

# Compte rendu de la 21<sup>ème</sup> journée du Groupe d'Etude de la biologie des maladies hémorragiques (BIMHO)

Cette réunion s'est tenue le 17 juin 2022 et a rassemblé 34 biologistes.

## 1. Retour de congrès (Claire Pouplard)

### L'administration de FVIII par voie sous cutanée : où en sommes-nous ?

Robert. F. Sidonio (Emory University and Children's Healthcare, Atlanta, USA) a présenté un exposé relatif à l'impact de la voie d'administration des facteurs antihémophiliques sur le risque d'inhibiteur.

Cette brève analyse sera ciblée au FVIII administré par voie sous cutanée et ne discutera pas le risque très faible d'anticorps anti-drogue (ADA) associé aux traitements par l'emicizumab. Le traitement prophylactique par FVIII nécessite des injections IV 2 à 3 fois par semaine en raison de la  $\frac{1}{2}$  vie relativement courte du F VIII, de 12 heures environ. Ces injections fréquentes sont très contraignantes pour les patients et plus particulièrement pour les enfants en bas âge qui possèdent souvent un réseau veineux difficilement accessible. Ces aspects expliquent le nombre croissant de patients hémophiles A traités par l'emicizumab qui est administré par voie sous cutanée.

Les données pharmacocinétiques résultant de cette voie d'administration sont plus complexes puisque le médicament injecté atteint la circulation après diffusion dans les capillaires sanguins lorsqu'il s'agit de protéines de petite taille ( $PM \leq 16$  KDa) ou après un passage dans les vaisseaux lymphatiques si leur poids moléculaire est plus élevé.

Ainsi la faible biodisponibilité du FVIII ( $PM$  de l'ordre de 300 KDa) administré par voie sous cutanée pourrait avoir plusieurs causes: une dégradation de la protéine dans l'interstitium puisqu'elle n'est pas protégée par le VWF mais également une absorption du F VIII sur les tissus, en particulier au niveau des phosphatidylserines, et enfin une phagocytose du FVIII par les macrophages de l'interstitium.

L'administration du FVIII par voie sous cutanée, étudiée depuis plus de 20 ans (1), impose de relever différents défis : tout d'abord faire face à une plus forte immunogénicité d'une protéine lorsqu'elle est administrée par voie sous cutanée, mais également la nécessité d'atteindre la circulation avec un taux de F VIII suffisant pour permettre une correction satisfaisante de l'hémostase. Deux F VIII par voie sous cutanée sont actuellement en cours d'étude avec des stratégies différentes.

Tout d'abord un FVIII délété du domaine B et pégylé (N8-GP ; tuoctoag alfa) qui a été approuvé aux USA pour sa demi-vie allongée lorsqu'il est administré par voie IV et qui est actuellement évalué après administration par voie sous cutanée. Des premiers résultats ont été rapportés dans l'étude Alleviate 1 (2). Lors de la première phase de cette étude (Phase A), les patients (24 Hémophiles A sévères) recevaient quotidiennement une dose croissante de de N8-GP par voie SC allant de 12,5 à 100 IU/kg pendant 7 jours afin de réaliser des analyses de pharmacocinétique. Afin d'évaluer la tolérance du produit lors de cette phase, un groupe contrôle a été traité avec un placebo. Dans la 2eme partie de l'étude (Phase B): 26 patients (Hémophilies A sévères) ont reçu quotidiennement une dose fixe de N8-GP SC pendant 13

semaines. Les patients de moins de 60 kg étaient traités par 2 000 UI et ceux  $\geq$  60 kg recevaient 4 000 UI de F VIII. Un ajustement de posologie était laissé à la discrétion de l'investigateur en cas de saignement.

La demi-vie du N8-GP SC, étudiée lors de la phase A, était de 21,6 et 20,6 heures pour des posologies de 50 et 100 UI/Kg, respectivement. Un taux circulant F VIII stable et proche de 10% a été mesuré dès la 2ème semaine de traitement.

Un certain nombre d'effets indésirables ont été relatés : 16 lors de l'étude de phase A (11 patients/24) et 45 lors de l'étude de phase B, les événements les plus fréquents étant des réactions cutanées aux sites d'injection.

Au cours de l'étude de phase B, deux événements indésirables sévères (EIS) ont été notifiés et ils concernaient des patients différents. Dans un cas, le développement d'un inhibiteur de faible titre (max 2,6 UB/ml) survenu à 49 JCPA a été rapporté. Cet anticorps était neutralisant et aucune activité de FVIII n'était détectable. L'étude de l'immunogénicité du N8-GP sous cutanée ne ciblait pas uniquement les anticorps neutralisants anti-FVIII mais également les anticorps non neutralisants (détectés par une méthode ELISA), les anticorps anti-PEG et les anticorps anti-*host-cell protein* qui correspondent à des anticorps dirigés contre les autres protéines contenues dans les préparations différentes du FVIII. Ainsi 4 autres patients ont développé des IgG4 anti N8-GP détectables uniquement par ELISA mais pour ces patients, les taux d'IgG4 anti N8-GP étaient corrélés avec la diminution du taux circulant de F VIII. Les anticorps anti-PEG étaient présents chez 2 patients au moment de l'inclusion dans l'étude. Quatre autres ont développé des anti-PEG durant le protocole mais ils étaient transitoires chez 2 d'entre eux. Le 2ème événement indésirable a concerné un patient ayant présenté des arthralgies sévères du genou gauche ayant entraîné la sortie de l'étude.

Concernant l'efficacité clinique du N8-GP, 7 saignements nécessitant un traitement substitutif complémentaire sont survenus chez 3 des 5 patients présentant des IgG4 anti-N8-GP.

