

Diagnostic de l'hémophilie et des autres troubles de la coagulation Manuel de laboratoire

Troisième édition

Coordination de la publication :

Silmara de Lima Montalvão, PharmD, MSc, PhD

DIRECTRICE DU DIAGNOSTIC ET DE LA RECHERCHE SUR L'HÉMOSTASE BIOLOGIQUE, directrice scientifique, programme national brésilien d'évaluation externe de la qualité (PAEQ-Hemostasia) pour la coagulation sanguine, centre du sang, université de Campinas-UNICAMP, São Paulo, Brésil

Steve Kitchen, PhD

SCIENTIFIQUE CLINIQUE, centre d'hémophilie et de thrombose de Sheffield, Royal Hallamshire Hospital Sheffield ; directeur scientifique, programme national britannique d'évaluation externe de la qualité (NEQAS) pour la coagulation sanguine ; et directeur scientifique, évaluation externe de la qualité internationale de l'OMS et de la FMH

Publié par la Fédération mondiale de l'hémophilie (FMH)

© Fédération mondiale de l'hémophilie, 2025

La FMH encourage la diffusion de ses publications à des fins pédagogiques par des organisations à but non lucratif. Pour obtenir l'autorisation de reproduire ou de traduire le présent document, merci de bien vouloir contacter le service Aide humanitaire - Éducation et formation médicales à l'adresse indiquée ci-dessous.

Cette publication est disponible sur le site Web de la FMH, à l'adresse www.wfh.org.
Pour commander d'autres exemplaires imprimés, veuillez contacter la FMH à l'adresse suivante :

Fédération mondiale de l'hémophilie
1184 rue Sainte-Catherine Ouest Bureau 500
Montréal, Québec H3B 1K1 Canada
Tél. : (514) 875-7944
Fax : (514) 875-8916
Courriel : wfh@wfh.org

www.wfh.org

Table des matières

PARTIE 1	Planification générale de la qualité dans le laboratoire d'hémostase, Pierre Toulon.....	3
PARTIE 2	Validation du bilan d'hémostase, intervalles de référence et performances, Silmara Montalvão.....	15
PARTIE 3	Intégrité des échantillons et variables pré-analytiques, Kieron Hickey.....	23
PARTIE 4	Investigations en laboratoire faisant uniquement appel à des tests manuels, Steve Kitchen	27
PARTIE 5	Évaluation initiale de l'hémostase, Anastasia Khasiani	34
PARTIE 6	Investigations en laboratoire sur l'hémophilie, Annette Bowyer.....	50
PARTIE 7	Détection et quantification des inhibiteurs fonctionnels congénitaux et acquis dans l'hémostase, Silmara Montalvão	69
PARTIE 8	Investigations en laboratoire sur la maladie de Willebrand, Tulasi Geevar, Nitty S. Mathews et Annette Bowyer	77
PARTIE 9	Investigations en laboratoire d'autres facteurs de coagulation, Annette Bowyer.....	115
PARTIE 10	Plaquettes, Tulasi Geevar.....	123
PARTIE 11	Investigations en laboratoire sur le syndrome des anticorps a ntiphospholipides (SAPL), Silmara Montalvão	142
PARTIE 12	Investigations en laboratoire sur la fibrinolyse, Silmara Montalvão.....	147
PARTIE 13	Paramètres de coagulation dans les populations pédiatriques, Pierre Toulon.....	150
PARTIE 14	Analyse génétique moléculaire, Carlos De Brasi & Megan Sutherland	154
PARTIE 15	Résolution des problèmes liés aux tests de coagulation en laboratoire, Steve Kitchen	164

Contributions

Anastasia Khasiani, Clinisys Associates Ltd, Atlanta, Géorgie, États-Unis

Annette Bowyer, Coagulation Department, Sheffield Teaching Hospitals NHS Foundation Trust, Sheffield, Royaume-Uni

Carlos De Brasi, Instituto de Medicina Experimental (IMEX), CONICET-Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentine

Kieron Hickey, scientifique principal de la thrombose, Sheffield Haemophilia and Thrombosis Centre, Royaume-Uni

Megan Sutherland, North West Genomic Laboratory Hub, Manchester University NHS Foundation Trust, Manchester, Royaume-Uni

Nitty Mathews, Christian Medical College, Vellore, Inde

Pierre Toulon, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Université Nice-Côte d'Azur, France

Tulasi Geevar, Christian Medical College, Vellore, Inde

SUJETS ABORDÉS

- ✓ Contrôle des substances potentiellement dangereuses pour la santé
- ✓ Sécurité au laboratoire
- ✓ Responsables de sécurité
- ✓ Guide de sécurité
- ✓ Mesures de sécurité - Précautions universelles
- ✓ Équipement général de laboratoire
- ✓ Métrologie
- ✓ Évaluation et utilisation des coagulomètres

Contrôle des substances potentiellement dangereuses pour la santé : la norme EN ISO 15189 spécifie les exigences de qualité et de compétence applicables aux laboratoires de biologie médicale. Elle est destinée à être utilisée dans toutes les disciplines effectivement pratiquées par les laboratoires de biologie médicale. Son application est donc fondamentale pour les laboratoires car leurs services doivent satisfaire les besoins à la fois des patients et des cliniciens responsables des soins prodigues à ces patients. Les prestations des laboratoires incluent la prescription des examens, la préparation du patient et son identification, le prélèvement d'échantillons, le transport, la conservation, le prétraitement et l'analyse d'échantillons biologiques, suivis de l'interprétation des résultats, du compte rendu et du conseil, tout en assurant la sécurité du personnel et le respect de l'éthique.

Sécurité au laboratoire : les laboratoires dans lesquels on manipule des échantillons chimiques et biologiques sont des lieux potentiellement dangereux. Il a été constaté ces dernières années que le secteur accordait une importance de plus en plus grande aux pratiques de travail sûres, tant pour des raisons de santé qu'environnementales. Ainsi, grâce à cette sensibilisation, on insiste davantage sur des points comme la documentation en matière de sécurité, la formation du personnel et l'évaluation des risques. Les employeurs ont la responsabilité de fournir les vêtements et l'équipement de protection nécessaires et l'obligation de dispenser les formations en matière de pratiques de travail sûres. Si ces pratiques sont en place, la probabilité qu'un membre du personnel ou le public subisse des blessures graves devrait être grandement réduite.

Responsables de sécurité : il est important de nommer un ou plusieurs responsables de sécurité pour chaque service. Ces personnes sont responsables de mettre en place et de maintenir les pratiques de sécurité. La sécurité reste néanmoins la responsabilité de tous les membres du personnel dans le laboratoire.

Guide de sécurité : il convient de rédiger un guide de sécurité exhaustif qui traite de tous les aspects des pratiques de travail sûres pour l'entièreté du service. Tous les membres du personnel doivent lire ce guide et signer une déclaration pour indiquer qu'ils l'ont compris. Les responsables de sécurité doivent conserver des exemplaires du guide. Le guide doit aussi être à disposition, placé à des endroits facilement accessibles pour l'ensemble du personnel, soit sous forme imprimée, soit de préférence sous forme électronique, afin de systématiquement disposer de la version à jour.

Mesures de sécurité - Précautions universelles : selon le système de précautions universelles, tout danger d'infection d'une source quelle qu'elle soit sera évité ou minimisé grâce à de bonnes pratiques de travail. Tous les échantillons sanguins, les produits sanguins (y compris les kits et les réactifs à base de plasma) et les autres matières d'origine humaine doivent être considérés comme comportant un risque possible d'infection. Il faut toujours prendre les mesures de protection maximales, quelle que soit la

matière avec laquelle on travaille. Aucune autre classification du risque ne doit être faite. L'ensemble des matières et fluides corporels autres que le sang, qu'ils soient recueillis ou apportés dans l'unité à des fins d'analyse ou autre, doivent être manipulés avec autant de soin que le sang.

Le laboratoire : le laboratoire doit toujours être propre et bien rangé. Les documents doivent être séparés des zones d'analyse de laboratoire. Essayer de ne pas entreposer d'articles en vrac dans le laboratoire. Faire en sorte que tout le personnel participe au maintien de l'ordre dans le laboratoire.

Vêtements de protection : toute personne qui entre dans le laboratoire, y compris les visiteurs, doit porter une blouse. La blouse doit être immédiatement remplacée si elle est contaminée.

Gants jetables : beaucoup de personnes n'aiment pas se servir de gants, mais il est recommandé de porter des gants jetables en latex ou en polyacrylamide, car chaque échantillon manipulé en laboratoire est potentiellement dangereux. Lors de la manipulation de matières toxiques, il convient de systématiquement porter des gants. Les gants et les blouses n'offrent évidemment aucune protection contre les piqûres accidentelles avec des aiguilles, mais ils éviteront par exemple que du sérum ou du plasma positif pour le VIH entre en contact avec une coupure ou une éraflure sur la peau. Il est obligatoire de systématiquement remplacer les gants dès qu'ils sont déchirés ou troués.

Lavage des yeux : se laver immédiatement les yeux sous l'eau courante froide en cas de contact avec une matière potentiellement infectieuse, car de nombreuses infections peuvent être facilement contractées par contact avec les muqueuses des yeux.

Objets pointus et tranchants : les objets pointus et tranchants, comme les aiguilles et le verre brisé, présentent un danger important. Utiliser une boîte suffisamment solide pour ces objets. Il existe des cas de contraction d'une infection à la suite de blessures causées par une piqûre d'aiguille.

Aérosols : éviter toutes les pratiques à ciel ouvert du laboratoire qui peuvent provoquer des éclaboussures ou libérer des gouttelettes ou de la poussière en suspension dans l'air. Les manipulations qui produisent des aérosols doivent toujours être effectuées dans une hotte fermée adaptée ; des lunettes de sécurité doivent être portées. Tout liquide renversé doit être nettoyé sur-le-champ, en utilisant de l'eau de Javel ou un agent neutralisant si nécessaire.

Substances toxiques et inflammables : les substances toxiques et inflammables doivent toujours être maintenues dans une hotte ou une armoire sécurisée appropriée.

Équipement électrique : faire particulièrement attention avec tout appareil qui fonctionne avec des liquides, comme les cuves d'électrophorèse et les bains-marie. Confier systématiquement les travaux d'installation, d'entretien et de réparation à du personnel compétent.

Effets personnels et comportement : n'apporter jamais d'effets personnels (stylos, sacs, peignes, etc.) dans le laboratoire. Au laboratoire, éviter de se toucher le visage ou les muqueuses (yeux, nez et bouche) avec les mains. Si c'est inévitable, veiller à toujours se laver les mains au préalable. Se laver toujours soigneusement les mains avant de quitter le laboratoire. Ne jamais faire de pipetage à la bouche. La nourriture, les cigarettes et les produits cosmétiques ne doivent jamais entrer dans le laboratoire. Cela implique d'éviter de manger, boire et fumer dans le laboratoire.

Accidents : tous les accidents doivent être immédiatement signalés et consignés dans un registre des accidents tenu par le responsable de sécurité de l'unité. Ceci est particulièrement important en ce qui concerne les blessures par piqûre d'aiguille. Dans ces situations, suivre la procédure locale pour consigner et signaler l'accident, ainsi que toute action recommandée ou requise à l'échelle locale.

Contrôle des substances potentiellement dangereuses pour la santé : les laboratoires doivent se conformer à la réglementation locale, qui publie souvent des guides utiles pour identifier les risques et les

dangers, tels que le contrôle des substances dangereuses pour la santé (COSHH) dans les laboratoires britanniques.

Danger et risque : le danger inhérent à une substance est son potentiel à causer des dommages. Le risque d'une substance est la probabilité qu'elle provoque des dommages à quelqu'un dans des conditions réelles d'utilisation.

Détermination des dangers : la détermination des dangers est une condition préalable essentielle de l'évaluation des risques. Le temps nécessaire pour déterminer les dangers variera en fonction de la substance.

Évaluation des risques. Tenir compte des faits suivants :

- Dangers
- Conditions d'utilisation
- Quantités à utiliser
- Voies ou sites d'exposition probables (inhalation, ingestion, peau ou yeux)

Le résultat de l'évaluation des risques déterminera :

- Conditions de stockage
- Procédures de manutention
- Procédures d'élimination
- Exigences relatives au contrôle et à la surveillance médicale
- Procédures d'urgence

L'évaluation des risques doit être révisée annuellement et mise à jour s'il y a lieu. Est illustré au tableau 1 un exemple de la manière de consigner les informations pour les évaluations du risque, selon la procédure COSHH utilisée dans les laboratoires britanniques. L'objet de ce formulaire est de déterminer les dangers et les mesures de contrôle associées à l'équipement utilisé dans une procédure particulière. Seul le personnel attesté comme compétent peut effectuer une procédure et il ne peut l'effectuer qu'après avoir étudié la documentation sur la santé et la sécurité liée à cette analyse particulière.

Tableau 1. COSHH pour le temps de prothrombine et les tests de facteurs de coagulation basés sur le TCA

N° RÉF. ÉPREUVES COSHH 1		Dosages en un temps de réf. en laboratoire pour les facteurs II, V, VII, VIII, IX, X, XI et XII	
Titre de la procédure/l'expérience :			
Substance	Quantité approx.	Danger déterminé	
Tampon glyoxaline (imidazole), contient (voir**)	< 5 ml	Nocif en cas d'ingestion.	
**Imidazole	3,4 g/l	Corrosif : provoque des brûlures. Nocif en cas d'inhalation, d'ingestion ou d'absorption par la peau. Irritant pour les yeux.	
**Chlorure de sodium	5,85 g/l	Irritant pour les yeux et les poumons. Éviter tout contact avec la peau.	
Plasma déficient en facteurs	1 ml	Risque d'infection.	
Thromboplastine	2 ml	Risque faible.	
Réactif pour la détermination du TCA	2 ml	Risque faible.	
Chlorure de calcium 0,025 M	5 ml	Risque faible.	
Tampon d'Owren	<500 ml	Contient du barbital. Nocif en cas d'ingestion. Peut provoquer une sensibilisation par contact cutané ou par inhalation.	

Solution 1 de lavage de l'analyseur de coagulation	<50 ml	Provoque des brûlures : nocif pour les yeux, la peau, etc. Ne pas mélanger avec d'autres désinfectants. Corrosif. Le contact avec des matières combustibles peut provoquer un incendie. Le contact avec l'acide libère des gaz toxiques. Réagit violemment avec les sels d'ammonium ; solvant organique - risque d'explosion.
Solution 2 de lavage de l'analyseur de coagulation	<50 ml	Contient de l'acide chlorhydrique à 0,16 % et un détergent. Irritant : peut léser les yeux et la peau.
Plasma de référence/de contrôle/du patient	<1000 µl	Risque d'infection.

Équipement général de laboratoire : tout laboratoire impliqué dans le diagnostic et le suivi du traitement des troubles de la coagulation utilisant certaines ou toutes les techniques décrites dans le présent manuel nécessitera un minimum d'équipement de base.

Équipement général. Les exigences de base en matière d'équipement sont les suivantes :

- 1) Un réfrigérateur à 4 °C pour la conservation des réactifs. Les réactifs doivent normalement être conservés à une température comprise entre 2 et 8 °C, sauf indication contraire du fabricant. Un appareil ménager de bonne qualité peut convenir.
- 2) Un congélateur capable de maintenir une température d'au moins -20 °C (de préférence -35 °C). Une température plus basse, par exemple -70 °C, est utile pour une conservation plus longue, car les facteurs de coagulation sont stables à cette température pendant au moins six mois. Les congélateurs avec cycle de dégivrage automatique ne conviennent absolument pas.
- 3) Bain(s) d'eau régulé(s) capable(s) de maintenir des températures de $37 \pm 0,5$ °C. La température est normalement mieux maintenue dans un bainmarie que dans des thermoblocs à sec, qui peuvent ou non convenir, selon l'appareil.
- 4) Un pH-mètre.
- 5) Une source de lumière.
- 6) Un ou des chronomètres.
- 7) Pipettes automatiques calibrées capables de délivrer avec précision un volume d'échantillon et de réactif compris entre 0 et 200 µl et jusqu'à 1000 µl. Il est important de vérifier régulièrement l'exactitude de ces pipettes.
- 8) Une pipette étalonnée pour la distribution de volumes de liquide allant jusqu'à 5 ml.
- 9) Une centrifugeuse capable de tourner à au moins 1700 g, et de préférence entre 2200 et 2500 g. Pour la plupart des analyses de coagulation, la centrifugation à température ambiante (20-25 °C) est acceptable, même si la centrifugation à 4 °C est recommandée dans certaines techniques.
- 10) Une balance analytique étalonnée capable de mesurer avec exactitude les grammes jusqu'à la troisième décimale.

Un équipement supplémentaire est nécessaire pour certaines procédures, notamment :

- 11) Un analyseur de coagulation (coagulomètre).
- 12) Un lecteur de microplaques pour les tests ELISA (test d'immunoabsorption enzymatique).
- 13) Un agrégomètre plaquettaire. Équipement indiqué sur la fiche d'une méthode particulière.

La climatisation dans chaque pièce est un avantage indéniable dans les pays où les températures sont élevées.

Il devrait y avoir une quantité suffisante de matériel jetable. La réutilisation des tubes à essai et des embouts de pipette après nettoyage devrait être évitée, puisque des résidus peuvent compromettre les résultats,

occasionnant ainsi des pertes de réactifs et de temps. Il en va de même pour les tubes de prélèvement, qui sont conçus pour un usage unique et ne doivent pas être réutilisés même après un lavage intensif.

Métrologie : afin de faciliter le management de la qualité, l'étalonnage de la balance et du volume des pipettes doit être vérifié tous les trois à six mois. Cesser immédiatement d'utiliser les appareils mal étalonnés jusqu'à ce qu'ils soient réétalonnés. Chaque pipette doit avoir un identifiant unique.

Méthode pour la vérification de l'étalonnage des pipettes : les pipettes peuvent être à volume unique, à deux ou trois volumes ou pour une gamme continue de volumes.

- Les pipettes à un ou deux volumes fixes sont vérifiées à chacun des volumes.
- Les pipettes à trois volumes fixes sont vérifiées pour les volumes maximum et minimum.
- Pipettes ayant une gamme continue de réglages de volumes : vérifier le réglage maximum ainsi qu'un volume d'environ 25 % du réglage maximum, à savoir :
 - Pipette de 10 ml – 10 ml et 2,5 ml
 - Pipette de 5 ml – 5 ml et 1,25 ml
 - Pipette de 1 ml – 1 ml (1000 µl) et 0,25 ml (250 µl)
 - Pipette de 0,2 ml – 0,2 ml (200 µl) et 0,05 ml (50 µl)
 - Pipette de 0,1 ml – 0,1 ml (100 µl) et 0,025 ml (25 µl)
 - Pipette de 50 µl – 50 µl et 15 µl

Vérifier l'étalonnage en pesant cinq volumes répétés d'eau distillée (à température ambiante) sur une balance. Chaque mesure de poids est notée en grammes (plus trois décimales). Pour des raisons pratiques, 1,000 ml d'eau distillée pèse 1,000 g.

Les résultats et toute mesure prise doivent être consignés. Il serait préférable que les pipettes soient ajustées avec un écart bien inférieur à 10 % (voir les exemples cidessous). Lorsqu'une pipette s'avère inexacte (le volume pipeté moyen diffère du volume attendu de plus de 10 %), il faut immédiatement cesser de l'utiliser jusqu'à ce qu'elle soit réétalonnée, conformément aux instructions du fabricant.

Remarque : si l'inexactitude dépasse les limites suivantes (poids moyen), il faut immédiatement cesser d'utiliser la pipette.

Pipette de 10 ml

10 ml : 9,000 à 11,000 g
2,5 ml : 2,250 à 2,750 g

Pipette de 5 ml

5 ml : 4,500 à 5,500 g
1,25 ml : 1,125 à 1,375 g

Pipette de 1 ml

1 ml : 0,900 à 1,100 g
0,25 ml : 0,225 à 0,275 g

Pipette de 0,2 ml

0,2 ml : 0,180 à 0,220 g
0,05 ml : 0,045 à 0,055 g

Pipette de 0,1 ml

0,1 ml : 0,090 à 0,110 g
0,25 ml : 0,225 à 0,0275 g

Pipette de 50 µl

50 µl : 0,045 à 0,055 g
15 µl : 0,013 à 0,165 g

Pour plus d'informations, voir le document ISO 8655-2-2002, disponible en différentes langues.

Méthode pour la vérification des balances : pour s'assurer de leur exactitude, les poids étalonnés sont pesés tous les six mois et les résultats consignés.

- 1) Remettre la balance à zéro.
- 2) Peser les trois poids étalonnés, un par un. Noter les résultats à trois décimales près (p. ex. 1,003 g).

- 3) Tout poids dont la mesure est hors des limites indiquées (> 2 %) ne doit pas être utilisé tant que le problème n'est pas réglé.

Méthode pour la vérification de la température des armoires réfrigérées : la température interne des réfrigérateurs doit être maintenue à +4 °C (généralement entre +2 et +7 °C) à l'aide d'une sonde de température et doit idéalement être enregistrée en permanence, soit à l'aide d'un disque imprimé local, soit par voie électronique. Il en va de même pour les congélateurs, qui doivent se maintenir à des températures de -20 °C ou -35 °C, voire inférieures à -70 °C.

Évaluation et utilisation des coagulomètres : l'automatisation est désormais répandue dans les laboratoires d'analyse de la coagulation de la plupart des régions du monde. Elle a contribué à améliorer la standardisation et à faciliter les tests qui exigent une formation et des conditions de travail spécifiques, de sorte que les laboratoires peuvent améliorer leur efficacité et profiter d'un meilleur catalogue de prestations. L'automatisation dans le domaine de l'hémostase est relativement récente. Les méthodes manuelles reposant sur la détection visuelle du caillot de fibrine et faisant appel à des incubateurs à 37 °C étaient autrefois les seules techniques d'étude de la coagulation. Dans les années 1970, sont arrivés de nouveaux appareils semi-automatiques utilisant des principes photométriques ou mécaniques pour détecter la fibrine. Plus récemment, les laboratoires modernes font usage d'instruments entièrement automatisés. Aujourd'hui, de nouveaux appareils connectés aux systèmes d'information de laboratoire, incluant généralement des systèmes de traitement de données spécifiques, peuvent effectuer des tests de coagulation, chromogéniques et immunologiques.

Deux méthodologies, qui reposent sur des systèmes de détection mécaniques et optiques, sont principalement disponibles aujourd'hui. Les systèmes mécaniques ne permettent d'effectuer que des tests de coagulation, tandis que les systèmes optiques permettent de pratiquer des tests chronométriques, chromogéniques et immunologiques reposant sur des principes photo-optiques, néphélométriques, chromogéniques et immunologiques. En outre, il y a sur le marché de plus en plus d'analyseurs à base de fluorescence et de chimiluminescence, ce qui permet d'effectuer des dosages spécifiques avec une large gamme de mesures.

Principe mécanique : les méthodes électromagnétiques sont fondées sur la détection d'une augmentation de la viscosité du plasma lors de la formation de fibrine. Deux variantes de ce principe s'appliquent à l'équipement de laboratoire aujourd'hui.

La première utilise un champ électromagnétique appliqué aux cuvettes de test qui détecte le mouvement d'une sphère en acier inoxydable placée dans l'échantillon plasmatique. La sphère d'acier suit un mouvement de pendule, se balançant d'un côté à l'autre d'un mouvement continu dans un mélange de réactif et de plasma. Au fur et à mesure que la fibrine se forme, la viscosité augmente et le mouvement de la sphère est ralenti. Lorsque l'oscillation de la sphère atteint un niveau prédéterminé, le chronomètre s'arrête et indique le temps de coagulation du plasma.

Une deuxième méthode de détection mécanique utilise également une sphère en acier inoxydable, placée cette fois à un endroit précis. Un capteur magnétique détecte la position de la sphère et, alors que la cuvette tourne, la sphère maintient son inclinaison tant que l'échantillon liquide demeure fluide. Lorsque la fibrine est formée, le caillot s'empare de la sphère et la déplace de son emplacement initial. Lorsque la sphère sort de la portée du capteur, le circuit est interrompu et le chronomètre s'arrête.

Principes optique ou spectrophotométrique

Principe photo-optique : les systèmes optiques s'appuient sur le fait que la formation de caillot provoque un changement dans la densité optique du plasma. Lors de la formation du caillot, les caractéristiques optiques du plasma/des réactifs mesurées initialement se modifient. Ces modifications sont monitorées et utilisées pour déterminer le temps nécessaire pour qu'un certain degré de changement se produise.

Principe néphéломétrique : certains systèmes font appel à ce principe. Dans des tests de coagulation, une source de lumière laser monochromatique est transmise, par exemple, au moyen de fibres optiques. La lecture de la dispersion de la lumière est rendue possible par un capteur qui peut être installé à 90 ou 180 degrés du trajet de la lumière, selon le système employé, qui mesure par la suite la lumière diffusée à un certain angle ou qui enregistre les changements de la transmission de la lumière. Lorsque la lumière atteint des complexes insolubles comme les fibres de fibrine, elle se disperse à des angles de diffusion frontale (180 degrés) et latérale (90 degrés). Le chronomètre s'arrête lorsque la quantité de lumière diffusée ou transmise atteint un certain niveau prédéterminé. La différence entre la lumière diffusée ou transmise avant et après la formation du caillot est habituellement proportionnelle à la quantité de fibrine formée.

Principe chromogénique : ce principe se fonde sur l'usage d'une substance générant une couleur spécifique, appelée « chromophore », dont la paranitroaniline (pNA) est la plus courante. Elle a une absorbance maximale à 405 nm. Le principe du test chromogénique est fondé sur la liaison de la pNA aux substrats synthétiques. La pNA est fixée à une suite d'acides aminés qui imitent la séquence cible du facteur de coagulation activé que nous voulons déterminer. La protéine de coagulation clive le substrat chromogénique à un endroit précis dans une séquence définie d'acides aminés et libère la pNA. L'intensité de la couleur jaune est proportionnelle à la quantité de pNA libérée. Celleci est mesurée par photodétection à une longueur d'onde de 405 nm. Plus le clivage et la libération de pNA sont importants, plus la capacité d'absorbance de l'échantillon augmente, ce qui entraîne des changements plus importants dans la densité optique de la solution. Les premiers appareils de coagulation ne pouvaient fournir qu'un seul paramètre de définition, tel un paramètre mécanique ou photo-optique. Les outils photo-optiques étaient à l'origine conçus pour faire la lecture d'une seule longueur d'onde (p. ex. 500 ou 600 nm), qui pouvait servir uniquement à la détection de la formation du caillot. Plus récemment, certains coagulomètres peuvent faire la lecture à deux ou plusieurs longueurs d'onde, incluant souvent 405 nm, ce qui augmente la possibilité de réactions plus modernes (méthodes utilisant des substrats chromogéniques). Dans les années 1990, un certain nombre de fabricants ont intégré les méthodes de détection multiples ; ainsi, un même laboratoire peut désormais appliquer des méthodologies multiples avec le même équipement.

Principe immunologique : des microparticules de latex enrobées d'un anticorps spécifique contre l'analyte (l'antigène) à mesurer sont habituellement utilisées. Un faisceau de lumière monochromatique traverse une suspension de microparticules de latex. Lorsque la longueur d'onde est supérieure au diamètre des particules en suspension, les particules absorbent une petite quantité de lumière. Cependant, lorsque les microparticules de latex enrobées d'anticorps spécifique entrent en contact avec l'antigène présent dans la solution, elles adhèrent à l'anticorps en créant des liens entre les particules, ce qui produit leur agglutination. Lorsque le diamètre des particules agglutinées s'approche de la longueur d'onde du faisceau de lumière monochromatique, une plus grande quantité de lumière est absorbée. Cette augmentation de l'absorption de la lumière est proportionnelle à l'agglutination, qui, à son tour, est proportionnelle à la quantité d'antigène présent dans l'échantillon. Ce type de technologie est présent dans les analyseurs de coagulation plus sophistiqués introduits sur le marché dans les années 1990. Des tests immunologiques classiques, qui exigent habituellement beaucoup de temps, peuvent être effectués en quelques minutes lorsque l'un de ces outils automatisés est employé.

Tableau 2. Avantages et inconvénients des méthodes de détection dans la définition de paramètres

Méthode	Avantages	Inconvénients
Mechanical	Aucune interférence de caractéristiques physiques comme la lipémie ou l'ictère Possibilité d'utiliser de petits volumes d'échantillon	Impossibilité d'observer graphiquement la formation d'un caillot Peut poser des problèmes sur le plan de la détection du point final dans certains échantillons contenant un taux de fibrinogène bas
Photo-optique	Possibilité de voir graphiquement la formation de caillots Vérifications optiques pour hémolyse/lipémie/ictère dans certains systèmes optiques Possibilité d'utiliser de petits volumes d'échantillon	Interférences dues à la lipémie, à l'hémolyse, à l'hyperbilirubinémie ou à l'augmentation de protéines dans certains systèmes Sur certains systèmes, difficulté à détecter les caillots lors de l'emploi de réactifs complètement transparents Des temps de coagulation très courts peuvent ne pas être détectés en raison du temps de latence précédent le début du monitorage
Néphéломétrique	Peut mesurer les réactions antigène-anticorps de protéines présentes en très petites quantités	Limite le nombre de tests disponibles Coût des réactifs
Chromogénique	Les tests totalement spécifiques pourraient être plus faciles Possibilité de paramètres additionnels qui ne peuvent pas être mesurés par la détection d'un caillot Augmente le répertoire des tests possibles Améliorations possibles de la fidélité de mesure comparativement aux analyses à base de formation du caillot	Limité par la longueur d'onde de l'instrument Nécessite de grands volumes à tester pour un rapport coût-bénéfice positif Coût de l'instrument et des réactifs
Immunologique	Permet l'automatisation de méthodes manuelles chronophages Augmente le nombre de tests possibles	Nombre limité de tests disponibles Coût des instruments Coût des réactifs

Avantages de l'automatisation dans le laboratoire d'analyse de la coagulation :

- 1) Améliore la capacité et la flexibilité du temps passé par les professionnels (Rodak, 1995).
- 2) Améliore la reproductibilité des tests. Par le passé, les tests de coagulation réalisés manuellement étaient inexacts et les coefficients de variation étaient supérieurs à 20 % ; les appareils semi-automatiques ont apporté une plus grande exactitude. Toutefois, en raison du pipetage manuel des échantillons et des réactifs, les tests doivent être faits en double. L'équipement entièrement automatisé améliore l'exactitude, qui atteint des coefficients de variation inférieurs à 5 %, voire 1 % pour certains tests. Ainsi, certains auteurs ont introduit la notion de tests réalisés une seule fois et la possibilité de réduire de moitié les coûts des réactifs et des cuvettes.
- 3) Réduit le coût des échantillons et des réactifs, par l'utilisation de volumes plus faibles de plasma et de réactifs (au moins la moitié).
- 4) Facilite le stockage et la recherche de données au moyen de logiciels informatiques.
- 5) Permet de tester à nouveau les résultats automatiquement lorsque des erreurs sont commises lors de la première analyse.
- 6) Offre la possibilité d'exécuter différents tests sur un même échantillon.

- 7) Permet l'échantillonnage à partir d'un tube fermé, ce qui augmente la sécurité et l'efficacité des tests de coagulation. Cela réduit dans une large mesure le risque d'exposition de l'opérateur à des aérosols ou des éclaboussures de l'échantillon du patient, ou d'erreur d'étiquetage. À titre anecdotique, un fabricant propose un système breveté de dépistage qui sépare automatiquement le plasma des érythrocytes avant d'effectuer les tests sans centrifugation préalable.
- 8) Permet de diluer les échantillons, les étalons et les contrôles. L'équipement peut être programmé pour des dilutions additionnelles si le résultat initial échappe à la linéarité de la méthode. Il peut aussi effectuer automatiquement d'autres tests sans intervention de l'opérateur s'il est cliniquement justifié de procéder ainsi, ou en raison des résultats obtenus au premier essai.
- 9) La plupart des analyseurs comportent des systèmes d'alarme qui avertissent l'opérateur de dépassements de critères préétablis, susceptibles d'indiquer des problèmes au niveau de l'équipement (p. ex. quantité de réactif trop faible, défaillance sur le plan de la température, volume d'échantillon trop petit et erreurs dans le contrôle qualité), ainsi que d'erreurs pré-analytiques (tubes sous-remplis, hémolyse, ictere, lipémie et présence de caillots).

Les types de méthodologies disponibles comportent des avantages et des inconvénients qui doivent être connus et compris afin de garantir la fidélité et la validité des résultats des tests. Il est important de tenir compte du fait que les laboratoires ont la responsabilité de produire des résultats fiables. La préoccupation principale d'un laboratoire est de choisir l'équipement de coagulation qui fournit des résultats appropriés malgré les restrictions budgétaires. De tels instruments exigent un entretien technique régulier, la mise à jour des connaissances et des contrôles du système, puisqu'une erreur ou une défaillance peut influencer de façon décisive un certain nombre de facteurs. Les systèmes de contrôle qui garantissent la fiabilité analytique sont par conséquent obligatoires.

Certains laboratoires ont la chance de pouvoir évaluer l'équipement avant d'en faire l'achat. Si cela n'est pas possible, il est très important d'obtenir des renseignements adéquats et des conseils d'un laboratoire de référence, en plus de passer la littérature en revue.

Lors de l'évaluation précédant l'achat d'un nouvel équipement, comparer d'abord les analyseurs en fonction de critères tels que :

- Coût de l'équipement et de l'entretien
- Période d'inactivité et fiabilité
- Délai de réponse aux demandes de réparation
- Facilité d'utilisation
- Disponibilité de services d'entretien adéquats dans un délai approprié
- Processus de validation et temps de traitement
- Coût des consommables
- Flexibilité en ce qui concerne l'usage de réactifs d'autres fabricants
- Possibilité d'ajouter de nouveaux protocoles de tests
- Possibilité et coût de connexion avec le système d'information du laboratoire
- Sessions de formation et promotion de la formation continue

La sensibilité de différents types d'équipement à divers paramètres variera en fonction de la façon dont les machines sont étalonnées et de la manière dont le point final de la réaction est détecté. Les laboratoires ont des besoins différents et il est conseillé d'établir l'ordre des priorités. Pour un exemple, voir le tableau 3.

Tableau 3. Caractéristiques des équipements spécialisés (d'après Rodak, 1995)

Caractéristiques	Description
Accès aléatoire	Avec l'échantillon du patient, une gamme de tests différents peut être effectuée en même temps, dans n'importe quel ordre.
Tube d'échantillon primaire	L'échantillon de plasma est directement prélevé par aspiration dans le tube de prélèvement ouvert placé dans l'analyseur.
Système de pénétration d'un tube de prélèvement fermé	L'analyseur aspire l'échantillon de plasma dans le tube de prélèvement avec le bouchon de caoutchouc en place.
Code-barres	Permet l'identification de réactifs, d'échantillons de patients ou des deux au moyen d'un code-barres. Ceci réduit la saisie de données manuelle.
Interphase bidirectionnelle	L'analyseur interroge un ordinateur central afin de déterminer le nombre de tests demandé. L'opérateur n'a pas besoin de programmer manuellement cette information dans l'appareil.
Indicateur d'échantillon	Avertit l'opérateur de problèmes quant à l'intégrité de l'échantillon.
Capteur de niveau des liquides	Avertit l'opérateur en cas de volume insuffisant de l'échantillon ou du réactif pour effectuer une analyse adéquate, ou si l'équipement n'a pas aspiré suffisamment de liquide de l'échantillon pour effectuer le test demandé.
Programmes intégrés de contrôle qualité	Le logiciel de l'instrument mémorise et organise les données du contrôle qualité. Il peut inclure l'application complète des règles de Westgaard pour indiquer les résultats hors limites.
Possibilité d'introduire des échantillons STAT	Permet à l'opérateur de mettre fin à la séquence des tests pour mettre un nouvel échantillon urgent (STAT) dans l'analyseur.
Capacité de réfrigération des échantillons chargés	Préserve l'intégrité des échantillons ou des réactifs ou des deux lors du processus de vérification.
Capacité de conservation des échantillons chargés	Indique la quantité de l'échantillon du patient qui peut être chargé à tout moment dans l'analyseur.
Capacité de test réflexe	Rend possible la programmation de l'équipement pour qu'il répète ou ajoute des essais selon des paramètres particuliers définis par l'opérateur.
Mémorisation des données du patient	Capacité de l'analyseur à stocker les résultats des tests qui peuvent être rappelés à tout moment. Peut stocker des courbes de formation de caillots.
Contrôle du volume de réactif	Avertit l'opérateur de l'insuffisance de réactif pour les tests programmés.
Traitement	Nombre de tests pouvant être traités au cours d'une période donnée (généralement classé en nombre de tests par heure).
Courbe de formation de caillots	Permet à l'opérateur de visualiser la formation d'un caillot dans la cuvette. Aide à détecter certaines conditions anormales ou des états morbides, ou l'origine des résultats anormaux d'un test raté ainsi que leur résolution.
Vérifications pré-analytiques	Détection de tubes sous-remplis, d'une hémolyse, d'un ictere, d'une lipémie ou d'un caillot.

La technologie est en plein essor et les demandes quotidiennes croissantes créent le besoin d'avoir des instruments de ce type dans un laboratoire. Ceux-ci représenteront un grand pas en avant dans le domaine de la biologie, étant donné la possibilité d'effectuer des tests de manière fiable, exacte et fidèle et d'obtenir des résultats dans un délai plus rapide et de meilleures conditions de contrôle. Les avantages de l'automatisation sont nombreux. La technologie progresse constamment pour se conformer aux nouveautés dans ce domaine et pour réduire les délais de traitement, ce qui permet aux tests d'être fiables, exacts et fidèles, tout en maintenant le degré de qualité.

Réactifs : en plus des réactifs spécifiques destinés à des dosages spécifiques, qui seront détaillés dans les parties correspondantes, certains réactifs sont largement utilisés dans le laboratoire d'hémostase (solution de chlorure de calcium, divers tampons, etc.). Ils peuvent être achetés auprès de fabricants de réactifs ou préparés en local à partir de réactifs en vrac ou de solutions concentrées.

Solution de chlorure de calcium 25 mM : par exemple, si une solution molaire est achetée, pour obtenir une solution 25 mM, diluer 25 ml de solution à 1 M à un litre dans une fiole jaugée avec de l'eau distillée.

Tampons :

- Tampon barbiturique d'Owren pH 7,35

Peser 5,875 g de diéthylbarbiturate de sodium (barbitone sodium) et 7,335 g de chlorure de sodium.

Placer dans une fiole jaugée et dissoudre dans approximativement 780 ml d'eau distillée.

Ajouter 215 ml d'acide chlorhydrique 0,1 M.

Ajuster le volume à un litre avec de l'eau distillée.

Vérifier le pH et ajuster à 7,35, au besoin.

- Solution saline tamponnée d'Owren

200 ml de tampon barbiturique d'Owren (voir ci-dessus).

Ajouter 800 ml de solution saline normale (chlorure de sodium 0,9 %).

- Tampon glyoxaline (imidazole)

Peser 2,72 g de glyoxaline (imidazole) et 4,68 g de chlorure de sodium.

Placer dans une fiole jaugée et dissoudre dans approximativement 650 ml d'eau distillée.

Ajouter 148,8 ml d'HCl 0,1 M et ajuster le pH à 7,3.

Ajuster le volume à un litre avec de l'eau distillée, au besoin.

Réactifs pour les tests de dépistage de la coagulation : dans les premiers stades de l'investigation et du diagnostic des troubles de la coagulation, le choix et l'application de réactifs appropriés pour les tests de dépistage, surtout pour le temps de prothrombine (TP) et le temps de céphaline activée (TCA), sont d'une grande importance. Sont commercialisés dans le monde beaucoup de réactifs différents. Lorsqu'un large éventail est proposé, le choix effectué doit tenir compte des variations sur le plan de la sensibilité. Dans le dépistage des troubles de la coagulation par le TP et le TCA, les sources de renseignements suivantes, qui ont trait à la performance probable d'un réactif donné, peuvent être considérées :

- Données comparatives par rapport à d'autres réactifs provenant de programmes d'évaluation externe de la qualité (EEQ), comme le programme international d'EEQ
- Données publiées
- Tests locaux du plasma de patients ayant des anomalies connues
- Fiches techniques des fabricants

La production locale de réactifs de TP et de TCA peut sembler intéressante sur le plan financier, mais peut être source de problèmes de standardisation et doit donc être évitée. À noter que certains fabricants proposent plusieurs réactifs. De plus, la composition des réactifs portant le même nom peut être modifiée de temps à autre. Cela signifie qu'il est impossible de recommander une source en particulier.

Références

- Graves S, Holman B, Rossetti M, Estey C, Felder R. Robotic automation of coagulation analysis. *Clinica Chimica Acta* 1998; 278: 269-279.
- Kitchen S, Olson JD, Preston FE (eds). Quality in laboratory hemostasis and thrombosis 2nd ed. Oxford, UK: Wiley Blackwell, 2013.
- Lippi G, Plebani M, Favaloro EJ. Technological advances in the hemostasis laboratory. *Semin Thromb Hemost* 2014; 40: 178-185.
- Qari MH. High throughput coagulation analyzers review. *Comb Chem High Throughput Screen* 2005; 8: 353-360.
- Rodak BF (ed). Diagnostic hematology. Philadelphia: WB Saunders, 1995.
- Sasaki M, Kageoka T, Ogura K, Kataoka H, Ueta T, Sugihara S. Total laboratory automation in Japan: Past, present and the future. *Clinica Chimica Acta* 1998; 278: 217-227.
- Walenga JM, Fareed J. Automation and quality control in the coagulation laboratory. *Clin Lab Med* 1994; 14: 709-728.
- Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Colesse G, Gourmelin Y. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001; 12: 229-236.

Validation du bilan d'hémostase, intervalles de référence et performances

Silmara Montalvão

SUJETS ABORDÉS

- ✓ Méthode de préparation du plasma normal poolé
- ✓ Comment valider l'équipement et les tests de coagulation
- ✓ Échantillons pour les processus de validation de l'équipement/des réactifs
- ✓ Validation ou vérification
- ✓ Fidélité et exactitude
- ✓ Établissement d'un intervalle de référence
- ✓ Validation versus vérification de l'intervalle de référence
- ✓ Analyse statistique de l'intervalle de référence
- ✓ Contrôle interne de qualité et évaluation externe de la qualité

Le plasma normal poolé (PNP) est un composant essentiel pour le laboratoire d'hémostase, car il est utilisé dans différents protocoles de test, de l'évaluation d'un TCA allongé à l'évaluation d'inhibiteurs spécifiques et non spécifiques. Il peut également être utilisé comme matériel de référence pour l'étalonnage et comme solution de contrôle normale si des conditions idéales sont observées à cette fin. Suit un protocole pour la préparation de PNP.

Tableau 4. Exigences pour la préparation de PNP

Personnes donneuses	Au moins 20 personnes saines qui ne prennent aucun médicament interférant avec les facteurs et la réaction de coagulation. Les femmes prenant des contraceptifs oraux sont admis-sibles. Un nombre approximativement égal d'hommes et de femmes est souhaitable. La tranche d'âge court de 20 à 50 ans.
Anticoagulant	Citrate dihydraté trisodique 0,109 M (3,2 %) tamponné avec de la N-2-hydroxyéthylpipérazine. Acide N-2-éthanesulfonique (HEPES) à 5 g pour 100 ml de citrate trisodique.
Collecte	Le sang est prélevé entre 9 h et 11 h au moyen de seringues jetables en plastique de 60 ml et d'aiguilles de ponction veineuse de calibre 21.

Méthode de préparation du PNP :

- ✓ Prélever 54 ml de sang et le mélanger avec 6 ml d'anticoagulant dans des récipients en plastique.
- ✓ Conserver l'échantillon sur de la glace fondante pendant la préparation du pool.
- ✓ Centrifuger à 4 °C pendant 15 minutes à 2500 g.
- ✓ Pooler le plasma dans un récipient sans contact en plastique.
- ✓ Aliquoter en portions de 0,5 ml dans des tubes en plastique de 1,5 ml.
- ✓ Congeler rapidement sur de la glace carbonique si disponible. Sinon, placer immédiatement sur une étagère ouverte à -70 °C.
- ✓ Effectuer la procédure décrite ci-dessus dans un délai de quatre heures.
- ✓ Stable à -70 °C pendant plus de six mois.

