le test utilisé est un VWF :RCo ou un VWF :GPIbR (non AcuStar), un aliquot est demandé au service proposant l'inclusion, afin de réaliser un dosage d'Innovance ®. Si le résultat de l'Innovance ® confirme un ratio <0.7, alors l'inclusion est acceptée, les documents ad hoc sont envoyés par le CRMW au demandeur pour envois d'échantillons de plasma et d'ADN afin de réaliser les tests phénotypiques et génotypiques.

Il est donc important pour nous de connaître la technique de dosage de l'activité ayant servie pour le ratio VWF :Act/VWF :Ag. Une nouvelle fiche d'inclusion sera prochainement disponible.

VWF:Act (UI/dl ou%)

- 1) méthode utilisant la ristocétine (VWF:RCo ou VWF:GPIbR)
 Agrégométrie Automatisée Chimiluminescence
- 2) méthode sans ristocétine
 HemosIL VWF activity (VWF:Ab)
 Innovance (VWF:GPIbM)

En attendant, nous utiliserons vos réponses au questionnaire envoyé par mail, afin de faire un tableau des différentes techniques utilisées par les différents centres, pour évaluer la nécessité d'une confirmation du ratio par Innovance®.

Le point sur la qualité (Frédéric Sobas, Lyon) : visio conf le 18 Novembre 2020

L'objet principal de la présentation est d'apporter une réponse réellement opérationnelle à la thématique essentielle de la maîtrise statistique des procédés (MSP) au sein des LABM notamment en Hémostase dans l'esprit de la norme ISO 15 189. Toutes les dispositions concernant la gestion des résultats de CIQ et d'EEQ doivent s'adosser à une politique compréhensible par l'ensemble des intervenants des laboratoires. Les analyses des résultats d'EEQ constituent le cœur même de la politique analytique des tous les LABM. L'objectif tangible de tout laboratoire pour chacune de ses méthodes est de répondre aux fondamentaux de la MSP (absence d'OUTLIERS, absence d'accroissement statistiquement significatif de l'erreur aléatoire et de l'erreur systématique). Il est capital de rappeler que les exercices d'EEQ sont le reflet de l'état de l'art des méthodes (modèle 3 de la conférence de consensus de Milan) qu'il s'agit de valoriser en participant à des programmes d'organismes d'EEQ offrant le plus possible d'échantillons de patients avec pathologies hémorragiques et thrombotiques (axe prioritaire de la fondation ECAT). La notion clé est de faire partie de groupes de pairs aptes à faire le diagnostic de pathologies hémorragiques et thrombotiques pour ensuite ainsi porter une appréciation sur la performance de son laboratoire d'un point de vue statistique selon les fondamentaux de la MSP décrits ci-dessus. Par ailleurs, il est très important de rappeler la complémentarité entre la gestion des résultats d'EEQ et celle des résultats de CIQ qui ont la même vocation à identifier l'influence des facteurs externes et internes pouvant ponctuellement ou de façon persistante faire perdre la maîtrise des méthodes. Il est ainsi complètement inacceptable de statuer que des laboratoires s'adossant à ces considérations ne sont pas des laboratoires performants au regard d'une perception rationnelle et scientifique de la gestion des CQ englobant EEQ et CIQ. Cette approche est l'approche la plus performante pour maîtriser au mieux les effets du second principe de la thermodynamique (« tout est instable ») qui ne peut être dupé par les discours d'opinion à type « d'erreur acceptable » ou de capacité 6 sigma sur les modèles 1 ou 2 de la conférence de consensus de Milan notamment si les organismes d'EEQ ne fournissent pas d'échantillons de patients pour se conformer à la notion essentielle de commutabilité des échantillons d'EEQ avec les échantillons des malades analysés par les laboratoires. La présentation met par ailleurs en avant l'intérêt de l'inférence Bayésienne dans la gestion des CIQ dans l'esprit de cette gestion globale des CQ.

Il est proposé aux collègues de prendre connaissance de ce sur quoi s'adosse ce discours via un support consultable sur le lien suivant :

<https://www.researchgate.net/publication/344712764> Une vision globale de la gestion des CQ au regard d'une politique analytique

Point sur l'étude des Pratiques de « Dosage de l'Eemicizumab » (Claire Pouplard, Tours)

Le projet a été lancé au printemps malgré le confinement.