Un autre FVIII administrable par voie SC est développé par le laboratoire Octapharma qui tente d'améliorer la biodisponibilité du F VIII en limitant sa liaison aux phosphatidylserines et par là-même sa protéolyse. Dans ce but, un petit fragment du VWF (rVWF-12) contenant le domaine de liaison pour le F VIII (domaine D'D3) enrichi en sites de O-glycosylation a été produit afin d'être administré simultanément au FVIII recombinant (simoctocog alfa). Les travaux présentés sont réalisés sur un modèle de souris hémophile A (F8 -/-) (3). Ainsi, alors que le rFVIII administré seul par voie sous cutanée est très faiblement absorbé (biodisponibilité 1,5 %), l'injection simultanée de rVWF-12 permet d'atteindre une biodisponibilité de 18,5 % et l'absorption du F VIII est maximale après 6 heures. La demi-vie d'élimination du FVIII est 2,5 fois plus longue que celle observée lorsqu'il est administré seul par voie IV (7,2 h versus 2,8 h). Comme attendu, toutes les souris s'immunisent contre le FVIII recombinant mais le fragment D'D3 VWF n'augmente pas cette immunogénicité. Ces résultats encourageants doivent être confirmés chez des patients hémophiles A.

Nous ne connaissons pas à ce jour l'impact à très long terme des traitements de l'hémophilie reposant sur des molécules qui ne sont pas des facteurs de coagulation. La voie sous cutanée est un espoir pour les patients et les travaux visant au développement de cette approche doivent être donc poursuivis.

## Références

1. Fatouros A, Lidén Y, Sjöström B. Recombinant factor VIII SQ--stability of VIII: C in homogenates from porcine, monkey and human subcutaneous tissue. *J Pharm Pharmacol.* 2000 Jul;52(7):797-805.
2. Klamroth R, Feistritz C, Friedrich U, Lentz SR, Reichwald K, Zak M, Chowdary P. Pharmacokinetics, immunogenicity, safety, and preliminary efficacy of subcutaneous turoctocog alfa pegol in previously treated patients with severe hemophilia A (alleviate 1). *J Thromb Haemost.* 2020 Feb;18(2):341-351.
3. Vollack-Hesse N, Oleshko O, Werwitzke S, Solecka-Witulska B, Kannicht C, Tiede A. Recombinant VWF fragments improve bioavailability of subcutaneous factor VIII in hemophilia A mice. *Blood.* 2021 Feb 25;137(8):1072-1081.

### **La thérapie génique : une nouvelle problématique pour les laboratoires d'hémostase lorsque l'on doit doser les taux de F VIII ou F IX circulants.**

Les laboratoires d'hémostase ont été largement confrontés aux problématiques de dosage des Facteurs VIII ou IX à demi vie prolongée et une littérature assez riche existe dans ce domaine. Moins de patients hémophiles bénéficient de traitement par thérapie génique mais nous devons à nouveau faire face à des difficultés pour doser l'activité de ces protéines transgéniques (F VIII ou F IX).

La thérapie génique par vecteur à adénovirus recombinant permet l'expression de FVIII ou FIX transgénique à partir des hépatocytes qui sont les cellules qui synthétisent naturellement le FIX. Cependant le FVIII, physiologiquement synthétisé par les cellules endothéliales, va subir des modifications structurales lorsqu'il est synthétisé par les hépatocytes avec des modifications post-traductionnelles pouvant expliquer des différences de comportement lors du dosage de son activité au laboratoire par méthode chromogénique (CSA) ou coagulante (OSA).

Lors de la cession « *New Challenges for the Coagulation Laboratory* » Bob Gosselin (University of California, Sacramento, USA) a présenté une synthèse des différentes difficultés rencontrées lors du dosage de l'activité de ces protéines transgéniques.

**Concernant la thérapie génique de l'hémophilie B**, à ce jour 6 études sont en phase 1,2 ou 3 et la thérapie génique de l'hémophilie B semble plus avancée que celle de l'hémophilie A en raison de la découverte du F IX Padua qui est une protéine gain de fonction et utilisée au niveau du transgène (1,2). Avec ce transgène, les taux de F IX sont 2 à 3 fois supérieurs lorsqu'ils sont mesurés par méthodes coagulantes comparativement à la méthode chromogénique et il existerait des variations importantes selon les réactifs utilisés. Le réactif chromogénique de référence étant le réactif ROX.FIX. En effet, MM Robinson (3) rapporte des taux de FIX systématiquement plus bas chez des patients ayant reçu le FIX Padua-AAV-spark 100 (Pfizer) lorsque le FIX est mesuré par méthode chromogénique. Par méthode coagulante, l'activité du FIX la plus élevée est obtenue avec le réactif STA PTT automate (Stago) (activateur silice micronisée, phospholipides de lapin) et la plus basse avec l'actine FSL (Siemens) (activateur acide ellagique, phospholipides de lapin et soja). Lorsque du FIX Padua est ajouté à du plasma déficient en FIX, les auteurs observent les mêmes variations confirmant le rôle de cette protéine gain de fonction. L'activité augmentée du F IX Padua pourrait nécessiter, lors de son dosage par méthode chromogénique, une concentration plus importante de FX dans le réactif.

**L'hémophilie A bénéficie** d'un programme de développement plus important avec actuellement 10 essais cliniques en cours. Même si aucun FVIII gain de fonction n'a été identifié à ce jour, la découverte d'un variant régulateur du FVIII et entraînant une augmentation de 3 à 4 fois des taux plasmatiques circulant est très encourageante (4).