Un plasma normal poolé préparé de cette façon aura des taux situés autour de 1 U/ml ou de 100 U/dl pour les facteurs II, V, VII, IX, X, XI et XII, le kininogène de haut poids moléculaire (KHPM) et la prékallicréine (PKK), bien que les taux de facteur VIII et de facteur Willebrand (FW) varient grandement d'un PNP à l'autre. Ce PNP local doit être étalonné en unités internationales (UI), puisque des normes internationales existent désormais pour les facteurs de coagulation susmentionnés, à l'exception du facteur XII. Le pool

peut être utilisé non étalonné avec une puissance présumée de 100 U/dl ou de 1 U/ml pour le facteur XII. Pour l'étalonnage en UI, il est nécessaire soit d'obtenir des préparations de référence étalonnées de l'Organisation mondiale de la santé (conservées au *National Institute for Biological Standards and Control*, à South Mimms, Potters Bar, Herts, au RoyaumeUni), soit d'acheter un plasma de référence commercial approprié qui a été étalonné en UI par le fabricant. Il faut tenir compte du fait qu'un pool doit être remplacé tous les 12 à 18 mois, sauf si les résultats obtenus lors des contrôles internes de qualité démontrent qu'il a conservé sa stabilité.

Méthode d'étalonnage du PNP local :

- ✓ Obtenir un étalon de référence, p. ex. étalon de référence international de l'OMS (minimum deux flacons).
- ✓ Deux jours différents, utiliser un flacon de l'étalon de référence international et quatre aliquotes du PNP local.
- ✓ Le premier jour, doser dans l'ordre : étalon de référence international, pool local, pool local, pool local, pool local, étalon de référence international, et répéter cette série en utilisant des dilutions fraîchement préparées de chacun de ces plasmas.
- ✓ Le deuxième jour, doser dans l'ordre : pool local, pool local, étalon de référence international, étalon de référence international, pool local, pool local, pool local et répéter cette série en utilisant des dilutions fraîchement préparées de chacun de ces plasmas.

Calculer la teneur de chaque aliquote de l'étalon local en la comparant à la moyenne des résultats obtenus avec les deux étalons de référence internationaux.

- ✓ La valeur moyenne des résultats des 4 aliquotes \times 2 dilutions \times 2 jours ($n = 16$) est considérée comme étant celle de l'étalon local.

Comment valider l'équipement et les tests de coagulation : avant d'utiliser une nouvelle méthode, il est essentiel qu'elle soit évaluée pour déterminer si elle convient à l'usage prévu. Cette partie fournit des recommandations générales sur la façon de planifier et de mettre en œuvre les processus nécessaires à la sélection et à l'évaluation des analyseurs d'hémostase et des systèmes de test. Ces recommandations ne visent pas à remplacer les réglementations ou les normes, mais plutôt à fournir des orientations sur les étapes nécessaires pour respecter les bonnes pratiques de laboratoire.

L'étendue de l'évaluation d'un système de test dépendra de plusieurs facteurs, notamment : a) l'utilisation prévue du système de test, b) si le système de test a été approuvé pour un usage clinique par un organisme régional ou par la législation, c) les ressources disponibles du laboratoire. Lors du choix d'un système de test, des recherches doivent être effectuées pour déterminer quels analyseurs d'hémostase sont disponibles. Une liste d'exigences doit être établie pour identifier le meilleur système pour son laboratoire, détaillant les caractéristiques physiques du laboratoire ainsi que les performances requises de l'équipement. La planification de la validation, étape importante, est liée aux résultats obtenus, car une bonne planification peut générer une validation techniquement adéquate. Il est donc important d'établir un calendrier réaliste pour l'évaluation, en fonction des ressources disponibles et de la portée de l'évaluation. Il convient de définir les détails du processus d'évaluation (par étapes), qui doit être examiné et approuvé par le responsable du secteur. Le plan de validation doit détailler le paramètre d'évaluation (l'imprécision par exemple), le ou les tests à effectuer et le résultat souhaité (les limites statistiques par exemple). Comme certains systèmes de test peuvent nécessiter des échantillons inhabituels ou pour ceux couvrant une large gamme de valeurs, il peut être conseillé de commencer à prélever et à congeler des échantillons des semaines, voire des mois à l'avance. Les quantités de consommables (y compris les réactifs) nécessaires à l'évaluation du système de test doivent être estimées avec une marge de manœuvre pour les plans d'urgence, au cas où des travaux supplémentaires seraient nécessaires. Le laboratoire doit documenter chaque étape du processus d'évaluation, y compris la maintenance préventive des instruments, les évaluations de la température et les données générées lors des étapes de validation ou de

vérification. Le responsable du laboratoire doit analyser les données et consigner le résultat de l'analyse. Il est conseillé d'avoir un registre électronique prévu et nommé à cet effet pour la validation et l'évaluation du système. Quoi qu'il en soit, toute forme d'évaluation du système de test doit être à disposition s'il est nécessaire de vérifier l'adéquation du laboratoire.

Échantillons pour les processus de validation des équipements/réactifs : le traitement des échantillons utilisé dans le processus de validation doit être le même que pour les échantillons à tester du patient. Pour le TP, des études montrent que la stabilité du plasma traité est de 24 heures lorsqu'il est conservé à température ambiante, cependant, plus il est traité rapidement, meilleure est l'assurance qualité. Les échantillons de plasma pour d'autres tests doivent être traités dans les quatre heures suivant le prélèvement. Si les échantillons ne peuvent pas être analysés dans des limites de stabilité acceptables, des échantillons de plasma pauvre en plaquettes (PPP) doivent être produits, aliquotés et conservés à -70 °C (Favaloro et al., 2008). Avant l'analyse, les échantillons congelés doivent être décongelés à 37 °C (trois à cinq minutes pour les aliquotes jusqu'à 1 ml) et mélangés immédiatement avant le test (Kitchen et al., 2021).

Validation ou vérification : de manière générale, la validation est un processus qui doit être effectué sur des systèmes de test entièrement nouveaux ou un test développé au laboratoire. La vérification, en revanche, est un processus qui peut être appliquée à des systèmes déjà validés récemment introduits sur le marché du diagnostic. La vérification peut également être appliquée à l'évaluation après le déplacement de l'équipement. Si un système de test a été autorisé par l'autorité de réglementation régionale, seul le processus de vérification du système peut être effectué en local. Dans ce cas, la vérification peut être définie comme une preuve objective qu'un système de test donné répond localement aux spécifications définies par le fabricant. L'écart par rapport au mode d'emploi du fabricant pour un système de test nécessitera un suivi pour la validation du système (Castellone, 2017).

Fidélité et exactitude : après l'installation de l'équipement, il est important d'évaluer dans quelle mesure les résultats de test d'un même cycle ne sont pas fidèles. Cette pratique est utile pour identifier les valeurs aberrantes et la variabilité du système. Le nombre de tests requis pour une évaluation dépendra du fait que le ou les systèmes nécessitent une validation ou une vérification (Gardiner et al., 2021a). Pour les études d'exactitude, les échantillons analysés dépendront du type d'échantillons de patients qu'il est prévu d'analyser en laboratoire. L'exactitude est une évaluation importante, définie comme la concordance entre une valeur mesurée et une valeur vraie. Elle est généralement établie en comparant de nouveaux instruments ou systèmes de réactifs à une méthode existante ou prédéterminée (Eusebi, 2013). La comparaison entre les systèmes doit être effectuée à l'aide d'une analyse statistique. La comparabilité entre les systèmes peut être analysée à l'aide d'une régression linéaire (normale, pondérée, de Deming ou de Passing-Bablok, selon le cas), de graphiques de tendance Bland-Altman et de tests t appariés (ou tests U de Mann-Whitney si les données ne sont pas normalement distribuées) (Jensen et Kjelgaard-Hansen, 2006). Les critères d'acceptabilité seront spécifiques au test. Pour le test de TCA par exemple, deux systèmes distincts utilisant des réactifs différents pourraient générer des résultats présentant des différences cliniquement significatives (Montalvão et al., 2020). Les évaluations de la sensibilité, de la spécificité et de la valeur prédictive négative et positive du test sont également des informations pertinentes et fondamentales pour certaines analyses. Les dosages calibrés pour lesquels il existe une norme internationale (par exemple le facteur VIII) et une méthodologie standardisée devraient produire une droite de régression avec une pente proche de 0,90-1,10, avec une forte corrélation ($r > 0,95$) et aucun biais cliniquement significatif (Gardiner et al., 2021b). Le nombre exact d'échantillons pour l'évaluation statistique du processus de vérification/validation dépendra des critères d'acceptabilité pour chaque test. La participation à un programme d'EEQ peut être utile pour établir l'exactitude du système avant une utilisation de routine chez les patients (Montalvão et al., 2022).

Établissement d'un intervalle de référence : l'établissement d'un intervalle de référence normal est l'une des tâches les plus importantes effectuées en laboratoire, car la plupart des décisions médicales sont prises sur la base des résultats biologiques. Les tests de coagulation présentent un ensemble de problématiques unique. Les réactifs utilisés en routine peuvent avoir différentes sensibilités à la coagulation

en fonction de la concentration et du type de phospholipides et d'activateurs. Un exemple classique est celui des réactifs destinés au test de TCA ; ils font appel à des particules (p. ex. kaolin, cérite, silice) ou à des produits chimiques (p. ex. acide ellagique) qui affectent directement la sensibilité et la spécificité. Dans ce contexte, les différentes particules, ainsi que la classe des phospholipides et la composition des acides gras, ne sont pas standardisées. Les réactifs de fournisseurs différents peuvent ainsi avoir des compositions différentes. L'ensemble des propriétés des réactifs doivent être prises en compte lors de l'établissement d'un intervalle de référence normal. Il est donc essentiel que le laboratoire détermine en local la plage de référence normale afin que l'ensemble des réactifs, des équipements et des procédures puissent être pris en compte lors de l'évaluation du patient. La santé n'est pas un état bien défini et est souvent un terme relatif. Dans certains cas, le groupe idéal pourrait être étroitement lié à la population étudiée concernant l'âge et le sexe. Cette sélection minutieuse n'est toutefois pas essentielle pour de nombreux tests de coagulation. Dans la réalité, la sélection de sujets sains normaux pour l'établissement d'une plage normale sera influencée par des considérations pratiques. On peut faire appel à des membres du personnel hospitalier qui ne prennent aucun traitement médicamenteux et à des personnes donneuses de sang. Sont repris ci-après les aspects importants dont il faut tenir compte pour les plages normales. L'état de santé des sujets normaux lors du prélèvement sanguin peut influer sur les résultats obtenus. Il s'agit notamment de passer en revue les éléments probants concernant les effets du stress physique (p. ex. persistance jusqu'à 10 heures d'un FVIII/FW multiplié par 2,5), du stress mental (p. ex. augmentation du FVIII et du FW après un stress mental aigu), des effets hormonaux, des variations circadiennes et des effets de la posture et de l'alimentation. Des recommandations générales, qui ne se limitaient pas à l'investigation de patientes, ont été formulées. Il s'agissait des éléments suivants :

- ✓ S'abstenir de tout exercice physique intense dans les 24 heures précédent la ponction veineuse.
- ✓ Prévoir un environnement où le stress physique et mental est réduit.
- ✓ S'abstenir de consommer des aliments gras et de fumer le matin de la ponction veineuse.
- ✓ Prélever des échantillons tôt le matin (entre 7 h 00 et 9 h 00), après que la personne est restée assise, en position détendue, pendant 20 à 30 minutes.

Validation versus vérification de l'intervalle de référence : les résultats de l'intervalle de référence font l'objet d'une évaluation statistique, dont le type repose sur le nombre d'individus auquel il a été fait appel. Le processus peut inclure une validation ou une vérification complète lorsque l'intervalle de référence est préalablement établi. La validation nécessite un minimum de 120 personnes, tandis que la vérification n'en nécessite que 20 pour démontrer qu'un test fonctionne comme précédemment établi. L'intervalle de référence doit être vérifié avec tout changement de réactif, de numéro de lot et d'instrument ou de dispositif de prélèvement. La moyenne et l'écart type peuvent être calculés (Gardiner et al., 2021a).

Analyse statistique de l'intervalle de référence : l'écart type (ET) est la dispersion des données autour de la moyenne. Plus les données sont dispersées, plus l'écart est important. L'intervalle de confiance mesure le niveau d'incertitude. Si le niveau de confiance à 95 % est choisi, les intervalles seront estimés aux 2,5^e et 97,5^e centiles de la distribution des résultats. Cela est la garantie que l'intervalle de confiance des valeurs contient la vraie moyenne de 95 % de la population. Des niveaux de confiance plus élevés auront des intervalles de référence plus larges, tandis que des intervalles de confiance plus faibles sont plus étroits (Henny et al., 2016).

Différentes méthodes statistiques peuvent être utilisées pour évaluer les données :

- 1) Méthode paramétrique : utilisée lorsque la répartition de la population est normale ou gaussienne.
- 2) Méthode non paramétrique : ne nécessite pas de lois de probabilité en raison d'une sélection minutieuse des sujets et d'un nombre suffisant (≥ 120) d'individus testés.

3) Méthode robuste : à utiliser sur un nombre limité d'individus sans que la distribution soit nécessairement gaussienne. Mesure la position (emplacement) et la dispersion (propagation) au lieu de la moyenne et de l'écart type.

Les compteurs de position trient les données en parts égales par ordre croissant, tandis que la dispersion analyse la distance des valeurs de la distribution par rapport au centre. Pour les valeurs aberrantes, il est possible de visuellement inspecter et évaluer les données selon une méthode proposée par Dixon (Henny et al., 2016). Pour un échantillon de 20 sujets (vérification de l'intervalle de référence), deux valeurs aberrantes sont autorisées. S'il y a plus de deux valeurs aberrantes, 20 échantillons supplémentaires doivent être analysés. S'il y a à nouveau deux valeurs aberrantes, d'autres sources d'erreur (réactifs, problèmes d'analyseur, variation biologique, etc.) doivent être étudiées (Henny et al., 2016). Il peut être nécessaire d'effectuer un intervalle de référence complet.

Contrôle interne de qualité et évaluation externe de la qualité : l'assurance qualité (AQ) est un terme général qui peut servir à décrire l'ensemble des mesures prises pour assurer la fiabilité des analyses et des rapports de laboratoire. Elle comprend le choix du test, le prélèvement d'un échantillon conforme auprès du patient, l'analyse du spécimen et la saisie correcte des résultats dans les délais, l'interprétation des résultats le cas échéant et la communication de ceuxci aux cliniciens demandeurs. Le contrôle interne de qualité (CIQ) et l'évaluation externe de la qualité (EEQ) (parfois appelés « essais d'aptitude ») sont deux composantes distinctes, mais complémentaires, du programme d'assurance qualité d'un laboratoire. Le CIQ vise à établir si une série de techniques et de procédures montrent des résultats uniformes sur une période donnée. Il sert donc à assurer l'uniformité quotidienne du laboratoire. L'EEQ permet d'identifier le degré de concordance entre les résultats obtenus par un laboratoire et ceux obtenus par d'autres.

Contrôle interne de qualité : le CIQ vise à établir si une série de techniques et de procédures montrent des résultats uniformes sur une période donnée. L'expression « contrôle qualité » est couramment utilisée pour décrire l'ensemble des procédures servant à s'assurer que les résultats des expériences en laboratoire sont suffisamment fiables pour aider le clinicien à prendre des décisions, à assurer le suivi thérapeutique et à déceler les anomalies hémostatiques. Les procédures de contrôle qualité doivent être appliquées de manière à assurer un contrôle immédiat et constant de la production des résultats.

Dans le cadre d'un laboratoire, la qualité des résultats obtenus dépend de nombreux facteurs, notamment :

- Collecte et manipulation appropriées des échantillons
- Sélection des techniques appropriées et maintien à jour d'un manuel des procédures opérationnelles standard
- Utilisation de réactifs et de matériel de référence fiables
- Sélection d'une automatisation appropriée et d'un entretien adéquat
- Enregistrement approprié des données
- Système de communication des résultats

En outre, la qualité des résultats obtenus dans la pratique courante dépend fortement de la sélection, de la formation et de la motivation de personnels dûment qualifiés avec des effectifs appropriés.

Le CIQ est particulièrement utile pour identifier le degré de fidélité d'une technique particulière, la fidélité étant le degré de concordance entre les mesures répétées sur un même échantillon. Pour s'assurer que les résultats obtenus en laboratoire sont fiables, les analyses doivent être précises. Le CIQ garantit l'uniformité quotidienne d'un processus analytique et aide ainsi à déterminer si les résultats des patients sont suffisamment fiables pour être diffusés. Un programme de CIQ doit faire référence aux institutions qui soutiennent les lignes directrices de qualité des laboratoires, telles que l'Organisation internationale de normalisation (ISO) ou le *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Les tests de laboratoire doivent être en mesure d'identifier les résultats physiologiques et pathologiques, quel que soit le moment où le test est effectué. Dans les recommandations de la norme ISO 15189:2022, le laboratoire doit disposer

d'une procédure de CIQ pour surveiller en continu la validité des résultats d'examen, conformément aux critères spécifiés. Cette procédure permet de vérifier que la qualité prévue est atteinte et de garantir la validité constante des résultats vis-à-vis de la prise de décision clinique. Le CIQ doit être effectué à une fréquence basée sur la stabilité et la robustesse de la méthode d'examen et sur le risque de préjudice pour le patient en cas de résultat erroné. Dans le document H47-A2 volume 28 n° 207.8 du CLSI, pour tous les systèmes d'analyse de la coagulation non manuels, le laboratoire doit inclure au moins deux niveaux de matériau de contrôle toutes les huit heures de fonctionnement et chaque fois qu'un réactif est changé.

Matériaux de contrôle interne de qualité : pour évaluer la fidélité d'une méthode particulière, il est nécessaire d'effectuer des analyses répétées des aliquotes du même échantillon. Il est important d'inclure des échantillons de contrôle qualité (CQ) avec des valeurs normales et anormales pour s'assurer qu'une méthode est sous contrôle à différents niveaux d'un analyte particulier, car des changements relativement mineurs dans un processus analytique peuvent être plus apparents lors du test d'un contrôle anormal. Le matériau de contrôle doit avoir des propriétés similaires à celles des échantillons à tester et être analysé simultanément. Les matériaux de contrôle qualité d'origine humaine sont plus susceptibles de ressembler étroitement aux échantillons humains à tester. Tous les flacons ou aliquotes du matériau de contrôle doivent en pratique être identiques, de sorte que toute variation des résultats ne soit pas une conséquence d'une variation entre les flacons. Le matériau de contrôle qualité doit également être stable pendant la période d'utilisation prévue. En ce qui concerne les tests et dosages hémostatiques, les échantillons de plasma doivent être congelés (de préférence à -35 °C au moins) ou lyophilisés afin d'assurer une stabilité adéquate pour une utilisation en tant que matériau de CQ. Pour la reconstitution des échantillons lyophilisés, il est important d'utiliser de l'eau distillée à un pH de 6,8fl7,2 et de prévoir au moins cinq minutes pour la reconstitution. Tout matériau de CQ du commerce doit être reconstitué conformément aux instructions du fabricant à l'aide d'un système de pipetage précis. Un matériau de CQ congelé doit être décongelé rapidement à 37 °C pendant cinq minutes. Lors de la sélection du matériau de CQ, le risque de transmission de virus transmissibles par le sang doit être pris en compte. Un matériau à haut risque ne doit pas être utilisé. Au moins un matériau de CQ doit être inclus avec chaque groupe de tests de dépistage ou de dosages. Pour les tests de dépistage, il peut être plus approprié d'inclure un CQ normal de cette manière et de tester les matériaux de CQ anormaux une fois par jour ou par équipe ou en cas de doute sur une méthode. Un matériau de CQ à taux réduit doit être inclus avec les tests utilisés pour le diagnostic et la surveillance des états de déficit congénital associés aux saignements. Dans tous les cas, si cela est possible, le matériau de contrôle doit être traité exactement comme des échantillons à tester.

Limites de variation acceptables : pour les CIQ disponibles dans le commerce, les fabricants fournissent souvent une plage cible de valeurs acceptables. Dans le cas de tests de dépistage et d'analyses occasionnelles, les résultats obtenus dépendront des réactifs et du système de détection du point final utilisés. La plage cible doit tenir compte de ces effets. Lorsqu'une plage cible n'est pas disponible pour une technique particulière, elle peut être établie localement. Le matériau de CIQ est testé à plusieurs reprises (au minimum 10 fois) des jours différents lorsque la méthode est considérée sous contrôle (comme indiqué par exemple par des résultats dans la cible sur un autre matériau de CQ). La moyenne et l'ET de ces résultats sont ensuite calculés. L'ET est la racine carrée de la somme de d^2 divisée par $n-1$, où d représente la différence entre chaque résultat et la moyenne et n le nombre de déterminations. L'ET est une mesure de la dispersion des résultats : plus l'écart type est grand, plus les résultats sont dispersés. Un autre paramètre important est le coefficient de variation (CV), qui est l'expression de l'écart type sous forme de pourcentage de la moyenne ($CV = ET \text{ divisé par la moyenne, multiplié par } 100\%$). Le CV des résultats obtenus des jours différents pour le temps de prothrombine et le temps de céphaline activée d'un échantillon de CQ devrait toujours être inférieur, voire très inférieur, à 8 %. Pour les dosages comme le FVIII:C et le FIX, des CV inférieurs à 10 % devraient être atteignables pour les tests effectués sur un certain nombre de jours. Dans la plupart des cas, les résultats obtenus avec un échantillon de CIQ présenteront une distribution normale (gaussienne). Il est courant de définir la plage cible des résultats de CIQ comme la moyenne ± 2 ET, puisque cela devrait inclure 95 % des valeurs. Les résultats individuels doivent être consignés dans un tableau qui identifie la plage cible. Les résultats en dehors de cette plage indiquent que le matériau

de CQ est dégradé ou a été mal manipulé, ou que la méthode n'est pas correctement maîtrisée. Un test avec du matériau de CQ supplémentaire permettra de différencier ces deux possibilités : des résultats qui se situent à niveau hors limites confirmeront que l'analyse n'est pas maîtrisée.

Évaluation externe de la qualité : dans des programmes d'EEQ de grande envergure, l'analyse rétrospective des résultats obtenus par les laboratoires participants permet d'identifier non seulement les mauvaises performances de certains laboratoires, mais aussi les réactifs et les méthodes qui donnent des résultats peu fiables ou erronés. La fonction principale de l'EEQ est de soumettre à des essais d'aptitude les analyses de chaque laboratoire. Le programme international d'évaluation externe de la qualité (*International External Quality Assessment Scheme* ou IEQAS) de la Fédération mondiale de l'hémophilie (FMH) comprend des analyses d'une pertinence particulière pour le diagnostic et la prise en charge des troubles de la coagulation (pour plus de renseignements, s'adresser à la FMH). Les résultats obtenus par ce programme ont été publiés dans les ouvrages suivants :

- Jennings I, Kitchen S, Woods TAL, Preston FE. Development of a World Federation of Hemophilia External Quality Assessment Scheme: results of a pilot study. *Haemophilia* 1996; 2: 4-46.
- Jennings I, Kitchen S, Woods TAL, Preston FE. Laboratory performance of haemophilia centres in developing countries: 3 years' experience of the World Federation of Hemophilia External Quality Assessment Scheme. *Haemophilia* 1998; 4: 739-746.
- Jennings I, Kitchen DP, Woods TA, Kitchen S, Walker ID, Preston FE. Laboratory performance in the WFH EQA programme 2003-2008. *Haemophilia*. 2009; 15:571-7.
- Silmara Montalvão, Ian Jennings, Christopher Reilly-Stitt, Dianne Kitchen, Steve Kitchen. Quality of diagnosis and lab monitoring of people with hemophilia and other bleeding disorders across the continents: WFH IEQAS programme 2016-2023.

L'IEQAS a été lancé en 2004 pour contrôler et améliorer les performances des laboratoires dans les centres de traitement de l'hémophilie (CTH) du monde entier. Les laboratoires peuvent participer à ce programme pour évaluer leurs systèmes d'assurance qualité et la fiabilité de leurs résultats de test. L'IEQAS améliore et standardise le diagnostic de laboratoire en vérifiant l'efficacité des systèmes internes d'assurance qualité en place et en évaluant les compétences du laboratoire. Le programme est géré par le *National External Quality Assessment Service* (UK NEQAS) britannique, basé à Sheffield, qui a été inspecté par United Kingdom Accreditation Service Ltd (UKAS) et a reçu la certification à la norme ISO 17043 pour tous les tests répertoriés. L'IEQAS de la FMH a pour mission de fournir une EEQ pour les tests de coagulation sanguine et de promouvoir des normes élevées de performances et de pratiques. L'EEQ, ainsi que les procédures de CIQ, sont des éléments essentiels de l'assurance qualité globale des laboratoires. En outre, l'IEQAS propose un service de conseil aux participants par le biais d'échanges sur le diagnostic de laboratoire, y compris une réunion des participants lors du *Congrès mondial* biennal de la FMH et des visites sur site/ virtuelles à des fins de formation, selon les besoins. Le comité IEQAS de la FMH est chargé de superviser le programme. Il est composé d'une présidence indépendante nommée par la FMH, d'un directeur ou d'une directrice du programme, du personnel du programme IEQAS dans les *Sheffield Teaching Hospitals* (établissement hôte), ainsi que du personnel et des bénévoles de la FMH. Il supervise tous les aspects opérationnels du programme, examine la participation au programme, analyse les résultats, surveille les performances des laboratoires mondiaux et fournit un soutien consultatif aux centres qui adhèrent au programme. Les enquêtes de l'IEQAS sont envoyées trois fois par an, généralement en mars, juillet et novembre. Toutes les enquêtes englobent généralement le TP, le TCA et les dosages des facteurs VIII et IX. Deux des trois enquêtes comprennent le dosage de l'antigène du FW et le dosage de l'activité cofacteur de la ristocétine/FW. Une des trois enquêtes comprend deux autres tests de facteurs afin que les tests de FII, FV, FVII, FX et FXI et de fibrinogène soient tous évalués à un moment donné. Pour plus de détails, contacter neqas@coageqa.org.uk.

Références

- Castellone DD. Establishing reference intervals in the coagulation laboratory. *Int J Lab Hematol* 2017; 39 Suppl 1: 121–127.
- Eusebi P. Diagnostic accuracy measures. *Cerebrovasc Dis.* 2013; 36(4): 267–272.
- Favaloro EJ, Lippi G, Adcock DM. Preanalytical and postanalytical variables: the leading causes of diagnostic error in hemostasis? *Semin Thromb Hemost* 2008; 34(7): 612–634.
- Gardiner C, Coleman R, de Maat MPM, Dorgalaleh A, Echenagucia M, Gosselin RC, Ieko M, Kitchen S. International Council for Standardization in Haematology (ICSH) laboratory guidance for the evaluation of haemostasis analyser-reagent test systems. Part 1: Instrument-specific issues and commonly used coagulation screening tests. *Int J Lab Hematol* 2021a; 43(2): 169–183.
- Gardiner C, Coleman R, de Maat MPM, Dorgalaleh A, Echenagucia M, Gosselin RC, Ieko M, Kitchen S. International Council for Standardization in Haematology (ICSH) laboratory guidance for the verification of haemostasis analyser-reagent test systems. Part 2: Specialist tests and calibrated assays. *Int J Lab Hematol* 2021b; 43(5): 907–916.
- Henny J, Vassault A, Boursier G, Vukasovic I, Mesko Brguljan P, Lohmander M et al. Recommendation for the review of biological reference intervals in medical laboratories. *Clin Chem Lab Med* 2016; 54(12): 1893–1900.
- Jensen AL, Kjelgaard-Hansen M. Method comparison in the clinical laboratory. *Vet Clin Pathol* 2006; 35(3): 276–286.
- Kitchen S, Adcock DM, Dauer R, Kristoffersen AH, Lippi G, Mackie I, Marlar RA, Nair S. International Council for Standardization in Haematology (ICSH) recommendations for processing of blood samples for coagulation testing. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(6): 1272–1283.
- Montalvão SAL, Francisco AP, da Silva BLQ, Huber SC, Aguiari HJ, Fernandes MCGL et al. From hemophilia to deep venous thrombosis patient samples: How to perform an easy coagulometer validation process according to available guidelines. *Clin Appl Thromb Hemost* 2020; 26: 1076029620915512.
- Montalvão SAL, Lowe A, Kitchen S. Advantages of external quality assessment-EQA programs. *Haemophilia* 2022; 28(4): 679–686.

SUJETS ABORDÉS

- ✓ Prélèvement de sang
- ✓ Conservation
- ✓ Plasma pauvre en plaquettes (PPP)
- ✓ Décongélation
- ✓ Substances interférentes

Quelques facteurs doivent être pris en compte avant le prélèvement sanguin. Pour la plupart des examens hémorragiques et thrombotiques, il n'est pas nécessaire d'être à jeun avant le prélèvement sanguin, à l'exception cependant du dosage de l'homocystéine. L'activité physique (Venema *et al.*, 2017) et le stress (Austin *et al.*, 2012) peuvent provoquer des hausses transitoires du FVIII et du FW. L'activité physique peut également affecter le dosage des Ddimères (Huskens D *et al.*, 2016). Il est possible qu'une inflammation ait un effet sur les facteurs de coagulation et d'autres paramètres hémostatiques (Hardy *et al.*, 2024). La grossesse influe sur divers paramètres, notamment le FVIII (Castaman, 2013), le VWF (Delbrück *et al.*, 2019) et les Ddimères (Blombäck *et al.*, 2007). De nombreux produits pharmaceutiques et anticoagulants peuvent interférer avec les bilans d'hémostase. Par conséquent, les informations concernant les traitements des patients sont essentielles pour le laboratoire (Gosselin *et al.*, 2019).

Prélèvement de sang : plusieurs lignes directrices décrivent les bonnes pratiques de collecte et de traitement des échantillons pour les bilans d'hémostase (CLSI, 2024 ; CLSI, 2017). Le sang doit être prélevé dans un dispositif de prélèvement à vide ou une seringue en plastique de calibre 19 à 21 pour les adultes et de 22 ou 23 pour les enfants (Srivastava *et al.*, 2021). Les tubes ne sont pas tous du même type ; les centres ne doivent utiliser qu'un seul type et générer des intervalles de référence sur cette base (Bowen *et al.*, 2016). Même pour un type de tube, la composition est importante ; les tubes en plastique et en verre ne sont pas interchangeables (Fiebig *et al.*, 2005). Les tubes de prélèvement sanguin doivent contenir du citrate trisodique de 0,105 M à 0,109 M (3,2 %) (CLSI, 2024). La séquence de prélèvement est importante pour prévenir la contamination croisée par l'EDTA (Lima-Oliveira *et al.*, 2015) ou l'héparine (Keppel *et al.*, 2019) ; ainsi, les bonnes pratiques en matière de prélèvement d'échantillons doivent être suivies (OMS, 2010 ; Simundic *et al.*, 2018). Les échantillons nécessitent une anticoagulation immédiate après la ponction veineuse, avec un remplissage à au moins 80 % du volume cible (Kitchen *et al.*, 2021) pour atteindre un ratio sang:anticoagulant de 9:1. Les tubes doivent être retournés délicatement (trois à cinq fois) après la ponction pour une mélange approprié des échantillons. Des changements hémostatiques indésirables se produisent dans les tubes qui ne sont pas suffisamment remplis (Lippi *et al.*, 2012). Pour les échantillons présentant des taux d'hématocrite > 55 %, la solution de citrate doit être ajustée de manière à compenser ces taux et parvenir au ratio 9:1 adéquat. Des variations significatives du TP, du TCA et de l'INR peuvent être observées si ce ratio n'est pas préservé (Marlar *et al.*, 2006). La formule recommandée pour l'ajustement des taux de citrate est indiquée ci-après (Kitchen *et al.*, 2021). Les échantillons doivent être correctement étiquetés immédiatement avant ou après la ponction veineuse, conformément aux politiques réglementaires ou de l'établissement applicables.

$$C = (1,85 \times 10^{-3})(100 - HCT)(V)$$

C = volume de citrate en millilitres (ml) à ajouter à un volume de sang (V)

HCT = hématocrite du patient

V = volume de sang ajouté en ml

Et $1,85 \times 10^{-3}$ est la constante

Exemple : un HCT à 70 % et 4,5 ml de sang prélevés avant ajout d'anticoagulant donnent le calcul suivant, à savoir 0,25 ml de citrate mélangé à 4,5 ml de sang.

$$(1,85 \times 10^{-3})(100 - \text{HCT})(V) = C$$

$$(1,85 \times 0,001)(100 - 70)(4,5 \text{ ml}) = 0,25 \text{ ml de citrate}$$

Plasma pauvre en plaquettes (PPP) : la plupart des tests de coagulation peuvent être réalisés avec du PPP après centrifugation à $> 1700 \text{ g}$ pendant 10 minutes (CLSI, 2024 ; Kitchen et al., 2021). Les centrifugeuses réfrigérées doivent être évitées, car l'activation par le froid du facteur plaquettaire 4 peut affecter la surveillance de l'héparine, ainsi que les tests de la fonction plaquettaire, du FVIII et du FW (Favaloro, 2004). Certains tests, tels que celui de l'héparine non fractionnée (HNF) et de l'anticoagulant de type lupique, nécessitent du plasma sans plaquettes obtenu après une double centrifugation ($< 10 \times 10^9$) si le test est effectué sur des échantillons préalablement congelés. Dans ce cas, le plasma est retiré du tube de sang centrifugé, placé dans un deuxième récipient approprié et à nouveau centrifugé avec des sous-aliquotes retirées pour la congélation. Le test de la fonction plaquettaire nécessite un plasma riche en plaquettes (PRP), préparé après centrifugation à 170 g pendant 15 minutes ou 250 g pendant 10 minutes (Gomes et al., 2021).

Substances interférentes : les échantillons hémolysés ne doivent pas être analysés, car on pourrait observer des changements significatifs, du TCA en particulier (Woolley et al., 2016 ; Lippi et al., 2013), sauf lorsque l'hémolyse est intravasculaire (Arachchillage et al., 2014). Les analyses de routine ne sont généralement pas affectées par la jaunisse/l'ictère (Woolley et al., 2016) et il est possible de contourner la lipémie par ultracentrifugation (Lippi et al., 2013, Dimeski et Jones, 2011).

Conservation : l'analyse des échantillons est sensible au facteur temps. Le traitement et l'analyse doivent être effectués dans la fenêtre de stabilité suivant la ponction veineuse et les échantillons doivent être conservés à température ambiante dans l'intervalle. Les lignes directrices recommandent de procéder à l'analyse dans les quatre heures (CLSI, 2024) pour tous les échantillons, à moins que les données locales ne confirment une stabilité étendue pour une combinaison spécifique de tube/dosage (Kitchen et al., 2021 ; Linskens et al., 2018). Une conservation à température élevée peut entraîner une perte de facteurs de coagulation, le facteur VIII notamment (Omidkhoda et al., 2011). La libération du facteur plaquettaire 4 peut entraîner la neutralisation de l'héparine non fractionnée dans les échantillons. Par conséquent, ces tubes doivent être centrifugés dans l'heure et analysés dans les quatre heures (Baker et al., 2020). Si le plasma est stocké pour analyse ultérieure, les conditions de conservation peuvent affecter certains dosages. Il est acceptable de conserver le plasma à -24°C pendant trois mois. Cependant, pour une conservation à plus long terme (six mois environ), les échantillons doivent être conservés à 70°C (Woodhams et al., 2001 ; Fenclova et al., 2023).

Décongélation : les échantillons congelés doivent être décongelés dans un bain-marie à 37°C pendant trois à cinq minutes et retournés à plusieurs reprises avant l'analyse de manière à homogénéiser l'échantillon (Jo et al., 2020). Il faut éviter de recongeler du plasma décongelé pour d'autres tests.

Références

- Arachchillage DJ, Platton S, Hickey K, Chu J, Pickering M, Sommerville P, MacCallum P, Breen K. Guidelines on the investigation and management of antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol* 2024; 205(3): 855-880.
- Austin AW, Wirtz PH, Patterson SM, Stutz M, von Känel R. Stress-induced alterations in coagulation: Assessment of a new hemoconcentration correction technique. *Psychosom Med* 2012; 74(3): 288-295.
- Baker P, Platton S, Gibson C, Gray E, Jennings I, Murphy P, Laffan M. Guidelines on the laboratory aspects of assays used in haemostasis and thrombosis. *Br J Haematol* 2020; 191(3): 347-362.
- Blombäck M, Konkle BA, Manco-Johnson MJ, Bremme K, Hellgren M, Kaaja R. Preanalytical conditions that affect coagulation testing, including hormonal status and therapy. *J Thromb Haemost* 2007; 5(4): 855-858.
- Bowen RA, Adcock DM. Blood collection tubes as medical devices: The potential to affect assays and proposed verification and validation processes for the clinical laboratory. *Clin Biochem* 2016; 49(18): 1321-1330.
- Castaman G. Changes of von Willebrand factor during pregnancy in women with and without von Willebrand disease. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2013; 5(1): e2013052.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays, 6th edition. CLSI standard H21. 2024. https://clsi.org/media/bp2jr13r/h21ed6e_sample.pdf.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Collection of diagnostic venous blood specimens, 7th edition. CLSI standard GP41. 2017. https://clsi.org/media/1372/gp41ed7_sample.pdf.
- Delbrück C, Miesbach W. The course of von Willebrand factor and factor viii activity in patients with von Willebrand disease during pregnancy. *Acta Haematol* 2019; 142(2): 71-78.
- Dimeski G, Jones BW. Lipaemic samples: Effective process for lipid reduction using high speed centrifugation compared with ultracentrifugation. *Biochem Med (Zagreb)* 2011; 21(1): 86-92.
- Favaloro EJ, Soltani S, McDonald J. Potential laboratory misdiagnosis of hemophilia and von Willebrand disorder owing to cold activation of blood samples for testing. *Am J Clin Pathol* 2004; 122(5): 686-692.
- Fenclova T, Marecek F, Hrachovinova I. Effects of frozen storage conditions and freezing rate on the stability of coagulation proteins in human plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2023; 34(6): 377-384.
- Fiebig EW, Etzell JE, Ng VL. Clinically relevant differences in prothrombin time and INR values related to blood sample collection in plastic vs glass tubes. *Am J Clin Pathol* 2005; 124(6): 902-909.
- Gomez K, Anderson J, Baker P, Biss T, Jennings I, Lowe G, Platton S. Clinical and laboratory diagnosis of heritable platelet disorders in adults and children: A British Society for Haematology guideline. *Br J Haematol* 2021; 195(1): 46-72.
- Gosselin RC, Marlar RA. Preanalytical variables in coagulation testing: Setting the stage for accurate results. *Semin Thromb Hemost* 2019; 45(5): 433-448.
- Hardy M, Catry E, Pouplard M, Lecompte T, Mullier F. Is lupus anticoagulant testing with dilute Russell's viper venom clotting times reliable in the presence of inflammation? *Res Pract Thromb Haemost* 2024; 8(6): 102536.
- Huskens D, Roest M, Remijn JA, Konings J, Kremers RM, Bloemen S, Schurgers E, Selmecki A, Kelchtermans H, van Meel R, Meex SJ, Kleinegris MC, de Groot PG, Urbanus RT, Ninivaggi M, de Laat B. Strenuous exercise induces a hyper-reactive rebalanced haemostatic state that is more pronounced in men. *Thromb Haemost* 2016 Jun 2;115(6):1109-19.
- Keppel MH, Auer S, Lippi G, von Meyer A, Cornes M, Felder TK, Oberkofler H, Mrazek C, Haschke-Becher E, Cadamuro J. Heparin and citrate additive carryover during blood collection. *Clin Chem Lab Med* 2019; 57(12): 1888-1896.
- Kitchen S, Adcock DM, Dauer R, Kristoffersen AH, Lippi G, Mackie I, Marlar RA, Nair S. International Council for Standardisation in Haematology (ICHS) recommendations for collection of blood samples for coagulation testing. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(4): 571-580.
- Kitchen S, Adcock DM, Dauer R, Kristoffersen AH, Lippi G, Mackie I, Marlar RA, Nair S. International Council for Standardization in Haematology (ICHS) recommendations for processing of blood samples for coagulation testing. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(6): 1272-1283.

- Lima-Oliveira G, Salvagno GL, Danese E, Favaloro EJ, Guidi GC, Lippi G. Sodium citrate blood contamination by K2-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA): Impact on routine coagulation testing. *Int J Lab Hematol* 2015; 37(3): 403-409.
- Linskens EA, Devreese KMJ. Pre-analytical stability of coagulation parameters in plasma stored at room temperature. *Int J Lab Hematol* 2018; 40(3): 292-303.
- Lippi G, Plebani M, Favaloro EJ. Interference in coagulation testing: Focus on spurious hemolysis, icterus, and lipemia. *Semin Thromb Hemost* 2013; 39(3): 258-266.
- Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Lima-Oliveira G, Guidi GC, Favaloro EJ. Quality standards for sample collection in coagulation testing. *Semin Thromb Hemost* 2012; 38(6): 565-575.
- Marlar RA, Potts RM, Marlar AA. Effect on routine and special coagulation testing values of citrate anticoagulant adjustment in patients with high hematocrit values. *Am J Clin Pathol* 2006; 126(3): 400-405.
- Omidkhoda A, Tabatabaei MR, Atarodi K, Karimi K, Froushani AR, Pourfathollah AA. A comparative study of the effects of temperature, time and factor VIII assay type on factor VIII activity in cryoprecipitate in Iran. *Blood Transfus* 2011; 9(4): 394-399.
- Simundic AM, Bölenius K, Cadamuro J, Church S, Cornes MP, van Dongen-Lases EC et al. Joint EFLM-COLABIOCLI recommendation for venous blood sampling. *Clin Chem Lab Med* 2018; 56(12): 2015-2038.
- Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, Kitchen S, Sutherland M, Pipe SW et al. WFH guidelines for the management of hemophilia, 3rd edition. *Haemophilia* 2020; 26 Suppl 6: 1-158.
- Venema CL, Schutgens REG, Fischer K. Pathophysiological mechanisms of endogenous FVIII release following strenuous exercise in non-severe haemophilia: A review. *Thromb Haemost* 2017; 117(12): 2237-2242.
- Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Colesse G, Gourmelin Y. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001; 12(4): 229-236.
- Woolley A, Golmard JL, Kitchen S. Effects of haemolysis, icterus and lipaemia on coagulation tests as performed on Stago STA-Compact-Max analyser. *Int J Lab Hematol* 2016; 38(4): 375-388.
- World Health Organisation. WHO guidelines on drawing blood: Best practices in phlebotomy. 2010. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK138650/>.

SUJETS ABORDÉS

- ✓ Quand utiliser la technique d'inclinaison manuelle du tube
- ✓ Comment réaliser la technique d'inclinaison manuelle du tube
- ✓ Temps de prothrombine selon la technique d'inclinaison manuelle du tube
- ✓ Temps de céphaline activée selon la technique d'inclinaison manuelle du tube
- ✓ Temps de thrombine et fibrinogène selon la technique d'inclinaison manuelle du tube
- ✓ Test de fibrinogène dérivé du TP

Le recours à des coagulomètres pour les tests de coagulation présente des avantages, notamment la rapidité, le rendement et l'uniformité de l'analyse, avec des résultats fidèles et exacts en temps opportun. Bien qu'il existe de nombreux instruments différents dans le monde, la technique d'inclinaison manuelle du tube reste valable pour déterminer le temps de coagulation. Elle peut être employée pour tous les échantillons si aucune méthode automatisée appropriée n'est à disposition, ou pour un sous-groupe d'échantillons, soit parce que l'analyse automatisée ne génère pas de résultats sur des échantillons présentant des caractéristiques spécifiques, ce qui entraîne une incompatibilité de l'échantillon avec l'instrument utilisé, soit parce que la méthode du coagulomètre est temporairement indisponible. Les méthodes d'inclinaison du tube conviennent en remplacement des méthodes reposant sur la formation d'un caillot et même les laboratoires des centres d'hémophilie bien équipés devraient disposer de la méthode d'inclinaison manuelle pour les très rares échantillons où l'analyse automatisée échoue, mais où les résultats sont absolument nécessaires pour la prise en charge sûre du patient. Cela peut être le cas en présence de concentrations lipidiques extrêmement élevées dans le plasma ou lorsque le schéma de formation de caillots dans l'échantillon diffère considérablement des échantillons normaux, en particulier lorsque la polymérisation du fibrinogène en fibrine est nettement anormale. En raison des nombreuses variables et des sources de contamination possibles associées aux techniques manuelles, celles-ci peuvent nécessiter de doubler les tests. Si le CV des résultats de CIQ est $> 5\%$ d'un jour à l'autre, il convient d'envisager des tests en double ; les deux résultats doivent alors se situer à $\pm 5\%$ de la moyenne.