À ce jour, 9 centres ont débuté les inclusions (Lyon, Versailles, Bordeaux, Caen, Marseille, Tours, Necker, Lille et Nantes). 381 échantillons ont été inclus correspondant à 59 hémophiles A avec inhibiteur, 66 hémophiles A sans inhibiteur et 3 Willebrand de type 3 avec anticorps anti-Willebrand.

Les inclusions se poursuivent, d'autres centres vont débiter les inclusions.
Le recueil des datas sera réalisé auprès des centres en décembre. Une fiche de recueil sera envoyée à chaque centre

Le FVIII Porcin recombinant : actualités et mise en place d'un protocole (Véronique Le Cam, Rouen)

Il s'agit de reprendre un projet multicentrique soumis à Shire (Takeda) en 2016 par Claire, Catherine et Claudine dont :

- le **premier objectif** était de comparer les différents réactifs de dosage chronométrique et chromogénique pour le dosage du facteur VIII recombinant porcin sur des échantillons surchargés avec Obizur®.
- Le **deuxième objectif** était de vérifier les conditions analytiques de la méthode Bethesda modifiée pour la recherche et le titrage des anti-VIII qui reconnaissent le FVIII recombinant porcin.

Ce protocole avait été déposé dans le contexte de l'obtention d'une indication thérapeutique d'Obizur® dans le traitement des épisodes hémorragiques chez les patients adultes atteints d'hémophilie A acquise.

Par la suite, les recommandations ont été mises à jour par Kruse-Jarres et al. (1) permettant d'utiliser le facteur VIII porcin recombinant en première ligne de traitement des épisodes hémorragiques de l'hémophilie A acquise, comme le FEIBA® ou le Novoseven®. Cette AAM faisait suite à l'étude de Kruse-Jarres et al. publiée dans Haemophilia en 2015 (2). Elle concernait 29 patients (19 hommes, 10 femmes) d'âge moyen 70 ans, avec un saignement grave et nécessitant une hospitalisation. Les critères d'exclusion étaient un titre d'inhibiteur anti-VIII porcin supérieur à 20 UB ou des plaquettes inférieures à 100 Giga/L. Cette étude a montré 100 % de réponses positives à 16 heures et 24 heures avec 25 réponses dites efficaces et 4 partiellement efficaces.

Avant l'initiation du traitement 10 patients avaient un anti-VIII porcin présent avec un taux médian à 4 UB et un patient avait 29 UB, et 19 n'avaient pas d'anti-VIII porcin. A la fin de l'étude, 5 patients sur les 19 qui n'avaient pas d'anti-VIII porcin avaient développé un anti-VIII porcin et sur les 10 ayant un anti-VIII porcin avant le traitement par Obizur®, le titre de l'anti VIII a augmenté chez seulement 2 patients.

Dans le RCP du médicament, il est nécessaire de mesurer le taux facteur VIII 30 minutes après l'injection puis à 3 heures et avant chaque dose ultérieure afin de définir la dose à injecter.

Nous sommes ainsi confrontés à deux problématiques :

- 1) la nécessité de connaître la méthode de dosage optimale pour mesurer l'activité du FVIII porcin. On sait que les flacons d'Obizur® sont titrés par méthode chronométrique en utilisant de l'Actin FS et que le standard de facteur VIII recombinant porcin est calibré contre « le WHO 8th international Standard Facteur VIII concentrate ».

Un article publié par Turecek et al. (3) dans Haemophilia en 2016 a étudié la variabilité des dosages d'activité de l'Advate® ou de l'Obizur®. Cette étude a été réalisée par 35 laboratoires qui utilisaient une méthode chronométrique et 11 d'entre eux ont également testé une méthode chromogénique. Des échantillons ont été surchargés avec Obizur® aux concentrations finales de 80 %, 20 % et 5 %. De nombreux réactifs APTT ont été testés : silice ou Kaolin dans 71 % des cas et acide ellagique ou polyphénol dans 29%

ces cas. Concernant les kits chromogéniques il existait une grande diversité de fournisseurs. Cet article a montré qu'il n'y avait pas de différence significative concernant le dosage d'Obizur entre les réactifs APTT. En revanche, les auteurs rapportent que la méthode chromométrique surestime le dosage d'Obizur[®] quel que soit le niveau (récupération moyenne de 114 à 125% selon la valeur de l'échantillon surchargé). Pour le dosage par méthode chromogénique ces résultats étaient environ 50 % plus bas que les dosages par méthode chromométrique.