Concernant le dosage du FVIII transgène, les écarts entre les deux méthodes de dosages sont plus réduits que ceux observés avec le FIX Padua avec un rapport OSA/CSA aux alentours de 1,6. La source de phospholipides et d'activateur ne semble pas impacter les résultats.

Lors des essais cliniques BMN 270 (Bio-Marin) les plasmas des patients ont été étudiés et les ratios OSA/CSA variaient entre 1,5 et 2,0 (5). Rosen *et al* ont montré par méthode coagulante, une génération plus forte de thrombine et de FXa avec le FVIII transgène expliquant des taux mesurés de FVIII plus importants par cette méthode. Il est intéressant de souligner que le gène du FVIII utilisé lors de cette thérapie génique est celui codant pour un F VIII délété en domaine B (Refacto®) qui se comporte de façon inverse (CSA > OSA) lorsqu'il est utilisé en traitement substitutif. Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que le Refacto® est produit sur cellules non humaines (Cellules ovariennes d'hamster) alors que la protéine transgénique est produite par les hépatocytes humains avec de possibles modifications post traductionnelles ou de repliement des protéines. En effet, lorsque le FVIII transgène est produit sur cellules HepG2 (cellules de carcinome hépatique humain) les taux de FVIII sont 2 fois plus élevés par méthode coagulante. Le polymorphisme entre la séquence du Refacto et celle qui code pour le F VIII transgène (Leu/Phe 1880) ne semble impacter les taux de FVIII mesurés.

Ainsi, au cours des développements cliniques, la méthode chromogénique a été choisie pour évaluer de façon prudente l'efficacité hémostatique et permettre une comparaison avec les produits recombinants.

#### Références :

1. Simioni P, Tormene D, Tognin G, Gavasso S, Bulato C, Iacobelli NP, Finn JD, Spiezia L, Radu C, Arruda VR. X-linked thrombophilia with a mutant factor IX (factor IX Padua). *N Engl J Med*. 2009 Oct 22;361(17):1671-5.
2. George LA, Sullivan SK, Giermasz A, Rasko JEJ, Samelson-Jones BJ, Ducore J, Cuker A, Sullivan LM, Majumdar S, Teitel J, McGuinn CE, Ragni MV, Luk AY, Hui D, Wright JF, Chen Y, Liu Y, Wachtel K, Winters A, Tiefenbacher S, Arruda VR, van der Loo JCM, Zelenia O, Takefman D, Carr ME, Couto LB, Anguela XM, High KA. Hemophilia B Gene Therapy with a High-Specific-Activity Factor IX Variant. *N Engl J Med*. 2017 Dec 7;377(23):2215-2227.
3. Robinson MM, George LA, Carr ME, Samelson-Jones BJ, Arruda VR, Murphy JE, Rybin D, Rupon J, High KA, Tiefenbacher S. Factor IX assay discrepancies in the setting of liver gene therapy using a hyperfunctional variant factor IX-Padua. *J Thromb Haemost*. 2021 May;19(5):1212-1218.
4. Simioni P, Cagnin S, Sartorello F, Sales G, Pagani L, Bulato C, Gavasso S, Nuzzo F, Chemello F, Radu CM, Tormene D, Spiezia L, Hackeng TM, Campello E, Castoldi E. Partial F8 gene duplication (factor VIII Padua) associated with high factor VIII levels and familial thrombophilia. *Blood*. 2021 Apr 29;137 (17):2383-2393.
5. Rosen S, Tiefenbacher S, Robinson M, Huang M, Srimani J, Mackenzie D, Christianson T, Pasi KJ, Rangarajan S, Symington E, Giermasz A, Pierce GF, Kim B, Zoog SJ, Vettermann C. Activity of transgene-produced B-domain-deleted factor VIII in human plasma following AAV5 gene therapy. *Blood*. 2020 Nov 26;136(22):2524-2534.

## 2. Agrégométrie optique : élaboration de propositions du GFHT pour l'accréditation selon la norme EN15189 (Dominique Lasne, Alain Stépanian et Sophie Voisin)

Ce travail a débuté fin 2019 suit le cheminement suivant :

|   |                                    |
|---|------------------------------------|
| revue de la littérature                 | validation des méthodes SH form 43 |
| enquête de pratique (BIMHO juin 2021)   |                                    |
| élaboration de propositions             |                                    |
| Relecture par des experts (CRPP, GFHT)  |                                    |
| Vote des propositions (membres du GFHT) |                                    |

Revue de la littérature à partir des recommandations GFHT, CLSI, ISTH, des recommandations anglaises, nord-américaines, ou des publications du CRPP.

La synthèse des recommandations suit le plan suivant :

1. Les besoins cliniques-justification médicale, tiennent compte de la NABM et des RIHN, précisant qu'il s'agit d'un examen difficile qui ne doit être réalisé que dans des laboratoires spécialisés (ISTH).
2. Détails des différents analyseurs et automates sur le marché.
3. Détails des différentes étapes de l'analyse, du pré au post-analytique
4. la possibilité d'utilisation des témoins a fait l'objet d'une analyse spécifique du code de la santé publique (article L. 1221-4) « *Le sang, ses composants et leurs dérivés peuvent être distribués et utilisés à des fins de recherche, de contrôle des examens de biologie médicale ou de contrôle des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro, à l'exclusion de toute administration à l'homme, avant l'obtention des résultats des examens biologiques et des tests de dépistage prévus au premier alinéa » [\(CSP\)](#). Toutefois, l'article L.1221-3 précise que « le prélèvement ne peut être fait qu'avec le consentement du donneur par un médecin ou sous sa direction et sa responsabilité » [\(CSP\)](#). Leur utilisation doit être particulièrement encadrée.*

Les 22 propositions du groupe ont été débattues et enrichies selon les pratiques de chacun lors de la réunion :

Les propositions concerneront toutes les étapes de l'agrégométrie, du pré ou post analytique, y compris et la formation habilitation du personnel. La notion de maîtrise de l'examen par l'équipe technicien et biologiste a été très discutée car c'est un point important pour la validation des méthodes. Les échanges très riches lors de la réunion ont permis de faire avancer ce document important, difficile et très attendu, d'ajouter des propositions supplémentaires.