Quand utiliser la technique d'inclinaison manuelle du tube : cette technique peut être utilisée pour la détermination du TP, du TCA, du temps de thrombine et du fibrinogène, ainsi que pour les dosages des facteurs de coagulation sur la base du TP et du TCA.

Comment réaliser la technique d'inclinaison manuelle du tube : la méthode a récemment été harmonisée par rapport à l'analyse du TP dans le cadre de l'étalonnage des thromboplastines de référence pour le système d'INR utilisé pour le suivi des médicaments antagonistes de la vitamine K (van den Besselaar et al., 2020). Cette méthode harmonisée a amélioré la concordance des résultats du TP selon la méthode d'inclinaison du tube lorsque les tests sont effectués par différents opérateurs et dans différents centres. Elle peut être employée pour les tests d'inclinaison du tube pour le TCA, le temps de thrombine et l'analyse du fibrinogène, en plus des tests du TP.

Matériel requis :

- 1) Un bainmarie pour maintenir les tubes à essai à une température constante de 37 °C. Les dimensions avoisinant 40 × 30 × 20 cm sont pratiques. Dans la mesure du possible, l'eau du

- bain doit être mise en circulation en continu par une pompe. La température doit être de 37 °C (limites de tolérance : 37 ± 0,5 °C). Elle doit être régulée à l'aide d'un thermomètre étalonné.
- 2) Une source de lumière (lampe articulée p. ex.) placée à 20 cm audessus du niveau de l'eau peut éclairer le tube à essai pendant l'inclinaison, ce qui facilite la détection du point final de la coagulation par l'opérateur. Il est préférable d'avoir recours à des LED plutôt qu'à des ampoules, qui génèrent de la chaleur, ce qui peut éléver la température des tubes à essai à proximité.
 - 3) Les tubes à essai doivent être en verre, non siliconés et non utilisés. Des tubes de culture jetables (référence catalogue 73500-1275, Kimble Chase Life Science and Research Products LLC, Vineland, New Jersey) de 75 × 12 mm dont la paroi a une épaisseur de 0,8 mm ont été utilisés dans le cadre des travaux visant à harmoniser les analyses du TP avec inclinaison des tubes (van den Besselaar et al., 2020), mais des tubes de 75 × 10 mm peuvent également convenir. Les tubes à essai doivent être en verre borosilicaté. Ils doivent être jetés après utilisation et ne doivent pas être lavés pour être réutilisés. Il est parfaitement possible d'utiliser des tubes en verre provenant de différentes sources, mais cela est susceptible d'influencer les temps de coagulation obtenus, en particulier dans les tests de dépistage tels que le TCA. Si la source (fabricant ou composition) des tubes est modifiée, il faut tenir compte de la possibilité d'une influence sur les résultats. Celle-ci pourrait être évaluée en comparant un petit nombre de tests avec les deux types de tubes. En présence de différences systématiques, une nouvelle plage normale doit être établie.

Technique :

- La température de la pièce dans laquelle l'équipement est installé et où la technique doit être effectuée doit être maintenue à 2022 °C.
- Avant de commencer les tests manuels de TP, TCA, temps de thrombine ou fibrinogène dans le bain-marie, vérifier et consigner la température.
- Les tubes à essai vides doivent être maintenus en position verticale sur un portoir, dans le bain-marie à 37 °C, pendant au moins quatre minutes à une profondeur de 3,5 cm, et ce avant l'ajout de réactifs et de plasma.

Temps de prothrombine selon la technique d'inclinaison manuelle du tube :

- Pour le TP, ajouter 200 µl du réactif thromboplastine/calcium et incuber pendant deux minutes.
- Pipeter ensuite 100 µl de plasma non préchauffé, en le distribuant depuis une hauteur de 1 cm audessus du niveau de thromboplastine, l'embout reposant contre la paroi du tube, et démarrer immédiatement le chronomètre avec l'autre main.
- Agiter doucement le tube pour mélanger le contenu, en immergeant le tube dans l'eau.
- Placer le tube sur le portoir dans le bain-marie.
- Poser la pipette.
- Maintenir manuellement le tube dans l'eau, de manière à immerger les 5 cm inférieurs du tube (figure 1).
- Commencer l'inclinaison manuelle du tube sept secondes après le démarrage du chronomètre.
- Incliner le tube à près de 90°, le sortir de l'eau pendant deux secondes et l'y remettre pendant une seconde (figure 1). À noter qu'une inclinaison à 90° ou plus entraîne généralement le déversement du mélange réactionnel hors du tube.
- Le tube ne doit pas rester immobile pendant ce cycle ; il doit être incliné en continu, la main de l'opérateur étant posée à côté du bain-marie.
- Répéter ce cycle jusqu'à ce que le caillot se forme.
- En position horizontale, le tube est maintenu à 10 cm maximum et 2 cm minimum au-dessus du niveau de l'eau (figure 1).
- Avant que le mélange ne coagule, l'opérateur observe le mélange s'écouler du bas aux trois quarts de la longueur du tube en position presque horizontale et retourner vers le bas.
- Lorsque la coagulation commence, la vitesse d'écoulement est réduite.
- Lorsque l'écoulement s'arrête, l'opérateur stoppe le chronomètre et consigne le temps de coagulation en secondes à une décimale près.

L'opérateur qui procède à l'inclinaison manuelle du tube sort régulièrement le tube de l'eau ; cela entraînera une chute de température du mélange réactionnel. L'immersion entraînera en revanche une hausse de température. La chute de température moyenne observée dans la technique d'inclinaison manuelle décrite ci-dessus est limitée à 0,4 °C (van den Besselaar et al., 2020).

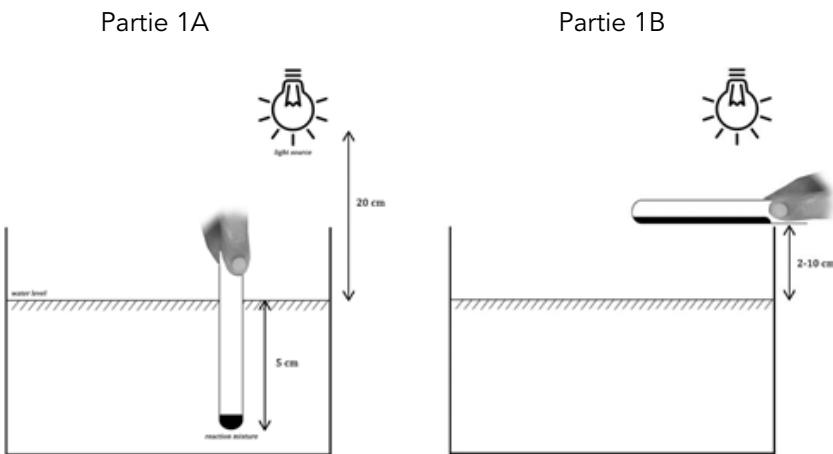


Figure 1. Représentation schématique de la technique d'inclinaison manuelle du tube. Partie 1A : le tube à essai est en position verticale dans le bainmarie. Partie 1B : le tube à essai est en position horizontale hors du bainmarie. La main de l'opérateur repose sur le bord du bainmarie. En raison de la taille variable des mains des opérateurs, la distance entre le tube en position horizontale et la surface de l'eau varie de 2 à 10 cm. L'image n'est pas à l'échelle. (Avec l'aimable autorisation d'Elsevier Publishing, Amsterdam, PaysBas, reproduction de : van den Besselaar et al. J Thromb Haemost. 2020 ; 18 : 1986-1994.)

La méthode harmonisée ci-dessus a été développée au cours de deux ateliers de manipulation de liquides évaluant les tests du TP réalisés par un maximum de sept opérateurs provenant de trois centres, où un certain nombre de variables ont été identifiées dans la technique (van den Besselaar et al., 2020). Les ateliers ont en effet confirmé que les temps de coagulation étaient plus longs lorsque le composant final du mélange réactionnel était déposé tout en haut du tube plutôt que près de la surface du mélange réactionnel plus bas dans le tube. Avec la méthode harmonisée décrite, le CV inter-opérateurs sur les mêmes plasmas à tester était de 3 % pour un TP normal et de 1,4 % pour un TP allongé.

Temps de céphaline activée selon la technique d'inclinaison manuelle du tube :

- Ajouter 100 µl de réactif pour la détermination du TCA dans le tube et incuber pendant deux minutes.
- Pipeter ensuite 100 µl de plasma non préchauffé, en le distribuant depuis une hauteur de 1 cm au-dessus du niveau du réactif, l'embout reposant contre la paroi du tube à essai, et démarrer immédiatement un chronomètre avec l'autre main.
- Agiter doucement le tube pour mélanger le contenu, en immergeant le tube dans l'eau.
- Placer le tube sur le portoir dans le bain-marie.
- Après le temps d'activation recommandé par le fabricant du réactif de TCA (généralement trois minutes, mais ce peut être cinq minutes pour d'autres), ajouter 100 µl de chlorure de calcium préchauffé à 37 °C dans un tube séparé dans le bainmarie. Le distribuer depuis une hauteur de 1 cm au-dessus du niveau du mélange réactionnel, l'embout reposant contre la paroi du tube à essai, et démarrer immédiatement un nouveau chronomètre avec l'autre main.
- Agiter doucement le tube pour mélanger le contenu, en immergeant le tube dans l'eau.
- Placer le tube sur le portoir dans le bainmarie.
- Poser la pipette.
- Maintenir manuellement le tube dans l'eau, de manière à immerger les 5 cm inférieurs du tube (figure 1).

- Commencer l'inclinaison manuelle du tube 15 secondes après le démarrage du chronomètre.
- Incliner le tube à près de 90°, le sortir de l'eau pendant deux secondes et l'y remettre pendant une seconde (figure 1). À noter qu'une inclinaison à 90° ou plus entraîne généralement le déversement du mélange réactionnel hors du tube.
- Le tube ne doit pas rester immobile pendant ce cycle ; il doit être incliné en continu, la main de l'opérateur étant posée à côté du bainmarie.
- Répéter ce cycle jusqu'à ce que le caillot se forme.
- En position horizontale, le tube est maintenu à 10 cm maximum et 2 cm minimum audessus du niveau de l'eau (figure 1).
- Avant que le mélange ne coagule, l'opérateur observe le mélange s'écouler du bas aux trois quarts de la longueur du tube en position presque horizontale et retourner vers le bas.
- Lorsque la coagulation commence, la vitesse d'écoulement est réduite.
- Lorsque l'écoulement s'arrête, l'opérateur stoppe le chronomètre et consigne le temps de coagulation en secondes à une décimale près.

Temps de thrombine et fibrinogène selon la technique d'inclinaison manuelle du tube : les méthodes d'inclinaison manuelle doivent utiliser les proportions de réactifs et de plasma ou les dilutions de plasma recommandées par le fabricant du réactif et suivre les principes des méthodes décrites pour le TP/TCA ci-dessus.

Échantillons avec lipidémie : nombre des coagulomètres actuellement utilisés qui font appel à une détection photo-optique du point final supportent très bien des taux de lipides élevés dans les échantillons. Cependant, ce taux peut parfois être tellement élevé que l'analyseur ne parvient pas à détecter la formation d'un caillot. Ces échantillons peuvent être analysés manuellement et produisent généralement un caillot solide observable visuellement pour le TP, le TCA et le temps de thrombine. Il peut être difficile d'observer la formation d'un caillot lors du dosage de l'activité du fibrinogène de Clauss de ces échantillons. Dans ce cas, une autre option consiste à soumettre les échantillons à une centrifugation à 10 000 g pendant 10 minutes à température ambiante, si disponible (lignes directrices de l'ICSH ; Kitchen et al., 2021). Après cette ultracentrifugation, les lipides sédimentent et l'échantillon peut être analysé sur un coagulomètre automatisé (si disponible) ou selon la technique d'inclinaison manuelle du tube pour le TP, le TCA, le temps de thrombine ou le fibrinogène.

Échantillons présentant des anomalies du fibrinogène : la formation de caillots peut être perturbée en présence de certaines anomalies du fibrinogène. Par exemple, le fibrinogène Longmont est associé à un faible caillot translucide lors du dosage du fibrinogène de Clauss. Les systèmes photo-optiques qui surveillent la lumière diffusée à mesure que le caillot se forme (par opposition à la surveillance de la lumière transmise) pourraient ne pas détecter le point final. Il est possible d'analyser ces échantillons selon la méthode de l'inclinaison du tube, mais l'opérateur doit avoir conscience que la formation de caillots peut être difficile à discerner visuellement. Pour certains échantillons de dysfibrinogénémie dont l'analyse automatisée échoue, la technique manuelle doit être effectuée en examinant très attentivement le processus de coagulation, car les caillots peuvent être fragiles et facilement perturbés par un mélange/inclinaison supplémentaire après la formation du caillot initial.

Contrôle qualité : l'utilisation d'un matériau de contrôle qualité, tel que décrit par ailleurs dans ce manuel pour le TP, le TCA, le temps de thrombine et le fibrinogène, convient aux méthodes manuelles. Il est acceptable de tester un seul niveau de CIQ lorsque la technique manuelle est réservée aux échantillons occasionnels dont l'analyse automatisée échoue. Deux niveaux doivent être disponibles et testés selon les critères décrits par ailleurs dans ce manuel lorsque la technique manuelle est la principale procédure analytique du laboratoire.

La plage des résultats de CIQ obtenus par un petit groupe d'opérateurs différents ayant l'expérience de la technique d'inclinaison manuelle devrait être la suivante :

Moyenne \pm 1 seconde pour un CQ avec un TP moyen compris entre 10 et 12 secondes

Moyenne \pm 2,5 secondes pour un CQ avec un TCA moyen compris entre 25 et 30 secondes

Moyenne \pm 2,5 secondes pour un CQ avec un temps de thrombine moyen compris entre 12 et 20 secondes

Moyenne \pm 0,5 g/l pour un CQ avec un fibrinogène moyen de 2,5 à 3 g/l

Plages normales : les résultats des tests manuels sont d'ordinaire différents de ceux générés par les coagulomètres. En règle générale, les temps de coagulation pour le TP et le TCA sont plus courts sur les analyseurs photo-optiques que lors d'analyses manuelles. Le degré de différence n'est pas uniforme entre les différents analyseurs qui peuvent faire appel à de la lumière transmise ou diffusée. Les analyseurs surveillent l'évolution dans le temps de la diffusion/transmission de la lumière après le démarrage de la coagulation et consignent le temps de coagulation comme le temps nécessaire pour dépasser un seuil de changement particulier. Ce seuil peut osciller de 3 à 50 % par rapport à la valeur de référence. Plus la variation en pourcentage utilisée dans l'analyse de la courbe de coagulation est faible, plus le temps de coagulation rapporté est court. Cela signifie que les résultats des tests manuels ne doivent pas être communiqués en regard d'une plage de référence établie pour une technique automatisée, même lorsque les mêmes réactifs sont utilisés. Il y a deux manières d'aborder cette problématique. L'une consiste à établir une plage de référence pour la technique manuelle à l'aide du processus décrit par ailleurs dans le présent manuel, ce qui est nécessaire si tous les tests sont réalisés au moyen de techniques manuelles. Le plus souvent, les tests manuels se limitent à un petit sousgroupe d'échantillons pour lesquels l'analyse automatisée a échoué. Dans ce cas, la plupart des résultats seront communiqués par le laboratoire avec la plage de référence automatisée correspondante. Des résultats de TP ou de TCA occasionnels publiés avec une plage de référence différente ne sont d'aucune utilité pour les usagers. Dans ces circonstances, le laboratoire peut adopter une approche pragmatique et utiliser un tableau de conversion tel que décrit ci-dessous ; la technique d'analyse est manuelle, mais le résultat est converti en un résultat qui aurait été obtenu si l'échantillon avait été analysé par une méthode automatisée.

Conversion des résultats manuels de temps de prothrombine, temps de céphaline activée et temps de thrombine en équivalents automatisés : une série de 20 à 30 échantillons couvrant une gamme de résultats normaux et anormaux doit être analysée à l'aide de méthodes à la fois manuelles et automatisées. Il convient de procéder à une analyse de régression pour établir la relation entre les résultats obtenus selon les deux méthodes. La corrélation entre les résultats doit être significative, avec un coefficient de corrélation $> 0,8$. Si tel est le cas, la relation de régression peut ensuite servir à créer un tableau qui présente le résultat manuel et le résultat équivalent qui aurait été obtenu sur le système automatisé. Ainsi, le résultat manuel est converti en résultat automatisé, qui est ensuite communiqué en regard de la plage de référence de la méthode automatisée habituelle. Cela signifie que les usagers ne verront qu'une seule plage de référence pour le TP, le TCA ou le temps de thrombine. C'est un point important, car ces plages de référence sont susceptibles d'être intégrées dans les protocoles cliniques pour la prise en charge des patients. Le tableau 5 présente les résultats manuels et automatisés obtenus en analysant les mêmes 21 échantillons à l'aide des deux méthodes.

Tableau 5. TCA manuels et automatisés sur les mêmes échantillons

N° de l'échantillon	TCA manuel (s)	TCA automatisé (s)	N° de l'échantillon	TCA manuel (s)	TCA automatisé (s)
1	31,7	27,0	12	31,7	30,1
2	51,1	46,9	13	31,9	28,9
3	27,2	26,5	14	36,2	33,2
4	42,2	39,4	15	33,1	28,5
5	34,5	30,4	16	40,0	36,4
6	44,2	43,2	17	37,1	30,7
7	33,0	30,5	18	29,2	25,6
8	31,9	30,0	19	35,2	28,1
9	22,2	19,6	20	37,1	34,7
10	34,0	27,8	21	36,5	31,4
11	32,5	31,3			

La relation de régression linéaire entre les deux jeux de données est calculée à l'aide d'un ensemble de statistiques. Dans cet exemple, le coefficient de corrélation (r) est de 0,96 et la relation de régression est calculée comme suit :

$$y = 0,9551x - 1,887$$

où

y est le TCA automatisé

x est le TCA manuel

0,9551 est la pente de la droite de régression linéaire

-1,887 est l'ordonnée à l'origine.

Cette équation est utilisée pour dériver le TCA automatisé du TCA déterminé manuellement de tout échantillon. Il est pratique de préparer un tableau reliant le TCA manuel au résultat équivalent automatisé. Le tableau 6 a été établi à l'aide de l'équation de régression cidessus.

Tableau 6. Tableau de conversion : TCA manuel en TCA équivalent automatisé

TCA manuel (s)	TCA automatisé (s)	TCA manuel (s)	TCA automatisé (s)	TCA manuel (s)	TCA automatisé (s)
19	16,3	40	36,3	61	56,4
20	17,2	41	37,3	62	57,3
21	18,2	42	38,2	63	58,3
22	19,1	43	39,2	64	29,2
23	20,1	44	40,1	65	60,2
24	21,0	45	41,1	66	61,2
25	22,0	46	42,0	67	52,1
26	22,9	47	43,0	68	63,1
27	23,9	48	44,0	69	64,0
28	24,9	49	44,9	70	65,0
29	25,8	50	45,9	71	65,9
30	26,8	51	46,8	72	66,9
31	27,8	52	47,8	73	67,8
32	28,7	53	48,7	74	68,8
33	29,6	54	49,7	75	69,8
34	30,6	55	50,7	76	70,7
35	31,5	56	51,6	77	81,7
36	32,5	57	52,6	78	82,6
37	33,4	58	53,5	79	73,6
38	34,4	59	54,5	80	74,5
39	35,4	60	55,4		

Dosage manuel du fibrinogène par la méthode de Clauss : les réactifs et les méthodes utilisés ici sont les mêmes que pour la version automatisée (à savoir les mêmes tampon, thrombine et dilution de l'échantillon à tester). Le temps de coagulation des tests manuels est converti en concentration de fibrinogène à l'aide d'une courbe d'étalonnage. Celleci doit être construite à l'aide du même étalon et des mêmes dilutions de l'étalon que ceux qui seraient utilisés pour l'analyse automatisée ; voir la section Fibrinogène (dosage de Clauss modifié) plus loin dans le présent manuel. Cependant, les temps de coagulation de chaque dilution de l'étalon utilisée pour construire la courbe d'étalonnage sont déterminés manuellement. Les résultats sont ainsi convertis en concentration de fibrinogène et le résultat est rapporté au même format que la version automatisée (g/l ou mg/dl) à l'aide de la même plage de référence que pour la méthode de Clauss automatisée dans le même centre.

Références

Kitchen S, Adcock DM, Dauer R, Kristoffersen AH, Lippi G, Mackie I, Marlar RA, Nair S. International Council for Standardization in Haematology (ICSH) recommendations for processing of blood samples for coagulation testing. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(6): 1272-1283.

van den Besselaar A, van Rijn CJJ, Abdoel CF, Chantarangkul V, Scalambino E, Kitchen S, Tripodi A, Woolley AM, Padovan L, Cobbaert CM. Paving the way for establishing a reference measurement system for standardization of plasma prothrombin time: Harmonizing the manual tilt tube method. *J Thromb Haemost* 2020; 18(8): 1986-1994.

SUJETS ABORDÉS

- ✓ Test du temps de saignement
- ✓ Temps de prothrombine (TP)
- ✓ Temps de céphaline activée (TCA)
- ✓ Tests de mélange pour l'exploration approfondie de TP et de TCA allongés
- ✓ Temps de coagulation de la thrombine
- ✓ Temps de thrombine en présence de sulfate de protamine pour détecter la présence d'héparine
- ✓ Temps de reptilase
- ✓ Fibrinogène (dosage de Clauss modifié)
- ✓ Élimination de l'héparine du plasma

Test du temps de saignement : historiquement, ce test a été développé pour évaluer en préopératoire la capacité à maintenir un schéma hémorragique normal lors d'interventions chirurgicales majeures, ou à évaluer une suspicion de troubles de la coagulation en raison d'une anomalie plaquettaire. Il a malheureusement été confirmé que ce test n'était ni reproductible ni sensible, et son utilisation ne peut donc avoir lieu qu'en association avec des antécédents familiaux et cliniques complets, accompagnés de tests de dépistage de la coagulation, numération et morphologie plaquettaires comprises. L'analyseur PFA100/200 a largement remplacé le test du temps de saignement dans l'évaluation de la fonction plaquettaire, et ce malgré les insuffisances observées chez les patients thrombocytopéniques (Rodgers et Levin, 2023 ; Undas, 2023).

Le temps de saignement est le temps nécessaire à l'arrêt du saignement après une incision cutanée normalisée (d'une profondeur et d'une longueur déterminées). L'allongement du temps de saignement survient en présence d'une thrombocytopénie, d'une maladie de Willebrand (mW) de type 3 et 2B, d'une thrombasthénie de Glanzmann, d'un syndrome de Bernard-Soulier, d'une maladie du pool vide, d'autres dysfonctions plaquettaires, d'une septicémie (Williams et al., 2024), de maladies auto-immunes, d'une carence en vitamines, d'une anémie sévère, de tumeurs malignes hématologiques (p. ex. des troubles myéloprolifératifs entraînant un déficit en facteur V) et d'une réaction aux médicaments (Vinholt et al., 2019). Le fibrinogène est indispensable à l'arrêt des saignements et il a été suggéré que le facteur V jouait aussi un rôle. Le temps de saignement peut donc s'allonger chez les patients déficients en fibrinogène ou en facteur V. Cet allongement se produit également chez certains patients atteints d'insuffisance rénale, de dysprotéinémie et de troubles vasculaires (Russeau et al., 2023 ; Bourguignon et al., 2022).

Matériel et équipement :

- ✓ Sphygmomanomètre
- ✓ Tampons de désinfection
- ✓ Dispositif pour la détermination du temps de saignement
- ✓ Papier filtre de 1 mm d'épaisseur
- ✓ Chronomètre

Méthode :

- ✓ Le brassard du sphygmomanomètre est placé autour du haut du bras, à la hauteur du cœur, et gonflé à 40 mm de mercure. Cette pression est maintenue tout au long du test.

- ✓ Nettoyer la face postérieure de l'avant-bras et placer le dispositif pour la détermination du temps de saignement fermement contre la peau, sans exercer de pression. Appuyer sur la détente et enclencher le chronomètre.
- ✓ Il est recommandé d'éviter les veines superficielles, les cicatrices et les ecchymoses.
- ✓ À des intervalles de 30 secondes, absorber le sang qui s'écoule avec du papier filtre. Approcher le papier filtre près des incisions sans en toucher les bords.
- ✓ Noter le temps écoulé entre la ponction et l'arrêt du saignement.

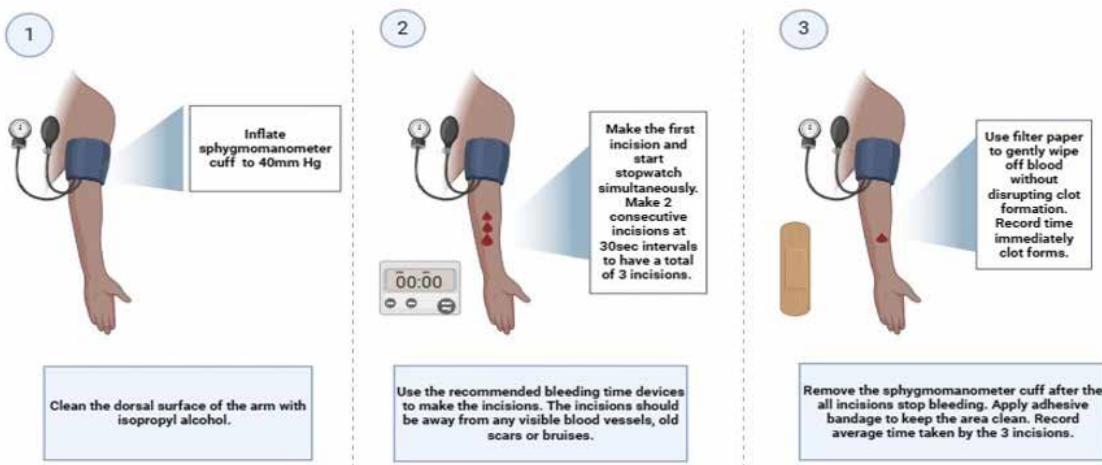


Figure 2. Schéma de déroulement du test de temps de saignement (d'après le modèle de Sally Kim pour « Measurement of blood pressure: The Auscultatory Method » sur biorender.com)

Interprétation : la plage normale chez l'adulte est de deux à sept minutes (jusqu'à huit minutes), mais peut varier en fonction de la méthode utilisée.

Remarques : une plage normale doit être établie localement, quel que soit l'appareil utilisé. L'incision doit être faite parallèlement à la longueur du bras. Les incisions perpendiculaires saignent plus longtemps. Si le résultat est anormal, il convient de répéter le test. Il n'est pas nécessaire d'enregistrer les points finaux si le saignement dure plus de 20 minutes. L'effet des médicaments interférant avec la fonction plaquettaire doit être pris en compte. Par exemple, les médicaments qui contiennent de l'aspirine peuvent allonger le temps de saignement. Donc, lorsque c'est possible, il est recommandé de suspendre la prise de ces médicaments dans les sept jours précédent le test. Il est possible qu'une cicatrice perdure ou qu'un hématome se forme à l'endroit où les incisions ont été faites ; il faut en informer le patient avant de pratiquer l'incision. Chez les femmes enceintes, le temps de saignement peut être trompeur en raison de taux physiologiquement élevés de FVIII et de FW. Le brassard du sphygmomanomètre doit être régulièrement étalonné conformément aux normes de qualité en vigueur. La méthode de Duke présente un taux d'inexactitude plus élevé, avec un risque accru de développement d'un hématome (Rousseau et al., 2023). Étant donné que le temps de saignement est mesuré au chevet de la personne, toutes les procédures standard relatives concernant les exigences de qualité des examens de biologie médicale délocalisée (EBMD) doivent être appliquées pour la sécurité du patient (ISO 15189:2022). En cas de suspicion de mW et si le laboratoire en a la capacité, les tests/analyses suivants doivent être pratiqués en sus des antécédents hémorragiques complets : antigène du FW, activité du FW, dosage du facteur VIII, numération formule sanguine (numération et morphologie plaquettaires comprises) et tests de dépistage de base de la coagulation (TP, TCA, temps de thrombine, fibrinogène). Ils pourraient apporter une meilleure compréhension de ce que pourrait être le diagnostic clinique en l'absence de temps de saignement ou d'un laboratoire d'analyse de la coagulation spécial capable de poser un diagnostic de mW définitif.

Temps de prothrombine (TP) : il évalue l'intégrité du système extrinsèque. Il est très utile pour détecter les déficits en facteur de coagulation, qualitatifs ou bien quantitatifs, des voies extrinsèques et communes. Il est également utile pour le suivi des anticoagulants antagonistes de la vitamine K (AVK) tels que la warfarine, ainsi que la détection des maladies du foie, de la carence en vitamine K, du déficit en facteur X dû à une amylose, de la coagulation intravasculaire disséminée (CIVD), de la présence d'anticoagulants oraux directs (AOD) de manière dose-dépendante ou d'anticorps contre les facteurs de la voie extrinsèque. Ces conditions peuvent allonger les résultats du test du TP (Dorgalaleh et al., 2021). Le TP est sensible aux variations des taux de facteurs V, VII et X et, dans une moindre mesure, de facteur II (prothrombine). Il ne convient pas à la détection de variations mineures du fibrinogène, mais peut être anormal si le taux de fibrinogène est très faible ou si un inhibiteur est présent. La sensibilité du test dépend des réactifs et de la technique utilisés et il est important d'établir en local une plage de référence. La voie mesurée par le temps de prothrombine est illustrée à la figure 3. Le réactif pour mesurer le temps de prothrombine, communément nommé « thromboplastine », contient du facteur tissulaire et des phospholipides. De nombreux réactifs appropriés sont disponibles dans le commerce.

Réactifs :

- ✓ Thromboplastine (peut contenir du chlorure de calcium)
- ✓ Chlorure de calcium 25 mM (requis uniquement si le réactif thromboplastine ne contient pas de calcium)

Méthode : la technique d'inclinaison manuelle du tube est décrite dans la partie 4 du présent manuel. Il y a lieu de suivre les recommandations du fabricant du réactif. Lors de l'utilisation d'un nouveau réactif thromboplastine dont le numéro de lot est différent du précédent, une nouvelle courbe d'étalonnage doit être tracée.

Interprétation : les différents coagulomètres utilisés influencent généralement les temps de coagulation, en fonction de la méthode de détection du point final et le temps nécessaire à cette détection. Cela souligne à nouveau l'importance d'établir des plages normales pour la méthode utilisée dans le laboratoire et sur la base de la population locale. En présence de déficits légers en facteurs II, V, VII ou X, le degré d'allongement peut être minime. Concernant le déficit en facteur II, le TP peut se situer dans la plage normale. La présence d'anticoagulants de type lupique ou d'anticorps antiphospholipides peut avoir un effet sur certains réactifs du TP, et certains types d'anticorps rares peuvent allonger le TP sans allonger le TCA. Les réactifs contenant des concentrations relativement faibles en phospholipides sont plus susceptibles d'être affectés, en particulier certains réactifs fabriqués en modifiant, à l'aide d'un lipide, le facteur tissulaire recombinant. La présence de facteur VII activé, soit à la suite d'une thérapie par facteur VIIa recombinant soit lorsque le facteur VII endogène a été activé, peut raccourcir le TP. Cet effet dépend du facteur tissulaire utilisé dans le réactif. Les réactifs contenant du facteur tissulaire bovin sont particulièrement sensibles à cet effet (Kitchen et al., 1992). Il est possible que le sang total servant à la détermination du TP reste stable pendant au moins 24 heures, en fonction des réactifs utilisés (Baglin et Luddington, 1997). Les TP déterminés par des réactifs contenant du facteur tissulaire humain peuvent différer de ceux obtenus avec des réactifs contenant du facteur tissulaire d'autres espèces, comme le lapin. Dans de tels cas, le résultat obtenu avec le réactif à base de facteur tissulaire humain peut être plus révélateur d'un risque de saignement. Pour une discussion approfondie sur les questions liées à la détermination du TP, consulter les lignes directrices en vigueur du CLSI sur le TP et le TCA en un temps (2023).

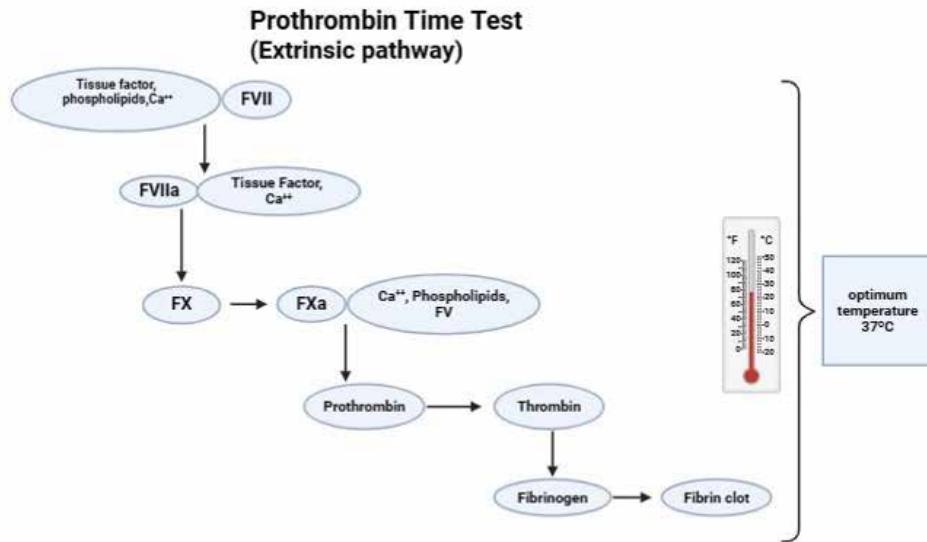


Figure 3. Voie mesurée par le test du TP

Temps de céphaline activée (TCA) : ce test basé sur la formation d'un caillot aide à identifier les déficits en facteur de coagulation ou les inhibiteurs des voies intrinsèques et communes. Conjugué à un temps de prothrombine normal, il s'agit du test le plus utile pour détecter les déficits en facteurs VIII, IX, XI et XII. Le TCA sera également plus long dans tout déficit impliquant les voies communes (déficits en facteurs V, X et II et fibrinogène) et en présence d'inhibiteurs. Certains anticoagulants à visée thérapeutique, comme l'héparine, allongent aussi le TCA. Il est important d'exclure la possibilité que de tels traitements aient été utilisés dans l'exploration initiale de TCA allongés. Le TCA est plus long en présence d'un déficit en prékallicréine (PKK) ou en kininogène de haut poids moléculaire (KHPM), à moins que le test ne soit effectué à l'aide d'un réactif contenant de l'acide ellagique comme activateur (Turi, 1986). Dans ce cas, le TCA sera normal, même en l'absence totale de ces facteurs. Il est conseillé de noter que chaque laboratoire doit déterminer ses plages normales de TCA en fonction de la population locale, du type de réactif de TCA et du coagulomètre employé. Le réactif de TCA contient des phospholipides dilués et des activateurs de contact tels que la silice, l'acide ellagique et le kaolin. Cela est ajouté au plasma citraté pauvre en plaquettes à 37 °C. Ce mélange est incubé à 37 °C pendant une durée spécifiée pour permettre l'activation des facteurs de contact, puis l'ajout de chlorure de calcium conduit à la formation du caillot de fibrine. La durée de formation d'un caillot est consignée en secondes. La voie mesurée par le TCA est illustrée à la figure 4.

Réactifs :

- ✓ Réactif pour la détermination du TCA
 - ✓ Chlorure de calcium 25 mM

Méthode : la technique d'inclinaison manuelle du tube est décrite dans la partie 4 du présent manuel. Il y a lieu de suivre les recommandations du fabricant du réactif.

Interprétation : une plage normale doit toujours être établie en local. Un TCA allongé avec un TP normal suggère la possibilité d'un déficit en facteurs VIII, IX, XI ou XII, en KHPM ou en PKK, ou la présence d'un inhibiteur. Dans ce cas, il est recommandé de refaire le test avec un mélange composé à parts égales de plasma normal et de plasma du patient (la « solution 50:50 » ci-après). Si le TCA corrige de plus de 50 % la différence des temps de coagulation du plasma du patient et du plasma normal, il faut suspecter un déficit en facteur (décrit en détail dans le sujet spécifique ci-après). Une correction plus faible suggère la présence d'un inhibiteur dirigé contre l'un des facteurs de la voie intrinsèque ou d'un inhibiteur de type non spécifique, comme l'anticoagulant lupique.

Tableau 7. Exemple d'interprétation d'un TCA allongé

Échantillon	Résultat
Contrôle du TCA	35 secondes
Test	60 secondes
Si solution 50:50	42 secondes (il s'agit d'une bonne correction, donc il existe probablement un déficit en facteur)
Si solution 50:50	52 secondes (il s'agit d'une correction faible, il y a donc probablement présence d'un inhibiteur)

Investigations portant sur un TCA allongé isolé : l'ordre logique des étapes à suivre pour des patients présentant un TP normal et un TCA allongé est le suivant :

- ✓ Mesurer le temps de thrombine. Si celui-ci est normal, passer aux étapes suivantes. Si le temps de thrombine est allongé, répéter le test en présence de sulfate de protamine. Si le temps de thrombine est corrigé et normalisé, cela suggère la présence d'héparine et il ne sera pas nécessaire d'effectuer les tests approfondis indiqués ci-dessous. Si l'on sait que le patient ne prend pas d'héparine sous quelque forme que ce soit, un nouvel échantillon devrait être demandé.
- ✓ Déterminer le TCA sur un mélange formé à parts égales de plasma normal et de plasma du patient (50 % de chaque). Un mélange à 50 % qui ne parvient pas à corriger et normaliser le TCA peut indiquer la présence d'un inhibiteur (décrite en détail ci-après).
- ✓ Déterminer le TCA avec un deuxième réactif contenant une concentration en phospholipides élevée, telle que l'Actin FS (Dade Behring). Si le TCA initial est nettement allongé (d'au moins trois secondes au-dessus de la limite supérieure de la normale utilisée) et que le TCA avec Actin FS est normal, un anticoagulant de type lupique est probablement la cause de l'allongement du TCA. Cela peut être confirmé ultérieurement au moyen de tests spécifiques, comme le temps de venin de vipère de Russell dilué, bien que ceci ne soit généralement pas nécessaire en l'absence de demande de recherche d'un éventuel anticoagulant de type lupique comme facteur de risque de thrombose. Une autre cause possible, mais très rare, d'un TCA normal avec Actin FS et d'un TCA allongé avec un réactif utilisant de la silice ou du kaolin comme activateur, est le déficit en PKK. À l'instar des anticoagulants de type lupique, cela ne prédispose pas à un risque de saignement. Dès lors, la confirmation peut ne pas être requise. Lorsque le TCA initial est clairement allongé (trois secondes ou plus) et que le TCA avec Actin FS est normal, il n'est pas nécessaire d'effectuer des dosages de facteurs.
- ✓ Si les deux TCA sont allongés, effectuer les dosages FVIII:C, FIX et FXI. Un dosage de FXII peut être réalisé le cas échéant, puisqu'il s'agit d'un déficit relativement courant et que sa mise en évidence peut expliquer l'allongement du TCA. Il n'est pas nécessaire d'exclure la présence de troubles de la coagulation étant donné qu'un déficit en facteur XII n'est pas associé à un risque accru de saignement.
- ✓ Les réactifs (Actin FS notamment) qui contiennent de l'acide ellagique comme activateur donnent des résultats normaux, et ce, même en présence de déficit sévère en PKK.

Remarques : il existe dans le commerce de nombreux réactifs appropriés, dont les matériaux présentent des sensibilités différentes. Comme pour le TP, les temps de coagulation peuvent être influencés par l'utilisation d'un coagulomètre. Historiquement, la recherche a prouvé qu'il existait une grande variabilité dans les tests du TCA, comme l'ont montré les résultats variables provenant de différents réactifs ou coagulomètres et de l'analyse d'échantillons similaires dans différents laboratoires. Ces preuves incitent à la nécessité d'établir des plages de valeurs normales en local pour des coagulomètres et des réactifs de TCA spécifiques. Dans les plasmas à analyser, des taux élevés d'un facteur de coagulation peuvent compenser des taux plus faibles d'autres facteurs. Par exemple, un facteur VIII nettement élevé au cours d'une réaction de phase aiguë peut conduire à un TCA normal en présence de baisses des facteurs IX ou XI, ce qui pourrait être cliniquement important. Si un patient a des antécédents personnels ou familiaux

suggérant des troubles de la coagulation, un examen plus approfondi (y compris dosages de facteurs spécifiques) peut être justifié en présence d'un TCA normal, en particulier si le résultat se situe dans la partie supérieure de la plage de référence. La concentration de phospholipides varie considérablement d'un réactif à l'autre. C'est l'une des raisons pour lesquelles la sensibilité des réactifs à la présence d'anticoagulants de type lupique varie considérablement. Si un réactif sensible au lupus est utilisé pour le TCA initial, il est pertinent d'effectuer un second TCA avec un réactif tel qu'Actin FS (Dade Behring, Marbourg, Allemagne) dont la concentration en phospholipides est très élevée (Kitchen et al., 1999). Si l'allongement avec le premier réactif est dû à un anticoagulant de type lupique, le second TCA est presque toujours normal, car très peu d'anticoagulants de type lupique allongent le TCA lorsque le réactif Actin FS est utilisé.

Un TCA normal avec Actin FS, combiné à un TCA allongé initial, exclut normalement la présence d'un déficit en facteurs VIII, IX ou XI et, dans ce cas, il n'est pas nécessaire de procéder à des dosages des facteurs. Dans de rares circonstances, un TCA normal peut se produire avec n'importe quel réactif lorsque les facteurs IX ou XI sont légèrement réduits (30 à 50 U/dl) et que l'élévation du facteur VIII est prononcée. Le TCA avec Actin FS est souvent normal lorsque le facteur XII est plus faible dans la plage de 20 à 50 U/dl et que le TCA avec activation à base de kaolin ou de silice est légèrement élevé. Cette anomalie n'a aucune pertinence clinique. Quelques anticoagulants lupiques puissants allongent le TCA avec Actin FS. Les anticorps spécifiques contre le facteur VIII, IX ou XI allongent le TCA, quel que soit le réactif. Pour une discussion approfondie sur les questions liées à la détermination du TCA, se rapprocher du CLSI (2023).