Les auteurs concluent que la méthode chromométrique permet de réaliser, quel que soit le réactif d'APTT, le dosage d'Obizur[®] avec exactitude et précision et qu'il n'est pas nécessaire de réaliser une calibration spécifique. Par contre, la méthode chromogénique n'est pas recommandée.

Cependant, il est important de souligner qu'un rapport interne de Baxter ne recommande pas l'utilisation du Pathromtin pour doser l'Obizur[®].

- 2) La nécessité de rechercher et de titrer les anticorps dirigés contre le facteur VIII porcin avant traitement au cas où le taux de récupération du FVIII porcin ne serait pas optimal ou si le saignement persiste après l'administration d'Obizur[®].

Le protocole utilisé pour le titrage de l'anti VIII porcin est identique à celui utilisé classiquement dans nos laboratoires mais le plasma du patient doit être incubé avec un plasma titré en facteur VIII porcin à la place du plasma humain normal.

Les ampoules de facteur VIII porcin recombinant qui sont adressées pour la recherche et le titrage en anti VIII porcin doivent être reconstituées avec 1 ml d'eau distillée. L'ampoule contient 11 UI de VIII porcin (titre à vérifier sur l'ampoule). Il est préconisé de diluer en plasma déficient en facteur VIII contenant du facteur Willebrand afin d'obtenir une solution de 1 unité d'activité facteur VIII porcin/ml.

Après discussion au cours de la réunion par visio, différentes questions persistent :

La 1^{ère} question : après la publication de Turecek (3), doit-on refaire l'étude des différentes céphalines ?

- La première expérience rouennaise montre qu'avec le pathromtin l'adjonction de 1ml dans le flacon amène à une concentration de 14 UI/ml plutôt que 11 UI/ml. Est-ce dû à la dilution ou au réactif APTT ? Sans doute faut-il tester nos différents réactifs APTT au moins sur cette reconstitution (1^{ère} partie du protocole)

La 2^{ème} question, concernant la validation du titrage en Anti VIII porcin, nous devons répondre à plusieurs problématiques :

- quelle dilution de l'ampoule doit on réaliser afin d'obtenir une concentration de 1 UI/mL?
- sommes-nous obligés d'utiliser du déficient VIII Siemens (déficient tamponné contenant du VWF) ou peut-on utiliser du tampon pour le titrage de l'anti-FVIII porcin ?

Pour répondre, nous allons étudier la stabilité des dilutions à 37°C pendant 2 heures en tampon imidazole ou en déficient FVIII tamponné avec VWF.

Enfin, après avoir répondu à ces 2 problématiques, un titrage d'anti -VIII porcin sur 1 ou 2 hémophilies A acquises et sur 2 ou 3 hémophilies sévères avec inhibiteur anti-VIII sera réalisé dans chaque centre. Les plasmas testés positifs seront envoyés dans un ou deux autres centres pour comparaison des résultats (ce sera la 3^{ème} partie du protocole).

Cette étude se fera en multicentrique sur environ 10 centres. Le protocole est en cours de rédaction et sera adressé très rapidement aux centres participants.

1. Acquired hemophilia A: Updated review of evidence and treatment guidance. Kruse-Jarres R, Kempton CL, Baudo F, Collins PW, Knoebl P, Leissinger CA, Tiede A, Kessler CM. *Am J Hematol*. 2017 Jul;92(7):695-705. doi: 10.1002/ajh.24777. Epub 2017 Jun 5.(2)
2. Efficacy and safety of OBI-1, an antihemophilic factor VIII (recombinant), porcine sequence, in subjects with acquired hemophilia A. Kruse-Jarres R, St-Louis J, Greist A, Shapiro A, Smith H, Chowdary P, Drebes A, Gomperts E, Bourgeois C, Mo M, Novack A, Farin H, Ewenstein B. *Haemophilia*. 2015 Mar;21(2):162-70. doi: 10.1111/hae.12627. Epub 2015 Jan 27.
3. A world-wide survey and field study in clinical hemostasis laboratories to evaluate FVIII:C activity assay variability of ADYNOVATE and OBIZUR in comparison with ADVATE. Turecek PL, Romeder-Finger S, Apostol C, Bauer A, Crocker-Buqué A, Burger DA, Schall R, Gritsch H. *Haemophilia*. 2016 Nov;22(6):957-965. doi: 10.1111/hae.13001. Epub 2016 Jun 28.