Les propositions sont en cours de relecture par le groupe qualité du GFHT, avant d'être soumises aux membres du GFHT (Via Survey Monkey), La méthodologie de notation par les membres du GFHT sera la suivante :

- ✓ Echelle de notation comprise entre 1 et 10
- ✓ Accord fort obtenu si  $\geq 50$  % des votants expriment une note  $\geq 7$  et  $< 20$  % des votants une note  $\leq 4$ .

- ✓ En l'absence d'accord, les propositions seront reformulées et soumises à nouveau au vote

Il est donc important de bien choisir sa notation !

Après cette réunion, les trois corédacteurs modifient la formulation d'un certain nombre de propositions, en ajoutent d'autres, qui sont rediscutées avec le groupe qualité du GFHT. L'objectif final et la soumission au vote du GFHT à la rentrée de septembre, avant publication à l'automne (français et anglais).

### **3. Willebrand acquis (Catherine Ternisien)**

Le Willebrand acquis (AVWS) est une pathologie hémorragique rare de l'hémostase primaire dont la prévalence est estimée à 0,04 % la population générale, prévalence qui est très probablement sous-estimée. Il est tout à fait similaire à la forme constitutionnelle et il est lié à un déficit quantitatif ou qualitatif en facteur Willebrand (VWF). Ce syndrome est très hétérogène sur le plan clinique, biologique, et sur les pathologies qui lui sont associées. A ce jour, il existe très peu d'études épidémiologiques permettant la publication de recommandations.

Le diagnostic est évoqué devant un syndrome hémorragique associé à des anomalies du VWF ou bien des anomalies biologiques du VWF isolées qui surviennent chez un sujet jusque-là indemne d'une histoire hémorragique familiale ou personnelle. Ce syndrome survient le plus souvent chez l'adulte avec un âge moyen de 62 ans qui va présenter, le plus souvent, un contexte clinique évocateur. Il touche indifféremment les hommes et les femmes. Le plus souvent, ce patient présentera une mauvaise réponse au traitement DDAVP ou aux par concentrés de VWF avec une 1/2 vie du VWF très raccourcie.

A la différence de l'Hémophilie acquise, l'AVWS est toujours secondaire à une pathologie sous-jacente (syndrome lymphoprolifératif B secondaire le plus souvent à une gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS) ou à un myélome ou Waldenström, pathologie cardiovasculaire associée à des forces de cisaillement élevées et assistances circulatoires mécaniques, syndrome myéloprolifératif, autre cause). Les mécanismes impliqués sont nombreux illustrant la diversité des pathologies sous-jacentes associées :

- diminution de synthèse dans l'hypothyroïdie
- protéolyse accélérée par ADAMTS 13 ou d'autres protéases (plasmine) dans les pathologies cardiovasculaires
- présence d'auto anticorps dirigés contre le VWF (syndromes lymphoprolifératifs B et maladies auto immunes). Cet auto anticorps est le plus souvent une IgG parfois une IgM avec une chaîne légère Kappa prédominante. Contrairement à l'hémophilie A acquise, il est le plus souvent non neutralisant.
- adsorption du VWF sur des cellules tumorales ou activées.

Le diagnostic biologique d'AVWS est identique à celui de la forme constitutionnelle. L'évaluation biologique initiale inclut habituellement : un hémogramme, un temps de Quick et un temps de céphaline avec activateur. Un bon test de dépistage est la mesure du temps d'occlusion plaquettaire sur automate PFA-100® très sensible à la perte de multimères de HPM du VWF. Concernant les tests dits de premier niveau à réaliser, 3 tests à ne pas dissocier: le dosage du facteur VIII, le dosage du VWF fonctionnel et VWF antigène. Des tests complémentaires sont nécessaires pour permettre un diagnostic correct de type de VWD mais

ils ne sont pas accessibles à tous les laboratoires : dosage du VWF:CB et analyse des multimères du VWF.

Pour essayer de distinguer une forme constitutionnelle d'un AVWS, on peut essayer de rechercher dans le plasma du patient un autoanticorps par des tests fonctionnels (VWF :CB ou VWF :Act) sur un mélange. Ces anticorps sont rarement neutralisants et la recherche ne sera positive que dans 14% des cas. Des techniques Elisa ont été développées pour rechercher des ac non inhibiteurs. Elles ont également une faible sensibilité de l'ordre de 34% et à ce jour aucune étude n'a démontré la signification clinique des ac détectés par Elisa. Un test intéressant en revanche, le dosage du propeptide du VWF (VWFpp) qui reflète la synthèse du VWF. Un ratio VWFpp/VWF:Ag augmenté ( $N < 2$ ) traduit une augmentation de clairance du VWF. Ce ratio est très souvent élevé en cas de gammopathies monoclonales mais est également élevé dans certains VWD constitutionnel avec clairance accélérée (type 1C). Sur le plan du phénotype biologique, la présentation la plus fréquente sera celle d'un déficit qualitatif en VWF (type 2A) avec un profil multimérique anormal. Dans certains cas, le profil est proche d'un déficit quantitatif en VWF (type 1) et plus volontiers d'un type 1C avec clairance accélérée caractérisé par un rapport propeptide/antigène élevé.