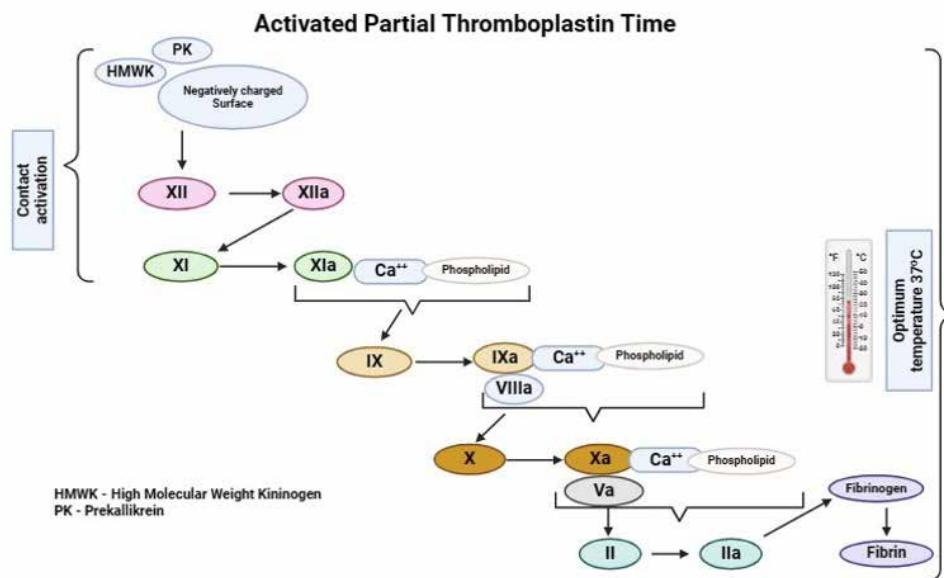


Figure 4. Voie mesurée par le TCA

Tests de mélange pour l'exploration approfondie de TP et de TCA allongés : les tests de mélange sont en grande partie effectués lorsque le TP ou le TCA initial est allongé et qu'il faut identifier la cause de cet allongement de manière à pratiquer d'autres tests et parvenir à un diagnostic. L'on a constaté que la réalisation et l'interprétation des tests de mélange sont très variables. Il est primordial d'avoir une bonne connaissance des déficits en facteurs et du comportement des inhibiteurs dans les tests de mélange, en plus des facteurs susceptibles d'en influencer la réalisation et l'interprétation (figure 5) (Favaloro, 2020 ; Adcock et al., 2023). Le plasma du patient et le PNP sont mélangés à parts égales (c.-à-d. 50:50) et le test précédemment allongé est réalisé sur ce mélange. Il convient d'avoir recours à des contrôles appropriés (PNP mélangé à du plasma contenant un inhibiteur et PNP mélangé à du plasma comportant un déficit factoriel). Il existe différentes méthodes d'interprétation et chaque laboratoire doit établir ses plages limites. Il doit par ailleurs établir les intervalles de référence normaux pour le TP et le TCA en fonction de la population locale de manière à parvenir à une interprétation fiable des résultats (Adcock et al., 2023).

Procédure :

- ✓ Mélanger des parts égales de PNP et de plasma du patient (50:50) et préparer le test précédemment allongé (le TCA sera appliqué dans ce cas).

Si le résultat de TCA obtenu à partir du mélange est corrigé par rapport au résultat de TCA allongé initial, d'autres tests de mélange peuvent être effectués pour identifier le facteur déficient. Un deuxième lot de tests de mélange peut être analysé avec un tube contenant un mélange de plasma du patient et de plasma déficient en facteur VIII à parts égales, et un deuxième tube contenant un mélange égal de plasma déficient en facteur IX et de plasma du patient. Le TCA est mesuré sur les deux mélanges. Le résultat de TCA qui présente une correction indique un déficit en facteur VIII ou IX (tableau 8).

Ces deux mélanges ne sont effectués que si les antécédents cliniques du patient suggèrent un déficit factoriel de la voie intrinsèque dans les laboratoires qui n'ont pas la capacité de réaliser des dosages de facteurs.

Interprétation des tests de mélange : si le TCA corrige de plus de 50 % la différence des temps de coagulation du plasma du patient et du plasma normal, il faut suspecter un déficit en facteurs, comme évoqué précédemment. Une correction plus faible suggère la présence d'un inhibiteur dirigé contre l'un des facteurs de la voie intrinsèque ou d'un inhibiteur de type non spécifique, comme l'anticoagulant lupique. Nous pouvons également utiliser le pourcentage de correction pour l'interprétation du test de mélange, comme cidessous.

$$(\%) \text{ Correction} = \frac{(\text{patient APTT} - \text{mix APTT})}{(\text{patient APTT} - \text{NPP APTT})} \times 100$$

Correction = la valeur en pourcentage est supérieure/égale au point limite local

Aucune correction = la valeur en pourcentage est inférieure à la valeur limite établie en local

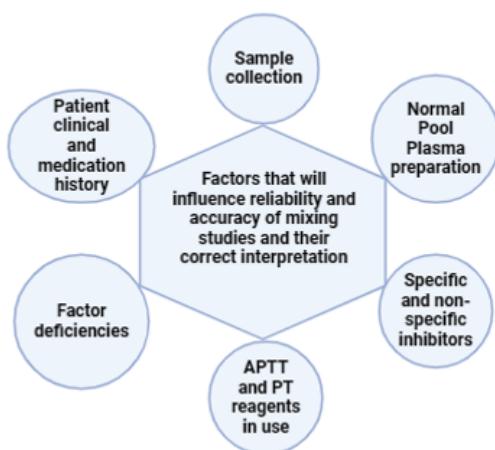


Figure 5. Schéma élaboré sur biorender.com à partir d'informations obtenues auprès d'Adcock et al. 2023

Comme le soulignent Adcock et al. (2023), plusieurs facteurs influencent l'exactitude des tests de mélange. Les antécédents cliniques et médicamenteux du patient constituent un facteur important. Parmi les autres facteurs importants, citons le respect des normes acceptées pour le prélèvement d'échantillons, d'éventuels antécédents de déficits en facteurs, le type de réactifs utilisés et leur sensibilité (en particulier aux déficits factoriels légers et aux inhibiteurs), l'établissement d'intervalles de référence normaux pour les tests de dépistage sur la base d'échantillons normaux de la population locale, la préparation du plasma

normal poolé et les taux de concentration des facteurs de coagulation (au moins 80 %), ainsi que la nature endogène ou exogène des inhibiteurs spécifiques ou non spécifiques. Une meilleure compréhension de ces facteurs améliorera la capacité des laboratoires à correctement interpréter les résultats des tests de mélange.

Plasma déficient en facteur VIII/IX pour étude de mélange : le plasma provenant de patients présentant un déficit sévère isolé en facteur VIII ou IX (< 1 UI/dl) est très utile pour les études mixtes. Le plasma sélectionné à cette fin doit avoir un TP normal, confirmant que les autres facteurs de coagulation synthétisés dans le foie sont susceptibles d'être à des taux normaux. Ces plasmas peuvent être lyophilisés pour une conservation à long terme ou stockés sous forme de plasma à -35 °C (minimum) pendant au moins trois mois. En utilisant des mélanges 50:50 d'additif et de plasma du patient, une anomalie peut être caractérisée. Dans les situations où il y a un allongement isolé du TCA, le plasma déficient en facteur VIII est préférable au plasma vieilli. De même, un plasma déficient en facteur IX est préférable au plasma adsorbé.

L'éthique impose d'obtenir le consentement éclairé du patient avant de prélever un échantillon pour les tests de mélange. De même, l'absence d'inhibiteur doit être établie avant le recueil d'échantillons.

Tableau 8. Schéma des résultats de tests de mélange en présence de déficits factoriels individuels

Déficit dans le plasma du patient	TCA	Déficit en FVIII	Déficit en FIX	Plasma normal
FVIII	anormal	non corr.	corr.	corr.
FIX	anormal	corr.	non corr.	corr.
FXI/FXII	anormal	corr.	corr.	corr.
Inhibiteur	anormal	non corr.	non corr.	non corr.

Déficit dans le plasma du patient	TP	TCA	Plasma normal
FII	anormal	anormal	corr.
FV	anormal	anormal	corr.
FVII	anormal	normal	corr.
FX	anormal	anormal	corr.

non corr. = aucune correction ; corr. = correction

Remarques : l'échantillon de coagulation doit contenir une numération plaquettaire < 10 × 10⁹/l pour fournir une teneur minimale en phospholipides et permettre la détection des anticoagulants de type lupique faibles (Toulon et al., 2016). Les études de mélange doivent uniquement être effectuées sur le plasma qui avait donné un résultat allongé. Si, pour une raison quelconque, un nouvel échantillon a été prélevé chez le patient, le test initial anormal doit être répété avant que le test de mélange ne soit effectué. Il convient de toujours procéder à la validation et la vérification de nouveaux réactifs avec de nouveaux numéros de lot pour s'assurer que la sensibilité des réactifs aux inhibiteurs et aux déficits factoriels reste dans la plage acceptable (Toulon et al., 2016). Tous les échantillons de coagulation doivent être prélevés comme décrit dans la partie 3 de ce manuel. Les plasmas contenant des inhibiteurs non spécifiques qui ont un effet sur le TCA (anticoagulant de type lupique p. ex.) ne présentent typiquement pas de correction ; cependant les plasmas qui contiennent un titrage d'inhibiteurs faible ou très faible peuvent être corrigés partiellement par du plasma normal.

Inhibiteurs spécifiques du facteur VIII : les inhibiteurs spécifiques du facteur VIII sont susceptibles d'être associés à l'absence de correction immédiate du TCA par ajout de plasma normal. Dans d'autres cas, l'ajout de plasma normal entraîne une correction immédiate, suivie d'un allongement du TCA dans le mélange au cours du temps. Un mélange composé de plasma du patient et de plasma normal peut être analysé après une heure passée à 37 °C, et le TCA peut être déterminé sur du plasma normal et du

plasma du patient incubés séparément pendant la même durée. Les inhibiteurs spécifiques contre d'autres facteurs de coagulation sont particulièrement rares, mais peuvent survenir. Il est impossible de faire des généralisations au sujet de leur comportement dans les expériences de mélange, à l'exception du fait que les inhibiteurs du facteur IX agissent rapidement de manière générale. La figure 6 montre l'effet sur le TCA lorsque du PNP à 20 et 50 % est ajouté à des échantillons de personnes atteintes d'hémophilie A acquise et présentant des anticorps antifacteur VIII. La limite supérieure de la plage normale pour cette méthode de TCA était de 37 secondes. Cet exemple illustre qu'en présence d'anticorps antifacteur VIII, il peut dans certains cas y avoir une correction complète dans un mélange 50:50 de plasma de patient et de plasma normal poolé. Si ces mélanges sont incubés à 37 °C, il y a un allongement progressif du TCA, puisque l'anticorps antifacteur VIII inhibe le facteur VIII. La méthode de Bethesda modifiée par Nijmegen est le test « de référence » pour la quantification des inhibiteurs présents dans un échantillon de plasma après un dépistage positif. La méthode chromogénique de Bethesda est le test privilégié pour évaluer les inhibiteurs chez les patients sous émicizumab, car l'on sait que les résultats du dépistage des inhibiteurs sur la base du TCA sont plus courts chez les patients sous émicizumab (Lowe et al., 2020). D'autres inhibiteurs des facteurs de coagulation (inhibiteurs du facteur Xa notamment) peuvent être détectés à l'aide d'un dosage de l'activité antifacteur Xa.

Tableau 9. Études de mélange dans l'hémophilie A acquise

Titre Bethesda (U/ml)	TCA (s)	TCA + plasma normal à 20 % (s)	TCA + plasma normal à 50 % (s)
1,0	210	137	77
1,1	83	52	38
2,0	82	43	34
6,6	107	51	37
8,4	150	55	39
21	145	62	48
23	123	127	55
120	69	50	38

Temps de coagulation de la thrombine : Le temps de coagulation de la thrombine (également appelé « temps de thrombine ») est utile pour identifier les anomalies fibrinogènes héréditaires ainsi que les anomalies quantitatives ou qualitatives acquises. L'on sait qu'il est très sensible à la présence d'héparine ou de médicaments, tels que les inhibiteurs directs de la thrombine ou IDT (Bonar et al., 2017). Il est le reflet de la réaction entre la thrombine et le fibrinogène. Il est allongé lorsque le taux de fibrinogène est très bas (inférieur à 1,0 g/l), en présence d'héparine, de substances analogues à l'héparine, d'IDT ou d'autres inhibiteurs (produits de dégradation du fibrinogène ou de la fibrine, etc.) et lorsque le fibrinogène est qualitativement anormal (dysfibrinogénémie), incluant à la fois les anomalies congénitales et acquises, secondaires à une atteinte hépatique (Mackie et al., 2024).

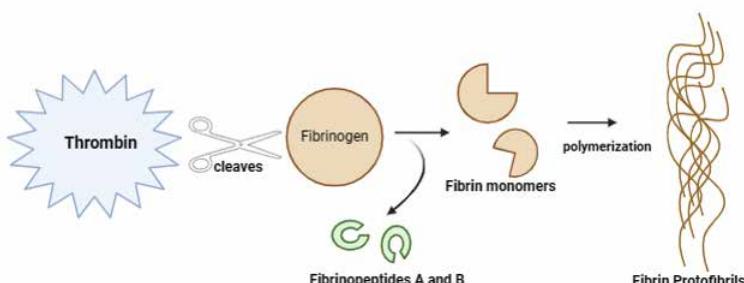


Figure 6. Schéma illustrant la conversion du fibrinogène en fibrine en présence de thrombine. Élaboré sur biorender.com

Réactifs :

- ✓ Solution de thrombine, qui provoque la coagulation de plasma normal en 15 secondes environ.
- ✓ Les solutions plus concentrées donnent des temps de coagulation plus courts, ce qui peut résulter en un résultat normal en présence d'anomalies légères.

Divers réactifs sont disponibles dans le commerce. Certains ont deux niveaux de dilutions du réactif avec le tampon, et une troisième concentration du réactif pour les échantillons à forte teneur en héparine suggérant un patient sous héparine thérapeutique. Comme toujours, il y a lieu de suivre les instructions du fabricant, et les plages de référence normales locales doivent être établies par le laboratoire.

Méthode : la méthode d'inclinaison manuelle du tube est décrite dans la partie 4 du présent manuel. Il convient de suivre les recommandations du fabricant du réactif.

Remarques : la concentration en thrombine à utiliser doit être celle qui donne un temps de coagulation d'environ 15 secondes avec du plasma normal poolé (contrôle). Pour de la thrombine concentrée, la diluer dans une solution saline à environ 10-15 U/ml, ou davantage au besoin, jusqu'à atteindre un temps de coagulation approprié pour le contrôle. Pour tous les réactifs du temps de thrombine disponibles dans le commerce, il convient de respecter les instructions du fabricant concernant la reconstitution, l'utilisation et la conservation. La solution de thrombine reconstituée peut être stockée à une température de -35 °C minimum et diluée avant d'être utilisée. La thrombine diluée se détériore à température ambiante. Du PNP servant de contrôle doit être inclus avec chaque série de tests. Les échantillons de plasma pour le temps de thrombine doivent être analysés dans les quatre heures suivant le prélèvement et dans les deux heures si la présence d'héparine est suspectée. Des taux élevés d'héparine dans l'échantillon entraîneront l'absence de formation d'un caillot. Cela est également possible avec certains IDT (dabigatran entre autres). Utiliser le temps de reptilase pour confirmer la présence d'IDT ou une contamination par l'héparine ou sa présence dans l'échantillon du patient. Les résultats du temps de thrombine varient en fonction du type de réactifs et de l'instrument de coagulation utilisé. Par conséquent, il est recommandé que chaque résultat soit communiqué au patient avec une plage de référence spécifique à ce réactif et à cet instrument.

Temps de thrombine en présence de sulfate de protamine pour détecter la présence d'héparine : la présence d'HNF peut causer un allongement du temps de thrombine. Les plus grandes chaînes d'héparine, qui allongent le temps de thrombine, peuvent être neutralisées par adjonction de sulfate de protamine. Le sulfate de protamine est disponible dans de nombreuses pharmacies hospitalières, où il est utilisé comme agent thérapeutique pour neutraliser l'effet de l'héparine. La concentration du médicament dans les préparations thérapeutiques est normalement beaucoup plus élevée que ce qui est utile pour les analyses biologiques. Par conséquent, le cas échéant, le médicament doit être dilué dans une solution saline de façon à atteindre une concentration de 40 mg% et obtenir la solution de travail. La solution de travail de thrombine avec sulfate de protamine est préparée en mélangeant neuf parts de réactif à une part de sulfate de protamine 40 mg%. Celle-ci est ensuite utilisée à la place de la solution de thrombine. Un contrôle normal doit être analysé. Si le temps de thrombine d'un échantillon est allongé, mais se corrige à moins de deux secondes du résultat de contrôle, la présence de l'héparine est confirmée.

Réactifs (Hogwood et al., 2017) :

- ✓ Tampon barbital pH 7,4 (Fritsma, 2019)
- ✓ Solution de travail de sulfate de protamine – utiliser 5 ml de sulfate de protamine 10 mg/ml pour préparer une dilution 1/20 à l'aide de tampon barbital. Des dilutions en série à différentes concentrations de sulfate de protamine peuvent être préparées à partir de cette solution. Elles restent stables lorsqu'elles sont stockées à 4 °C.
- ✓ PPP du patient
- ✓ Thrombine

Méthode :

- ✓ Effectuer une dilution en série de sulfate de protamine dans du tampon barbital.
- ✓ Préparer de la thrombine diluée à l'aide de tampon barbital. L'ajout de 100 µl de thrombine diluée à 200 µl de plasma du patient dans un tampon à 37 °C devrait permettre la formation d'un caillot à 10 secondes.

Interprétation : si le caillot se forme dans les 10 secondes, il n'y a pas d'HNF dans le plasma du patient. Si le temps est allongé, le plasma du patient contient de l'HNF. Le plasma du patient est mélangé avec du sulfate de protamine dilué et le test est répété. L'objectif est de mesurer le temps de thrombine sur différentes dilutions de plasma du patient et sulfate de protamine qui permettent la formation d'un caillot dans une plage normale.

Temps de reptilase : la reptilase est un venin provenant du faux crotal ou grage commun (*Bothrops atrox*). Il s'agit d'une enzyme ressemblant à la thrombine, appelée « batroxobine », qui agit par clivage du fibrinogène pour former le fibrinopeptide A, ce qui entraîne la formation d'un monomère de fibrine et d'un caillot par polymérisation. Cette enzyme n'est pas inhibée par les antithrombines et n'est donc pas affectée par la présence d'héparine ou d'IDT. Par conséquent, elle peut être utilisée pour évaluer le taux de conversion du fibrinogène en fibrine en présence d'héparine et d'IDT (Mackie et al., 2024). Il est pertinent de vérifier si un temps de thrombine allongé est dû à la présence d'héparine ou d'IDT dans l'échantillon. Si le temps de thrombine est allongé et que le temps de reptilase est normal, la cause la plus probable sera la présence d'héparine ou d'IDT. En cas de dysfibrinogénémie, le temps de reptilase peut être plus sensible (c'est-à-dire plus long) que le temps de thrombine. La reptilase ajoutée au plasma du patient (PPP) fournit de la batroxobine qui clive le fibrinogène, libérant le fibrinopeptide A pour former un monomère de fibrine avec formation de caillots après polymérisation (Karapetian, 2013).

Réactifs : reptilase (Sigma Aldrich, code V5375) dissoute à une concentration de 25 mg dans 15 ml de tampon d'Owren. Ce venin à l'état brut est dangereux et il faut faire attention de ne pas inhaller la poudre. Le technicien doit porter des gants et un masque lorsqu'il manipule le venin brut. La solution mère doit être conservée congélée à -70 °C en aliquotes de 0,5 ml. Elle est stable pendant au moins deux ans dans ces conditions. Afin de préparer un réactif prêt à l'emploi, décongeler et diluer une part de la solution mère dans 10 parts de tampon d'Owren. Aliquoter et recongeler à -70 °C pour usage ultérieur. Ce réactif prêt à l'emploi est stable pendant au moins trois mois dans ces conditions. Les aliquotes congélées prêtes à l'emploi doivent être décongelées dans un bain-marie à 37 °C pendant au moins trois minutes. Cette solution est ensuite stable pendant au moins 12 heures à la température du laboratoire (20 à 25 °C). Il existe diverses préparations de batroxobine disponibles dans le commerce.

Méthode :

- ✓ Effectuer tous les tests en double.
- ✓ Placer un nombre suffisant de tubes de coagulation en verre de 75 × 10 mm dans un bain-marie à 37 °C (deux par patient, plus deux pour le contrôle).
- ✓ Pipeter 0,3 ml de plasma (contrôle ou patient) dans des tubes de coagulation préchauffés.
- ✓ Chauffer pendant une à deux minutes.
- ✓ Ajouter 0,1 ml de dilution de reptilase et enclencher le chronomètre.
- ✓ Incliner à trois reprises pour mélanger, puis à trois autres reprises toutes les cinq secondes jusqu'à la formation d'un caillot.
- ✓ Noter le temps de coagulation.
- ✓ Le temps du contrôle doit être entre 15 et 18 secondes. (S'il est plus court, ajuster en diluant davantage le réactif de reptilase avec du tampon d'Owren.)
- ✓ Si aucune coagulation ne se produit, noter le résultat comme > 90 secondes.

Plage normale : le temps du patient doit se situer à trois secondes près du temps du contrôle. Les deux temps doivent être communiqués.

Interprétation : l'interprétation du temps de thrombine et du temps de reptilase allongés est présentée au tableau 10.

Tableau 10. Interprétation du temps de thrombine allongé

Temps de thrombine	Temps de reptilase	Cause	Commentaires
Allongé	Également allongé	Hypo- ou afibrinogénémie	Mesurer le fibrinogène
Allongé	Fortement allongé	Dysfibrinogénémie	Congénitale ou acquise
Allongé	Normal	Héparine	
Allongé	Légèrement allongé	Héparine et une certaine hypo- ou dysfibrinogénémie	De rares cas de dysfibrinogé-némie peuvent donner ce résultat
Allongé	Également allongé	Coagulation intravasculaire disséminée (CIVD)	Mesurer les D-dimères
Allongé	Normal	Inhibiteurs directs de la thrombine	

Remarque : des réactifs pour le temps de reptilase sont proposés par plusieurs fabricants sous forme de concentré prêt à l'emploi. L'avantage de ceux-ci est qu'ils éliminent le besoin de manipuler le venin brut, qui comporte des risques pour la santé et la sécurité. Si l'un de ces produits est utilisé, suivre les instructions du fabricant. Comme la reptilase est un réactif coûteux, il est possible de faire appel à la méthode de neutralisation de la protamine/temps de thrombine pour confirmer la présence d'héparine dans l'échantillon à tester.

Fibrinogène (dosage de Clauss modifié) : des dilutions d'un plasma normal de référence dont la teneur en fibrinogène est connue sont préparées avec une solution tampon glyoxaline. Mesurer le temps de coagulation après adjonction de thrombine et tracer un graphique. Le temps de coagulation est proportionnel à la concentration en fibrinogène et la dilution 1/10 est considérée comme représentant la valeur de la préparation standard. Le plasma à tester est dilué à 1/10, et le résultat est lu à partir de la courbe de référence.

Réactifs :

- ✓ Plasma de référence dont la concentration en fibrinogène est connue
- ✓ Concentration élevée de thrombine de 100 à 200 U/ml (la concentration peut varier en fonction de la source)
- ✓ Tampon imidazole (glyoxaline) ou tampon d'Owren pH 7,35

Méthode : la technique d'inclinaison manuelle du tube est décrite dans la partie 4 de ce manuel. Il convient de suivre les recommandations du fabricant du réactif.

Ce test n'est pas affecté par l'héparine aux doses utilisées dans le traitement de la thrombo-embolie veineuse. L'utilisation d'une concentration plus élevée de thrombine est censée neutraliser l'effet de fortes concentrations de HNF sur la thrombine, telles que celles appliquées dans le pontage cardiopulmonaire permettant la formation de caillots. Il convient cependant de faire preuve de prudence lors de l'interprétation des résultats chez ces patients, car des temps de coagulation allongés peuvent être observés, ce qui entraîne une sous-estimation du taux de fibrinogène, à moins que le réactif ne contienne des agents neutralisant l'héparine. L'effet des IDT dépendra fortement de leur concentration dans le plasma

du patient et du type de réactifs utilisés. Les IDT dans la plage thérapeutique n'affectent pas la thrombine à forte concentration utilisée dans le dosage de Clauss (Mackie et al., 2024).

Données d'étalonnage types :

(Remarque : une courbe d'étalonnage doit être établie avec les réactifs utilisés en local.)

Plasma de référence : fibrinogène 2,1 g/l

Tableau 11. Exemple d'étalonnage du fibrinogène

Dilution de l'étalon	Concentration de fibrinogène (g/l)	Temps de coagulation (s)
1/5	4,2	8,5
1/10	2,1	14
1/15	1,4	19,5
1/20	1,05	24,5

Exemples :

Plasma à tester 1 : dilué à raison de 1 partie pour 10, temps de coagulation de 15 secondes

fibrinogène = 1,9 g/l (lu sur le graphique de l'étalonnage)

Plasma à tester 2 : dilué à raison de 1 partie pour 5, temps de coagulation de 16 secondes

fibrinogène = 1,8 g/l lu sur le graphique de l'étalonnage \times 5/10 (puisque dilution 1/5 au lieu de 1/10)

= 0,9 g/l

Remarques sur le dosage de Clauss : le taux de fibrinogène peut être sous-estimé en présence de concentrations élevées de fibrine/produits de dégradation du fibrinogène. Il est donc conseillé de soigneusement interpréter les résultats en cas de suspicion. Il y a lieu d'éviter le prélèvement d'échantillons de sang de coagulation à partir de dispositifs veineux ou artériels contaminés par l'héparine afin d'exclure toute possibilité d'interférence de l'héparine dans les résultats obtenus. Les échantillons provenant de patients recevant des doses élevées d'HNF doivent être évités lors de la quantification des taux de fibrinogène afin d'éviter l'obtention de résultats faussement faibles.

Test de fibrinogène dérivé du TP : un certain nombre d'analyseurs de coagulation peuvent estimer le taux de fibrinogène lors de la détermination du temps de prothrombine. Cela est possible puisque la pente de la diffusion ou de la transmission de la lumière lors de la formation d'un caillot est proportionnelle à la concentration initiale de fibrinogène. Ces méthodes sont couramment appelées « fibrinogène dérivé du temps de prothrombine », et la plupart comportent des limites. En particulier, les résultats obtenus sont souvent beaucoup plus élevés que ceux obtenus par un dosage de Clauss lorsque les taux de fibrinogène sont très faibles (< 1,5 g/l) ou élevés (plus de 5 g/l). Les résultats sont généralement normaux en présence de dysfibrinogénémie (Mackie et al., 2024 ; Miesbach et al., 2010). Il existe des méthodes de Clauss pour la détermination de fibrinogène sur du plasma non dilué, mais les résultats ne sont pas les mêmes que ceux obtenus avec le test de Clauss sur du plasma dilué (Jennings et al., 2009).

Facteurs qui affectent l'utilisation du fibrinogène dérivé du TP : pour les patients sous anticoagulothérapie, il est conseillé de ne pas utiliser l'estimation du fibrinogène dérivé du TP pour quantifier les taux de fibrinogène. Certains anticoagulants oraux affectent la production de thrombine, en réduisant en fin de compte la production et provoquant la formation de fibrilles épaisse détectées comme une turbidité dans l'échantillon par les capteurs optiques et relayées comme une augmentation du fibrinogène (Chitolie et al., 1994). Il y a eu des cas de patients atteints d'hypodysfibrinogénémie identifiés comme ayant un

fibrinogène dérivé du TP normal alors que ces taux étaient en fait faibles lorsqu'ils étaient mesurés selon la méthode de Clauss (Chitolie et al., 1994). La turbidité du plasma de référence conduit à des estimations plus élevées des taux de fibrinogène. En outre, le plasma lipémique et trouble d'un patient peut conduire à une estimation élevée erronée du fibrinogène. Ces taux inexacts peuvent être observés en cas de maladies sévères chroniques. Sur la base des lignes directrices internationales en vigueur pour la quantification du fibrinogène, la méthode de Clauss est recommandée. De plus, en raison des inexactitudes associées au fibrinogène dérivé du TP, il ne faut pas l'utiliser pour le dépistage des déficits en fibrinogène, ni chez les patients dont on sait qu'ils sont sous anticoagulothérapie, et les résultats doivent être interprétés avec beaucoup de vigilance.

Élimination de l'héparine du plasma : l'héparinase 1 (le composant actif d'Hepzyme®) est spécifique de l'héparine, dont elle clive les molécules en plusieurs endroits, ce qui produit des oligosaccharides qui ont perdu leurs propriétés antithrombotiques. Hepzyme® est une héparinase 1 bactérienne purifiée, produite dans *Flavobacterium heparinum*. Elle peut éliminer jusqu'à 2 UI d'héparine par millilitre présent dans le plasma. Hepzyme® peut servir à neutraliser l'effet de l'héparine dans un échantillon, de sorte que la coagulation de base puisse être évaluée. On y a en particulier recours dans les cas de contamination à l'héparine (Forte et Abshire, 2000).

Réactifs :

- ✓ Hepzyme®, un flacon contenant une préparation sèche d'héparinase 1 avec stabilisants
- ✓ Fabricant : Dade Behring
- ✓ Conservation : 4 °C
- ✓ Stabilité : voir la date de péremption du fabricant. Chaque flacon ne peut être utilisé que pour un seul patient.

Méthode :

- ✓ Ajouter 1,0 ml de plasma citraté pauvre en plaquettes dans un flacon d'Hepzyme®.
- ✓ Reboucher et retourner délicatement 5 à 10 reprises.
- ✓ Laisser à température ambiante pendant 15 minutes.
- ✓ Transférer dans un récipient en plastique de 2 ml et attendre quelques instants que les bulles disparaissent.
- ✓ Placer sur l'appareil CA1500 et procéder à l'analyse.

Le temps de thrombine doit être inclus pour confirmer que l'héparine a intégralement été éliminée. Les analyses doivent être pratiquées dès que possible (c'est-à-dire conformément aux lignes directrices pour cette procédure).

Interprétation : cette enzyme n'élimine aucun facteur de coagulation (contrairement à certaines autres techniques d'élimination de l'héparine), donc tout raccourcissement conséquent du temps de coagulation dans le TCA, le temps de thrombine ou le TP après le traitement par Hepzyme® indique la présence d'héparine. L'héparine non fractionnée et l'héparine de bas poids moléculaire sont toutes deux dégradées par cette enzyme.

Références

- Adcock DM, Gosselin RC. The danger of relying on the APTT and PT in patients on DOAC therapy, a potential patient safety issue. *Int J Lab Hematol* 2017; 39 Suppl 1: 37-40.
- Adcock DM, Moore GW, Montalvão SL, Kershaw G, Gosselin RC. Activated partial thromboplastin time and prothrombin time mixing studies: Current state of the art. *Semin Thromb Hemost* 2023; 49(6): 571-579.
- Baglin T, Luddington R. Reliability of delayed INR determination: Implications for decentralized anticoagulant care with off-site blood sampling. *Br J Haematol* 1997; 96(3): 431-434.
- Bonar RA, Lippi G, Favaloro EJ. Overview of Hemostasis and Thrombosis and Contribution of Laboratory Testing to Diagnosis and Management of Hemostasis and Thrombosis Disorders. In: Favaloro EJ, Lippi G, eds. *Hemostasis and Thrombosis: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer New York; 2017: 3-27.
- Bourguignon A, Tasneem S, Hayward CP. Screening and diagnosis of inherited platelet disorders. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2022; 59(6): 405-444.
- Chitolie A, Mackie IJ, Grant D, Hamilton JL, Machin SM. Inaccuracy of the 'derived' fibrinogen measurement. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994; 5(6): 955-957.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. One-stage prothrombin time (PT) test and activated partial thromboplastin time (APTT) test, 3rd edition. CLSI standard H47. 2023. <https://clsi.org/standards/products/hematology/documents/h47>.
- Dorgalaleh A, Favaloro EJ, Bahraini M, Rad F. Standardization of prothrombin time/international normalized ratio (PT/INR). *Int J Lab Hematol* 2021; 43(1): 21-28.
- Favaloro EJ. Coagulation mixing studies: Utility, algorithmic strategies and limitations for lupus anticoagulant testing or follow up of abnormal coagulation tests. *Am J Hematol* 2020; 95(1): 117-128.
- Favaloro EJ. Optimizing the verification of mean normal prothrombin time (MNPT) and international sensitivity index (ISI) for accurate conversion of prothrombin time (PT) to international normalized ratio (INR). *Methods Mol Biol* 2017; 1646: 59-74.
- Forte K, Abshire T. The use of hezyme in removing heparin from blood samples drawn from central venous access devices. *J Pediatr Oncol Nurs* 2000; 17(3): 179-181.
- Fritsma GA. Antithrombotic Therapies and Their Laboratory Assessment. In: Rodak's Hematology: Clinical Principles and Applications. 2019: 746-764.
- Hogwood J, Mulloy B, Gray E. Precipitation and neutralization of heparin from different sources by protamine sulfate. *Pharmaceuticals (Basel)* 2017; 10(3): 59.
- International Organization for Standardization (ISO). ISO 15189:2022(en) Medical laboratories — Requirements for quality and competence. <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:15189:ed-4:v1:en>. Accessed March 23, 2025.
- Jennings I, Kitchen DP, Woods T, Kitchen S, Walker ID. Differences between multifibrin U and conventional Clauss fibrinogen assays: Data from UK National External Quality Assessment Scheme surveys. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2009; 20(5): 388-390.
- Karapetian H. Reptilase time (RT). *Methods Mol Biol* 2013; 992: 273-277.
- Kitchen S, Adcock DM, Dauer R, Kristoffersen AH, Lippi G, Mackie I, Marlar RA, Nair S. International Council for Standardisation in Haematology (ICSH) recommendations for collection of blood samples for coagulation testing. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(4): 571-580.
- Kitchen S, Cartwright I, Woods TA, Jennings I, Preston FE. Lipid composition of seven APTT reagents in relation to heparin sensitivity. *Br J Haematol* 1999; 106(3): 801-808.
- Kitchen S, Malia RG, Preston FE. A comparison of methods for the measurement of activated factor VII. *Thromb Haemost* 1992; 68(3): 301-305.
- Lowe A, Kitchen S, Jennings I, Kitchen DP, Woods TAL, Walker ID. Effects of emicizumab on APTT, FVIII assays and FVIII inhibitor assays using different reagents: Results of a UK NEQAS proficiency testing exercise. *Haemophilia* 2020; 26(6): 1087-1091.

- Mackie I, Casini A, Pieters M, Pruthi R, Reilly-Stitt C, Suzuki A. International Council for Standardisation in Haematology recommendations on fibrinogen assays, thrombin clotting time and related tests in the investigation of bleeding disorders. *Int J Lab Hematol* 2024; 46(1): 20-32.
- Mackie IJ, Kitchen S, Machin SJ, Lowe GD. Guidelines on fibrinogen assays. *Br J Haematol* 2003; 121(3): 396-404.
- Maier CL, Sniecinski RM. Anticoagulation monitoring for perioperative physicians. *Anesthesiology* 2021; 135(4): 738-748.
- Mielke CH. Measurement of the bleeding time. *Thromb Haemost* 1984; 52(2): 210-211.
- Miesbach W, Schenk J, Alesci S, Lindhoff-Last E. Comparison of the fibrinogen Clauss assay and the fibrinogen PT derived method in patients with dysfibrinogenemia. *Thromb Res* 2010; 126(6): e428-433.
- Miller CH. Laboratory testing for factor VIII and IX inhibitors in haemophilia: A review. *Haemophilia* 2018; 24(2): 186-197.
- Pipe SW. Functional roles of the factor VIII b domain. *Haemophilia* 2009; 15(6): 1187-1196.
- Practical-Haemostasis.com. Protamine sulphate neutralization test. <https://practical-haemostasis.com/>. Accessed March 23, 2025.
- Rodgers RPC, Levin J. A critical reappraisal of the bleeding time. *Semin Thromb Hemost* 2024; 50(3): 499-516.
- Russeau AP, Vall H, Manna B. Bleeding Time. [Updated 2023 Aug 8]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/books/NBK537233/>. Accessed March 23, 2025.
- Toulon P, Eloit Y, Smahi M, Sigaud C, Jambou D, Fischer F, Appert-Flory A. In vitro sensitivity of different activated partial thromboplastin time reagents to mild clotting factor deficiencies. *Int J Lab Hematol* 2016; 38(4): 389-396.
- Undas A. The bleeding time test in 2024: A glorious past and current challenges. *Semin Thromb Hemost* 2024; 50(3): 517-519.
- Vandiver JW, Vondracek TG. Antifactor Xa levels versus activated partial thromboplastin time for monitoring unfractionated heparin. *Pharmacotherapy* 2012; 32(6): 546-558.
- Vinholt PJ. The role of platelets in bleeding in patients with thrombocytopenia and hematological disease. *Clin Chem Lab Med* 2019; 57(12): 1808-1817.
- Williams B, Lin Z, Pittet JF, Chao W. Sepsis-induced coagulopathy: a comprehensive narrative review of pathophysiology, clinical presentation, diagnosis, and management strategies. *Anesth Analg* 2024; 138(4): 696-711.

SUJETS ABORDÉS

- ✓ Dosage des facteurs VIII et IX : méthodes en un temps et chromogéniques
- ✓ Dosages de facteurs sur des analyseurs dont le logiciel n'utilise qu'une dilution
- ✓ Anticorps bispécifiques
- ✓ Surveillance suivant l'injection de facteur VIII ou IX
- ✓ Thérapie génique
- ✓ Considérations biologiques pour le traitement par rééquilibrage de l'hémostase

Dosage des facteurs VIII et IX : méthodes en un temps et chromogéniques. Le diagnostic de l'hémophilie A ou B établi en laboratoire repose sur la mesure de l'activité des facteurs de la coagulation (Srivastava et al., 2020). La méthodologie la plus couramment utilisée est le dosage en un temps sur la base du TCA. Est décrit dans cette section le dosage en un temps de l'activité du facteur VIII. Celui-ci s'appuie sur la comparaison de la capacité des dilutions d'un plasma de référence et du plasma d'un patient à corriger le TCA d'un plasma totalement déficient en facteur VIII, mais contenant tous les autres facteurs nécessaires à une coagulation normale. Pour les facteurs IX, XI et XII, le dosage est essentiellement le même et réalisé en remplaçant le plasma déficient en facteur VIII par un plasma déficient dans le facteur que l'on veut doser. Dans tous les cas, il faut un plasma étalon (Baker et al., 2020). Il est impossible de procéder à un dosage en un temps du facteur VIII ou IX en présence d'anticorps bispécifiques tels que l'émicizumab (Jenkins et al., 2020).

Réactifs :

- ✓ Plasma à tester citraté pauvre en plaquettes
- ✓ Plasma étalon (de référence)

Le plasma étalon (de référence) utilisé doit être soit un pool de plasma préparé en local et conservé à une température de -70 °C au minimum, soit un plasma du commerce. Dans un cas comme dans l'autre, ce plasma doit être calibré par rapport à l'étalon de référence international pour le facteur VIII ou IX dans le plasma. Il n'est pas acceptable de présumer qu'un plasma normal poolé contient 100 UI/dl de facteur.

- ✓ Plasma de contrôle interne de qualité (CLSI, 2016)
- ✓ Plasma déficient en facteur VIII

Ce type de plasma est disponible dans le commerce ou peut être recueilli auprès d'une personne donneuse hémophile dans les conditions suivantes :

- ✓ Taux inférieur à 1 UI/dl
- ✓ Pas d'antécédents d'anticorps antifacteur VIII
- ✓ Aucun traitement pendant deux semaines, y compris par facteur à demi-vie prolongée (DVP) ou par anticorps bispécifiques
- ✓ Bilan hépatique normal

Une fonction hépatique anormale pourrait entraîner une réduction des autres facteurs de coagulation, ce qui nuit à la spécificité du dosage. Ce plasma peut être conservé en aliquotes à -20 °C au minimum

pendant un mois environ (Woodhams et al., 2001 ; Zhao et al., 2018). Il est préférable d'utiliser du plasma déficient en facteur VIII/IX produit par immunodéplétion du facteur VIII ou IX d'un plasma normal au moyen d'un anticorps monoclonal. Ce type de produit est disponible dans le commerce et présente l'avantage d'améliorer la sécurité virologique par rapport au plasma provenant de patients atteints d'hémophilie qui ont été traités avec des produits issus du plasma. Toutefois, tous les plasmas immunodéplétés n'ont pas < 1 UI/dl de facteur et il faut prendre soin de le vérifier avant utilisation. Certains experts estiment que la présence de concentrations normales de FW dans le plasma déficient en facteur VIII/IX peut être un avantage, et des preuves étaient ceci par rapport aux dosages effectués dans le cadre de la détermination des inhibiteurs (Verbruggen et al., 2001).

- ✓ Réactif pour la détermination du TCA sensible aux déficits en facteurs (CLSI, 2016)
- ✓ Solution tampon saline d'Owren (TSO ou glyoxaline ; voir la section sur les réactifs)
- ✓ CaCl₂ 25 mM (à noter que le CaCl₂ Werfen fourni avec Synthasil est à 20 mM)

Méthode :

- ✓ Préparer dans des tubes en plastique des dilutions 1/10 des plasmas de référence, de CQ et du patient dans une solution tampon saline. (Commencer par une dilution 1/5 s'il est prévu que le plasma du patient aura une très faible teneur en facteur VIII.)
- ✓ En utilisant des volumes de 0,2 ml, dans des tubes en plastique, préparer dans de la solution TSO des dilutions géométriques de plasma de référence, de CQ et à tester allant de 1/10 à 1/40. (Bien mélanger chaque dilution avant de faire le transfert vers le tube suivant.) Les dilutions de plasmas doivent être analysées immédiatement après leur préparation. Si la température du laboratoire dépasse 25 °C, il peut être nécessaire de conserver les dilutions sur de la glace fondante avant de procéder à l'analyse.
- ✓ Pipeter 0,1 ml de chaque dilution du plasma de référence dans un tube en verre de 75 × 10 mm.
- ✓ Ajouter 0,1 ml de plasma déficient en facteur VIII et transférer le tube dans un bain-marie à 37 °C.
- ✓ Ajouter 0,1 ml de réactif de TCA et incuber pendant cinq minutes.
- ✓ Une fois les cinq minutes écoulées, ajouter 0,1 ml de CaCl₂ et noter le temps de coagulation.
- ✓ Un blanc doit aussi être préparé en utilisant 0,1 ml de TSO à la place du plasma à tester.

Le temps de coagulation du blanc doit être supérieur au temps correspondant à un taux de 1 % d'activité en facteur VIII de l'étalon selon le graphique de l'étalonnage. Si le temps obtenu lui est inférieur, ceci indique que le plasma déficient n'est pas entièrement déficient en facteur VIII et par conséquent ne convient pas.

Résultats : la courbe d'étalonnage doit être tracée sur du papier log/log ou du papier log/linéaire. Une valeur de 100 % est arbitrairement assignée à la dilution 1/10, une valeur de 50 % à la dilution 1/20 et une valeur de 25 % à celle de 1/40. La dilution 1/5, si elle est utilisée, a une valeur de 200 %. On doit obtenir des lignes droites, parallèles entre elles. Lire la concentration de l'échantillon à tester comme indiqué à la figure 7. Dans cet exemple, la concentration en facteur VIII dans l'échantillon à tester est de 7 % de celle de l'étalon. Si l'étalon a une concentration en facteur VIII de 85 UI/dl, l'échantillon à tester a une concentration de $85 \text{ UI/dl} \times 7\% = 6 \text{ UI/dl}$. Si les droites ne sont pas parallèles, le dosage doit être répété. Des droites non parallèles peuvent résulter d'erreurs techniques. Si l'erreur technique est exclue, il est possible que ces droites soient dues à la présence d'un inhibiteur qui peut agir spécifiquement contre le facteur VIII, ou qui peut être de « type lupique », donnant une image convergente. Des droites divergentes sont typiques d'un échantillon activé ou de la présence d'un AOD (Baker et al., 2020).