Les manifestations hémorragiques du AVWS ressemblent à celles de la forme constitutionnelle et sont dominées par les hémorragies cutanéomuqueuses et les hémorragies gastro intestinales associées à des angiodysplasies mais dans 30 à 50% des cas les patients sont asymptomatiques en dehors d'un geste invasif.

En résumé, le diagnostic d'AVWS doit être évoqué :

- 1) chez un patient qui saigne : si un déficit quantitatif ou qualitatif en VWF est retrouvé, la question que l'on doit se poser : s'agit-il d'un déficit constitutionnel ou acquis ? La différence est importante à faire car prise en charge est différente. Une histoire hémorragique chez un sujet sans histoire personnelle ou familiale associée à une pathologie sous-jacente est en faveur d'un AVWS. A l'inverse des ATCDs hémorragiques familiaux et une bonne réponse aux traitements avec une demi-vie correcte à la Desmopressine ou aux concentrés de VWF est en faveur d'un VWD constitutionnel. Toutefois le diagnostic différentiel peut être difficile car le patient peut rester asymptomatique pendant longtemps, ne pas avoir d'ATCD familiaux en raison de la faible pénétrance de la maladie ; dans ces situations, il faut savoir que l'étude génétique du VWF est accessible dans le cadre du CRMW et qu'elle peut aider au diagnostic différentiel de même que l'étude familiale.
- 2) chez un patient asymptomatique sur le plan hémorragique mais qui présente une pathologie connue pour être associée à un VWD acquis. La recherche doit être envisagée en cas de chirurgie ou geste à risque hémorragique.

Concernant la prise en charge thérapeutique, pour prévenir ou traiter un saignement l'efficacité de la desmopressine, des concentrés de VWF /FVIII, des IgIV, du rFVIIa, des plasmaphèreses et des antifibrinolytiques varie en fonction de la pathologie sous-jacente (1). Dans tous les cas, la prise en charge comprend le traitement de la pathologie causale quand cela est possible et/ou nécessaire. Concernant les MGUS, les traitements immunosuppresseurs (rituximab, cyclophosphamide, azathioprine) sont inefficaces. En revanche, la littérature récente rapporte des bons résultats dans le traitement précoce en première ligne des MGUS avec les thérapeutiques du myélome comme les inhibiteurs de protéasome (Bortezomib) ou des immunomodulateurs (thalidomide, lenalidomide) ou encore l'anticorps monoclonal, le daratumumab (anti CD38). Ces données rejoignent tout à fait le concept de gammopathies



monoclonales de signification clinique développé il y a quelques années. Ce concept souligne tout particulièrement l'importance d'une chimiothérapie précoce ciblant le clone de plasmocytes qui produit une Ig monoclonale associée avec une pathologie et cela en dépit de l'absence d'indication purement hématologique (2). Ainsi, Moreno et son équipe (3) préconisent un traitement précoce en première ligne des MGUS associée à un AVWS, après une approche bénéfique/risque et si la maladie hémorragique est jugée préoccupante et /ou menaçant le pronostic vital, les traitements utilisés dans le myélome doivent être considérés.

#### Références :

1. Franchini M, Mannucci PM. Acquired von Willebrand syndrome: focused for hematologists. *Haematologica*. 2020 Aug;105(8):2032-2037.
2. Abou-Ismaïl MY, Rodgers GM, Bray PF, Lim MY. Acquired von Willebrand syndrome in monoclonal gammopathy - A scoping review on hemostatic management. *Res Pract Thromb Haemost*. 2021 Feb 17;5(2):356-365.
3. Moreno DF, Rosiñol L, Cibeira MT, Bladé J, Fernández de Larrea C. Treatment of Patients with Monoclonal Gammopathy of Clinical Significance. *Cancers (Basel)*. 2021 Oct 13;13(20):5131.

#### 4. Norme ISO 15189 : évolutions avec la version 2022 (Frédéric Sobas)

A la fin de l'année 2022 sera diffusée une version 2022 de la norme ISO 15189. Cette version issue d'un processus de relecture au niveau de chaque pays puis de conférences de consensus internationales va agréger ISO 15189 et ISO 22870 en une seule norme unique ISO 15189. F Sobas ayant acheté la norme ISO 15189 en 2012 a été invité (comme tous les acheteurs) par l'AFNOR à participer aux relectures du comité français. Ce résumé a pour but de donner les grandes orientations générales de cette nouvelle version d'une part et d'autre part d'exprimer un point de vue sur ce qui était encore un draft en Avril 2022 avant de nouvelles réunions de consensus internationales.

##### En termes d'orientations générales :

- Il y a intégration des exigences de la norme ISO 22870 avec disparition de la norme ISO 22870
- Corrélation avec la norme ISO 17025 : harmonisation de forme ISO
- Cette révision apporte une amélioration par rapport à la v 2012 avec la mise en place d'un SMQ basé sur une approche risques pour la prise en charge des patients : TOUT s'articule sur les analyses de risque !
- Le Manuel Qualité n'est plus une exigence
- Estimation des incertitudes de mesure sans « nécessité d'exigence de performance » ; NB : l'ISO 20914 est simplificatrice
- Exigences relatives aux processus pré ana – ana et post ana sont bien détaillées

##### En termes d'appréciation globale et personnelle de ce processus de révision :

##### **Points positifs :**



- Une évolution « orientée patients »
- L'aide méthodologique de l'Afnor (responsable de la traduction pour tous les pays francophones)
- Des échanges non conflictuels en réunions
- L'intérêt de la dimension internationale qui pondère les travers corporatistes et ou l'expression des liens d'intérêt
- Un moyen d'expression (influer et ne pas subir) pour faire passer des messages au niveau du Cofrac et à un niveau international :

**Point perfectible :**

- Le chapitre CIQ qui pourrait être largement amélioré ... mais il est toujours possible d'influer pour la suite au regard de l'ouverture du texte

**Point négatif :**

- Un point regrettable : la « non harmonisation » méthodologique de la réalisation des analyses de risque

Mais la norme ISO 15189 demeurera un fil rouge pérenne pour la formalisation du fonctionnement des LABM.

## 5. EEQ VIII bas chronométrique : suite de l'analyse des résultats en fonction des méthodologies (Valérie Eschwège, Marc Trossaërt, Clémentine Wahl)

Cette intervention avait pour objet de présenter le détail des différentes méthodologies utilisées par les 27 centres ayant participé à au moins une des 2 enquêtes réalisées en Fev et Nov 2020 par Marc Trossaërt et Clémentine Wahl.

- **Les utilisateurs des systèmes CS Sysmex – Siemens** (n=5) utilisaient tous le déficient VIII Siemens et la calibrant SHP Siemens. Différentes céphalines utilisées : Pathromtin SL, Actin FS, Trinicot APTT HS. Dans ce système, la calibration est réalisée avec 7 points (entre 140% et 0,4%) avec une courbe en point par point et une dilution au 1/20. Un utilisateur modifie un peu les valeurs des points de calibration en partie basse et en ajoute un. Les échantillons ont été mesurés en rapport de dilution 1/1 c'est-à-dire au 1/20. Les points tampon mesurés le jour de l'enquête ont toujours été trouvé plus longs que le point avec la plus faible concentration de VIII de la calibration.

- **Les utilisateurs des systèmes ACL Top – Werfen** (n=7) utilisaient tous le SynthASil comme céphaline et l'HemosIL Calibration Plasma en calibrant. Pour le déficient VIII, 6 utilisaient le Werfen et un le Cryopep. Dans ce système, la calibration est réalisée avec 8 points (entre 150% et 0%) avec une courbe en 2 polynomiales intégrant chacune 6 points et une dilution au 1/10. Les échantillons ont été mesurés soit au 1/10 soit au 1/5. Les points tampon mesurés le jour de l'enquête ont été trouvé proches du point « zéro » de la calibration mais pas toujours plus long.

- **Les utilisateurs des systèmes Stago** (n=16) utilisaient en majorité comme déficient en VIII l'immunodef Stago, 4 utilisaient le def Siemens. 15 utilisateurs utilisaient comme céphaline le CKPrest et 1 utilisait le Pathromtin. Comme calibrant, la majorité utilisait le STA-Unicalibrator, 1 centre le SHP Siemens et 1 centre le CryoCheck Normal Reference Plasma. Dans ce système, la calibration est réalisée avec 6 points (entre 140% et 3%) avec une courbe polynomiale d'ordre 2 et une dilution au 1/10. Lorsque le résultat échantillon est <3,3%, une reanalyse avec une dilution au 1/2 est réalisée pour rendre les résultats jusqu'à 0.7% (et si le résultat échantillon est >120% une reanalyse avec une dilution au 1/40 est réalisé pour rendre jusqu'à 400%). Très peu de points tampons ont été réalisés car l'automate dans sa configuration de

base ne rend pas de résultat en secondes si <0.7%. Seuls les 3 centres qui avaient créé une nouvelle méthodologie en secondes pour l'étude et les 2 centres qui réalisent une courbe basse au 1/5 en complément de la courbe classique ont réalisé un point tampon le jour de l'enquête. Un des centres retranche ce point tampon des valeurs très basses.

**Conclusion – Perspectives** Le faible nombre de centre utilisant la même méthode ne permet pas une analyse des causes de la variabilité des résultats obtenu lors des enquêtes réalisées en 2020, ni une comparaison des performances d'une méthode par rapport à l'autre. En revanche, plusieurs questions ont été soulevées qui pourraient donner lieu à de nouvelles études dans les suites de ce travail sur les valeurs très basses de facteur VIII.

## 6. Le dosage des FIX-long acting en France en 2022 (François Grand)

Le but de ce travail était de réaliser l'état des lieux des pratiques de dosages de facteur IX sous Idelvion® et Alprolix® dans les laboratoires en France en 2022. Les réactifs aPTT du marché ne réagissent pas de la même manière que celles de référence (Idelvion® : Pathromtin SL ; Alprolix® : Actin). Trente biologistes de 22 CHU et 8 CH non universitaires ont répondu à un questionnaire afin de préciser comment ils réaliseraient le dosage de FIX sous Idelvion, en comparaison au dosage standard et sous Alprolix®. 70 % des centres ont réceptionné un échantillon de patient sous Idelvion® et 22 % ont réalisé un dosage en urgence.

La majorité des utilisateurs Werfen utilisent le même dosage de FIX en Synthasil pour toutes les situations ; les utilisateurs Siemens utilisent majoritairement le réactif Pathromtin SL commun pour le dosage classique et sous Idelvion® ; les utilisateurs Stago emploient le CK Prest avec réserve, le remplacent par une autre céphaline, ou délèguent le dosage à un autre centre. A défaut d'un dosage idéal commun, le laboratoire peut transmettre l'échantillon à un centre de référence, utiliser une méthode au moins commune à deux situations, ou au contraire s'orienter vers une calibration spécifique. Une étude au sein du groupe BIMHO est proposée.