Remarques : si la concentration en facteur VIII (ou facteur IX) dans le plasma à tester est proche de zéro (c'est-à-dire que les temps de coagulation de toutes les dilutions sont semblables à celui du blanc), des droites non parallèles peuvent être obtenues. La présence d'anticoagulant de type lupique peut interférer avec les phospholipides dans les réactifs de TCA et produire des dosages de facteurs non parallèles (Ruinemans-Koerts et al., 2001). La plage normale doit être établie localement, mais a souvent une limite inférieure comprise entre 50 et 65 UI/dl pour les facteurs VIII et IX. La surveillance fiable de certains

produits à demi-vie prolongée par un dosage en un temps peut être affectée par le réactif de TCA utilisé (Gray et al., 2020). Voir la partie 6 sur la demi-vie prolongée. Les dosages en un temps du facteur VIII ou IX ne peuvent pas être effectués en présence d'anticorps bispécifiques tels que l'émicizumab. Ces médicaments raccourcissent artificiellement le TCA. Un temps de coagulation court dans un dosage en un temps correspond à une forte activité des facteurs de la coagulation (Jenkins et al., 2020 ; Bowyer et al., 2020 ; Bowyer et al., 2023). Voir la partie 6 sur les anticorps bispécifiques. Une divergence du dosage chromogénique en un temps du facteur VIII a été décrite dans l'hémophilie A mineure dans certaines régions, et rarement dans l'hémophilie B mineure (Pouplard et al., 2009). Si cela est possible, un nouveau diagnostic d'hémophilie mineure devrait s'accompagner de la mesure de FVIII:C ou FIX:C par le test chromogénique (Bowyer et al., 2018). Les dosages en un temps du facteur VIII peuvent servir à mesurer le traitement par facteur VIII porcin recombinant (Bowyer et al., 2022). Il a été rapporté qu'une mutation du facteur IX, FIX Padoue (p.R338L), aurait une activité huit fois plus élevée que l'antigène (Simioni et al., 2009).

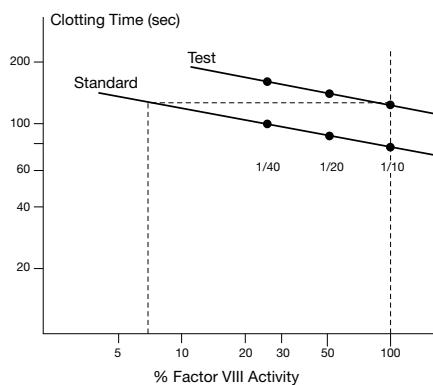


Figure 7. Graphique du dosage du facteur VIII

Les échantillons à tester doivent être analysés à l'aide de trois dilutions différentes, comme décrit ci-dessus. Il s'agit d'une recommandation systématique des lignes directrices nationales et internationales publiées, y compris celles de la FMH. Cela améliore à la fois l'exactitude et la fidélité du dosage par rapport au recours à une simple dilution de l'échantillon à tester. Les dosages des facteurs sont parfois effectués sur des analyseurs dont le logiciel est conçu pour tester une seule dilution. La section suivante décrit une méthode pouvant servir à inclure trois dilutions sur ce type d'analyseurs.

Réalisation de dosages de facteurs sur des analyseurs dont le logiciel utilise une seule dilution de l'échantillon à tester : la FMH recommande que les dosages en un temps basés sur le TCA pour les facteurs VIII et IX soient effectués à l'aide de trois dilutions différentes de l'échantillon à tester. Cela est décrit dans le document suivant :

Lignes directrices de la FMH pour la prise en charge de l'hémophilie, 3^e édition. Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, Kitchen S, Sutherland M, Pipe SW, Carcao M, Mahlangu J, Ragni MV, Windyga J, Llinás A, Goddard NJ, Mohan R, Poonnoose PM, Feldman BM, Lewis SZ, van den Berg HM, Pierce GF ; chapitre 3 : Diagnostic et contrôle en laboratoire. Steve Kitchen, Francisco de Paula Careta, Silmara A de Lima Montalvao, Emna Gouider, Radoslaw Kaczmarek, Claude T. Tagny, Pierre Toulon, Glenn F. Pierce, Alok Srivastava. Haemophilia 2020; 26 (Suppl 1): 35-48.

Le document complet est disponible en téléchargement gratuit sur le site Web de la FMH via le lien suivant :

[Lignes directrices de la FMH pour la prise en charge de l'hémophilie - Plateforme d'apprentissage en ligne \(wfh.org\)](https://www.wfh.org)

Le texte suivant est repris des lignes directrices de la FMH :

Recommandation : Pour l'examen en laboratoire en raison d'une suspicion clinique d'hémophilie en utilisant des dosages de facteur VIII ou IX en un temps, la FMH recommande au moins trois dilutions différentes du plasma de référence et de l'échantillon test en cours d'analyse.

REMARQUE : les résultats des dilutions du plasma de référence et de l'échantillon test doivent être comparés par analyse parallèle. Une des façons de procéder est de calculer le coefficient de variation (CV) des trois résultats en utilisant l'équation suivante : $CV = ([\text{écart type}/\text{moyenne}] \times 100)$. Si le coefficient de variation est inférieur à 15 %, il faut alors indiquer la moyenne des trois résultats. Si le coefficient est supérieur à 15 %, il convient d'examiner minutieusement les résultats. La présence d'inhibiteurs pathologiques des facteurs de coagulation ou d'anticoagulants de type lupique peut interférer avec certains dosages de facteur VIII ou IX en un temps. Certains anticoagulants thérapeutiques peuvent également interférer. Dans tous les cas, l'activité des facteurs augmente au cours du test au fur et à mesure de la dilution du plasma. L'activité du facteur est sous-estimée lorsque le plasma est moins dilué, et un résultat d'activité plus précis est obtenu lorsque le plasma test est plus dilué.

Les principes ci-dessus doivent également être appliqués aux dosages en un temps d'autres facteurs de coagulation (c.-à-d. FII, FV, FVII, FX, FXI et FXII). Certains analyseurs sont dotés d'un logiciel qui permet plusieurs dilutions de l'échantillon à tester. Ainsi, l'échantillon à tester est présenté pour analyse et l'analyseur établit les différentes dilutions, procède à l'analyse et calcule l'activité du facteur de coagulation concerné. D'autres analyseurs disposent d'un logiciel qui ne permet qu'une seule dilution de l'échantillon. Sur ces analyseurs, il est possible d'utiliser la procédure ci-dessous afin de respecter les recommandations de la FMH et d'améliorer l'exactitude et la fidélité.

Les exemples donnés concernent les dosages du facteur VIII, mais peuvent être utilisés pour des dosages en un temps d'autres facteurs.

- ✓ Les échantillons à tester sont fournis à l'analyseur non dilués (c'est-à-dire sans aucune prédilution par l'opérateur).
- ✓ L'échantillon à tester est prédilué à 1/2 par l'opérateur, de préférence à l'aide du même tampon que celui utilisé par l'analyseur (tampon d'Owen la plupart du temps).
- ✓ Cela peut être fait dans n'importe quel tube ou flacon en plastique qui peut être utilisé dans l'analyseur et qui ne provoque pas l'activation de l'échantillon à tester.
- ✓ L'échantillon à tester est prédilué à 1/4 à l'aide du même tampon que celui utilisé par l'analyseur (voir les points 2 et 3 ci-dessus).
- ✓ Cela signifie que l'analyseur reçoit trois matériaux différents dérivés du même échantillon.
- ✓ L'analyseur est ensuite programmé pour exécuter un dosage du facteur VIII sur chacun de ces trois matériaux (c.-à-d. échantillon à tester non dilué, prédilué à 1/2 et prédilué à 1/4).
- ✓ On obtient un résultat de facteur VIII sur l'échantillon à tester non dilué.
- ✓ Un autre résultat est obtenu sur l'échantillon prédilué à 1/2. Il doit être multiplié par 2 pour corriger la prédilution.
- ✓ Un autre résultat est obtenu sur l'échantillon prédilué à 1/4. Il doit être multiplié par 4 pour corriger la prédilution.
- ✓ Les trois chiffres sont ensuite comparés par l'opérateur.
- ✓ De manière générale, les trois chiffres sont très proches les uns des autres. Si tel est le cas, l'opérateur peut calculer et communiquer la moyenne des trois chiffres comme étant l'activité du facteur VIII de l'échantillon à tester.
- ✓ Parfois, les trois chiffres sont divergents. Cela peut se produire si l'échantillon contient des substances interférentes ou si la coagulation a été activée dans l'échantillon (peut-être en raison de difficultés lors du prélèvement).
- ✓ Il revient à l'opérateur de décider s'il est sûr d'utiliser la moyenne des trois réponses différentes obtenues.

- ✓ La FMH recommande d'utiliser une simple évaluation mathématique pour décider.
- ✓ Il faut pour cela calculer le CV des trois résultats différents.
- ✓ La moyenne de ces trois résultats peut être utilisée en toute sécurité si le CV est < 15 %.
- ✓ Le fait d'utiliser la moyenne de cette manière améliore la fidélité du test.
- ✓ Si le CV est supérieur à 15 %, l'opérateur a plus de décisions à prendre.
- ✓ Lorsque le taux de facteur est compris entre 10 et 15 UI/dl, le CV des trois dilutions est plus élevé que lorsque l'activité du facteur est à des taux supérieurs. Dans ces échantillons, un CV de 20 % est acceptable.
- ✓ Lorsque le taux de facteur est inférieur à 5 UI/dl, une prédilution de 1/4 peut réduire l'activité du facteur en dessous de la limite inférieure de quantification, en fonction des réactifs. Dans ces échantillons, il est acceptable de tester uniquement l'échantillon non dilué et l'échantillon prédilué à 1/2. Dans ces circonstances, le laboratoire doit communiquer la moyenne des deux résultats (après avoir multiplié par deux le résultat de l'analyseur pour la dilution 1/2), sans calculer le CV.
- ✓ Pour les échantillons dont le facteur VIII est > 15 UI/dl, si le CV est > 15 % et que le résultat sur le plasma non dilué est inférieur aux résultats de la troisième dilution, cela indique qu'il pourrait y avoir une substance interférente dans l'échantillon à tester. Dans ce cas, le résultat obtenu pour la dilution 1/4 (après multiplication du résultat de l'analyseur par quatre pour corriger la prédilution) sera le plus exact (cf. exemples ci-après).
- ✓ Des exemples de substances interférentes à l'origine de ce résultat faussement faible dans les échantillons non dilués sont les inhibiteurs tels que l'anticoagulant de type lupique, l'HNF, les IDT ou les inhibiteurs directs du facteur Xa.
- ✓ L'utilisation d'une seule dilution peut entraîner des résultats faussement faibles et des dosages excessivement inexacts.

Quelques exemples sont donnés ci-dessous.

Tableau 12. Exemple 1 - Dosage du facteur VIII avec prédilution manuelle

	Activité du FVIII enregistrée par l'analyseur	Activité du FVIII après correction pour prédilution	Commentaires
Échantillons à tester sans prédilution	25 UI/dl (%)	25 UI/dl (%)	Pas de prédilution par l'opérateur, donc le résultat ne change pas
Échantillons dilués à 1/2 avant l'analyse	13,5 UI/dl (%)	27 UI/dl (%)	Résultat de l'analyseur multiplié par 2
Échantillons dilués à 1/4 avant l'analyse	6 UI/dl	24 UI/dl (%)	Résultat de l'analyseur multiplié par 4

- ✓ La moyenne de trois résultats est de 25,3 UI/dl (%).
- ✓ L'écart type des trois résultats est de 1,53.
- ✓ Le CV des trois résultats est de 6,0 %.
- ✓ Le CV est < 15 %, donc le résultat rapporté est de **25,3 UI/dl (%)**.

Tableau 13. Exemple 2 - Dosage du facteur VIII avec prédilution manuelle

	Activité du FVIII enregistrée par l'analyseur	Activité du FVIII après correction pour prédilution	Commentaires
Échantillons à tester sans prédilution	62 UI/dl (%)	62 UI/dl (%)	Pas de prédilution par l'opérateur, donc le résultat ne change pas
Échantillons dilués à 1/2 avant l'analyse	33 UI/dl (%)	66 UI/dl (%)	Résultat de l'analyseur multiplié par 2
Échantillons dilués à 1/4 avant l'analyse	13 UI/dl	52 UI/dl (%)	Résultat de l'analyseur multiplié par 4

- ✓ La moyenne de trois résultats est de 60,0 UI/dl (%).
- ✓ L'écart type des trois résultats est de 7,2.
- ✓ Le CV des trois résultats est de 12,0 %.
- ✓ Le CV est < 15 %.
- ✓ Le résultat rapporté est de **60,0 UI/dl (%)**.

Tableau 14. Exemple 3 - Dosage du facteur VIII avec prédilution manuelle

	Activité du FVIII enregistrée par l'analyseur	Activité du FVIII après correction pour prédilution	Commentaires
Échantillons à tester sans prédilution	7,0 UI/dl (%)	7,0 UI/dl (%)	Pas de prédilution par l'opérateur, donc le résultat ne change pas
Échantillons dilués à 1/2 avant l'analyse	3,0 UI/dl (%)	6,0 UI/dl (%)	Résultat de l'analyseur multiplié par 2
Échantillons dilués à 1/4 avant l'analyse	2,1 UI/dl	8,4 UI/dl (%)	Résultat de l'analyseur multiplié par 4

- ✓ La moyenne de trois résultats est de 7,1 UI/dl (%).
- ✓ L'écart type des trois résultats est de 7,1.
- ✓ Le CV des trois résultats est de 16,9 %.
- ✓ Le CV est < 20 %.
- ✓ Le résultat rapporté est de **7,1 UI/dl (%)**.

Tableau 15. Exemples de substances interférantes présentes, les résultats du dosage du FVIII sont en UI/dl (%)

Interférence	Sans prédilution	Prédilution 1/2		Prédilution 1/4		Résultats utilisés pour calculer le CV	CV
		Résultat de l'analyseur	Résultat corrigé par l'opérateur	Résultat de l'analyseur	Résultat corrigé par l'opérateur		
Inhibiteur direct de la thrombine	46,5	34,0	68,0	18,5	74,0	46,5, 68,0, 74,0	23,0 %
Rivaroxaban	64,0	45,2	90,4	29,1	116,4	64,0, 90,4, 116,4	29,0 %
Anticoagulant lu-pique	25,3	19,3	38,6	16,2	64,8	25,3, 38,6, 64,8	46,8 %

- ✓ À noter que des schémas similaires se produisent dans d'autres dosages en un temps, du facteur IX entre autres.
- ✓ Les trois ont un CV > 15 %.
- ✓ Les effets de ces substances interférantes sont généralement moins marqués dans la dilution 1/4 que dans l'échantillon non dilué ou dans l'échantillon prédilué à 1/2.
- ✓ Il est possible que le résultat pour l'échantillon 1/4 soit encore sous-estimé, mais il est le plus proche d'un résultat exact des trois tests effectués. Dans de tels cas, il peut également être utile d'ajouter une prédilution 1/8 comme quatrième test.
- ✓ Les résultats à communiquer à partir des exemples du tableau pourraient être > 74 UI/dl (%), > 116,4 UI/dl (%) ou > 64,8 UI/dl (%).

Les trois échantillons analysés dans cet exemple ont tous une activité du facteur VIII qui n'est pas en dessous de la plage normale. La simple confirmation que l'activité n'est pas réduite suffit parfois à une prise en charge sûre du patient.

Dosages chromogéniques de FVIII:C et FIX : le diagnostic de l'hémophilie A ou B établi en laboratoire repose sur la mesure de l'activité des facteurs de la coagulation (Srivastava *et al.*, 2020). La méthodologie la plus couramment utilisée est le dosage en un temps sur la base du TCA. Le dosage en un temps comporte des limites, notamment les interférences en présence d'anticoagulants de type lupique, d'anticoagulants oraux directs (AOD) ou de traitements de l'hémophilie à demi-vie prolongée, y compris des anticorps bispécifiques (Gray *et al.*, 2020 ; Jenkins *et al.*, 2020 ; Bowyer *et al.*, 2021 ; Moser *et al.*, 2021 ; Ruinemans-Koerts *et al.*, 2010). Plus important encore, l'hémophilie A mineure n'est pas exclue par la constatation d'un FVIII:C (et rarement FIX:C) normal dans dosage en un temps (Pouplard *et al.*, 2009). Plusieurs groupes ont signalé qu'un sous-ensemble de patients atteints d'hémophilie A mineure présentait des divergences dans l'activité du facteur VIII quand elle était mesurée par différents types de tests (Pavlova *et al.*, 2014). Plus de 20 % des patients atteints d'hémophilie A mineure sont associés à un écart dans lequel l'activité chromogénique est deux fois (voire plus) plus faible que le dosage en un temps et le phénotype hémorragique est proportionnel au dosage utilisant un substrat chromogénique (Bowyer *et al.*, 2018). Une forme inverse d'écart de dosage peut également se produire avec un FVIII:C deux fois plus faible (voire plus) par le dosage en un temps que par le dosage utilisant un substrat chromogénique. Les rapports de saignements sont beaucoup moins nombreux chez ces patients (Bowyer *et al.*, 2018 ; Bowyer *et al.*, 2011). Des résultats de ces patients sont fournis en exemple au tableau 16.

Tableau 16. Exemples de patients atteints d'hémophilie A mineure confirmée génétiquement et de divergences de dosage

Cas	Dosage en un temps (UI/dl)	Dosage chromogénique (UI/dl)
A	101	13
B	88	28
C	15	69
D	55	40
E	58	33
F	72	36
G	84	45

Au vu de ces résultats, il est souhaitable que tous les centres d'hémophilie aient à disposition un dosage chromogénique du facteur VIII. Celui-ci doit être pratiqué chez des sujets dont le TCA et l'activité du facteur VIII dosée en un temps sont normaux en présence d'antécédents personnels ou familiaux qui correspondent à une hémophilie mineure. Les dosages chromogéniques du facteur VIII ont été introduits pour la première fois au début des années 1980 (Rosen *et al.*, 1984), et de nombreux fabricants vendent des trousse commerciales à cet effet. La plupart de ces trousse conviennent pour le diagnostic de l'hémophilie A lorsque l'activité du facteur VIII est normale avec le dosage en un temps. Un petit nombre de dosages chromogéniques du facteur IX sont disponibles depuis le milieu des années 2010 et se limitent principalement à la recherche ou à des laboratoires spécialisés en hémostase (Kershaw *et al.*, 2018). Une divergence du dosage chromogénique en un temps du facteur IX a été décrite dans l'hémophilie B mineure, mais la divergence semble compromettre la classification de la sévérité, entre hémophilie B modérée et mineure (Pouplard *et al.*, 2009 ; Truedsson *et al.*, 2020).

Principe de l'analyse pour le dosage utilisant un substrat chromogénique du facteur VIII : de nombreux coagulomètres automatisés ont la capacité d'effectuer le dosage chromogénique, mais comme ces dosages étaient initialement réalisés manuellement à l'aide de plaques de microtitration, il est toujours possible d'utiliser une méthode manuelle. Dans certains dosages chromogéniques (mais pas tous), la totalité du facteur VIII présent dans l'échantillon est activé par la thrombine. Le facteur VIII activé accélère alors la conversion de facteur X en facteur Xa en présence de facteur IX activé, de phospholipides et d'ions calcium. L'activité du facteur Xa est évaluée par hydrolyse d'un substrat spécifique au facteur Xa contenant de la p-nitroaniline. La vitesse initiale de libération de p-nitroaniline (couleur jaune) mesurée à 405 nm est proportionnelle à l'activité du facteur Xa, et donc à l'activité du facteur VIII dans l'échantillon.

Les résultats du plasma du patient et de l'échantillon de contrôle qualité sont comparés au plasma de référence (étalon) pour quantifier le dosage chromogénique en utilisant les mêmes principes que le dosage en un temps (Baker et al., 2020). Les protéines utilisées dans les trousse de dosage chromogénique du facteur VIII peuvent être d'origine humaine ou bovine. Pour la mesure de FVIII:C endogène, ou le traitement par facteur VIII à demi-vie standard ou prolongée, la source de protéines n'affecte pas le dosage chromogénique. Elle est importante lorsque des anticorps bispécifiques sont présents dans le plasma (voir la partie 6 sur les anticorps bispécifiques).

Principe de l'analyse pour le dosage utilisant un substrat chromogénique du facteur IX : dans certains dosages chromogéniques du facteur IX (mais pas tous), la totalité du facteur IX présent dans l'échantillon est activé par le facteur Xla. Le facteur IX activé accélère alors la conversion de facteur X en facteur Xa en présence de facteur VIII activé, de phospholipides et d'ions calcium. L'activité du facteur Xa est évaluée par hydrolyse d'un substrat spécifique au facteur Xa contenant de la p-nitroaniline. La vitesse initiale de libération de p-nitroaniline (couleur jaune) mesurée à 405 nm est proportionnelle à l'activité du facteur Xa, et donc à l'activité du facteur IX dans l'échantillon, comme décrit ci-dessus.

Remarques : si la concentration en facteur VIII (ou facteur IX) dans le plasma à tester est proche de zéro (c'est-à-dire que la densité optique de toutes les dilutions est semblable à celle du blanc), des droites non parallèles peuvent être obtenues. La plage normale doit être établie localement, mais a souvent une limite inférieure comprise entre 50 et 65 UI/dl pour les facteurs VIII et IX. Le dosage chromogénique du facteur IX peut ne pas mesurer avec exactitude la récupération de certains produits de facteur IX à demi-vie prolongée (Gray et al., 2020 ; Bowyer et al., 2022). Les dosages chromogéniques peuvent être utilisés pour mesurer l'effet mimétique dans le plasma contenant des anticorps bispécifiques (Jenkins et al., 2020 ; Bowyer et al., 2020 ; Bowyer et al., 2023). Le dosage chromogénique du facteur VIII contenant du facteur X bovin peut servir à mesurer le traitement par facteur VIII recombinant dans le plasma contenant également des anticorps bispécifiques. Si cela est possible, un nouveau diagnostic d'hémophilie A ou B mineure devrait s'accompagner de la mesure de FVIII:C ou FIX:C par le test chromogénique (Bowyer et al., 2018). Il convient de faire preuve de prudence lors de l'utilisation d'un dosage chromogénique pour mesurer le facteur VIII porcin recombinant, car une sous-estimation est possible (Bowyer et al., 2022). Le dosage chromogénique du facteur IX peut sous-estimer les traitements par facteur IX recombinant à demi-vie standard (Nederlof et al., 2020).

Mesure des molécules de facteur VIII et IX à demi-vie prolongée : des modifications ont été apportées au facteur VIII ou IX recombinant pour allonger la demi-vie *in vivo* du traitement en agissant sur la conformation de la molécule. L'extension peut être réalisée par ajout de fractions de polyéthylène glycol (PEG), liaison covalente des chaînes lourdes et légères du facteur VIII, fusion à l'albumine ou fusion covalente à la partie Fc (fragment cristallisable) de l'IgG1 humaine. La surveillance suivant l'injection de concentrés de facteur VIII ou IX recombinant à demi-vie prolongée est indispensable pour la prise en charge clinique du patient atteint d'hémophilie. Une réponse plus faible que prévue ou une demi-vie réduite peut indiquer la nécessité d'un traitement supplémentaire ou le développement possible d'anticorps antimédicaments. Les études de laboratoire menées au cours des essais pharmaceutiques de chaque facteur à demi-vie prolongée ont mis en évidence des problèmes liés à l'exactitude de mesure de certaines molécules. Une surestimation ou une sous-estimation a été signalée avec certains facteurs VIII ou IX à demi-vie prolongée, mais cela dépendait de la méthodologie ou du TCA utilisé dans le dosage en un temps. La méthode de modification des molécules n'est pas prédictive de la réponse du dosage des facteurs, de sorte qu'une surveillance étroite des trois molécules de FVIII PEGylées peut ne pas être possible avec les mêmes réactifs du TCA. Pour les molécules de FVIII à demi-vie prolongée actuellement autorisées, les dosages chromogéniques de l'activité du facteur VIII sont tous considérés comme appropriés pour une surveillance fiable. Toutefois, pour le dosage en un temps, cela peut dépendre du réactif. Pour les molécules de FIX à demi-vie prolongée, il n'existe pas de méthodologie ou de réactif unique permettant de mesurer avec exactitude les trois concentrés actuellement autorisés. Un concentré à très longue demi-vie, rFVIII-FC-VWF-XTEN, éfanésoctocog alfa (Altuviiio/Altuvoc), a reçu l'autorisation réglementaire en 2023 pour

les États-Unis et en 2024 pour l'Europe. Une surveillance est recommandée, par le dosage en un temps du facteur VIII à l'aide d'un réactif du TCA particulier, Siemens Actin FSL. Les réactifs de TCA courants, Siemens Actin FS et Werfen Synthasil, ont respectivement surestimé et sous-estimé l'éfanésoctocog alfa. Les dosages chromogéniques du facteur VIII surestiment de deux à trois fois l'activité attendue (Pipe, 2009). Il est donc nécessaire de soigneusement évaluer si les dosages disponibles dans chaque laboratoire d'hémostase sont appropriés pour une surveillance fiable de chaque produit à demi-vie prolongée utilisé comme traitement avec facteur de remplacement dans leur centre. Les tableaux 17 et 18 donnent des exemples de concentrés de rFVIII et rFIX à demi-vie prolongée, et indiquent comment la puissance du produit a été attribuée et si le dosage en un temps ou le dosage utilisant un substrat chromogénique est acceptable pour la surveillance post-injection.

Tableau 17. Molécules de facteur VIII à demi-vie prolongée

Nom	Société	Molécule	Attribution de la puissance	En un temps	Chromogénique	Références
Adynovi/ Adynovate rurioctocog alfa pégal	Takeda	FVIII 2 × 10 kDa PEG	Chromogénique	Divers résultats	Oui	Turecek <i>et al.</i> , 2016 Bulla <i>et al.</i> , 2017
Afstyla ionoctocog alfa	CSL Behring	FVIII détélé du domaine B à chaîne unique	Chromogénique	Les résultats sont d'environ la moitié du dosage chromogénique	Chromogénique	Bowyer <i>et al.</i> , 2017 St Ledger <i>et al.</i> , 2018
Elocta/ Elocate efmoroctocog	Sobi	FVIII fusionné au Fc	Chromogénique	Oui	Oui	Sommer <i>et al.</i> , 2014 Powell <i>et al.</i> , 2012 Pouplard <i>et al.</i> , 2020
Esperoct turoctocog alpha pégal	Novo Nordisk	rFVIII à domaine B tronqué 40 kDa PEG	Chromogénique	Divers résultats	Oui	Pickering <i>et al.</i> , 2016 Hillarp <i>et al.</i> , 2017
Jivi damoctocog alfa pégal	Bayer	rFVIII détélé du domaine B 60 kDa PEG	Chromogénique	Pas de réactifs du TCA à base de silice ou de kaolin	Oui	Gu <i>et al.</i> , 2014 Church <i>et al.</i> , 2018
Altvocet/ Altvio éfanésoctocog alfa	Sanofi	rFVIII FC- VWF-XTEN	En un temps	Actin FSL recommandé	Surestimation fois 2 ou 3	Pipi <i>et al.</i> , 2024

Tableau 18. Molécules de facteur IX à demi-vie prolongée

Nom	Société	Molécule	Attribution de la puissance	En un temps	Chromogénique	Références
Alprolix eftrénonacog	Sobi	rFIX fusionné au Fc	En un temps	Pas certains réactifs du TCA à base de silice ou de kaolin	Oui	Sommer et al., 2014 Bowyer et al., 2019 Persson et al., 2018
Idelvion albutrépénacog	CSL Behring	rFIX fusionné à l'albumine	En un temps	Divers résultats	Non	Persson et al., 2018 St Ledger et al., 2016 Kitchen et al., 2017 Horn et al., 2019 Pouplard et al., 2019
Refixia/Rebinyn nonacog bêta pégol	Novo Nordisk	rFIX 40 kDa PEG	En un temps	Cephascreen et Synthafax vali-dés uniquement	Oui	Bowyer et al., 2016 Tiefenbacher et al., 2017 Young et al., 2016

Anticorps bispécifiques

Mesure des anticorps bispécifiques : les anticorps bispécifiques sont une classe de traitement sans facteur de remplacement de l'hémophilie A. Ils agissent comme un lien entre le facteur IXa et le facteur X humains, en l'absence de facteur VIII, pour promouvoir l'activation du facteur X. Les anticorps bispécifiques diffèrent du facteur VIII natif par un certain nombre d'aspects intrinsèques, dont un manque de mécanismes de régulation, ce qui a un impact sur les bilans d'hémostase (Lenting et al., 2017). Les futures générations d'anticorps bispécifiques, plus puissantes, pourraient avoir un impact plus important sur les bilans d'hémostase (Bowyer et al., 2023).

Temps de céphaline activée et anticorps bispécifiques : les anticorps bispécifiques ne nécessitent pas d'activation pour participer à l'activation du facteur X. En présence d'anticorps bispécifiques, le TCA est considérablement raccourci, souvent en dessous de la limite inférieure de la plage de référence (Bowyer et al., 2020 ; Bowyer et al., 2023). Le TCA n'est pas suffisamment sensible aux variations de la concentration des anticorps bispécifiques pour être utilisé dans le suivi de ces traitements, mais un allongement du TCA chez un patient où il était précédemment court peut indiquer une perte d'efficacité ou d'observance (Druzgal et al., 2020 ; Valsecchi et al., 2021).

Dosage en un temps et anticorps bispécifiques : en présence d'anticorps bispécifiques, les dosages à base de TCA calibrés selon un standard relatif aux produits plasmatiques, y compris les facteurs VIII, IX, XI et XII, la protéine C, la protéine S et le temps de coagulation activé, surestiment la quantité de facteur de coagulation ou d'inhibiteur naturel, et leur utilisation n'est donc pas adaptée (Bowyer et al., 2023 ; EMA, 2018).

Dosage en un temps modifié du facteur VIII et anticorps bispécifiques : un étalon (référence) commercial spécifique au produit et des plasmas de contrôle qualité sont disponibles pour la première génération

d'anticorps bispécifiques. Le dosage du facteur VIII en un temps peut être modifié à l'aide de ces étalons spécifiques au produit parallèlement à une dilution accrue du plasma (dilutions de 1/40 ou 1/80 au lieu de 1/10) pour mesurer la concentration médicamenteuse de l'anticorps bispécifique en µg/ml. Ce dosage modifié mesurera aussi tout facteur VIII endogène ou de remplacement présent dans le plasma (Bowyer et al., 2020).

Dosage chromogénique du facteur VIII et anticorps bispécifiques : les dosages chromogéniques du facteur VIII qui contiennent des facteurs X et IXa humains sont sensibles à la présence d'anticorps bispécifiques et mesurent une certaine activité « mimétique ou de substitution » ressemblant à celle du facteur VIII (Bowyer et al., 2020 ; Bowyer et al., 2023). Le dosage chromogénique humain peut être utilisé comme marqueur de la présence d'anticorps bispécifiques chez les patients sous prophylaxie. Cela n'est pas interchangeable avec la concentration médicamenteuse détaillée ci-dessus. Le dosage chromogénique humain mesurera également tout facteur VIII endogène ou de remplacement présent dans le plasma (Bowyer et al., 2020). Les dosages chromogéniques du facteur VIII qui contiennent du facteur X bovin ou du facteur IXa humain ou bovin sont insensibles à la présence d'anticorps bispécifiques de première génération, mais peuvent montrer une certaine sensibilité aux anticorps bispécifiques de nouvelle génération (Bowyer et al., 2020 ; Bowyer et al., 2023). Le dosage chromogénique du facteur X bovin doit être utilisé pour mesurer tout facteur VIII endogène ou traitement par remplacement du facteur VIII et pour mesurer le facteur VIII résiduel dans le dosage des inhibiteurs selon la méthode de Bethesda comme détaillé ci-dessous.

Dosage des inhibiteurs selon la méthode de Bethesda et anticorps bispécifiques : la mesure du facteur VIII résiduel après incubation dans les dosages des inhibiteurs selon la méthode de Bethesda s'appuie généralement sur le dosage en un temps (Verbruggen B, 1995), bien que les mesures chromogéniques et fluorogéniques aient été validées (Miller et al., 2021). En présence d'anticorps bispécifiques, le dosage en un temps ne peut pas être utilisé, contrairement au dosage utilisant un substrat chromogénique. Il est important que la trousse chromogénique utilisée contienne du facteur X bovin et du facteur IXa humain ou bovin pour exclure l'effet de l'anticorps bispécifique, sinon le titrage d'inhibiteur sera sous-estimé (Bowyer et al., 2021 ; Miller et al., 2021).

Surveillance suivant l'injection de facteur VIII et IX : la surveillance suivant l'injection de concentrés de facteur VIII ou IX dérivé du plasma ou recombinant à demi-vie standard est indispensable pour la prise en charge clinique du patient atteint d'hémophilie. Une réponse plus faible que prévue ou une demi-vie réduite peut indiquer la nécessité d'un traitement supplémentaire ou le développement possible d'inhibiteurs. La mesure du traitement avec facteur de remplacement doit idéalement être effectuée au moyen de la même méthode de dosage et des mêmes réactifs que ceux utilisés à l'origine pour attribuer la puissance au produit. Si cela n'est pas possible, un autre dosage validé doit être utilisé. En Europe, l'étiquetage de la puissance repose sur un dosage chromogénique pour les concentrés de facteur VIII (Barrowcliffe et al., 2002) et sur le dosage en un temps pour les concentrés de facteur IX (Kitchen et al., 2016). La Food and Drug Administration des États-Unis (FDA, 2020) recommande de recourir au dosage en un temps pour les concentrés de facteur IX. Cependant, certains concentrés de facteur VIII ont une puissance attribuée par le dosage en un temps et d'autres par le dosage chromogénique. La FMH recommande l'emploi d'un dosage du facteur VIII ou IX validé pour une utilisation avec le concentré spécifique ayant servi au traitement et calibré selon un standard relatif aux produits plasmatiques conforme à un étalon international validé par l'OMS (Srivastava et al., 2020). D'autres lignes directrices suggèrent d'utiliser le dosage en un temps ou chromogénique calibré selon des standards relatifs aux produits plasmatiques pour la surveillance de concentrés de facteur VIII dérivé du plasma (sauf preuve du contraire), et d'utiliser un dosage en un temps pour les concentrés de facteur IX (Gray et al., 2020). Les tableaux 19 et 20 donnent des exemples de concentrés de FVIII et FIX recombinant et dérivé du plasma à demi-vie standard couramment disponibles, et indiquent comment la puissance du produit a été attribuée et si le dosage en un temps ou le dosage utilisant un substrat chromogénique est acceptable pour la surveillance post-injection.

Tableau 19. Exemples de concentrés dérivés du plasma

Concentré	Factor	Potency assignment	CSA	OSA	References
Concentré	Facteur	Attribution de la puissance	Chromogénique	En un temps	Références
Factane	VIII	Chromogénique	Oui	Oui	Adcock <i>et al.</i> , 2018
Octanate	VIII	Chromogénique	Oui	Oui	
FVIII 8Y	VIII	Chromogénique	Oui	Oui	
Haemoctin	VIII	Chromogénique	Oui	Oui	
Octaplex	VIII	Chromogénique	Oui	Oui	
Recombinate	VIII	Chromogénique	Oui	Oui	Jennings <i>et al.</i> , 2007
Fanhdi	VIII	Chromogénique	Oui	Oui	Peyvandi <i>et al.</i> , 2016
Hemofil M	VIII	Chromogénique	Oui	Oui	Peyvandi <i>et al.</i> , 2016
Emoclot	VIII	Chromogénique	Oui	Oui	Peyvandi <i>et al.</i> , 2016
Replenine	IX	En un temps		Oui	
Betafact	IX	Pathromtin SL (silice) en un temps	Probablement acceptable	Oui	Adcock <i>et al.</i> , 2018
Mononine	IX	Pathromtin SL (silice) en un temps	Oui	Oui	Bowyer <i>et al.</i> , 2016 Wilmot <i>et al.</i> , 2014
Octafix	IX	Pathromtin (kao-lin) en un temps	Pas de données	Oui	
Alphanine	IX	En un temps		Oui	Aznar <i>et al.</i> , 2009

Tableau 20. Exemples de concentrés à demi-vie standard recombinants

Concentré	Facteur	Attribution de la puissance	Chromogénique	En un temps	Références
Advate	FVIII de pleine longueur	Chromogénique	Oui	Oui	Kitchen <i>et al.</i> , 2016 Kitchen <i>et al.</i> , 2019
Refacto AF	FVIII à domaine B délété	Chromogénique	Oui	Oui, standard labo. Refacto	Kitchen <i>et al.</i> , 2016 Morfini <i>et al.</i> , 2003 Ingerslev <i>et al.</i> , 2004
Novo8	FVIII à domaine B délété	Chromogénique	Oui	Oui, mais une certaine surestimation au niveau des taux résiduels	EMA, 2021 Viuff <i>et al.</i> , 2011
Nuwiq	FVIII à domaine B délété	Chromogénique	Oui	Oui	Lissitchkov <i>et al.</i> , 2016 EMA, 2022 Klukowska <i>et al.</i> , 2016 Tiefenbacher <i>et al.</i> , 2019
Xyntha	FVIII à domaine B délété	En un temps	Pas de surestimation	Oui	FDA, 2020
Kovaltry	FVIII	Chromogénique	Oui	Oui	Mahlangu <i>et al.</i> , 2018 Kitchen <i>et al.</i> , 2016
Benefix	IX	En un temps	Données insuffisantes	Oui	Bowyer <i>et al.</i> , 2016 Kershaw <i>et al.</i> , 2018 Sommer <i>et al.</i> , 2014
Rixubis	IX	Pathromtin SL en un temps validé	Oui	Oui	Kershaw <i>et al.</i> , 2018 Gritsch <i>et al.</i> , 2014

Thérapie génique : l'hémophilie A et l'hémophilie B sont des anomalies monogéniques et donc des candidates idéales pour la manipulation génétique. Depuis le début des années 2000, une grande variété de stratégies de thérapie génique, dont l'édition du génome, sont étudiées chez l'être humain pour ces deux anomalies (De Wolf et al., 2023). Au milieu des années 2020, l'utilisation limitée de produits de thérapie génique a bénéficié d'une autorisation réglementaire dans certains pays pour le traitement des personnes atteintes d'hémophilie A ou B. La mesure de l'expression du transgène du facteur VIII ou IX est essentielle pour déterminer la durée de la réponse et si des thérapies supplémentaires sont nécessaires pour parvenir à l'hémostase. Afin de minimiser la variabilité inter-laboratoires, il est judicieux de restreindre la surveillance de routine à un nombre limité de laboratoires spécialisés dans l'hémostase dans chaque pays. Les essais cliniques portant sur plusieurs thérapies géniques ont rapporté une variabilité des dosages chromogéniques de l'activité des facteurs VIII et IX 1,5 à 3,0 fois inférieure à celle des dosages en un temps. Au sein d'une même méthode, des différences entre les réactifs ont été signalées. En raison des contraintes liées à un volume plasmatique adéquat, il est difficile de mener des études comparatives multicentriques en laboratoire sur des échantillons de patients ayant reçu une thérapie génique. Il existe cependant des données limitées concernant la mesure des molécules de facteur VIII ou IX candidates à l'aide d'une gamme de méthodes ou de réactifs. Dans la mesure du possible, pour réduire la variabilité au minimum, les laboratoires doivent avoir recours aux réactifs et aux méthodes employés dans les essais cliniques pharmaceutiques pour la surveillance de l'expression après la thérapie génique (tableau 21).

Tableau 21. Thérapie génique pour l'hémophilie A et B

	Laboratoire pharmaceutique	Nom commercial	Méthode de dosage	Réactifs
Hémophilie A				
Valoctocogène roxaparvovec	Biomarin	Roctavian	Chromogénique	Coatest SP4
Hémophilie B				
Étranacogène dezaparvovec	CSL Behring	Hemgenix	En un temps	Synthasil
Fidanacogène élaparvovec	Pfizer	Beqvez	En un temps	Synthasil

Thérapie génique pour l'hémophilie A : pour l'hémophilie A, toutes les approches ont fait appel à des vecteurs de virus adénoassocié (AAV) et au facteur VIII recombinant à domaine B délété. Les essais de phase I à III de Roctavian (AAV5-FVIII-SQ, valoctocogène roxaparvovec, Biomarin) ont mesuré le transgène de FVIII:C avec un dosage chromogénique et un dosage en un temps Coatest SP4 à l'aide du réactif du TCA Actin FSL de Siemens sur l'analyseur Siemens BCS XP (Rangarajan et al., 2017). Le FVIII:C du dosage chromogénique représentait environ la moitié du FVIII:C du dosage en un temps (Mahlangu et al., 2023). Rosen et al. ont rapporté des résultats comparables entre les dosages chromogéniques Coatest SP4 et Hyphen Biomed lors de la mesure de l'AAV5-FVIII-SQ (4). Une comparaison entre deux centres du FVIII:C mesuré par dosage en un temps ou dosage chromogénique dans le plasma de patients après traitement par Roctavian a rapporté une différence d'environ 1,65 fois. Des résultats de FVIII:C similaires ont été obtenus avec le dosage chromogénique Hyphen Biomed et deux autres dosages chromogéniques (Platton et al., 2024). Les auteurs ont conclu que le dosage en un temps n'était pas approprié pour mesurer le facteur VIII après une thérapie génique avec Roctavian et que seul le dosage chromogénique devait être utilisé.

Thérapie génique pour l'hémophilie B : les deux produits actuellement approuvés dans l'hémophilie B, Hemgenix (étranacogène dezaparvovec, CSL Behring) et Beqver (fidanacogène élaparvovec, Pfizer), font tous deux appel à une variante de facteur IX très active d'origine naturelle, FIX Padoue (R338L) (Simioni et al., 2009). Dans ses rapports, le programme pharmaceutique n'a fait état que de dosages en un temps pour l'activité du facteur IX. A été mentionnée une variabilité entre les réactifs et les méthodologies lors de la mesure du FIX Padoue à la suite de l'expression génique et dans le plasma surchargé en molécule du FIX Padoue. Une étude de terrain mondiale sur le plasma surchargé en molécule R338L recombinante

(FLT180a, verbrinacogène setparvovec, par Freeline Therapeutics, actuellement en pause à la fin des tests de phase I/II) a rapporté une différence de l'ordre de trois dans l'activité du facteur IX entre 15 dosages en un temps et chromogéniques différents. Une variation de 1,8 fois a été observée sur 13 réactifs de TCA dans le dosage en un temps, tandis que les résultats des deux dosages chromogéniques étaient environ la moitié de l'activité attendue mesurée par le dosage en un temps de Synthasil (Foley et al., 2023). La mesure de l'activité du transgène du FIX Padoue de Beqver a mis en évidence des différences entre cinq réactifs du TCA dans le dosage en un temps, et entre le dosage en un temps et le dosage chromogénique (Robinson et al., 2021). Dans une étude de terrain mondiale portant sur le plasma des participants à l'essai de thérapie génique de phase I/Ia, le FIX:C était plus élevé avec le réactif de TCA activé par la silice, Synthasil, dans le dosage en un temps qu'avec les réactifs du TCA activés par l'acide ellagique, Actin FS et Actin FSL, ou que le dosage chromogénique (Pittman et al., 2024). Peu de données biologiques sont disponibles pour la mesure de l'activité du facteur IX après une thérapie génique par Hemgenix. Le résumé des caractéristiques du produit indique que les résultats des tests d'activité du facteur IX sont plus faibles s'ils sont mesurés avec un dosage utilisant un substrat chromogénique par rapport à un dosage en un temps (EMA, 2024). Les essais cliniques de phase I à III portant sur le facteur IX ont utilisé le réactif de TCA Synthasil dans le dosage en un temps et un dosage chromogénique non divulgué ; les activités du facteur IX dans le dosage en un temps étaient au moins deux fois plus élevées qu'avec le dosage chromogénique (Pipe et al., 2023 ; Miesbach et al., 2018).

Considérations biologiques pour le traitement par rééquilibrage de l'hémostase : les traitements sans facteur de remplacement pour l'hémophilie A ou B visent à promouvoir la coagulation et à rééquilibrer l'hémostase en ciblant les anticoagulants naturels ou les inhibiteurs de la coagulation, notamment l'antithrombine, l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI), la protéine C ou la protéine S (Nogami et Shima, 2023). Une partie de ces traitements a été approuvée pour certains groupes de patients, d'autres font actuellement l'objet d'essais pharmaceutiques.