**La majorité des utilisateurs Werfen appliquent une méthode unique avec Synthasil pour le dosage de FIX standard, sous Idelvion® et sous l'Alprolix®.**

7 laboratoires sur les 30 interrogés, tous en CHU, disposent d'un automate ACL TOP. Tous utilisent la méthodologie de FIX proposée par Werfen avec Synthasil en se basant sur les recommandations BIMHO 2019. Cette configuration est commune pour dosage standard, Idelvion® et Alprolix®.

Le CHU de Lyon utilise le Synthasil en appliquant une calibration spécifique à partir d'un concentré d'Idelvion® (communication Congrès Français d'Hémostase 2022). La même stratégie est envisagée pour l'Alprolix®.

**La majorité des utilisateurs Sysmex/Siemens utilisent le réactif de référence Pathromtin SL pour le dosage sous Idelvion®. Son utilisation commune avec le dosage standard ou sous Alprolix® reste problématique.**

Six centres sur les 30 interrogés disposent d'un automate Sysmex (CS 2100, 2400, 2500, 5100) ou Siemens (Atellica Coag 360). Siemens propose deux dosages de FIX : avec Actin FS ou Pathromtin SL.

Cinq centres sur 6 utiliseraient le réactif de référence Pathromtin SL. La stratégie est pertinente pour ceux utilisant ce réactif en dosage standard. Deux centres étendent cette méthode à l'Alprolix, malgré une bibliographie discordante.

Les laboratoires qui utilisent l'Actin FS en standard l'appliquent aussi pour l'Alprolix®, mais créent une méthodologie spécifique pour l'Idelvion® avec Pathromtin SL. Un centre utilise le Triniclot APTT HS commun avec le dosage standard.

**Les utilisateurs Stago appliquent différentes stratégies sous Idelvion® : méthode standard en CK Prest avec réserve ; méthode commune Idelvion®/Alprolix® avec un autre réactif de TCA ; ou transmission de l'échantillon à un autre laboratoire.**

La majorité des laboratoires (19/30) disposent d'un automate Star Max, la répartition est plus nette dans les centres non universitaires (7/8).

Neuf laboratoires sur 19 utilisent la méthode standard en STA-CK Prest en connaissant ses limites. Un commentaire précise la sous-estimation. Le résultat du compte-rendu n'est pas corrigé. Certains laboratoires réalisent ce dosage en garde en attendant le résultat d'une méthode plus adaptée.

Une autre stratégie consiste à employer une méthodologie commune pour Idelvion et Alprolix en substituant le CK Prest par une autre céphaline. Le Triniclot automated APTT (Stago, ex T Coag) est employé par 5 laboratoires. Ce réactif n'est pas répertorié dans les recommandations BIMHO 2019. Deux laboratoires évoquent le STA-Cephascreen et le STA-PTT-Automate et rapportent des expériences concluantes. Acceptables pour l'Alprolix®, ces céphalines ne le sont pas pour Idelvion® selon les recommandations 2019.

Deux centres ne réalisent pas le dosage et transfèrent les échantillons à un CHU.

**A défaut d'un dosage idéal commun, le laboratoire peut déléguer le dosage à un centre de référence, utiliser une méthode au moins commune à deux situations, ou au contraire s'orienter vers une calibration spécifique.**

Le dosage unique est idéal : envisageable en garde, paramétrage informatique simplifié et accréditation unique.

La non-réalisation du dosage est à évoquer pour les centres de petite taille, dans l'incapacité d'installer une méthodologie spécifique pour des situations rares. La problématique est la même qu'avec Hemlibra®. Une stratégie consiste à réduire les situations de dosages en programmant certaines chirurgies dans un centre de référence disposant d'un dosage acceptable. Les situations d'urgences restent limitées, et l'injection du produit prime sur le dosage.

Le laboratoire peut utiliser une méthode au moins commune à deux situations. Il manque cependant des données pour utiliser sereinement certaines céphalines (Triniclot, PTTA, Cephacreen).

Une méthode avec calibration spécifique à la molécule semble donner de résultats proches des cibles, mais peut être complexe à mettre en œuvre. Des interrogations persistent sur la gestion des CQI, des EEQ et la variabilité de préparation lors d'une calibration « maison ».

**Un projet d'étude est proposé lors de la réunion, à présenter à la prochaine session BIMHO.**

Plusieurs axes sont évoqués :

- Etudier les résultats de plasmas de patients, au lieu d'échantillons spikés : tubes conservés en plasmathèque dans les différents laboratoires et qui pourraient être échangés
- Etudier les méthodologies chromométriques qui manquent de données (Triniclot ...)
- Etudier les méthodologies avec calibration spécifique : s'assurer qu'il n'y a pas de variabilité liée à la technique de calibration elle-même.

## 7. Thrombopénie dans la maladie de Willebrand : y-a-t-il une place pour les agonistes du récepteur à la thrombopoïétine ? : Valérie Proulle

La maladie de Willebrand de type 2B (VWD2B), due à une hyper-adhésivité anormale du facteur von Willebrand (VWF) pour son récepteur plaquettaire (GPIb), peut s'accompagner d'une thrombopénie, qui apparaît ou s'exacerbe en situation de stress, infectieux ou inflammatoire, ou après administration de DDAVP.

Il existe une corrélation génotype/phénotype dans la VWD2B entre la chronicité et la sévérité de cette thrombopénie : si de rares mutations ne sont jamais responsables d'une baisse des plaquettes, même après administration de DDAVP, certaines sont associées à une thrombopénie fluctuante, et d'autres à une macro-thrombopénie chronique qui aggrave le risque hémorragique.

Les mécanismes de la thrombopénie de la VWD2B sont multiples. Il existe une anomalie de la production plaquettaire en particulier lors de la formation des pro-plaquettes par les mégacaryocytes, responsable de la macro-thrombopénie. Le mécanisme essentiel reste périphérique, dû à l'hyperadhésivité anormale du VWF, entraînant une élimination accélérée des plaquettes fixées au VWF et activées, par le système réticulo-endothélial de la rate et du foie. Ce phénomène est exacerbé lorsque le taux de VWF augmente, expliquant la diminution du chiffre de plaquettes en période post-chirurgicale, infectieuse aiguë, ou lors de la grossesse.

En parallèle de la substitution en VWF, la diminution du chiffre de plaquettes requiert des transfusions plaquettaires. Ces transfusions sont indispensables dans les situations où le risque hémorragique est majeur : chirurgie et période post chirurgicale, accouchement et post-partum. Le maintien d'un chiffre de plaquettes au-dessus d'un seuil hémostatique (50-80 G/L généralement) est parfois difficile en raison de la variabilité du rendement plaquettaire chez les patients dont le taux de VWF est très élevé.

A partir de la description de 2 cas de la littérature, l'utilisation des agonistes du récepteur de la thrombopoïétine (TPORA) a été proposée ponctuellement avec succès pour augmenter le chiffre de plaquettes chez 2 patients avec VWD2B dont la prise en charge nécessitait la correction du chiffre de plaquettes, lorsque les transfusions plaquettaires restaient inefficaces et/ou associées à une intolérance transfusionnelle : Casari C et al, *Ther Adv Hematol.* 2022 Feb 16;13:1-10, Espitia O, et al. *Platelets.* 2017 Jul;28(5):518-520.

L'AMM des TPORA est pour le moment restreinte aux patients atteints de PTI ; ou de thrombopénie liée au HCV ou lors d'aplasies acquises, hors femmes enceintes. Néanmoins, une étude internationale rétrospective a montré que leur utilisation pouvait être envisagée sans risque et avec succès, notamment sans augmentation du risque thrombotique, ponctuellement, chez des femmes enceintes (n=17, Michel et al., *Blood.* 2020;136(26):3056-3061) afin de maintenir un chiffre de plaquettes permettant de gérer l'accouchement et le post partum sans transfusion plaquettaire, lorsque les autres thérapeutiques avaient échoué. Les TPORA ont aussi été utilisés hors AMM pendant des périodes courtes, dans le cadre d'essais thérapeutiques, pour augmenter ponctuellement le chiffre de plaquettes des patients atteints de thrombopénie chronique, afin de permettre la réalisation de chirurgies programmées sans transfusions plaquettaires : Ghanima W et al *Haematologica.* 2019 Jun;104(6):1112-23, Rodeghiero F, et al, *J Thromb Haemost.* 2018 Sep;16(9):1700-10, Bastida JMet al. *Int J Mol Sci.* 2021 Apr 21;22(9):4330. Il existe actuellement un essai clinique français (ELPOT, Pr P Sie) en cours dans ce cadre. Les thrombopénies chroniques concernées sont

essentiellement les thrombopénies liées aux anomalies du gène MYH9, les macrothrombopénies autres ou les patients avec syndrome de Wiskott-Aldrich.

Aucun patient thrombopénique avec VWD2B n'est inclus dans ces études, en raison de l'association de la thrombopénie avec une maladie hémorragique constitutionnelle, même si les mécanismes de la thrombopénie associée avec la VWD2B sont similaires à ceux des thrombopénies chroniques et du PTI.

Nous voulons proposer une étude clinique française multicentrique et prospective pour l'utilisation ponctuelle des TPORA chez les patients avec VWD2B dont la prise en charge nécessiterait des transfusions plaquettaires pour corriger le chiffre de plaquettes. Ces situations influeraient les gestes invasifs programmés et les femmes enceintes, pour gérer l'accouchement et la période du post-partum.

La rédaction, l'organisation et la mise en place de cette étude débutera dans les mois à venir et inclura tous les sites du CRMW et de la filière MHEMO (Pr S Susen) impliqués dans la prise en charge de ce type de patients.

## **8 - Le point sur les projets en cours :**

### **8.1 Retour d'expériences des chirurgies sous Emicizumab Quelle surveillance biologique réaliser en fonction du type de chirurgie ? (C Nougier et al, Lyon)**

Une étude multicentrique Cometh- Bimho (étude CHIREMI) devrait démarrer courant 2022. Ses objectifs sont de décrire:

- la surveillance biologique, si celle-ci a été mise en place, des patients traités par emicizumab et ayant bénéficié d'une chirurgie
- la prise en charge thérapeutique des patients traités par emicizumab et ayant bénéficié d'une chirurgie
- la survenue de manifestations hémorragiques/thrombotiques au décours des chirurgies

### **8.2 Projet de groupe de travail sur la thématique : Bilan biologique d'hémostase en cas de suspicion de maltraitance (F. Nedelec Gac, CHU Rennes - C. Nougier, CHU Lyon)**

Un groupe de travail national sur le sujet « bilan biologique et suspicion de maltraitance » regroupant des pédiatres, biologistes, légistes a été mis en place. Du fait des pratiques hétérogènes, un état des lieux a été fait à l'aide d'un questionnaire adressé aux pédiatres et hémostasiens des différents centres afin de recenser les pratiques. A suivre prochainement pour les résultats.

### **8.3 FVIII Porcin recombinant (Obizur®) (Véronique Le Cam, CHU Rouen)**

Ce projet d'étude multicentrique du groupe a obtenu un financement par le laboratoire TAKEDA. Il démarre avec des premiers résultats qui seront présentés à l'automne 2022.

## **9. Questions diverses**

Deux membres du board souhaitent leur départ. Un appel à candidature est lancé.