Molécules qui ciblent l'antithrombine : l'antithrombine activée par l'héparine exerce des actions inhibitrices sur la thrombine et les facteurs Xa, IXa, XIa et XIIa (Rezaie et al., 2020). Le fitusiran, un petit ARN interférant ciblant la synthèse de l'antithrombine dans les hépatocytes, a été développé pour améliorer la génération de thrombine (Young et al., 2023). Dans les essais cliniques, une réduction de 82 à 87 % de l'antithrombine a été associée à une augmentation de la génération de thrombine (Pasi et al., 2021). Les taux cibles d'activité de l'antithrombine sont compris entre 15 et 35 UI/dl. Les dosages d'antithrombine sont bien établis dans le cadre du dépistage de la thrombophilie, mais il est rare de mesurer des activités d'antithrombine aussi faibles. Une étude comparative mondiale menée en laboratoire évaluant la mesure d'une gamme d'activités de l'antithrombine (9 à 100 UI/dl) a conclu que certains dosages ne devaient pas être utilisés pour la surveillance de l'antithrombine sous traitement par fitusiran (Chhabra et al., 2024).

Molécules qui ciblent l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire : les anticorps anti-TFPI ciblent le domaine Kunitz 2 du TFPI et empêchent la liaison au facteur X activé, permettant ainsi à la génération de facteur Xa de continuer (Mast et al., 2022). L'utilisation du premier anticorps monoclonal anti-TFPI (concizumab, Novo Nordisk, Danemark) a été approuvée en 2023 chez des patients canadiens atteints d'hémophilie B avec inhibiteurs. Un autre anticorps anti-TFPI, le marstacimab (Pfizer, États-Unis), est en cours d'approbation aux États-Unis et en Europe pour les personnes atteintes d'hémophilie A ou B sans inhibiteurs (Matino et al., 2023). Les dosages du TFPI sont disponibles dans certains laboratoires de recherche ou spécialisés, mais l'utilité clinique de la mesure n'est pas claire.

Molécules ciblant la protéine C activée (PCa) : la PCa, conjointement avec le cofacteur protéine S, inactive les facteurs Va et VIIa pour empêcher la génération de thrombine. Le facteur V de Leiden est une mutation p.Arg506Gln (c.1691G>A) au niveau du site de clivage primaire de la PCa dans le facteur V activé. La présence de facteur V de Leiden ralentit l'inactivation du facteur Va par la PCa et constitue la cause la plus fréquente de thrombophilie chez l'être humain (Van Cott et al., 2016). D'autres approches pour cibler la PCa font l'objet d'essais cliniques. Il a été rapporté qu'un anticorps monoclonal humanisé inhibant la protéine C activée rétablissait l'hémostase chez les souris hémophiles (Jiang et al., 2023) et des essais

cliniques ont commencé chez l'être humain pour un inhibiteur de la sérine protéase (serpine) qui ne cible que la PCa, et non la protéine C précurseur (Baglin *et al.*, 2023). Les dosages de la protéine C et de la PCa sont disponibles en routine dans de nombreux laboratoires d'hémostase de troisième niveau si une mesure est nécessaire pour la surveillance médicamenteuse.

Molécules qui ciblent la protéine S : la protéine S est un cofacteur pour le TFPI et la PCa dont l'action limite la production de thrombine. Il a été rapporté que le ciblage de la protéine S à l'aide d'un petit ARN interférant améliorait l'hémostase chez les souris hémophiles (Prince *et al.*, 2020) et qu'un anticorps anti-protéine S était utilisé pour améliorer le traitement avec facteur IX de remplacement dans la génération de thrombine chez les patients atteints d'hémophilie B (Wilson *et al.*, 2024). La protéine S libre et la protéine S totale, mesurant aussi la protéine S qui forme un complexe avec le régulateur du complément, la protéine de liaison à C4b, sont disponibles en routine dans de nombreux laboratoires d'hémostase de troisième niveau si une mesure est nécessaire pour la surveillance médicamenteuse.

Dosages de la génération de thrombine : il s'agit de dosages généraux pouvant évaluer le potentiel hémostatique global et mettre en évidence l'hyper ou l'hypocoagulabilité dans le plasma (Ninivaggi *et al.*, 2021). Plusieurs dosages chromogéniques ou fluorogéniques, développés en interne ou disponibles dans le commerce, déclenchent généralement la génération de thrombine au moyen du facteur tissulaire, Xla, ou du facteur IXa. En raison du manque de standardisation, leur corrélation est faible (Devreese *et al.*, 2007). Malgré ces problèmes, les dosages de la génération de thrombine sont souvent utilisés dans les essais pharmaceutiques pour évaluer l'effet de nouvelles molécules sur l'hémostase.

Références

- Adcock DM, Strandberg K, Shima M, Marlar RA. Advantages, disadvantages and optimization of one-stage and chromogenic factor activity assays in haemophilia A and B. *Int J Lab Hematol* 2018; 40(6): 621-629.
- Aznar JA, Cabrera N, Matysiak M, Zawilska K, Gercheva L, Antonov A, Montañés M, Páez AM, Lissitchkov T. Pharmacokinetic study of a high-purity factor IX concentrate (factor IX Grifols) with a 6-month follow up in previously treated patients with severe haemophilia b. *Haemophilia* 2009; 15(6): 1243-1248.
- Baglin T, Huntington JA, Koch A, Mocanu I, Makhaldiani L. Serpin-PC in persons with severe hemophilia (PwH): Updated results from a multicenter multi-part, first-in-human study. *Blood* 2023; 142(Supplement 1) :2619.
- Baker P, Plutton S, Gibson C, Gray E, Jennings I, Murphy P, Laffan M. Guidelines on the laboratory aspects of assays used in haemostasis and thrombosis. *Br J Haematol* 2020; 191(3): 347-362.
- Barrowcliffe TW, Raut S, Sands D, Hubbard AR. Coagulation and chromogenic assays of factor VIII activity: General aspects, standardization, and recommendations. *Semin Thromb Hemost* 2002; 28(3): 247-256.
- Bowyer A, Gray E, Lowe A, Murphy P, Plutton S, Riddell A, Chowdary P, Lester W, Jenkins PV. Laboratory coagulation tests and recombinant porcine factor VIII: A United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation guideline. *Haemophilia* 2022; 28(3): 515-519.
- Bowyer A, Kitchen S, Maclean R. Effects of emicizumab on APTT, one-stage and chromogenic assays of factor VIII in artificially spiked plasma and in samples from haemophilia A patients with inhibitors. *Haemophilia* 2020; 26(3): 536-542.
- Bowyer A, Kitchen S, Maclean R. Measurement of antifactor VIII antibody titre in the presence of emicizumab; Use of chromogenic Bethesda assays. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(4): O204-O206.
- Bowyer AE, Duncan EM, Antovic JP. Role of chromogenic assays in haemophilia A and B diagnosis. *Haemophilia* 2018; 24(4): 578-583.
- Bowyer AE, Ezban M, Kitchen S. Measuring the FVIII mimetic activity of the new bispecific antibody, Mim8, in severe haemophilia A plasma using APTT and one-stage FVIII assays. *Res Pract Thromb Haemost* 2021; 5: Abstract PB0680.
- Bowyer AE, Goodeve AC, Liesner R, Mumford AD, Kitchen S, Makris M. p.Tyr365Cys change in factor VIII: haemophilia A, but not as we know it. *Br J Haem* 2011; 154(5): 618-625.

Bowyer AE, Gosselin RC. Factor VIII and factor IX activity measurements for hemophilia diagnosis and related treatments. *Semin Thromb Hemost* 2022; 49(06): 609-620.

Bowyer AE, Hillarp A, Ezban M, Persson P, Kitchen S. Measuring factor IX activity of nonacog beta pegol with commercially available one-stage clotting and chromogenic assay kits: A two-center study. *J Thromb Haemost* 2016; 14(7): 1428-1435.

Bowyer AE, Kitchen S, Ezban M. The effect of a next generation factor VIII mimetic bispecific antibody (Mim8) on assays of factor VIII activity and thrombin generation. *J Thromb Haemost* 2023; 21(3): 480-487.

Bowyer AE, Kitchen S, Maclean RM. Effects of emicizumab on APTT, one-stage and chromogenic assays of factor VIII in artificially spiked plasma and in samples from haemophilia A patients with inhibitors. *Haemophilia* 2020; 26(3): 536-542.

Chhabra ES, Sadeghi-Khomami A, Liu M, Young G, Pipe SW, Ozelo MC, Le-Camus C, Toh M, Lima-Montalvo SA, Demissie M. Global comparative antithrombin (AT) field study: Impact of laboratory assay variability on the assessment of AT activity measurement (abstract PP-072). *Haemophilia* 2024; 30: 3-223.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Determination of coagulation factor activities using the one-stage clotting assay, 2nd edition. CLSI standard H48. 2016. <https://clsi.org/standards/products/hematology/documents/h48/>.

De Wolf D, Singh K, Chuah MK, VandenDriessche T. Hemophilia gene therapy: The end of the beginning? *Hum Gene Ther* 2023; 34(17-18): 782-792.

Devreese K, Wijns W, Combes I, Van kerckhoven S, Hoylaerts MF. Thrombin generation in plasma of healthy adults and children: chromogenic versus fluorogenic thrombogram analysis. *Thromb Haemost* 2007; 98(3): 600-613.

Druzgal CH, Kizilocak H, Brown J, Sennett M, Young G. Neutralizing antidrug antibody to emicizumab in a patient with severe hemophilia A with inhibitors: New case with detailed laboratory evaluation. *J Thromb Haemost* 2020; 18(9): 2205-2208.

European Medicines Agency (EMA). Hemlibra (emicizumab) Summary of Product Characteristics. 2018. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/hemlibra-epar-product-information_en.pdf.

European Medicines Agency (EMA). NovoEight (turoctocog alfa) Summary of Product Characteristics. 2021. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/novoeight-epar-product-information_en.pdf.

European Medicines Agency (EMA). Hemgenix (etranacogene dezaparvovec) Summary of Product Characteristics. 2024. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/hemgenix-epar-product-information_en.pdf.

European Medicines Agency (EMA). Nuwiq (simoctocog alfa) Summary of Product Characteristics. 2022. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/nuwiq-epar-product-information_en.pdf.

Foley JH, Shehu E, Riddell A, Gray E, Goodale A, Yu IM et al. Differences in wild-type- and R338L-tenase complex formation are at the root of R338L-factor IX assay discrepancies. *Blood Adv* 2023; 7(3): 458-467.

Food and Drug Administration (FDA). Xyntha (antihemophilic factor [recombinant]) Prescribing Information. 2020. <https://www.fda.gov/media/70399/download>.

Gray E, Kitchen S, Bowyer AE, Chowdary P, Jenkins PV, Murphy P et al. Laboratory measurement of factor replacement therapies in the treatment of congenital haemophilia: A United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation guideline. *Haemophilia* 2020; 26(1): 6-16.

Gritsch H, Romeda-Finger S, Scheiflinger F, Turecek PL. Potency assignment and measurement of recombinant FIX activity in human plasma – impact of aPTT reagents on the 1-stage clotting assay. *Haemophilia* 2014; 20(s3): 37 (abstract).

Ingerslev J, Jankowski MA, Weston SB, Charles LA. Collaborative field study on the utility of a BDD factor VIII concentrate standard in the estimation of BDDr factor VIII:C activity in hemophilic plasma using one-stage clotting assays. *J Thromb Haemost* 2004; 2(4): 623-628.

Jenkins PV, Bowyer AE, Burgess C, Gray E, Kitchen S, Murphy P et al. Laboratory coagulation tests and emicizumab treatment A United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation guideline. *Haemophilia* 2020; 26: 151-155.

Jennings I, Kitchen DP, Woods TA, Kitchen S, Walker ID. Emerging technologies and quality assurance: the United Kingdom National External Quality Assessment Scheme perspective. *Semin Thromb Hemost* 2007; 33(3): 243-249.

Jiang M, Yang F, Jiang Y, Cheng L, Han J, Yi J et al. Safety and efficacy of an anti-human APC antibody for prophylaxis of congenital factor deficiencies in preclinical models. *Blood* 2023; 142(12): 1071-1081.

Kershaw GW, Dissanayake K, Chen VM, Khoo T. Evaluation of chromogenic FIX assays by automated protocols. *Haemophilia* 2018; 24(3): 492-501.

Kitchen S, Beckmann H, Katterle Y, Bruns S, Tseneklidou-Stoeter D, Maas Enriquez M. BAY 81-8973, a full-length recombinant factor VIII: results from an International comparative laboratory field study. *Haemophilia* 2016; 22(3): e192-e199.

Kitchen S, Jennings I, Makris M, Kitchen DP, Woods TAL, Walker ID. Clotting and chromogenic factor VIII assay variability in post-infusion and spiked samples containing full-length recombinant FVIII or recombinant factor VIII Fc fusion protein (rFVIIIFc). *Int J Lab Hematol* 2019; 41(2): 176-183.

Kitchen S, Jennings I, Makris M, Kitchen DP, Woods TAL, Walker ID. Factor VIII assay variability in postinfusion samples containing full length and B-domain deleted FVIII. *Haemophilia* 2016; 22(5): 806-812.

Kitchen S, Katterle Y, Beckmann H, Maas Enriquez M. Chromogenic assay for BAY 81-8973 potency assignment has no impact on clinical outcome or monitoring in patient samples. *J Thromb Haemost* 2016; 14(6): 1192-1199.

Kitchen S, Kershaw GW, Tiefenbacher S. Recombinant to modified factor VIII and factor IX – chromogenic and one-stage assay issues. *Haemophilia* 2016; 22: 72-77.

Kukowska A, Szczepański T, Vdovin V, Knaub S, Jansen M, Liesner R. Novel, human cell line-derived recombinant factor VIII (Human-cl rhFVIII, Nuwiq®) in children with severe haemophilia A: efficacy, safety and pharmacokinetics. *Haemophilia* 2016; 22(2): 232-239.

Lenting PJ, Denis CV, Christophe OD. Emicizumab, a bispecific antibody recognising coagulation factors IX and X: how does it actually compare to factor VIII? *Blood* 2017; 130: 2463-2468.

Lissitchkov T, Hampton K, von Depka M, Hay C, Rangarajan S, Tuddenham E et al. Novel, human cell line-derived recombinant factor VIII (human-cl rhFVIII; Nuwiq®) in adults with severe haemophilia A: efficacy and safety. *Haemophilia* 2016; 22(2): 225-231.

Mahlangu J, Kaczmarek R, von Drygalski A, Shapiro S, Chou S, Ozelo MC et al. Two-year outcomes of valoctocogene roxaparvovec therapy for hemophilia A. *New Eng J Med* 2023; 388(8): 694-705.

Mahlangu JN, Ahuja SP, Windyga J, Church N, Shah A, Schwartz L. BAY 81-8973, a full-length recombinant factor VIII for the treatment of hemophilia A: product review. *Ther Adv Hematol* 2018; 9(7): 191-205.

Mast AE, Ruf W. Regulation of coagulation by tissue factor pathway inhibitor: Implications for hemophilia therapy. *J Thromb Haemost* 2022; 20(6): 1290-1300.

Matino D, Acharya S, Palladino A, Hwang E, McDonald R, Taylor CT et al. Efficacy and safety of the anti-tissue factor pathway inhibitor marstacimab in participants with severe hemophilia without inhibitors: Results from the phase 3 Basis trial. *Blood* 2023; 142(Supplement 1): 285.

Miesbach W, Meijer K, Coppens M, Kampmann P, Klamroth R, Schutgens R et al. Gene therapy with adeno-associated virus vector 5-human factor IX in adults with hemophilia B. *Blood* 2018; 131(9):1022-31.

Miller CH, Boylan B, Payne AB, Driggers J, Bean CJ. Validation of the chromogenic Bethesda assay for factor VIII inhibitors in hemophilia A patients receiving Emicizumab. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(2): e84-e86.

Miller CH, Rice AS, Boylan B, Shapiro AD, Lentz SR, Wicklund BM et al. Comparison of clot-based, chromogenic, and fluorescence assays for measurement of factor VIII inhibitors in the U.S. Hemophilia Inhibitor Research Study. *J Thromb Haemost* 2013; 11(7): 1300-1309.

Morfini M, Cinotti S, Bellatreccia A, Paladino E, Gringeri A, Mannucci PM. A multicenter pharmacokinetic study of the B-domain deleted recombinant factor VIII concentrate using different assays and standards. *J Thromb Haemost* 2003; 1(11): 2283-2289.

Moser KA, Smock KJ. Direct oral anticoagulant (DOAC) interference in hemostasis assays. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2021; 2021(1): 129-133.

Nederlof A, Kitchen S, Meijer P, Clossen MH, Ali Pour N, Kershaw GW et al. Performance of factor IX extended half-life product measurements in external quality control assessment programs. *J Thromb Haemost* 2020; 18: 1874-1883.

Ninivaggi M, de Laat-Kremers R, Tripodi A, Wahl D, Zuily S, Dargaud Y et al. Recommendations for the measurement of thrombin generation: Communication from the ISTH SSC Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibodies. *J Thromb Haemost* 2021; 19(5): 1372-1378.

Nogami K, Shima M. Current and future therapies for haemophilia—Beyond factor replacement therapies. *Br J Haematol* 2023; 200(1): 23-34.

Pasi KJ, Lissitchkov T, Mamonov V, Mant T, Timofeeva M, Bagot C et al. Targeting of antithrombin in hemophilia A or B with investigational siRNA therapeutic fitusiran-Results of the phase 1 inhibitor cohort. *J Thromb Haemost* 2021; 19(6): 1436-1446.

Pavlova A, Delev D, Pezeshkpoor B, Muller J, Oldenburg J. Haemophilia A mutations in patients with non-severe phenotype associated with a discrepancy between one-stage and chromogenic factor VIII activity assays. *Thromb Haemost* 2014; 111(5): 851-861.

Peyvandi F, Oldenburg J, Friedman KD. A critical appraisal of one-stage and chromogenic assays of factor VIII activity. *J Thromb Haemost* 2016; 14(2): 248-261.

Pipe SW, Leebeek FW, Recht M, Key NS, Castaman G, Miesbach W et al. Gene therapy with etranacogene dezaparvovec for hemophilia B. *New Engl J Med* 2023; 388(8): 706-718.

Pipe SW, Sadeghi-Khomami A, Konkle BA, Kitchen S, Negrier C, Liu M, et al. A global comparative field study to evaluate the factor VIII activity of efanesoctocog alfa by one-stage clotting and chromogenic substrate assays at clinical haemostasis laboratories. *Haemophilia*. 2024;30(1):214-23.

Pittman DD, Carrieri C, Soares H, McKay J, Tan CY, Liang JZ et al. Field study and correlative studies of factor IX variant FIX-R338L in participants treated with fidanacogene elaparvovec. *Thromb Haemost* 2024; 124(10): 912-921.

Platton S, Raheja P, Dale C, Guy S, Yartey N, Bowyer A. Evaluation of one-stage and chromogenic assays for the laboratory measurement of factor VIII activity following valoctocogene roxaparvovec infusion. *Haemophilia* 2024; 30(5): 1221-1224.

Pouplard C, Trossaert M, A LEQ, Delahousse B, Giraudeau B, Gruel Y. Influence of source of phospholipids for APTT-based factor IX assays and potential consequences for the diagnosis of mild haemophilia B. *Haemophilia* 2009; 15(1): 365-368.

Prince RE, Schaeper U, Dames S, Calzavarini S, Quarroz C, Reina Caro MD et al. Targeting protein S using small interfering RNA is well tolerated and protects mice with hemophilia A from acute hemarthrosis. *Blood* 2020; 136(Supplement 1): 20-21.

Rangarajan S, Walsh L, Lester W, Perry DJ, Madan B, Laffan M. AAV5-factor VIII gene transfer in severe hemophilia A. *N Engl J Med* 2017; 377(26): 2519-2530.

Rezaie AR, Giri H. Anticoagulant and signaling functions of antithrombin. *J Thromb Haemost* 2020; 18(12): 3142-3153.

Robinson M, George L, Carr ME, Samuelson-Jones BJ, Arruda VR, Murphy JE et al. Factor IX assay discrepancies in the setting of liver gene therapy using a hyperfunctional variant factor IX-Padua. *J Thromb Haemost* 2021; 19(5):1212-1218.

Rosen S, Tiefenbacher S, Robinson M, Huang M, Srimani J, Mackenzie D et al. Activity of transgene-produced B-domain-deleted factor VIII in human plasma following AAV5 gene therapy. *Blood* 2020; 136(22): 2524-2534.

Rosen S. Assay of factor VIII:C with a chromogenic substrate. *Scand J Haematol* 1984; 33(suppl 40): 139-145.

Ruinemans-Koerts J, Peterse-Stienissen I, Verbruggen B. Non-parallelism in the one-stage coagulation factor assay is a phenomenon of lupus anticoagulants and not of individual factor inhibitors. *Thromb Haemost* 2010; 104(5): 1080-1082

Simioni P, Tormene D, Tognin G, Gavasso S, Bulato C, Iacobelli NP et al. X-linked thrombophilia with a mutant factor IX (factor IX Padua). *N Engl J Med* 2009; 361: 1671-1675.

Sommer JM, Buyue Y, Bardan S, Peters RT, Jiang H, Kamphaus GD et al. Comparative field study: impact of laboratory assay variability on the assessment of recombinant factor IX Fc fusion protein (rFIXFc) activity. *Thromb Haemost* 2014; 112(5): 932-940.

Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, Kitchen S, Sutherland M, Pipe SW et al. WFH Guidelines for the Management of Hemophilia, 3rd edition. *Haemophilia* 2020; 26(supple 6): 1-158.

Tiefenbacher S, Clausen WHO, Hansen M, Lutzhof R, Ezban M. A field study evaluating the activity of N8-GP in spiked plasma samples at clinical haemostasis laboratories. *Haemophilia* 2019; 25: 893-901.

Truedsson Å, Schmidt DE, Strålfors A, Soutari N, Norberg E, Letelier A et al. One-stage versus chromogenic factor IX activity in hemophilia B [abstract]. *Res Pract Thromb Haemost* 2020;4.

Valsecchi C, Gobbi M, Beeg M, Adams T, Castaman G, Schiavone L et al. Characterization of the neutralizing anti-emicizumab antibody in a patient with hemophilia A and inhibitor. *J Thromb Haemost* 2021; 19(3): 711-718.

Van Cott EM, Khor B, Zehnder JL. Factor V Leiden. *Am J Hematol* 2016; 91(1): 46-49.

Verbruggen B, Giles AR, Samis J, Verbeek K, Mensink E, Novakova I. The type of factor VIII deficient plasma used influences the performance of the Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII inhibitors. *Thromb Haemost* 2001; 86: 1435-1439.

Verbruggen B, Novakova I, Wessels H, Boezeman J, van den Berg M, Mauser-Bunschoten E. The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: improved specificity and reliability. *Thromb Haemost* 1995; 72(2): 247-251.

Viuff D, Barrowcliffe TW, Saugstrup T, Ezban M, Lillicrap D, Viuff D, Barrowcliffe T, Saugstrup T, Ezban M, Lillicrap D. International comparative field study of N8 evaluating factor VIII assay performance. *Haemophilia* 2011; 17(4): 695-702.

Wilmot HV, Hogwood J, Gray E. Recombinant factor IX: discrepancies between one-stage clotting and chromogenic assays. *Haemophilia* 2014; 20(6): 981-987.

Wilson HP, Pierre A, Paysse AL, Kumar N, Cooley BC, Rudra P et al. Protein S antibody as an adjunct therapy for hemophilia B. *Blood Advances* 2024; 8(2): 441-452.

Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Colesse G, Gourmelin Y. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001; 12(4): 229-236.

Young G, Lenting PJ, Croteau SE, Nolan B, Srivastava A. Antithrombin lowering in hemophilia: a closer look at fitusiran. *Res Pract Thromb Haemost* 2023; 7(4): 100179.

Zhao Y, Feng G, Feng L. Effects of pre-analytical storage time, temperature, and freeze-thaw times on coagulation factors activities in citrate-anticoagulated plasma. *Ann Transl Med* 2018; 6(23): 456.

Détection et quantification des inhibiteurs fonctionnels congénitaux et acquis dans l'hémostase

Silmara Montalvão

SUJETS ABORDÉS

- ✓ Différentes cinétiques des anticorps
- ✓ Échantillons pour le dépistage des inhibiteurs des facteurs VIII et IX : collecte, expédition et préparation
- ✓ Plasma normal poolé pour le dépistage des inhibiteurs
- ✓ Protocole pour le dépistage des inhibiteurs des facteurs VIII et IX
- ✓ Dosages des inhibiteurs du facteur Willebrand
- ✓ Anticorps anti-médicament dans le laboratoire d'analyse de la coagulation - Émicizumab

Identifier le développement d'anticorps est fondamental pour que le programme de prise en charge de l'hémophilie soit en mesure de fournir des soins médicaux adéquats (Peyvandi *et al.*, 2016 ; Srivastava *et al.*, 2020). Dans le contexte de l'hémophilie, les inhibiteurs sont des anticorps IgG polyclonaux dirigés contre le facteur VIII ou IX et appartiennent principalement à la sous-classe des IgG4 de haute affinité (Montalvão *et al.*, 2015). Ils neutralisent le concentré de facteur administré au patient, ce qui rend difficile la prévention et le traitement des saignements (Pratt *et al.*, 2021). L'apparition d'inhibiteurs résulte d'un processus en plusieurs étapes impliquant des déterminants environnementaux et génétiques. Dans l'hémophilie A sévère, des inhibiteurs du facteur VIII se forment chez environ 30 % des patients, généralement au cours des 20 à 30 premiers jours d'exposition. Dans l'hémophilie B sévère, l'incidence cumulée du développement d'inhibiteurs est inférieure à celle de l'hémophilie A sévère et atteint 4 à 5 % 9 à 11 jours après l'exposition (Ljung *et al.*, 2019). Le traitement des épisodes hémorragiques aigus chez les patients présentant des inhibiteurs dépend du titrage de l'inhibiteur. Les patients dont le titrage est faible (< 5 UB/ml) peuvent recevoir un traitement avec facteur de remplacement standard, le concentré de facteur, même si des doses plus élevées sont requises pour surmonter les effets neutralisants de l'inhibiteur. Lorsque le titre est élevé (> 5 UB/ml), les seuls traitements efficaces des saignements sont les agents de contournement (Ljung *et al.*, 2019). Les trois agents de contournement disponibles dans l'hémophilie A et B sont (1) le concentré de complexe prothrombique activé (CCPa), (2) deux formes de facteur VII activé recombinant (rFVIIa) et (3) le facteur VIII porcin recombinant. De nouveaux médicaments hémostatiques, tels que les anticorps bispécifiques humanisés (l'émicizumab notamment), l'interférence ARN (p. ex. le fitusiran) et les agents anti-inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (anti-TFPI), entre autres, sont disponibles dans certains pays pour la prévention des saignements. L'induction de tolérance immunitaire (ITI) sert à éradiquer les inhibiteurs et implique de fréquentes injections intraveineuses de concentré de facteur sur une période de plusieurs mois. Dans l'hémophilie A, l'ITI est efficace chez environ 65 à 70 % des patients. Le suivi du titrage des inhibiteurs chez ces patients est essentiel pour l'évaluation et la gestion du protocole. L'étude en laboratoire de l'inhibiteur doit être effectuée selon la méthode Bethesda modifiée. Bien que ce test ait un CV élevé, il s'agit du test de référence pour le titrage des anticorps inhibiteurs. Dans certains cas, le dépistage des inhibiteurs à l'aide du TCA peut être effectué avant le titrage des anticorps. Toutefois, en raison des limites du test, les résultats négatifs ne doivent pas être utilisés pour exclure la présence éventuelle d'un inhibiteur. Ce point est développé dans la partie 6 de ce manuel. Une alternative au dépistage des anticorps antifacteur VIII ou IX est le cours à un test immunologique. Divers tests immunologiques ont été étudiés et, même si ces tests sont plus sensibles que les tests fonctionnels, ils ne font pas de distinction entre les anticorps inhibiteurs et non inhibiteurs et ne sont donc pas encore utiles dans

la pratique clinique pour détecter ou surveiller les inhibiteurs fonctionnels. Des études ont toutefois montré que les anticorps de la sous-classe IgG4 sont corrélés avec les inhibiteurs fonctionnels des facteurs VIII et IX (Awasthi *et al.*, 2022 ; Montalvão *et al.*, 2015 ; Moorehead *et al.*, 2015).

Différentes cinétiques des anticorps : des cinétiques différentes peuvent affecter l'analyse des données et entraîner une interprétation erronée. Lorsque les inhibiteurs du facteur VIII ou IX agissent dans un test d'inhibition de manière dose-dépendante, à savoir de complètement inactiver le facteur VIII ou IX, ces inhibiteurs sont appelés inhibiteurs de « type I ». Les inhibiteurs qui présentent un comportement cinétique plus complexe sont généralement appelés « type II », résultant en une inactivation incomplète du facteur VIII. Les inhibiteurs de type I se développent généralement chez les patients atteints d'hémophilie A ou B congénitale en réponse au concentré de facteur VIII ou IX, tandis que ceux de type II surviennent généralement chez les patients atteints d'hémophilie acquise ou d'hémophilie A mineure. Les inhibiteurs du facteur VIII de type I dépendent du temps et de la température car leur cible, le facteur VIII, forme un complexe avec sa protéine porteuse, le FW. Les inhibiteurs du facteur IX ne dépendent pas du temps et de la température.

Échantillons pour le dépistage des inhibiteurs des facteurs VIII et IX : collecte, expédition et préparation

Collecte et acheminement des échantillons : les échantillons pour le dosage des inhibiteurs des facteurs VIII et IX sont prélevés dans du citrate trisodique à 3,2 % (0,105-0,109 M), le même type d'échantillon étant utilisé pour la plupart des tests de coagulation. Le sang total citraté doit être centrifugé dans les quatre heures suivant le prélèvement de sang, à 1500 g pendant 15 minutes. Les échantillons de plasma positifs pour les inhibiteurs des facteurs VIII et IX, et non le sang total, peuvent être conservés à température ambiante pendant une semaine, ou congelés à -70 °C et conservés jusqu'à 15 ans. Il est important de garder à l'esprit que, contrairement aux procédures traditionnelles d'analyse de la coagulation, dans ce type d'échantillon, c'est l'anticorps qui doit être préservé. Ces informations sont très utiles pour les laboratoires qui doivent envoyer des échantillons vers un autre laboratoire, car le transport ne dépend pas de la glace carbonique.

Préchauffage des échantillons : les échantillons de patients servant à la détection des inhibiteurs peuvent contenir du facteur VIII ou IX exogène en raison de perfusions récentes de concentré de facteurs, notamment : (1) prophylaxie, (2) traitement des saignements, (3) ITI ou (4) facteur VIII ou IX endogène si le test est effectué pour une hémophilie mineure ou modérée. La présence de facteur VIII ou IX exogène peut considérablement affecter la détection des inhibiteurs, avec une sous-estimation du titrage et des résultats faussement négatifs (Batty *et al.*, 2014 ; De Lima Montalvão *et al.*, 2015). Le préchauffage des échantillons à 56 °C pendant 30 minutes dissocie le complexe antigène-anticorps et dénature le facteur. Pour standardiser le test, il est recommandé que tous les échantillons à tester soient systématiquement préchauffés, même si aucun facteur VIII ou IX exogène n'est attendu. Le préchauffage doit être suivi d'une étape de centrifugation, de deux minutes à 4 000 g, pour éliminer dans le plasma les résidus dus au préchauffage. Cette étape de préchauffage pour le dépistage des inhibiteurs n'a pas été évaluée pour tous les produits thérapeutiques disponibles. Par conséquent, pour chaque produit de facteur VIII ou IX modifié sur le plan moléculaire, il doit être démontré que le facteur VIII ou IX résiduel se détériore à cause du préchauffage. L'émicizumab n'est pas détruit par l'étape de préchauffage ; les inhibiteurs du facteur VIII peuvent toutefois être mesurés en présence d'émicizumab en ayant recours à la méthode chromogénique du facteur VIII bovin. Il convient de rappeler que certains patients reçoivent un concentré de facteur et l'émicizumab de manière concomitante, et qu'un traitement thermique est donc nécessaire.

Dilution de l'échantillon : pour le titrage de l'inhibiteur, le test doit être effectué avec plusieurs dilutions du plasma à tester. La méthode de sélection du facteur de dilution ne se limite pas à un nombre spécifique, car cela dépend du fait que le titrage précédent de l'inhibiteur soit ou non connu.

Plasma normal poolé pour le dépistage des inhibiteurs : pour évaluer l'activité de l'inhibiteur dans l'échantillon à tester, il est nécessaire de présenter une source « externe » de facteur VIII ou IX pour cet

inhibiteur. Cette source externe est basée sur le pool de plasma normal ; il est donc important de prendre en considération le fait que toute erreur à ce stade peut générer des résultats faux positifs et faux négatifs. Lors de la préparation d'un pool pour le dépistage des inhibiteurs, l'activité du facteur VIII ou IX doit être mesurée et l'écart par rapport à cette valeur doit être surveillé pendant la durée de conservation ou lors de la production d'un nouveau lot. Il convient d'utiliser un pool de plasma normal pour s'assurer que le taux de facteur VIII ou IX est proche de 1 UI/ml (100 %). Un taux de facteur plus faible dans le pool de plasma normal peut entraîner une surestimation du titrage de l'inhibiteur, tandis qu'un taux plus élevé peut entraîner une sous-estimation. Un écart maximum de 5 % de 1 UI/ml de facteur VIII ou IX dans le pool de plasma normal est acceptable. La source externe de facteur VIII ou IX peut être fabriquée en préparant le pool de plasma normal ou à partir d'une source du commerce, et peut être congelée ou lyophilisée. On suggère un minimum de 20 personnes donneuses pour obtenir du plasma ayant un taux de facteur VIII ou IX proche de 1 UI/ml. Le facteur VIII est un facteur de coagulation thermolabile, ce qui signifie que pendant une incubation de deux heures à 37 °C, il y aura une perte significative d'activité du facteur VIII en raison d'un changement de pH. Pour stabiliser le pH pendant l'incubation, le plasma normal utilisé doit être tamponné. Cela peut être fait à l'aide d'un tampon imidazole ou HEPES.

Protocole pour le dépistage des inhibiteurs des facteurs VIII et IX : en 1975, Kasper et al. ont décrit une méthode de détermination des inhibiteurs des facteurs VIII et IX et, à ce jour, il s'agit toujours du test le plus standardisé, connu sous le nom de « test Bethesda ». En 1995, a été décrite la méthode de Nijmegen, modification du test Bethesda, avec quelques différences : (1) l'introduction d'un pool tamponné pour améliorer la stabilité du facteur VIII pendant l'incubation, et (2) l'utilisation de plasma déficient en facteur VIII dans le mélange de contrôle. Cette méthode de Bethesda modifiée a été recommandée par la Société internationale de thrombose et d'hémostase (ISTH) comme méthode de référence pour le dépistage des inhibiteurs du facteur VIII (Verbruggen et al., 1995). Le dépistage des inhibiteurs est une méthode indirecte et repose sur le principe d'inactivation du facteur de coagulation d'une source externe connue par l'inhibiteur dans l'échantillon à tester pendant une période d'incubation. Une unité Bethesda est définie comme la quantité d'inhibiteur qui neutralisera 50 % d'une unité de facteur VIII ajoutée en deux heures à 37 °C.

Réactifs et équipement :

- Tampon de dilution (partie 1)
- Tampon imidazole ou HEPES (ci-dessous)
- Pool de plasma normal (partie 2)
- Plasma déficient en facteur VIII
- Céphaline (réactif de TCA)
- Tubes en plastique

Tableau 22. Tampon imidazole ou HEPES

Tampon	
Imidazole	Mélanger une partie de tampon imidazole 4 M à 39 parties de pool de plasma normal. Après le mélange, le pH doit être ajusté entre 7,3 et 7,5.
HEPES	Mélanger une partie de tampon HEPES 1 M à neuf parties de pool de plasma normal. Après le mélange, le pH doit être ajusté entre 7,3 et 7,5.

Méthode : préparer des dilutions du plasma à tester dans des tubes en plastique jusqu'à un volume final de 0,2 ml à l'aide du tampon de dilution. Les dilutions requises pour chaque patient peuvent varier. Un point de départ suggéré serait de commencer par un échantillon non dilué, puis d'effectuer des dilutions de 1/2, 1/4, 1/8, etc.

Remarque : si un dosage des inhibiteurs a déjà été effectué, le taux peut servir de guide approximatif quant aux dilutions à utiliser. Pipeter 0,2 ml de plasma déficient en facteur VIII dans un autre tube en plastique. Cela servira de tube témoin.

Remarque : dans le test de Bethesda d'origine, le tampon imidazole a servi à préparer un mélange de contrôle avec le pool de plasma normal. Dans le test de Nijmegen, le tampon imidazole est remplacé par du plasma déficient en facteur VIII. Des différences ont été observées entre un plasma déficient en facteurs par immunodéplétion, un plasma déplété chimiquement et un plasma issu de personnes donneuses ayant un déficit congénital. Ces différences peuvent être dues à l'absence ou à la présence de FW dans le plasma, à la présence d'anticorps ou à la présence de fragments de facteur VIII. Comme le FW est présent dans le pool de plasma normal, il n'est pas nécessaire que le diluant du mélange de contrôle contienne également du FW et, pour réduire les coûts, le plasma déficient en facteur peut être remplacé par de l'albumine de sérum bovin (BSA) à 4 %. La BSA tamponnée à 4 % est un substitut fiable et économique du plasma avec facteur VIII ou IX et favorise la standardisation de la méthode.

- ✓ Ajouter 0,2 ml de pool de plasma normal tamponné au tube témoin et aux dilutions de plasma à tester. Le taux de facteur VIII de tous les tubes sera d'environ 0,5 UI/ml. Cela signifie que le pool de plasma normal tamponné contient 1 UI/ml de facteur VIII.
- ✓ Boucher, mélanger et incuber tous les tubes à 37 °C pendant deux heures.
- ✓ Après deux heures, transférer tous les tubes dans un bain de glace, sauf si le dosage du facteur VIII doit être effectué immédiatement.
- ✓ Procéder au dosage du facteur VIII sur tous les mélanges incubés selon la méthode de dosage habituelle, en un temps ou chromogénique (partie 6).
- ✓ Lire le taux de facteur VIII résiduel de chaque mélange, en utilisant le contrôle comme la valeur 100 % (0,5 UI/ml).

Factor Inhibitor Assay

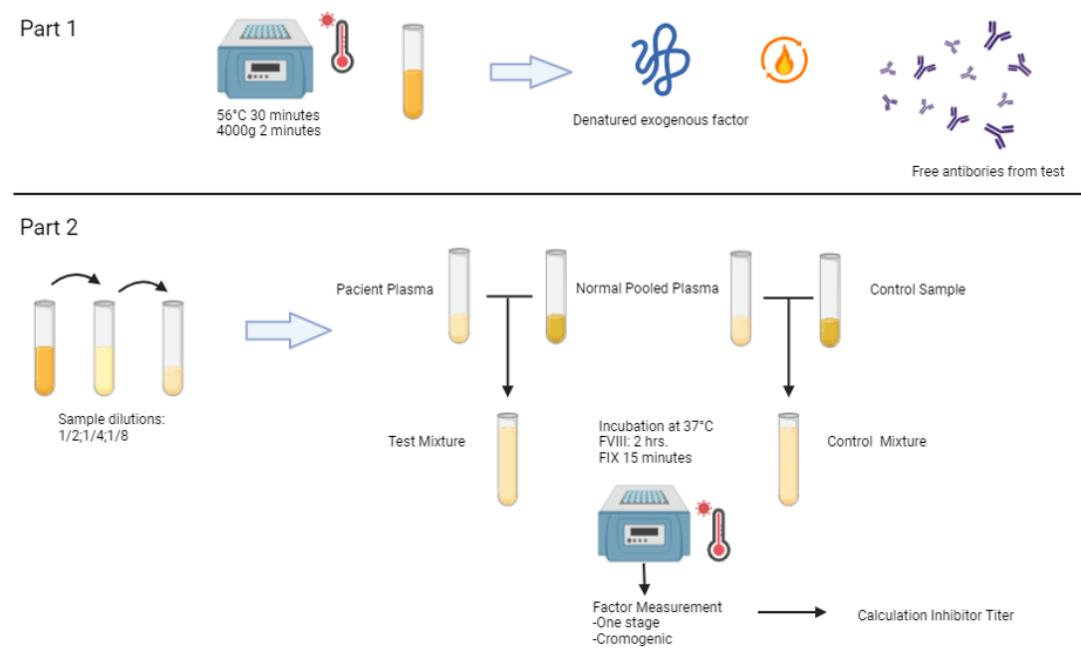


Figure 8. Procédures de dosage des inhibiteurs

Résultats et interprétation : la dilution qui fournit un facteur VIII résiduel le plus proche de 50 %, mais dans la plage de 25 à 75 %, est sélectionnée pour le calcul de l'inhibiteur. Tout facteur VIII résiduel < 25 % ou > 75 % ne doit pas être utilisé pour les calculs du taux d'inhibiteurs. Un graphique du pourcentage de facteur VIII résiduel par rapport aux unités d'inhibiteurs peut être réalisé sur du papier log/log à partir

de la définition de l'unité d'inhibiteur. Lire le taux d'inhibiteur correspondant au facteur VIII résiduel pour chaque mélange à tester et corriger la dilution. Par exemple, si la valeur la plus proche de 50 % du facteur résiduel a été trouvée dans la dilution 1/4 (c'est-à-dire dans le mélange 1/4 + pool normal), le résultat, qui sera proche de 1 unité Bethesda (UB), doit être multiplié par 4.

- ✓ Dilution 1/4 + pool normal
- ✓ FVIII résiduel = 50 %
- ✓ Unité d'inhibiteur (à partir du graphique) = 1 UB
- ✓ Multiplier par le facteur de dilution (1/4) = 4 UB

Remarque : le dosage de l'inhibiteur repose sur la détermination du facteur VIII ou IX résiduel du mélange de plasma à tester et de plasma de contrôle précédemment incubé. Les tests de Bethesda et de Nijmegen ont été développés à l'aide d'un dosage de facteur de coagulation en un temps. Le dépistage des inhibiteurs au moyen de ce test présente toutefois des limites. En effet, la formation de caillots peut notamment être affectée par l'anticoagulant de type lupique (inhibiteurs de la coagulation non spécifiques) et des médicaments tels que l'émicizumab. Le recours à une méthode chromogénique pourrait être une solution pour éviter ces problèmes. Un autre avantage du recours à une méthode chromogénique est la plus grande exactitude des résultats. Un échantillon de patient non dilué avec une activité résiduelle > 75 % peut être rapporté à < 0,4 UB/ml. Pour les inhibiteurs du facteur VIII, le comité scientifique et de normalisation de l'ISTH recommande de considérer un résultat $\geq 0,6$ UB/ml comme positif. En plus de la courbe d'étalonnage, le titrage d'inhibiteur peut être calculé à l'aide de la formule : $(2-\log \%AR)/0,301$. Dans le cas d'un inhibiteur de type I, une courbe du plasma d'un patient montre un parallélisme avec la courbe d'étalonnage. Une absence de parallélisme indique une cinétique différente de type II. Pour les inhibiteurs ayant une cinétique de type II, utiliser la dilution la plus faible qui se rapproche de 50 % de l'activité résiduelle pour le calcul final du titrage d'inhibiteur.

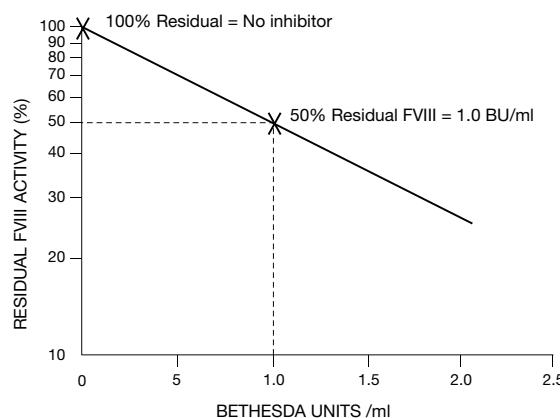


Figure 9. Calcul de l'activité résiduelle du facteur

Remarques : les inhibiteurs fonctionnels les plus courants sont les anticoagulants lupiques, qui ne sont pas dirigés contre les facteurs de coagulation spécifiques et qui doivent être exclus avant le dépistage d'inhibiteurs spécifiques. La quantification du titrage de l'inhibiteur est effectuée en laboratoire, de préférence à l'aide de la méthode Bethesda modifiée par Nijmegen, car cette modification améliore la spécificité et la sensibilité par rapport au dosage Bethesda initial. Les résultats positifs du dosage de l'inhibiteur du facteur VIII inférieurs à 2,0 UB peuvent être confirmés par la méthode chromogénique, car elle présente moins d'interférences analytiques et une plus grande exactitude par rapport à la méthode en un temps. La méthode chromogénique est également le meilleur choix si l'on suspecte la présence d'anticoagulants lupiques dans l'échantillon à tester ou si celui-ci contient des anticoagulants thérapeutiques, tels que l'héparine ou des inhibiteurs directs du facteur Xa ou IIa. Les anticorps anti-FVIII non neutralisants qui ne

sont pas détectés par le test Nijmegen-Bethesda peuvent être cliniquement pertinents, car ils peuvent augmenter la clairance du facteur VIII et être mesurés par ELISA.

Dosages des inhibiteurs du facteur Willebrand : La maladie de Willebrand (mW) est considérée comme le plus fréquent des troubles de la coagulation héréditaires connus chez l'être humain, avec une prévalence dans la population de 1 % et une prévalence symptomatique de 1/1000 (Bowman et al., 2010). Les options thérapeutiques sont notamment la perfusion de concentrés de facteur Willebrand (FW), qui généralement contiennent aussi du facteur VIII, administrés pour prévenir ou traiter les épisodes hémorragiques. Les allo-anticorps anti-FW ont une prévalence comprise entre 7 et 9,5 % (James et al., 2013 ; Pagliari et al., 2023). Dans de tels cas, le traitement par concentrés de FW est inefficace, et des épisodes d'anaphylaxie ont été rapportés avec une exposition ultérieure au FW (James et al., 2013). Comme nous le savons déjà, le déficit en FW peut s'expliquer par différents mécanismes résultant de types d'anomalies génétiques identifiés. Cette variabilité des anomalies génétiques contribue à une hétérogénéité des inhibiteurs ciblant différents épitopes de la molécule de FW. Pour cette raison, la détection de ces anticorps est difficile en laboratoire (Connell et al., 2021 ; Miller, 2021 ; Sarji et al., 1974). En 1974, Sarji et al. (1974) ont signalé pour la première fois un cas d'allo-anticorps anti-FW chez un patient multitransfusé. L'inhibiteur du FW a été mesuré à l'aide d'une méthode analogue à la méthode Bethesda pour les inhibiteurs du facteur VIII (Sarji et al., 1974). Bien qu'il n'y ait pas de standardisation pour l'identification des inhibiteurs du FW, la méthode Bethesda a été utilisée par la plupart des laboratoires (Favaloro et al., 2022), à la différence qu'a été évaluée l'activité du FW plutôt que celle du facteur VIII ou IX. Sont actuellement disponibles différents types de méthodes pour détecter l'activité du FW, avec diverses sensibilités et spécificités ; il est donc important de prendre en considération le fait que cette variabilité des méthodes influence la sensibilité et la spécificité de la détection de ces inhibiteurs (Favaloro et al., 2022). Les anticorps anti-FW n'ont pas pour caractéristique d'être dépendants du temps et de la température, ils peuvent donc être évalués immédiatement après le test de mélange (Sarji et al., 1974). La méthode classique du cofacteur de la ristocétine, qui évalue l'interaction du FW avec les plaquettes fixées en présence de ristocétine, ainsi que la méthode d'évaluation au collagène et la méthode du gain de fonction, sont des options qui ont déjà été évaluées et se sont révélées avoir une bonne sensibilité et une bonne stabilité, bien que présentant des résultats différents, comme évoqué ci-dessus. Les autres méthodes disponibles n'ont pas encore été évaluées pour ce type d'exploration. Des méthodes immunologiques ont aussi été décrites et détectent les anticorps neutralisants et non neutralisants. En lien avec le développement d'auto-anticorps qui caractérisent la mW acquise, les patients ayant des néoplasmes myéloprolifératifs sont un sous-groupe présentant des complications hémorragiques liées à l'activité du FW. Selon la technologie appliquée, de faux résultats sont observés dans les échantillons de patients avec néoplasmes myéloprolifératifs. L'étude en laboratoire des inhibiteurs du FW caractérisés par des allo-anticorps et des auto-anticorps doit être menée avec prudence compte tenu des différentes options méthodologiques. Les performances de toutes les méthodes modernes actuellement disponibles ne sont pas encore claires (Noye et al., 2024 ; Favaloro et al., 2022).

Anticorps anti-médicament dans le laboratoire d'analyse de la coagulation - Émicizumab : l'émicizumab est un anticorps bispécifique qui se lie au facteur IX/IXa et au facteur X/Xa humains et agit comme un mimétique de la fonction du facteur VIII. Il n'est pourtant pas régulé par les mécanismes qui régulent le facteur VIII (Mahlangu et al., 2018, Mahlangu et al., 2022). Le test de dépistage du TCA est considérablement réduit par l'émicizumab (c'est-à-dire en dessous de la plage de référence, quels que soient les réactifs utilisés). L'émicizumab affecte tous les essais et dosages de laboratoire basés sur le TCA. Il interfère aussi avec les dosages chromogéniques du facteur VIII utilisant les facteurs IXa et X humains, mais pas ceux utilisant les facteurs IXa et X d'origine bovine (Bowyer et al., 2021 ; Jenkins et al., 2020). L'émicizumab peut être mesuré et communiqué en µg/ml au moyen d'un dosage en un temps modifié avec une dilution plus élevée de l'échantillon et calibré avec des étalons spécifiques à l'émicizumab. Les anticorps anti-médicament (AAM) peuvent se développer après une dose unique ou l'administration répétée d'une protéine thérapeutique, et affecter la pharmacocinétique, la pharmacodynamique, l'efficacité et/ou l'innocuité de cette protéine thérapeutique. Les études évaluant les caractéristiques des AAM chez

les patients traités par émizumab montrent que le test de TCA peut être allongé en conjonction avec des épisodes hémorragiques en présence d'anticorps à action neutralisante (Novembrino et al., 2023 ; Valsecchi et al., 2021). Dans ce cas, lorsque le taux d'émicizumab était mesuré, il montrait une réduction significative. L'activité neutralisante de ces anticorps n'a pas été clairement identifiée dans les méthodes fonctionnelles, même pour le test Bethesda modifié (Kaneda et al., 2021). Le taux de l'unité Bethesda identifiée semble être plus faible que prévu par rapport au test qui mesure le taux d'émicizumab. Le rôle des tests fonctionnels pour les AAM n'a pas encore été établi, mais ces tests peuvent venir compléter la mesure du taux plasmatique du médicament dans ces circonstances. La FMH recommande de mesurer les taux d'émicizumab à l'aide d'un dosage en un temps modifié avec une dilution plus élevée de l'échantillon et calibré avec des étalons spécifiques à l'émicizumab (Srivastava et al., 2020).

Références

- Awasthi NP, Tiwari V, Riaz K, Arshad S, Husain N. Revealing and IgG4 analysis to factor VIII in haemophilia-A patients with and without inhibitors. *Transfus Apher Sci* 2022; 61(3): 103343.
- Batty P, Platton S, Bowles L, Pasi KJ, Hart DP. Pre-analytical heat treatment and a FVIII ELISA improve factor VIII antibody detection in acquired haemophilia A. *Br J Haematol* 2014; 166(6): 953-956.
- Bowman M, Hopman WM, Rapson D, Lillicrap D, James P. The prevalence of symptomatic von Willebrand disease in primary care practice. *J Thromb Haemost* 2010; 8(1): 213-216.
- Bowyer AE, Lowe AE, Tiefenbacher S. Laboratory issues in gene therapy and emicizumab. *Haemophilia* 2021; 27 Suppl 3: 142-147.
- Connell NT, Flood VH, Brignardello-Petersen R, Abdul-Kadir R, Arapshian A, Couper S et al. ASH ISTH NHF WFH 2021 guidelines on the management of von Willebrand disease. *Blood Adv* 2021; 5(1): 301-325.
- de Lima Montalvão SA, Tucunduva AC, de Almeida Sambo AL, De Paula EV, de Souza Medina S, Ozelo MC. Heat treatment of samples improve the performance of the Nijmegen-Bethesda assay in hemophilia A patients undergoing immune tolerance induction. *Thromb Res* 2015; 136(6): 1280-1284.
- Favaloro EJ, Dean E, Arunachalam S, Vong R, Mohammed S. Evaluating errors in the laboratory identification of von Willebrand disease using contemporary von Willebrand factor assays. *Pathology* 2022; 54(3): 308-317.
- James PD, Lillicrap D, Mannucci PM. Alloantibodies in von Willebrand disease. *Blood* 2013; 122(5): 636-640.
- Jenkins PV, Bowyer A, Burgess C, Gray E, Kitchen S, Murphy P, Platton S, Riddell A, Chowdary P, Lester W. Laboratory coagulation tests and emicizumab treatment a United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation guideline. *Haemophilia* 2020; 26(1): 151-155.
- Kaneda M, Kawasaki R, Matsumoto N, Abe H, Tashiro Y, Inokuchi Y et al. Detailed analysis of anti-emicizumab antibody decreasing drug efficacy, using plasma samples from a patient with hemophilia A. *J Thromb Haemost* 2021; 19(12): 2938-2946.
- Ljung R, Auerswald G, Benson G, Dolan G, Duffy A, Hermans C et al. Inhibitors in haemophilia A and B: Management of bleeds, inhibitor eradication and strategies for difficult-to-treat patients. *Eur J Haematol* 2019; 102(2): 111-122.
- Mahlangu J, Iorio A, Kenet G. Emicizumab state-of-the-art update. *Haemophilia* 2022; 28 Suppl 4(Suppl 4): 103-110.
- Mahlangu J, Oldenburg J, Paz-Priel I, Negrier C, Niggli M, Mancuso ME et al. Emicizumab prophylaxis in patients who have hemophilia A without inhibitors. *N Engl J Med* 2018; 379(9): 811-822.
- Miller CH. Monitoring of von Willebrand factor inhibitors in patients with type 3 von Willebrand disease using a quantitative assay. *Haemophilia* 2021; 27(5): 823-829.
- Montalvão SA, Tucunduva AC, Siqueira LH, Sambo AL, Medina SS, Ozelo MC. A longitudinal evaluation of anti-FVIII antibodies demonstrated IgG4 subclass is mainly correlated with high-titre inhibitor in haemophilia A patients. *Haemophilia* 2015; 21(5): 686-692.

Moorehead PC, Thibeault L, Tuttle A, Grabell J, Dwyre L, Silva M, James P, Lillicrap D. Rapid acquisition of immunologic tolerance to factor VIII and disappearance of anti-factor VIII IgG4 after prophylactic therapy in a hemophilia A patient with high-titer factor VIII inhibitor. *J Pediatr Hematol Oncol* 2015; 37(4): e220-222.

Novembrino C, Boscolo-Anzoletti M, Galbiati E, Shinohara S, Peyvandi F. Effect of emicizumab-neutralizing antibodies on activated partial thromboplastin time-based clotting time test results in patients treated with emicizumab. *Res Pract Thromb Haemost* 2023; 7(8): 102260.

Noye J, Beggs J, Mason J. Discrepant low von Willebrand factor activity results on the ACL TOP analyzer are frequent in unselected patients with myeloproliferative neoplasms and show no correlation with high-molecular-weight multimer loss or bleeding phenotype. *J Thromb Haemost* 2024; 22(4): 965-974.

Pagliari MT, Budde U, Baronciani L, Eshghi P, Ahmadinejad M, Badiee Z et al. Von Willebrand factor neutralizing and non-neutralizing alloantibodies in 213 subjects with type 3 von Willebrand disease enrolled in 3WINTERS-IPS. *J Thromb Haemost* 2023; 21(4): 787-799.

Peyvandi F, Garagiola I, Young G. The past and future of haemophilia: Diagnosis, treatments, and its complications. *Lancet* 2016; 388(10040): 187-197.

Pratt KP, Arruda VR, Lacroix-Desmazes S. Inhibitors-Recent insights. *Haemophilia* 2021; 27 Suppl 3: 28-36.

Sarji KE, Stratton RD, Wagner RH, Brinkhous KM. Nature of von Willebrand factor: A new assay and a specific inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974; 71(8): 2937-2941.

Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, Kitchen S, Sutherland M, Pipe SW et al. WFH guidelines for the management of hemophilia, 3rd edition. *Haemophilia* 2020; 26 Suppl 6: 1-158.

Valsecchi C, Gobbi M, Beeg M, Adams T, Castaman G, Schiavone L, Huntington JA, Peyvandi F. Characterization of the neutralizing anti-emicizumab antibody in a patient with hemophilia A and inhibitor. *J Thromb Haemost* 2021; 19(3): 711-718.

Verbruggen B, Novakova I, Wessels H, Boezeman J, van den Berg M, Mauser-Bunschoten E. The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: Improved specificity and reliability. *Thromb Haemost* 1995; 73(2): 247-251.

SUJETS ABORDÉS

- ✓ Dosages de l'activité de liaison du facteur Willebrand aux plaquettes - Nitty S. Mathews
- ✓ Antigène du facteur Willebrand - Tulasi Geevar
- ✓ Dosage de la liaison du facteur Willebrand au collagène - Tulasi Geevar
- ✓ Dosage de la liaison au facteur VIII - Tulasi Geevar
- ✓ Multimères du facteur Willebrand - Annette Bowyer
- ✓ Interprétation des tests du facteur Willebrand - Tulasi Geevar
- ✓ Variables préanalytiques dans le diagnostic de la maladie de Willebrand - Tulasi Geevar
- ✓ Tests à disposition pour le diagnostic de la maladie de Willebrand - Tulasi Geevar
- ✓ Diagnostic de la maladie de Willebrand dans les contextes pauvres en ressources - Tulasi Geevar

Dosages de l'activité de liaison du facteur Willebrand aux plaquettes (dosages de l'activité du facteur Willebrand) : l'ensemble des lignes directrices utilisant le rapport VWF:RCo/VWF:Ag pour déterminer si le patient a une mW de type 1 (quantitative) ou de type 2 (qualitative), le rôle de l'activité de liaison du FW à la glycoprotéine Ib (GPIb) est de la plus haute importance dans la classification de la mW. Un panel de lignes directrices multidisciplinaires, établi par l'*American Society of Hematology* (ASH), la Société internationale de thrombose et d'hémostase (ISTH), la *National Hemophilia Foundation* (NHF, désormais *National Bleeding Disorders Foundation* [NBDF]) et la FMH, suggère des dosages plus récents qui mesurent l'activité de liaison du FW aux plaquettes (par exemple FW:GP1bM et VWF:GP1bR) plutôt que le dosage conventionnel du cofacteur de la ristocétine du FW (VWF:RCo) [recommandation 4] (James et al., 2021). Le panel a jugé que les bénéfices des dosages plus récents étaient modérés, reflétant le CV plus faible et la reproductibilité plus élevée en comparaison du VWF:RCo. Le dosage VWF:GP1bR nécessite la présence de ristocétine ajoutée et peut donc être faire face aux mêmes problèmes que le dosage VWF:RCo en ce qui concerne les polymorphismes de liaison à la ristocétine. Il utilise pourtant un fragment de GP1b recombinante au lieu de plaquettes. En revanche, le dosage VWF:GP1bM utilise une molécule GPIb α recombinante qui comporte plusieurs mutations de gain de fonction ; par conséquent, ce variant GP1b se lie au domaine A1 du FW même en l'absence de ristocétine (Laffan et al., 2014). Dans une étude d'assurance externe de la qualité menée en 2022 par le *College of American Pathologists* sur le programme d'essais d'aptitude du FW (Salazar et al., 2022), le CV global pour le VWF:RCo variait de 14,6 à 23,5 % pour les résultats sur des échantillons normaux et de 24,3 à 44,8 % pour les résultats sur des échantillons à faible activité. Les CV étaient inférieurs pour VWF:GP1bM et VWF:Ab, allant de 8,0 à 34,8 %, incluant à la fois des échantillons normaux et anormaux. Une étude comparant différents dosages d'activité de liaison VWF:GP1b a rapporté que la sensibilité et la spécificité pour différencier le type 1 et le type 2 de la mW, sur la base des rapports activité/antigène en utilisant un seuil de 0,7, étaient de 92 % et 72,4 % pour VWF:RCo, de 84 % et 89,7 % pour GP1bR, et de 92 % et 85,1 % pour GP1bM (Vangenechten et al., 2018).

Tableau 23. Synthèse des dosages automatisés de l'activité du FW disponibles dans le commerce

Activité du FW – nomenclature ISTH	Principe	Dosages	Méthode de détection
VWF:RCo	Agrégation de plaquettes lyophilisées induite par la ristocétine	1. Réactif FW Siemens BC (Siemens, Marbourg, Allemagne) 2. STA-VWF:Rco (Diagnostica Stago, France)	Agglutination de plaquettes lyophilisées
VWF:GP1bR	Liaison induite par la ristocétine du FW à un fragment GPIb recombinant	1. Activité cofacteur de la ristocétine du FW HemosIL 2. Activité cofacteur de la ristocétine du FW HemosIL AcuStar (Instrumentation Laboratory, Bedford, MA, États-Unis)	1. Agglutination de billes de latex 2. Chimiluminescence
VWF:GP1bM	Liaison du FW à un fragment GPIb mutant à gain de fonction sans ristocétine	Siemens INNOVANCE VWF Ac (Siemens, Marbourg, Allemagne)	Agglutination de billes de latex
VWF:Ab	Liaison d'un anticorps monoclonal à un épitope du domaine A1 du FW (site de liaison plaquettaire)	Activité du FW HemosIL (Instrumentation Laboratory, Bedford, MA, États-Unis)	Agglutination de billes de latex

Avertissement d'ordre général : les kits de réactifs/protocoles énumérés ci-dessous ont été validés sur un ou plusieurs analyseurs de coagulation par le fabricant pour optimiser les performances et répondre aux spécifications du produit. Les modifications définies par l'utilisateur peuvent ne pas être prises en charge, car elles sont susceptibles d'affecter les performances du système et les résultats du dosage. Il est de la responsabilité de l'utilisateur de valider les modifications apportées à ces instructions ou à l'utilisation des réactifs sur des analyseurs autres que ceux inclus dans les fiches d'application ou le mode d'emploi spécifiques du fabricant.

Dosages automatisés de l'activité du FW

Dosage du cofacteur de la ristocétine du FW (VWF:RCo) : des dilutions d'un étalon (dont la valeur du cofacteur de la ristocétine est connue) sont réalisées et mélangées avec des plaquettes lyophilisées, de sorte qu'une quantité connue de cofacteur est ajoutée aux plaquettes. L'agrégation induite par la ristocétine est ensuite mesurée et une courbe standard est tracée. Les échantillons à tester sont traités de manière similaire et la valeur du cofacteur de la ristocétine est calculée à partir du graphique standard. Échantillon primaire : plasma citraté.

Réactifs :

- ✓ Plaquettes fixées lyophilisées (réactif BC von Willebrand5, Siemens Healthcare Diagnostics, Marbourg, Allemagne)
- ✓ Solution saline normale
- ✓ Plasma étalon
- ✓ Plasma du patient et plasmas de contrôle (contrôle normal [par exemple N] et un contrôle anormal de bas niveau [par exemple P])
- ✓ Réactif ristocétine (par exemple Revohem, 25 mg/ml ; reconstituer avec 0,625 ml d'eau distillée et bien mélanger)
- ✓ Eau distillée

Préparation du réactif :

- ✓ Commencer par reconstituer le réactif Willebrand avec 4 ml d'eau distillée et diluer avec 7 ml de solution saline. Vérifier la numération plaquettaire ; elle doit être comprise entre ~2 000 000 et 2 050 000/mm³. Ajouter 50,0 µl de réactif ristocétine pour 950 µl de plaquettes.
- ✓ Reconstituer le plasma étalon avec exactement 1 ml d'eau distillée. Laisser le matériau reconstitué reposer à température ambiante (entre 18 et 25 °C) pendant 30 minutes. Ensuite, faire doucement tournoyer le flacon avant utilisation. Le matériau est stable pendant huit heures à 15-25 °C. Il peut être congelé et conservé à -80 °C au minimum.
- ✓ Plasma de contrôle anormal (P). Reconstituer le plasma de contrôle P avec exactement 1 ml d'eau distillée ou désionisée. Agiter soigneusement pour dissoudre sans formation de mousse et laisser reposer à température ambiante (entre 18 et 25 °C) pendant 15 minutes. Avant utilisation, agiter à nouveau avec précaution.
- ✓ Contrôle normal (N). Reconstituer le plasma de contrôle N avec exactement 1 ml d'eau distillée ou désionisée. Agiter soigneusement pour dissoudre sans formation de mousse et laisser reposer à température ambiante (entre 18 et 25 °C) pendant 30 minutes. Avant utilisation, agiter à nouveau avec précaution.

Procédure :

- ✓ Les réactifs nécessaires (plaquettes lyophilisées avec ristocétine), la solution saline normale et l'étalon sont chargés sur l'analyseur de coagulation.
- ✓ La courbe standard est exécutée.
- ✓ Une fois l'étalonnage terminé, la courbe d'étalonnage doit être examinée et validée. La courbe validée est la courbe d'étalonnage utilisée pour la détermination des résultats.
- ✓ Analyser l'échantillon à tester.

Protocole de CQ :

Analyser le contrôle normal (N) et le contrôle anormal de bas niveau (P).

Remarque : les contrôles et le plasma étalon doivent être achetés séparément.

Interférence possible :

- ✓ Les plaquettes ne sont pas correctement diluées.
- ✓ La concentration de ristocétine est modifiée.

Interprétation des résultats :

Les résultats sont indiqués en pourcentage.

Valeurs attendues (évaluation sur le système BCS ; Siemens, Marbourg, Allemagne) :

Groupe sanguin	% de normalité
Tous (n = 185)	58–172
O	49–142
A+B+AB	66–183

Dosage VWF:GP IbR (activité cofacteur de la ristocétine du FW HemosIL® AcuStar⁶ ; Instrumentation Laboratory, MA, États-Unis) : il s'agit d'un immunodosage en deux temps quantifiant l'activité du VWF:RCo dans du plasma citraté humain, qui fait appel à des particules magnétiques comme phase solide et à un système de détection par chimiluminescence. Dans un premier temps, l'échantillon est mélangé avec le

tampon contenant de la ristocétine et des particules magnétiques enrobées d'un fragment recombinant du récepteur plaquettaire de la glycoprotéine du FW (rGP1b α) au moyen d'un anticorps monoclonal spécifique, qui orientent le fragment de GP1b α de manière appropriée pour interagir avec le FW de l'échantillon du patient en présence de ristocétine. Le FW présent dans l'échantillon se lie aux particules magnétiques proportionnellement à son activité cofacteur de la ristocétine. Après séparation magnétique et lavage, un anticorps monoclonal anti-FW marqué à l'isoluminol est ajouté et incubé dans un second temps. Après une nouvelle séparation magnétique et un lavage, deux déclencheurs sont ajoutés. Une réaction de chimiluminescence a lieu et est mesurée par le système optique ACL AcuStar. Le résultat est exprimé en unités de lumière relative (RLU) et proportionnel à la concentration de l'activité VWF:RCo dans l'échantillon.

Échantillon primaire : plasma citraté.

Réactifs (composition du kit) :

- ✓ Cartouche VWF:RCo pour 25 déterminations

Chaque cartouche contient un flacon d'une suspension de particules magnétiques enrobées d'une rGP1b α au moyen d'un anticorps monoclonal de souris spécifique, un flacon de tampon contenant du sulfate de ristocétine, un flacon d'un traceur contenant un anticorps monoclonal de souris anti-FW marqué à l'isoluminol et un flacon de diluant de l'échantillon. Les réactifs sont dans un tampon citrate ou HEPES contenant de la BSA, de l'IgG de souris, des stabilisants et un conservateur.

- ✓ Étalon 1 VWF:RCo : solution saline HEPES contenant de la BSA, de l'IgG de souris, des stabilisants et des conservateurs.
- ✓ Étalon 2 VWF:RCo : plasma humain lyophilisé contenant un tampon, des stabilisants et des conservateurs.

Préparation/procédure :

- ✓ Retourner délicatement la cartouche à 30 reprises en évitant la formation de mousse.
- ✓ Après la remise en suspension complète des microparticules, placer la cartouche sur une surface solide et retirer délicatement la languette d'expédition de la cartouche.
- ✓ Appuyer sur les deux languettes sur les côtés du capuchon de perforation (couleur grise) et appliquer une pression sur la partie supérieure de la cartouche jusqu'à ce qu'elle se verrouille.
- ✓ Une fois que la cartouche est stable, la charger sur l'instrument.
- ✓ Les flacons d'étalons dilués sont transférés dans les tubes à code-barres en plastique respectifs et chargés dans l'analyseur (ACL AcuStar).
- ✓ La courbe standard est exécutée.
- ✓ Une fois l'étalonnage terminé, la courbe d'étalonnage doit être examinée et validée. La courbe validée est la courbe d'étalonnage utilisée pour la détermination des résultats.
- ✓ Analyser l'échantillon à tester.

Contrôle qualité :

- ✓ Contrôles (deux niveaux) recommandés (se les procurer à part).
- ✓ Chaque laboratoire doit établir sa propre moyenne et son écart type.

Traçabilité des étalons et des contrôles :

Les valeurs rapportées ont été déterminées au cours de plusieurs cycles sur le système ACL AcuStar, à l'aide de lots spécifiques de réactifs et par rapport à un standard interne, dont la valeur a été attribuée par rapport au matériau de référence international actuel pour le facteur Willebrand et le facteur VIII.

Résultats :

Les résultats de VWF:RCO sont rapportés en pourcentage, ce qui équivaut à UI/dl.

Tableau 24. Valeurs attendues pour VWF:RCO

Type ABO	Nombre d'échantillons analysés	VWF:RCO HemosIL AcuStar (VWF:GP1bR)
Tous	287	45,6–176,3 %
O	163	43,8–161,5 %
A+B+AB	124	53,8–210,8 %

Remarque : il est recommandé que chaque laboratoire établisse ses propres plages VWF:RCO normales en fonction de la population concernée et de la technique, de la méthode et de l'équipement utilisés. Linéarité : 0,5 à 200,0 %. Limite de détection : 0,17 %.

Dosage VWF:GP1bM (Innovance®VWF Ac ; Siemens Healthcare Diagnostics, Marbourg, Allemagne) : le principe du dosage fait appel à la liaison du FW à son récepteur GPIb. Les particules de polystyrène sont enrobées d'un anticorps anti-GPIb. Une GPIb recombinante (deux mutations de gain de fonction incluses) est ajoutée et se lie à l'anticorps ainsi qu'au FW de l'échantillon. En raison des mutations de gain de fonction, la liaison du FW à la GPIb ne nécessite pas de ristocétine. Cette liaison induit une agglutination des particules dont le degré d'augmentation de l'extinction peut faire l'objet d'une mesure par turbidimétrie.

Échantillon primaire : plasma citraté.

Tableau 25. Réactifs (composition du kit) Innovance® VWF Ac

Innovance® VWF Ac	Ingrédients	Concentration	Source
RÉACTIF I	Tampon, saccharose, particules de polystyrène enrobées d'anticorps monoclonaux anti-GPIb, amphotéricine B, gentamicine	2,2 g/l	Souris
RÉACTIF II	Solution saline tamponnée, réactif bloquant hétérophile, détergent, polyvinylpyrrolidone, azoture de sodium	< 1 g/l	
RÉACTIF III	Solution saline tamponnée, GPIb recombinante, amphotéricine B, gentamicine	≤ 80 mg/l	

Préparation/procédure :

- ✓ Les réactifs (RI, RII et RIII), le tampon imidazole et l'étalon sont chargés dans l'analyseur.
- ✓ La courbe standard est exécutée.
- ✓ Une fois l'étalonnage terminé, la courbe d'étalonnage doit être examinée et validée. La courbe validée est la courbe d'étalonnage utilisée pour la détermination des résultats.
- ✓ Analyser l'échantillon à tester.

Étalonnage : une courbe standard est générée par détermination automatique de différentes dilutions de plasma humain standard et du tampon véronal d'Owren. Elle doit être régénérée s'il y a un changement dans l'instrument ou dans le lot d'Innovance® VWF Ac utilisé, ou si les résultats de contrôle sont hors de la plage acceptable. L'étalonnage du dosage est effectué avec du plasma humain standard calibré par rapport à la valeur VWF:RCO de l'étalon international pour le facteur VIII et le facteur Willebrand de coagulation sanguine dans le plasma.

Les échantillons initialement au-dessus de la plage d'étalonnage sont dilués par l'instrument, ce qui donne une plage de mesure allant jusqu'à 600 % de la normale.

Contrôle qualité :

- ✓ Les contrôles (deux niveaux) doivent être achetés séparément
- ✓ Plage normale : plasma de contrôle N
- ✓ Plage pathologique : plasma de contrôle P

Résultats :

- ✓ Les résultats sont rapportés en pourcentage de normalité
- ✓ 100 % = 1 UI/ml

Valeurs attendues : les échantillons de plasma frais provenant de personnes donneuses apparemment saines ont été analysés à l'aide du dosage Innovance® VWF Ac sur le système BCS®/BCS® XP avec des résultats (du 2,5^e au 97,5^e percentile) indiqués au tableau 26.

Tableau 26. Valeurs attendues pour le dosage Innovance® VWF Ac

Groupe sanguin	Nombre d'échantillons analysés	% de normalité
Tous	263	47,8–173,2
O	129	46,3–145,6
A+B+AB	134	61,4–179,1

Remarque : il est recommandé que chaque laboratoire établisse ses propres plages VWF:RCo normales en fonction de la population concernée et de la technique, de la méthode et de l'équipement utilisés.

Linéarité : 4 à 150 %

Limite de détection : 2,2 %

Dosage VWF:Ab (activité du FW HemosIL®, Instrumentation Laboratory, Bedford, MA, États-Unis) : le kit d'activité du FW est un dosage immunoturbidimétrique renforcé par des particules de latex pour quantifier l'activité du FW dans le plasma. Pour cela, est mesurée l'augmentation de la turbidité produite par l'agglutination du réactif au latex. Un anticorps monoclonal anti-FW spécifique adsorbé sur le réactif au latex, dirigé contre le site de liaison plaquettaire du FW (récepteur GPIb), réagit avec le FW du plasma du patient. Le degré d'agglutination est directement proportionnel à l'activité du FW dans l'échantillon et déterminé en mesurant la diminution de la lumière transmise causée par les agrégats.

Échantillon primaire : plasma citraté.

Réactifs (composition du kit) :

- ✓ Réactif au latex : une suspension lyophilisée de particules de latex de polystyrène enrobées d'un anticorps monoclonal de souris anti-FW purifié, dirigé contre un épitope fonctionnel du FW, contenant de l'albumine de sérum bovin, des stabilisants et un conservateur.
- ✓ Tampon : tampon Tris contenant de l'albumine de sérum bovin, des stabilisants et un conservateur.

Préparation :

- ✓ Tampon : prêt à l'emploi
- ✓ Réactif au latex : dissoudre le contenu de chaque flacon en versant la totalité du contenu d'un flacon de tampon dans un flacon de réactif au latex. Remettre le bouchon en place et faire doucement tournoyer pendant au moins 20 secondes pour dissoudre complètement le latex lyophilisé. S'assurer de la reconstitution complète du produit. Il doit se présenter sous la forme d'une suspension homogène et légèrement laiteuse. Conserver le réactif à une température comprise entre 15

et 25 °C pendant 30 minutes et le retourner pour le mélanger avant utilisation. Ne pas agiter. Remarque : éviter la formation de mousse lors de l'homogénéisation des réactifs reconstitués. Des bulles sur le dessus des liquides peuvent interférer avec les capteurs de l'instrument.

Contrôle qualité : du plasma étalon et des contrôles normaux et anormaux (à acheter séparément) sont recommandés pour un programme de contrôle qualité complet. Le contrôle normal et le contrôle d'essai spécial niveau 1 sont conçus pour ce programme. Chaque laboratoire doit établir sa propre moyenne et son écart type.

Résultats : les résultats de l'activité du FW sont rapportés en pourcentage de normalité.

Tableau 27. Valeurs attendues pour l'activité du FW selon le dosage VWF:Ab HemosIL®

Groupe sanguin	Nombre d'échantillons analysés	% d'activité du FW
O	132	40,3–125,9
A+B+AB	134	48,8–163,4

Remarque : en raison de nombreuses variables, qui peuvent affecter les résultats, chaque laboratoire doit établir sa propre plage normale pour l'activité du FW.

- ✓ Linéarité : 19-130 %
- ✓ Limite de détection : 3,2 %

Antigène du facteur Willebrand (VWF:Ag) : il s'agit d'un dosage quantitatif qui mesure la quantité totale de protéine FW présente dans l'échantillon, ce qui englobe les formes à la fois fonctionnelles et dysfonctionnelles. Les taux de VWF:Ag peuvent être quantifiés par des méthodes immunologiques telles qu'ELISA, LIA (automatisée au latex) et, plus récemment, CLIA (chimiluminescence). Les dosages sont généralement très fiables et reproductibles. La limite inférieure de détection varie d'une méthode à l'autre, la LIA ayant tendance à être légèrement plus élevée et la CLIA ayant la limite de détection la plus basse. Le dosage VWF:Ag est essentiel dans le diagnostic de la maladie de Willebrand, mais il comporte des limites puisqu'il évalue uniquement la présence de FW, et non sa fonction. Utilisé seul, le VWF:Ag peut seulement identifier la mW de type 3 lorsqu'il existe des taux indétectables de VWF:Ag, généralement inférieurs à 3 UI/dl. Selon les lignes directrices de la *British Society for Haematology* (BSH) et de la *United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation* (UKHCDO), le diagnostic de la mW de type 3 nécessite un dosage VWF:Ag capable de mesurer des taux < 1 UI/dl. Des dosages supplémentaires de la fonction ou de l'activité du FW avec calcul des rapports entre l'activité du FW et les dosages antigéniques sont requis pour le diagnostic et la différenciation de la mW de type 1 et de type 2. La plage normale de la valeur de VWF:Ag varie selon les laboratoires, mais il est généralement admis qu'elle se situe entre 50 et 200 UI/dl. Les taux inférieurs à 50 UI/dl sont considérés comme faibles, bien que cela doive être corrélé avec les antécédents hémorragiques et d'autres dosages de l'activité du FW pour établir un diagnostic de mW. Il est bien connu que les personnes du groupe sanguin O présentent une baisse de 25 % des taux de FW par rapport aux personnes des autres groupes et sont donc plus susceptibles d'être diagnostiquées avec la mW de type 1. Le phénotype hémorragique des personnes atteintes de mW est cependant similaire, quel que soit le groupe sanguin. Il n'est donc pas nécessaire de disposer de plages de référence spécifiques aux groupes sanguins. Les protocoles pour le dosage VWF:Ag par ELISA, LIA et CLIA est répertorié ci-dessous.

Antigène du facteur Willebrand (VWF:Ag) par ELISA : dosage ELISA pour la détermination quantitative de l'antigène du FW (VWF:Ag) dans le plasma citraté humain. Un puits de microtitration est recouvert d'un anticorps (anticorps de capture) spécifique du FW. Des dilutions du plasma à tester et du plasma de référence sont ajoutées et incubées, période pendant laquelle le FW est lié par l'anticorps de capture sur la plaque. Après lavage, une deuxième enzyme étiquetée anticorps anti-FW (anticorps de détection) est ajoutée et se lie au FW lié à la plaque. La quantité d'anticorps lié, et donc de FW présent dans

l'échantillon, est quantifiée par l'ajout de substrat enzymatique suivi du développement de la couleur.
Échantillon primaire : sang citraté à 3,2 %.

Matériel et réactifs :

- ✓ Plaque de microtitration
- ✓ Anticorps de capture (coating) : anticorps polyclonal de lapin anti-FW humain (Dako, code n° 0082)
- ✓ Anticorps de détection (marqué) : anticorps polyclonal de lapin anti-FW humain/conjugué avec du HRP (Dako, code n° 226)
- ✓ Tampon de coating bicarbonate
- ✓ Tampon de dilution
- ✓ Tampon de lavage
- ✓ Tampon de substrat
- ✓ Substrat : dichlorhydrate d'o-phénylenediamine (OPD) (Sigma P8287)
- ✓ H_2SO_4 1,5 M
- ✓ Étalon : PNP ou plasma standard du commerce
- ✓ PPP du patient citraté
- ✓ Plasma de contrôle normal et anormal
- ✓ Peroxyde d'hydrogène à 30 %
- ✓ Laveur et lecteur de plaques ELISA
- ✓ Pipettes et embouts
- ✓ Bain-marie à 37 °C
- ✓ Dispositifs de scellage des plaques
- ✓ Agitateur-mélangeur vortex

Préparation du réactif :

Tampon de coating bicarbonate :

- a. Carbonate de sodium (Na_2CO_3) : 0,16 g
- b. Bicarbonate de sodium (NaHCO_3) : 0,294 g
- c. Dissoudre dans de l'eau distillée et compléter jusqu'à 100 ml. Ajuster le pH à 9,6.
- d. Ajouter environ 100 µl de colorant rouge. La durée de conservation est de deux à trois semaines.

Tampon de travail concentré :

- a. Dihydrogénophosphate de sodium ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) : 0,975 g
- b. Hydrogénophosphate disodique ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) : 6,7 g
- c. Chlorure de sodium (NaCl) : 70,55 g

Dissoudre dans de l'eau distillée, bien mélanger à l'aide d'un agitateur magnétique dans une fiole conique à fond plat, puis compléter jusqu'à 250 ml.

Tampon de lavage : diluer le tampon de travail concentré à 1/10 (c.-à-d. 100 ml de tampon concentré pour 900 ml d'eau distillée). Ajouter 2 ml de Tween 20. Bien mélanger et conserver à 4 °C. La durée de conservation est de deux semaines.

Tampon de détection et de dilution : dissoudre 3 g de PEG dans 100 ml de tampon de lavage à haute teneur en sel. Ajouter 100 µl de colorant vert. La durée de conservation est de deux semaines.

Tampon de substrat : dissoudre 0,73 g d'acide citrique et 2,4 g d'hydrogénophosphate disodique dans de l'eau distillée et porter le volume à 100 ml. Ajuster le pH à 5,0. La durée de conservation est de deux mois.

Acide sulfurique 1,5 M : ajouter 16,5 ml d'acide sulfurique concentré à 180 ml d'eau. Toujours ajouter de l'acide à l'eau.

Procédure :

Coating de la plaque : Les plaques doivent être enduites la veille de leur utilisation, à savoir entre 16 et 96 heures. Diluer l'anticorps de coating à 1/1000 dans du tampon de coating, soit 12 µl dans 12 ml de tampon. Mélanger délicatement et pipeter 100 µl dans chaque puits. Sceller avec un couvercle en plastique et incuber à 40 °C pendant la nuit.

Procédures analytiques : préparer les dilutions pour la courbe standard comme indiqué :

- ✓ Pour la solution mère : diluer 50 µl du plasma normal poolé dans 3,95 ml de tampon de dilution (1,80). Préparer un éventail d'étalons à partir de cette solution, comme indiqué ci-dessous :
 - a. Solution mère 125 % (S1)
 - b. 0,8 ml de solution mère + 0,2 ml de tampon 100 % (S2)
 - c. 0,6 ml de solution mère + 0,4 ml de tampon 75 % (S3)
 - d. 0,4 ml de solution mère + 0,6 ml de tampon 50 % (S4)
 - e. 0,2 ml de solution mère + 0,8 ml de tampon 25 % (S5)
 - f. 0,1 ml de solution mère + 0,9 ml de tampon 12,5 % (S6)
 - g. solution à 0,05 % + 0,95 ml de tampon 6,25 % (S7)
 - h. 1,00 ml de blanc tampon
- ✓ Diluer les échantillons du patient et de contrôle en deux dilutions, 1/100 et 1/200, dans du tampon de dilution (c'est-à-dire 10 µl dans 990 µl et 500 µl de dilution 1/100 + 500 µl de tampon).
- ✓ Laver à trois reprises avec un tampon de lavage à l'aide du laveur de plaques, en laissant tremper trois minutes entre chaque lavage. Après l'aspiration finale, prélever l'excès de liquide et vérifier qu'il n'y a pas de bulles.
- ✓ Ajouter 100 µl des étalons, tests et blancs, en double, dans les puits de la plaque coatée, selon le format suivant :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S1	T1	T1	T5	T5	T9	T9	T13	T13	T17	T17
B	S2	S2	T1	T1	T5	T5	T9	T9	T13	T13	T17	T17
C	S3	S3	T2	T2	T6	T6	T10	T10	T14	T14	T18	T18
D	S4	S4	T2	T2	T6	T6	T10	T10	T14	T14	T18	T18
E	S5	S5	T3	T3	T7	T7	T11	T11	T15	T15	Q1	Q1
F	S6	S6	T3	T3	T7	T7	T11	T11	T15	T15	Q1	Q1
G	S7	S7	T4	T4	T8	T8	T12	T12	T16	T16	Q2	Q2
H	BK	BK	T4	T4	T8	T8	T12	T12	T16	T16	Q2	Q2

S1-S7 : dilutions de l'étalon ; T : plasma à tester ; BK : blanc

- ✓ Couvrir avec le dispositif de scellage de plaques. Incuber pendant une heure dans un bain-marie à 37 °C.
- ✓ Laver à trois reprises avec un tampon de lavage à l'aide du laveur de plaques, en laissant tremper trois minutes entre chaque lavage. Après l'aspiration finale, prélever l'excès de liquide et vérifier qu'il n'y a pas de bulles.
- ✓ Diluer l'anticorps de détection (marqué) du FW à 1/4000 (c.-à-d. 5 µl dans 20 ml de tampon de détection).

- ✓ Mélanger délicatement et ajouter 100 µl d'anticorps de détection dilué dans chaque puits. Couvrir avec le dispositif de scellage de plaques. Incuber pendant une heure dans un bain-marie à 37 °C.
- ✓ Laver à trois reprises avec un tampon de lavage à l'aide du laveur de plaques, en laissant tremper trois minutes entre chaque lavage. Après l'aspiration finale, prélever l'excès de liquide et vérifier qu'il n'y a pas de bulles.
- ✓ Pendant le lavage, préparer la solution de substrat comme suit : dissoudre un comprimé d'OPD à 10 mg dans 15 ml de tampon de substrat. Porter la solution préparée à température ambiante. Juste avant l'utilisation, ajouter 7 µl de peroxyde d'hydrogène à 30 %.
- ✓ À l'aide d'un chronomètre, ajouter 100 µl de solution de substrat dans chaque puits. Incuber pendant 8 à 10 minutes sur banc.
- ✓ Stopper la réaction en ajoutant 100 µl de H₂SO₄ 1,5 M dans chaque puits, EXACTEMENT dans le même intervalle que l'ajout de substrat.
- ✓ Secouer la plaque pour mélanger.
- ✓ Sélectionner le programme approprié (492 nm) sur le lecteur de plaques Lab Systems et tracer la courbe d'étalonnage à l'aide de papier graphique linéaire. Les plaques doivent être lues dans les 30 minutes. En cas de retard, ranger les plaques dans un placard sombre pendant quatre heures maximum.
- ✓ Pour calculer les résultats : lire la dilution 1/100 directement à partir de l'étalonnage, multiplier la dilution 1/200 par deux et faire la moyenne des résultats. N'inclure que les résultats qui se situent dans la courbe standard.

Protocole de contrôle qualité : analyser le contrôle normal et le contrôle anormal (bas niveau) avec chaque lot. Si disponible, inclure l'échantillon d'un patient atteint de la mW de type 3 comme contrôle.

Interprétation des résultats : les résultats sont rapportés en pourcentage ou en UI/dl.

Antigène du facteur Willebrand automatisé par LIA : la méthode LIA automatisée sert à la détermination quantitative de l'antigène du FW (VWF:Ag) dans le plasma citraté humain. C'est la méthode la plus couramment utilisée pour estimer les taux de VWF:Ag. Le kit VWF:Ag automatisé est un dosage immuno-turbidométrique renforcé par des particules de latex pour quantifier le VWF:Ag dans le plasma. Lorsqu'un plasma contenant du VWF:Ag est mélangé au réactif au latex et au tampon de réaction inclus dans le kit, les particules de latex enrobées s'agglutinent. Le degré d'agglutination est directement proportionnel à la concentration de VWF:Ag dans l'échantillon et déterminé en mesurant la diminution de la lumière transmise causée par les agrégats. Plusieurs kits de dosage VWF:Ag reposant sur la technologie LIA sont disponibles dans le commerce. Le protocole ci-dessous concerne le kit VWF:Ag HemosIL d'Instrumentation Laboratories, mais d'autres dosages peuvent également être utilisés. La présentation de cette méthode ne constitue pas une approbation du produit d'une société en particulier. Si un autre kit du commerce est utilisé, il est important de suivre les instructions du fabricant.

Réactifs et matériel :

- ✓ Réactif au latex : deux flacons × 3 ml d'une suspension de particules de latex de polystyrène enrobées d'un anticorps polyclonal de lapin anti-FW contenant de l'albumine de sérum bovin, un tampon, un stabilisant et un conservateur
- ✓ Tampon de réaction : deux flacons × 4 ml de tampon HEPES contenant de l'albumine de sérum bovin, des stabilisants et un conservateur
- ✓ Diluant du facteur (tampon imidazole)
- ✓ Plasma étalon (1 litre)
- ✓ PPP citraté du patient
- ✓ Plasma de contrôle normal et anormal (bas niveau)
- ✓ Eau distillée pour la reconstitution des réactifs

Préparation des réactifs, conservation et stabilité des réactifs :

- ✓ Reconstituer le plasma étalon avec exactement 1 ml d'eau distillée. Laisser le matériau reconstitué reposer à température ambiante (entre 18 et 25 °C) pendant 30 minutes. Ensuite, faire doucement tournoyer le flacon avant utilisation. La préparation est stable pendant huit heures à 15-25 °C. Elle peut être congelée et conservée à -80 °C au minimum.
- ✓ Plasma de contrôle anormal (Dade P) : reconstituer le plasma de contrôle P avec exactement 1 ml d'eau distillée ou désionisée. Agiter soigneusement pour dissoudre sans formation de mousse et laisser reposer à température ambiante (entre 18 et 25 °C) pendant 15 minutes. Avant utilisation, agiter à nouveau avec précaution.
- ✓ Contrôle normal/plasma normal poolé : conserver le PNP au bain-marie à 37 °C pendant cinq minutes, mélanger délicatement avant utilisation.
- ✓ Réactif au latex : ajouter 2 ml de tampon de réaction et bien mélanger sans bulle d'air. Une fois ouvert, il est stable pendant trois mois à 2-8 °C dans le flacon d'origine ou une semaine à 15 °C sur le système de la famille ACL TOP. Ne pas congeler.
- ✓ Tampon de réaction : Une fois ouvert, il est stable pendant trois mois à 2-8 °C dans le flacon d'origine ou une semaine à 15 °C sur le système de la famille ACL TOP. Ne pas congeler.

Détails de l'étalonnage : charger les réactifs appropriés (latex VWF:Ag, tampon VWF:Ag, étalon et diluant de facteur) sur l'analyseur automatisé. Sélectionner et lancer le programme d'étalonnage. Une fois l'étalonnage terminé, examiner les résultats. S'il n'y a pas d'erreurs/défaillances et que l'étalonnage est acceptable, valider la courbe d'étalonnage. L'étalonnage est effectué lorsqu'il y a un changement de numéros de lot de réactifs ou un changement des principaux composants de l'instrument, conformément aux exigences réglementaires locales ou à la discréption du laboratoire.

Protocole de contrôle qualité : effectuer au moins deux niveaux de contrôle (contrôle normal et contrôle anormal) à chaque cycle. Chaque laboratoire doit établir sa propre moyenne et son écart type et élaborer un programme de contrôle qualité.

Procédure : sélectionner le programme approprié sur l'instrument et conserver les réactifs requis (latex VWF:Ag, tampon VWF:Ag et diluant de facteur). Charger les échantillons et analyser conformément aux instructions du fabricant.

Résultats : les résultats sont rapportés en pourcentage ou en UI/dl.

Plage normale :

- ✓ Groupe sanguin O : 42,0–140,8 UI/dl
- ✓ Groupes sanguins A, B et AB : 66,1–176,3 UI/dl

Limite de détection :

- ✓ Famille ACL : 3,5 UI/dl
- ✓ Famille ACL Top/ACL Top série 5 : 2,2 UI/dl

Linéarité :

- ✓ Famille ACL : 10–150 UI/dl
- ✓ Famille ACL Top/ACL Top série 5 : 8,5–250 UI/dl
- ✓ Si la plage linéaire est dépassée, les échantillons doivent être dilués à 1/4 avec un diluant de facteur (100 µl d'échantillon + 300 µl de diluant). Une dilution supplémentaire jusqu'à 1/16 peut être effectuée si nécessaire. Multiplier les résultats par le facteur de dilution respectif.

Antigène du facteur Willebrand automatisé par CLIA : la méthode CLIA automatisée sert à la détermination quantitative du VWF:Ag dans le plasma citraté humain. Il s'agit d'un immunodosage en deux temps quantifiant le VWF:Ag dans du plasma citraté humain qui fait appel à des billes magnétiques comme phase solide et à un système de détection par chimiluminescence. Dans un premier temps, l'échantillon est mélangé avec des particules magnétiques enrobées d'anticorps polyclonaux anti-FW et le tampon du dosage. Le FW présent dans l'échantillon se lie aux particules. Dans un deuxième temps, après séparation magnétique et lavage, un anticorps polyclonal anti-FW marqué à l'isoluminol est ajouté. La réaction chimiluminescente est mesurée en unités de lumière relative qui sont directement proportionnelles à la concentration de VWF:Ag dans l'échantillon. Les études menées à partir des données d'assurance externe de la qualité ont montré que la méthode VWF:Ag CLIA avait le CV le plus bas et la limite de détection la plus basse. Actuellement, le VWF:Ag selon la méthode CLIA n'est proposé que par HemosIL AcuStar VWF:Ag et ne peut être réalisé que sur l'instrument ACL AcuStar.

Composition des réactifs

Le kit VWF:Ag se compose de :

- a. Cartouche VWF:Ag pour 25 déterminations : chaque cartouche contient un flacon de suspension de particules magnétiques lyophilisées enrobées d'un anticorps polyclonal de lapin anti-FW, un flacon de tampon du dosage, un flacon d'un traceur constitué d'un anticorps polyclonal de lapin anti-FW marqué à l'isoluminol et un flacon de diluant d'échantillon. Les réactifs sont dans un tampon phosphate contenant de l'albumine de serum bovin, des IgG polyclonales de lapin, des stabilisants et des conservateurs.
- b. Étalon 1 VWF:Ag : contient une solution saline avec des conservateurs.
- c. Étalon 2 VWF:Ag : deux flacons de plasma humain lyophilisé contenant un tampon, des stabilisants et un conservateur.

Préparation et procédure

Cartouche VWF:Ag : la première fois que la cartouche est utilisée, la retourner délicatement à 30 reprises en évitant la formation de mousse et vérifier la remise en suspension complète du flacon de microparticules. Si les microparticules ne sont pas totalement en suspension, continuer à retourner la cartouche jusqu'à remise en suspension complète. Suivre les instructions fournies pour ouvrir la cartouche et la charger sur le système ACL AcuStar.

Étalon 1 VWF:Ag : est liquide et doit être délicatement mélangé par plusieurs inversions avant utilisation pour assurer son homogénéité.

Étalon 2 VWF:Ag : dissoudre le contenu du flacon avec 1 ml d'eau de qualité réactif de laboratoire clinique (CLR) ou équivalent. Remettre le bouchon en place et faire doucement tournoyer. S'assurer de la reconstitution complète du produit. Conserver l'étalon à une température comprise entre 15 et 25 °C pendant 30 minutes et le retourner délicatement pour le mélanger avant utilisation. Ne pas agiter. Une fois reconstitué, verser la totalité du contenu du flacon de l'étalon dans le tube en plastique à code-barres vide étiqueté de manière appropriée pour une utilisation sur le système ACL AcuStar.

Conservation et stabilité des réactifs

Les réactifs et les étalons non ouverts sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur les étiquettes des cartouches et des flacons lorsqu'ils sont conservés à une température comprise entre 2 et 8 °C.

Cartouche VWF:Ag : la stabilité après ouverture à 2-8 °C dans le système ACL AcuStar est de huit semaines. Les cartouches ouvertes doivent rester à l'intérieur du système ACL AcuStar.

Étalons 1 et 2 VWF:Ag : la stabilité après ouverture et/ou reconstitution à l'intérieur de l'ACL AcuStar est de quatre heures. Pour une stabilité optimale, retirer les étalons du système et les stocker à une température comprise entre 2 et 8 °C dans des tubes en plastique à code-barres fermés.

Protocole de contrôle qualité : effectuer au moins deux niveaux de contrôle (contrôle normal et contrôle anormal) à chaque cycle. Chaque laboratoire doit établir sa propre moyenne et son écart type et élaborer un programme de contrôle qualité.

Procédure : sélectionner le programme approprié sur l'instrument et conserver les réactifs requis. Charger les échantillons et analyser conformément aux instructions du fabricant.

Résultats : les résultats sont rapportés en pourcentage ou en UI/dl.

Plage normale :

Tous les groupes sanguins : 52,2-177,9 UI/dl

Groupe sanguin O : 48,2-157,2 UI/dl

Groupes sanguins A, B et AB : 59,6-210,5 UI/dl

Limite de détection :

ACL AcuStar : 0,13 UI/dl

Linéarité :

Famille ACL : 0,3-400 UI/dl

Lorsque la capacité de réexécution est activée sur l'instrument, celui-ci effectue une dilution automatique et corrige le résultat final pour le facteur de dilution ($\times 20$), élargissant ainsi la plage de 8000 UI/dl. Le dosage n'est pas affecté par l'effet de prozone.

Dosage de la liaison du facteur Willebrand au collagène (VWF:CB) : le FW est une protéine plasmatique aux fonctions et activités multiples. Il agit comme un pont adhésif entre les plaquettes et la paroi vasculaire. Il se lie aux plaquettes, principalement par l'intermédiaire du récepteur GPIb en utilisant son domaine A1, et au collagène sous-endothélial, principalement par l'intermédiaire du domaine A3, provoquant l'adhésion plaquettaire. La capacité de liaison plaquettaire du FW peut être évaluée à l'aide du dosage du cofacteur de la ristocétine (VWF:RCO) ou d'autres tests de liaison à la GPIb plus récents. Il s'agit du dosage de l'activité du FW le plus couramment utilisé. Le VWF:RCO et le VWF:CB évaluent toutefois différentes fonctions du FW. Le VWF:CB repose sur la capacité du FW à adhérer au collagène et dépend de la présence de multimères de haut poids moléculaire (HPM) et d'un site de liaison au collagène intact. Le collagène a une faible affinité pour les domaines de liaison du FW uniques et nécessite un FW multimère important pour une association étroite avec le collagène. Cette propriété du VWF:CB sert à détecter la perte de multimères de HPM, ce qui peut différencier le type 2A/2B (perte de multimères de HPM) du type 2M (distribution normale des multimères). Les lignes directrices de 2021 sur la mW suggèrent d'avoir recours à l'analyse des multimères ou au VWF:CB pour discriminer le type 2M du type 2A/2B. Le VWF:CB est le plus souvent réalisé à l'aide d'une méthode reposant sur ELISA. Plusieurs dosages ELISA sont disponibles dans le commerce. Il faut veiller à choisir le dosage optimisé pour détecter de préférence le FW de HPM. Plus récemment, ce dosage peut aussi être pratiqué dans l'analyseur automatisé AcuStar, qui utilise une méthode CLIA. Le dosage AcuStar VWF:CB est un dosage immunologique en deux temps, dans lequel des particules magnétiques font office de phase solide et sont enduites d'un peptide à triple hélice de collagène de type III. La liaison du FW présent dans l'échantillon aux particules magnétiques est proportionnelle à sa capacité de liaison au collagène, qui est mesurée par un système de détection chimiluminescente.

Nous décrivons ici une méthode ELISA interne pour le VWF:CB : ce dosage évalue la capacité de liaison du FW dérivé du plasma du patient au collagène préalablement appliqué sur des plaques de microtitration à 96 puits. Le FW adsorbé sur le collagène immobilisé est détecté à l'aide d'un anticorps polyclonal marqué à l'enzyme et de la réaction subséquente du substrat, soumise à une surveillance photométrique au moyen d'un lecteur ELISA. Il est préférable d'utiliser un mélange d'environ 95 % de collagène de type I (faible liaison au FW) et d'environ 5 % de collagène de type III (bonne liaison au FW) afin d'obtenir une bonne sélectivité pour le FW de HPM. Sinon, une concentration plus faible de collagène de type III (1 à 5 µg/ml) peut également être utilisée. Des taux réduits de VWF:CBA seront présents chez les personnes présentant soit des anomalies quantitatives, soit des anomalies qualitatives. Étant donné que ce dosage à lui seul ne permettra pas la classification de la mW, il est important que ce test fonctionnel soit exécuté en même temps que le VWF:Ag et le VWF:RCo.

Échantillon primaire : sang citraté.

Matériel et réactifs :

- ✓ Collagène à un mélange d'environ 95 % de collagène de type I et 5 % de collagène de type III (collagène Horm, collagène ICN)
- ✓ Tampon de dilution et tampon de lavage (PBS avec Tween 20)
- ✓ Tampon de substrat : acétate de sodium/acide citrique 0,1 M
- ✓ Peroxyde d'hydrogène H_2O_2 à 30 %
- ✓ Antigène polyclonal de lapin anti-FW humain conjugué à de l'HRP (Dako)
- ✓ Plaques de microtitration pour dosage immuno-enzymatique 96 puits
- ✓ PPP citraté du patient, PNP et plasmas de contrôle anormal
- ✓ H_2SO_4 2 M
- ✓ Substrat : dichlorhydrate d'o-phénylénediamine (OPD)

Préparation du réactif :

PBS (pH 7,4) avec Tween 20 :

- d. Chlorure de sodium ($NaCl$) : 8,0 g
- e. Chlorure de potassium (KCl) : 0,20 g
- f. Hydrogénophosphate disodique ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) : 2,90 g
- g. Dihydrogénophosphate de potassium ($KH_2PO_4 \cdot H_2O$) : 0,20 g
- h. Compléter jusqu'à 1,0 l et ajuster le pH à 7,4. Ajouter 500 µl de Tween 20.

Tampon de substrat :

Tampon acétate de sodium/acide citrique 0,1 M

Dissoudre 13,6 g d'acétate de sodium dans 100 ml d'eau distillée, ajuster le pH à 6,0 à l'aide d'acide citrique 1 M (52,14 g pour 250 ml d'eau distillée).

H_2SO_4 2 M :

Ajouter 10,65 ml d' H_2SO_4 concentré à 89,35 ml d'eau distillée.

Procédure :

- ✓ Recouvrir les plaques ELISA de collagène. Avant utilisation, mélanger délicatement le collagène par inversion. Diluer 200 µl de la solution mère de collagène dans 20 ml de PBS, bien mélanger, puis dispenser 200 µl dans chaque puits. Sceller et conserver dans une boîte humide pendant 24 à 48 heures.

- ✓ Laver la plaque avec du PBS à trois reprises. (Intervalle de trois minutes entre chaque lavage.)
Prélever l'excès de tampon et vérifier qu'il n'y a pas de bulles d'air.
- ✓ Effectuer une prédilution 1/10 de chaque échantillon à tester (c.-à-d. ajouter 20 µl d'échantillon à 180 µl de PBS dans des tubes à essai). Inclure également des contrôles dans l'analyse.
- ✓ La courbe d'étalonnage s'étend de 400 à 0 %. Étiqueter les tubes de A à H. Prendre 180 µl de tampon dans un tube à essai et ajouter 120 µl de PNP (il s'agit du tube A). Ajouter 150 µl de tampon des tubes B à G. Procéder à des dilutions en série en prélevant 150 µl du tube A vers le tube B, et ce jusqu'au tube G.
- ✓ Le tube H sert de blanc. Ajouter seulement 200 µl de tampon.
- ✓ Ajouter 180 µl de tampon dans tous les puits après avoir lavé les plaques revêtues de collagène à trois reprises (comme décrit à l'étape 2).
- ✓ Ajouter 20 µl d'étalement dilué en série de A à G.
- ✓ Ajouter 20 µl d'échantillon prédilué et les contrôles en trois exemplaires.
- ✓ Sceller et incuber à 22 °C (température ambiante dans une boîte humide) pendant deux heures.
- ✓ Laver la plaque à trois reprises avec du PBS et ajouter un anticorps conjugué à une peroxydase prédilué (dilution 1/1000, soit 22 µl d'anticorps VWF HRP-TAG dans 22 ml de PBS). Ajouter 200 µl à chaque puits.
- ✓ Incuber pendant deux heures à température ambiante.
- ✓ Laver la plaque à trois reprises avec du PBS.
- ✓ Ajouter 200 µl de substrat. Pour cela, dissoudre un comprimé d'OPD 10 mg dans 22,5 ml d'eau distillée et 2,5 ml de tampon de substrat de travail. Juste avant l'utilisation, ajouter au substrat 15,0 µl d'H₂O₂ à 30 %.
- ✓ Attendre 15 à 20 minutes pour le développement de la couleur et ajouter 50 µl d'H₂SO₄ 2 M pour stopper la réaction. Lire à l'aide d'un lecteur ELISA avec le filtre de longueur d'onde de 492 nm.

Protocole de contrôle qualité : analyser le contrôle normal (PNP) et le contrôle anormal de bas niveau (Dade P) avec chaque cycle. Le cas échéant, un échantillon d'un patient connu atteint de la maladie de Willebrand peut également être inclus. Limite de détection : 0 à 400 %.

Interprétation des résultats : le VWF:CB permet un diagnostic plus exact de la mW et réduit les erreurs de classification et le risque de passer à côté d'un diagnostic. Des études ont montré que les taux d'erreur de diagnostic de la mW baissaient de 50 % par l'ajout du VWF:CB dans un panel de quatre tests (c.-à-d. facteur VIII, dosage VWF:RCo ou à base de GPIb, VWF:Ag et VWF:CB) par rapport au panel de trois tests le plus courant (facteur VIII, dosage VWF:RCo ou à base de GPIb et VWF:Ag).

- ✓ Maladie de Willebrand de type 1 versus type 2 : la mW de type 1 présente des taux de VWF:Ag réduits sans divergence entre les dosages de l'activité et de l'antigène. Par conséquent, les rapports VWF:CB/VWF:Ag et VWF:RCo/VWF:Ag sont tous deux normaux. Un rapport de 0,6 ou 0,7 peut servir à déterminer la divergence entre les différents dosages de l'activité et de l'antigène du FW. Des études ont montré que le VWF:CB permettait de mieux différencier le type 1 du type 2A/2B que le dosage VWF:RCo.
- ✓ Maladie de Willebrand de type 2A//2B versus 2M : le VWF:CB peut être utilisé comme substitut à l'analyse des multimères pour différencier la mW de type 2A/2B du type 2M, conformément aux lignes directrices sur la mW de 2021. Un moindre rapport VWF:CB/VWF:Ag suggère une perte de multimères de HPM, observable dans les types 2A et 2B de la mW. Ces patients auront également un rapport VWF:RCo/VWF:Ag plus faible. La mW de type 2M présentera un rapport VWF:CB/VWF:Ag normal, mais le rapport VWF:RCo/VWF:Ag sera réduit. Un sous-ensemble du type 2M avec un défaut du site de liaison au collagène peut avoir un rapport VWF:CB/VWF:Ag normal. Bien que le VWF:CB reposant sur la méthode CLIA puisse discriminer avec exactitude le type 1 du type 2, il est moins utile pour discriminer le type 2M du type 2A selon des études préliminaires, qui en nécessitent d'autres pour confirmer ces résultats. Il conviendrait pour cela d'avoir recours à un VWF:CB optimisé basé sur la méthode ELISA.

- ✓ Maladie de Willebrand de type 3 versus type 1 sévère : le VWF:CB a une meilleure limite de détection inférieure que le VWF:RCo. Il peut mieux détecter l'absence de FW dans la mW de type 3 et la présence de très faibles taux de FW dans la mW de type 1 sévère.
- ✓ Le VWF:CB est un outil important dans le diagnostic de la maladie de Willebrand. Il convient cependant d'utiliser un test de liaison au collagène approprié et optimisé. La source et la concentration de collagène peuvent affecter les résultats. Lorsque des dosages internes sont utilisés, il est préférable d'utiliser un mélange de collagène de type I/III (95 %/5 % environ), ou bien un collagène de type III à de faibles concentrations. Rapport coût-efficacité : le VWF:CB peut être pratiqué au moyen de dosages internes faisant appel à la méthode ELISA, ce qui en fait un dosage de l'activité du FW d'un bon rapport coût-efficacité. Conjointement avec un dosage VWF:Ag ELISA interne, il constitue une méthode peu coûteuse et efficace pour identifier les sous-types de la mW (à l'exception des types 2M et 2N) dans un contexte où les ressources sont limitées.

Test de liaison au facteur VIII pour le diagnostic de la maladie de Willebrand de type Normandie : le variant Normandie (type 2N) de la mW est un trouble autosomique récessif rare, identifié pour la première fois en 1989. La maladie est caractérisée par une anomalie du FW qui résulte en une capacité de liaison réduite au facteur VIII, ce qui entraîne une augmentation de la clairance du facteur VIII non lié dans la circulation. Les manifestations cliniques et biologiques chez les patients atteints de la mW de type 2N peuvent ressembler à celles des patients atteints d'hémophilie A mineure/modérée ou des personnes porteuses de l'hémophilie A. Il est probable que certains des patients de type 2N soient mal diagnostiqués à moins qu'un test de liaison au facteur VIII (VWF:FVIIIB) ne soit effectué pour confirmation. La distinction est importante, car le traitement de substitution avec du FW purifié sera beaucoup plus efficace chez ces patients que le traitement avec facteur VIII de remplacement. Le mode de transmission des deux maladies est également très différent : récessif autosomique dans la mW de type 2N et récessif lié au chromosome X dans l'hémophilie A. Les patients de type 2N sont soit homozygotes (mêmes mutations de type 2N) soit hétérozygotes composites (deux mutations de type 2N différentes ou une combinaison d'une mutation 2N et d'autres mutations de la mW). Les mutations sont fréquemment observées dans le domaine D'D3 du FW. Les taux de facteur VIII sont légèrement à modérément réduits, généralement entre 5 et 40 UI/dl. Les rapports FVIII/VWF:Ag sont réduits, généralement < 0,7. Les paramètres du FW (VWF:Ag, VWF:RCo, VWF:CB et analyse des multimères) sont habituellement normaux, sauf en cas d'hétérozygote composite pour d'autres mutations de la mW. Dans ce dernier cas, les patients ont tendance à être plus symptomatiques. Les hétérozygotes de type 2N sont généralement asymptomatiques et présentent des taux de facteur VIII normaux ou légèrement réduits. Deux tests internes ont été décrits pour le VWF:FVIIIB (Nesbitt et al., 1996 ; Casonato et al., 1998). Les deux tests montrent une bonne concordance et diffèrent en fonction de la détection du point final du facteur VIII résiduel. Dans les deux tests, la plaque de microtitration est recouverte d'anticorps anti-FW. Le complexe FW-FVIII dans l'échantillon du patient est immobilisé sur la plaque et le facteur VIII endogène est éliminé avec du chlorure de calcium. Est ajoutée une préparation recombinante de facteur VIII pur (rFVIII) à une concentration de 100 UI/dl. La quantité de rFVIII lié au FW immobilisé est mesurée par un dosage chromogénique (Nesbitt et al., 1996) ou en utilisant un anticorps polyclonal anti-FVIII conjugué (Casonato et al., 1998). Un seul test de liaison au facteur VIII est disponible dans le commerce (Aserachrom:FVIIIB, Diagnostica Stago). Nous décrivons ici la méthode interne reposant sur la méthode ELISA similaire à celle décrite par Casonato et al. (1998).

Échantillon primaire : sang citraté.

Matériel et réactifs :

- ✓ Anticorps de capture (coating) : polyclonal de lapin anti-FW humain (Dako)
- ✓ Anticorps primaire : IgG d'ovin purifiée anti-FVIII humain, 10 mg/ml
- ✓ Anticorps de détection (marqué) : IgG de singe anti-ovin conjuguée à la peroxydase AffiniPure (Jackson Immunoresearch)

Sinon, le cas échéant, il est possible d'utiliser l'anticorps anti-FVIII conjugué à de l'HRP en remplacement direct des anticorps primaire et de détection.

- ✓ Chlorure de calcium 0,4 M
- ✓ Tampon de coating bicarbonate
- ✓ Tampon TBS et tampon de dilution
- ✓ Tampon de lavage
- ✓ Tampon de substrat
- ✓ Substrat : dichlorhydrate d'o-phénylènediamine (OPD)
- ✓ Acide sulfurique (H_2SO_4) 2 M
- ✓ Acide chlorhydrique
- ✓ Concentré de facteur VIII (Recombinante)
- ✓ Plasma citraté pauvre en plaquettes à tester
- ✓ Plasma normal poolé, contrôles

Préparation du réactif

Tampon de coating bicarbonate :

- a. Carbonate de sodium (Na_2CO_3) : 0,16 g
- b. Bicarbonate de sodium ($NaHCO_3$) : 0,294 g
- c. Compléter jusqu'à 100 ml. Ajuster le pH à 9,6. La durée de conservation est de deux à trois semaines.
- d. Ajouter environ 200 µl de colorant rouge.

Préparer du tampon TBS 150 mM comme indiqué :

- a. Chlorure de sodium ($NaCl$) : 11,68 g
- b. Base TRIZMA : 12,12 g
- c. Dissoudre dans 1800 ml d'eau. Compléter jusqu'à 2000 ml. Ajuster le pH à 7,4 avec de l'acide chlorhydrique.

Tampon de dilution : dissoudre 1 g d'albumine de sérum bovin (BSA) dans 100 ml de tampon TBS et Tween 20 à 0,2 %. Environ 100 ml par plaque sont nécessaires.

Tampon de lavage : ajouter du Tween 20 à 0,2 % au TBS. Ajouter 2 ml de Tween 20 à 1000 ml de TBS.

Chlorure de calcium 0,4 M : dissoudre 0,588 g de $CaCl_2$ dans 10 ml de tampon de dilution.

Tampon de substrat :

- a. Acide citrique. H_2O : 0,73 g
- b. Hydrogénio-orthophosphate disodique ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) : 2,4 g
- c. Compléter jusqu'à 100 ml avec de l'eau distillée. Ajuster le pH à 5,0. La durée de conservation est de deux mois.

Substrat : dissoudre un comprimé d'OPD à 10 mg dans 15 ml de tampon de substrat.

Acide sulfurique 2 M : ajouter 10,65 ml d' H_2SO_4 concentré à 89,35 ml d'eau distillée.

Concentré de facteur VIII dilué (Recombinante) : reconstituer Recombinate dans 1 ml d'eau désionisée, aliquoter 500 µl en flacons et conserver congelé à -80 °C.

Procédure :

Coating de la plaque :

- ✓ Diluer l'anticorps de capture à 1/1000.
- ✓ Ajouter 100 µl/puits. Incuber à 4 °C pendant la nuit. Les plaques peuvent être enduites 16 à 96 heures avant leur utilisation.

Dilution des étalons :

- ✓ Pour préparer la solution mère, diluer 50 µl de PNP dans 3,95 ml de tampon de dilution (1/80).
- ✓ Préparer un éventail d'étalons à partir de cette solution.

a. Solution mère	125 % (S1)
b. 0,8 ml de solution mère + 0,2 ml de tampon	100 % (S2)
c. 0,6 ml de solution mère + 0,4 ml de tampon	75 % (S3)
d. 0,4 ml de solution mère + 0,6 ml de tampon	50 % (S4)
e. 0,2 ml de solution mère + 0,8 ml de tampon	25 % (S5)
f. 0,1 ml de solution mère + 0,9 ml de tampon	12,5 % (S6)
g. 0,05 ml de solution mère + 0,95 ml de tampon	0,25 % (S7)
h. 1,00 ml de tampon	Blanc

Dilution des échantillons des patients et des contrôles : diluer les échantillons des patients et les contrôles à 1/100 dans le tampon de dilution (10 µl d'échantillon + 990 µl de tampon).

Procédure analytique :

- ✓ Laver la plaque à trois reprises avec le tampon de lavage. Prélever l'excès de tampon et vérifier qu'il n'y a pas de bulles d'air.
- ✓ Ajouter 100 µl des étalons et des blancs en double et des tests en triple, dans les puits des plaques, selon le format suivant.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S1	T1	T1	T1	T9	T9	T9	T17	T17	T17	-
B	S2	S2	T2	T2	T2	T10	T10	T10	T18	T18	T18	-
C	S3	S3	T3	T3	T3	T11	T11	T11	T19	T19	T19	-
D	S4	S4	T4	T4	T4	T12	T12	T12	T20	T20	T20	-
E	S5	S5	T5	T5	T5	T13	T13	T13	T21	T21	T21	-
F	S6	S6	T6	T6	T6	T14	T14	T14	T22	T22	T22	-
G	S7	S7	T7	T7	T7	T15	T15	T15	T23	T23	T23	-
H	BK	BK	T8	T8	T8	T16	T16	T16	T24	T24	T24	-

S1-S7 : dilutions de l'étalon ; T : plasma à tester ; BK : blanc

- ✓ Sceller la plaque. Incuber pendant une heure dans un bain-marie à exactement 37 °C.
- ✓ Laver la plaque à trois reprises avec le tampon de lavage. Prélever l'excès de tampon et vérifier qu'il n'y a pas de bulles d'air.
- ✓ Pour éliminer le facteur VIII endogène, incuber avec 100 µl/puits de CaCl₂ 0,4 M pendant une heure au bain-marie à 37 °C. Il n'est pas nécessaire d'agiter.
- ✓ Laver à nouveau la plaque à trois reprises avec du tampon de lavage. Prélever l'excès de tampon.
- ✓ Décongeler l'un des flacons congelés de concentré de facteur VIII (Recombinant). Ajouter 400 µl de concentré de facteur VIII à 9,6 ml de tampon de dilution (concentration d'environ 100 UI/dl).
- ✓ Ajouter 100 µl de facteur VIII dilué dans chaque puits. Incuber pendant une heure à 37 °C.

- ✓ Laver la plaque à trois reprises avec du tampon de lavage. Prélever l'excès de tampon.
- ✓ L'anticorps primaire est aliquoté en quantités de 25 µl et stocké à -80 °C. Préparer une dilution 1/2000 de l'anticorps primaire dans le tampon de dilution (5 µl dans 10 ml). Remettre immédiatement l'aliquote d'anticorps dans le congélateur pour utilisation ultérieure.
- ✓ Ajouter 100 µl d'anticorps primaire dilué dans chaque puits. Incuber pendant une heure à 37 °C.
- ✓ Laver la plaque à trois reprises avec du tampon de lavage. Prélever l'excès de tampon.
- ✓ L'anticorps marqué est aliquoté en quantités de 10 µl et stocké à -80 °C. Préparer une dilution 1/5000 de l'anticorps marqué dans le tampon de dilution (2 µl dans 10 ml). Remettre immédiatement l'aliquote d'anticorps dans le congélateur pour utilisation ultérieure.
- ✓ Ajouter 100 µl d'anticorps marqué dilué dans chaque puits. Incuber pendant une heure à 37 °C.
- ✓ Laver la plaque à trois reprises avec du tampon de lavage. Prélever l'excès de tampon.
- ✓ La solution de substrat est préparée uniquement lors de la dernière étape de lavage. Juste avant l'utilisation, ajouter à cette solution 7 µl d'H₂O₂ à 30 %.
- ✓ Ajouter 100 µl de la solution ci-dessus dans chaque puits. Déclencher le chronomètre. Incuber pendant 8 à 10 minutes.
- ✓ Stopper la réaction en ajoutant 50 µl d'H₂SO₄ 2 M dans chaque puits, exactement dans le même intervalle que l'ajout de substrat.
- ✓ Sélectionner le programme approprié (492 nm) sur le lecteur de plaques ELISA. Procéder aux relevés de la densité optique.

Protocole qualité : analyser le contrôle normal (PNP) et le contrôle anormal de bas niveau (Dade P). Si des contrôles de mW Normandie connue sont disponibles, ajouter un échantillon en tant que contrôle avec chaque lot.

Interprétation des résultats : les résultats sont exprimés en UI/dl. Limites de détection : moins de 6,25 % à plus de 175 %.

- ✓ Homozygotes ou hétérozygotes composites pour le type 2N : absence ou réduction prononcée de VWF:FVIIIB (< 15 %) et très faibles rapports VWF:FVIIIB/VWF:Ag (< 0,3). Les taux de FVIII:C sont légèrement à modérément réduits, généralement compris entre 5 et 40 UI/dl. Les rapports FVIII:C/VWF:Ag sont également réduits, généralement < 0,7. Ce rapport peut être normal, en particulier chez les hétérozygotes composites avec un type 2N et des mutations du FW quantitatives/nulles. En conséquence, un dosage VWF:FVIIIB ou un test génétique peut être nécessaire si la suspicion clinique est forte.
- ✓ Hétérozygotes pour le type 2N : le VWF:FVIIIB est modérément réduit, voire normal, mais le rapport VWF:FVIIIB/VWF:Ag est moindre (< 0,7). Les taux de FVIII:C sont habituellement normaux ou légèrement réduits.
- ✓ Hémophilie A mineure ou porteuses de l'hémophilie : les taux de FVIII:C sont réduits ou normaux. Le dosage de VWF:FVIIIB est normal, de même que le rapport VWF:FVIIIB/VWF:Ag (> 0,7).

Multimères du facteur Willebrand : le FW est une grosse glycoprotéine multimérique qui circule dans le plasma sous la forme d'une série de sous-unités polymères identiques appelées « multimères ». Les multimères peuvent être libérés par les cellules endothéliales de manière régulière ou stockés dans les corps de Weibel-Palade des plaquettes. Ils comprennent un nombre variable de sous-unités (poids moléculaire de 500 kDa à plus de 10 000 kDa) liées par des liaisons disulfure. Ils sont classés en fonction de leur taille en multimères de poids moléculaire bas (1 à 5 multimères), moyen (6 à 10 multimères), haut (11 à 20 multimères) et très haut (20 multimères) (MBPM, MPMI, MHPM et MTHPM) (Stockschlaeder et al., 2014 ; James et al., 2021). Les multimères de haut poids moléculaire (MHPM) sont importants pour la liaison au collagène et aux récepteurs plaquettaires pendant l'hémostase primaire de manière à faciliter l'agrégation plaquettaire. Des anomalies dans l'assemblage ou le nombre de multimères peuvent entraîner des complications hémostatiques. L'analyse des multimères est utile pour la classification de la maladie de Willebrand qui, à son tour, peut éclairer la prise en charge des patients. La mW de type 1 est un déficit quantitatif partiel démontrant une réduction quantitative des multimères normaux. Le

sous-type 1C présente une survie moindre et une clairance accrue du FW, entraînant des saignements allongés (Platton et al., 2024).

La mW de type 2 est due à des déficits qualitatifs du FW, et la mW de type 3 est une absence totale de FW. La mW de type 2 est subdivisée en quatre sous-types :

- Type 2A dans lequel l'assemblage des multimères présente un défaut, la sensibilité au clivage AAMMTS13 est plus forte ou la synthèse diminue, entraînant une réduction ou une absence de MHPM.
- Le type 2B est dû à une mutation de gain de fonction qui augmente la liaison du FW aux plaquettes. Une perte de MHPM est signalée dans la plupart des cas, mais pas tous.
- Le type 2M présente une diminution de l'adhérence plaquettaire ou collagénique dépendante du FW, avec un profil normal des multimères du FW.
- Le type 2N a pour origine une affinité réduite de liaison au facteur VIII en raison de mutations dans le site de liaison au facteur VIII du FW ; il est fait état d'un profil normal des multimères du FW.

Il y a quelques exceptions ; des profils normaux ont été signalés dans certains cas de type 2B et, inversement, une perte de MHPM a été signalée dans quelques cas de variantes de type 2M. Des multimères du FW de grande taille peuvent être observés dans la mW de type 1C, dans le purpura thrombocytopénique thrombotique (PTT) et occasionnellement dans les cas de mW de type 2M.

Les méthodes traditionnelles de visualisation des multimères sont complexes, laborieuses et chronophages et impliquent une électrophorèse sur gel d'agarose contenant du dodécylsulfate de sodium, suivie d'une visualisation par western blot, immunodétection colorimétrique, autoradiographie, chimiluminescence ou fluorescence. L'évaluation des multimères peut être effectuée par inspection visuelle ou par quantification à l'aide de la densitométrie (Platton et al., 2024).

Au moment de la rédaction du présent document, la technique la plus largement utilisée, basée sur la participation à des programmes d'évaluation externe de la qualité, est un test semi-automatique disponible dans le commerce, qui est nettement plus rapide que les méthodes manuelles au gel d'agarose contenant du dodécysulfate de sodium. Cette méthode de détection et d'analyse de la distribution des multimères du FW dans le plasma humain par électrophorèse sur gel d'agarose et immunofixation avec l'instrument semi-automatique Sebia Hydrasys 2 est décrite ci-dessous (Bowyer et al., 2018).

Analyse des multimères du FW à l'aide de l'instrument Sebia Hydrasys : H5VWM et H11VWM sont des dosages à base de gel d'agarose destinés à la séparation des protéines plasmatiques en fonction de leur poids moléculaire. La séparation électrophorétique des multimères du FW est réalisée après traitement de l'échantillon avec un détergent anionique. Par un excès de ce détergent anionique, les protéines sont converties en complexes protéine-détergent anionique. Dans ces complexes, la conformation native des protéines est perturbée et elles prennent toutes la même conformation et la même charge négative par unité de masse. Lorsque ces protéines sont soumises à électrophorèse sur un milieu présentant des propriétés de criblage appropriées, tel que les gels H5VWM ou H11VWM, elles se séparent en fonction de leur poids moléculaire. Sur les gels H5VWM ou H11VWM, les multimères du FW sont séparés et immunoprécipités avec un antisérum anti-FW spécifique. Les différentes bandes sont ensuite visualisées dans le gel avec un anticorps marqué à la peroxydase et un substrat spécifique. Le dosage est réalisé en deux temps : (1) électrophorèse sur gel d'agarose pour séparer les protéines contenues dans les échantillons de plasma, et (2) immunofixation avec un antisérum anti-FW pour visualiser les différents multimères.

Équipement requis :

- Pipettes et embouts de 10 ml, 100 µl et 10 µl
- Tubes Eppendorf
- Bain-marie

- Minuterie
- Agitateur-mélangeur vortex
- Papier absorbant
- Lingettes imbibées d'alcool
- Analyseur Hydrasys (Sebia, Lisses, France)

Tableau 28. Réactifs pour l'analyse des multimères du FW à l'aide de l'instrument Sebia Hydrasys

Réactif	Réf. catalogue	Stabilité
Kit 5 ou 11 multimères du FW Sebia Hydragel	4359	Jusqu'à la date de péremption indiquée
Kit de visualisation des multimère du FW Sebia Hydragel	4747	Jusqu'à la date de péremption indiquée
Peroxyde d'hydrogène à 30 %	Sigma-Aldrich 216763 100 ml	Jusqu'à la date de péremption indiquée
Solution de décoloration Diluer 5 ml dans 5 l d'eau	4540 (10 flacons de 100 ml)	Solution de travail : 1 semaine à température ambiante
Solution de lavage Hydrasys Diluer 1 flacon dans 5 l d'eau (8 ml dans 500 ml)	4541 (10 flacons de 80 ml)	Solution de travail stable jusqu'à la date de péremption indiquée
CQ normal		

La méthode pour Hydragel 5 et Hydragel 11 ne varie qu'en termes de volumes de réactif et de taille des caches/papier buvard.

Préparation de l'échantillon :

- ✓ Chauffer le petit bain-marie Grant à 45 °C.
- ✓ Décongeler le plasma à tester et le CQ à 37 °C. Hydragel 5 est prévu pour quatre patients et un CQ. Hydragel 11 est prévu pour neuf patients et deux CQ (mais seul le flacon CQ 1 est requis).
- ✓ S'assurer que le résultat VWF:Ag est connu avant de commencer.
- ✓ Étiqueter les tubes Eppendorf pour les patients et le CQ.
- ✓ Agiter les échantillons avant utilisation. Diluer les échantillons avec le diluant du kit de multimères dans les tubes Eppendorf conformément au VWF:Ag de l'échantillon. La limite de détection des multimères du FW est de 0,05 UI/ml, la limite d'interprétation est de 0,11 UI/ml.

VWF:Ag (UI/ml)	Dilution	Diluant de l'échantillon (μl)	Plasma (μl)
< 0,20	1/4	30	10
0,20-1,50	1/6	50	10
1,50-3,00	1/10	90	10
> 3,00	1/20	95	5

- ✓ Agiter pendant cinq secondes.
- ✓ Incuber pendant exactement 20 minutes à 45 °C dans le bain-marie.
- ✓ Retirer les tubes Eppendorf du bain-marie, **agiter** et les laisser à température ambiante pendant 10 minutes. Pendant ces 10 minutes, préparer la migration.

Configuration de la migration

- 1) Mettre l'Hydrasys 2 et le dispositif de visualisation sous tension. Sélectionner le programme Phoresis : nom d'utilisateur adm mot de passe sebia.
- 2) Remplir une feuille de travail. Consigner les numéros de lot des kits, des mèches et du gel.

- 3) Sélectionner « 5 VWF » (programme de migration n° 57) ou « 11 VWF » (programme n° 58) dans le menu de l'instrument (écran de gauche).

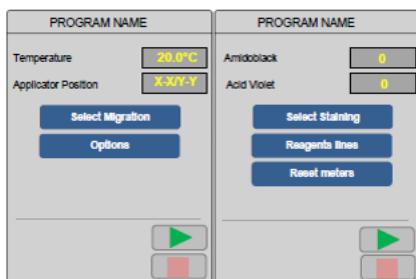


Figure 10. Analyseur Hydrasys

- 4) Ouvrir le couvercle du module de migration, retirer le porte-applicateur et soulever le porte-électrode. *****Ne jamais fermer le couvercle lorsque le support est levé***.**
- 5) À l'aide des extrémités en plastique, retirer les bandes de mèche tamponnées de leur emballage (vérifier l'excès d'eau). Les fixer au support par les trous, la protection en plastique touchant le support (figure 11).

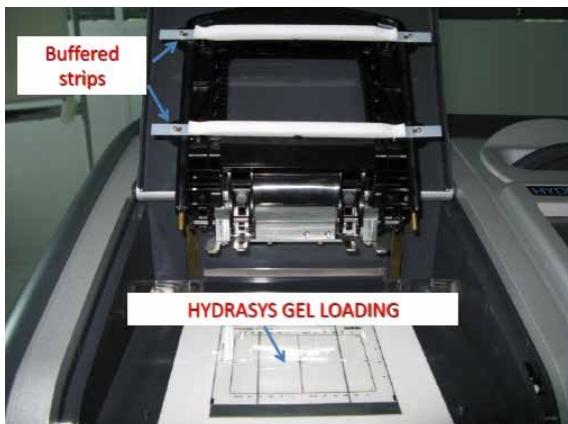


Figure 11. Analyseur Hydrasys

- 6) Hydragel 5 : ajouter 100 µl d'eau distillée jusqu'au tiers inférieur du cadre sérigraphié sur le module de migration.
- 7) Hydragel 11 : ajouter 200 µl d'eau distillée jusqu'au tiers inférieur du cadre sérigraphié sur le module de migration.
- 8) Ouvrir le gel et essuyer le support de gel en plastique avec du papier absorbant pour éliminer l'excès d'eau.
- 9) Placer le gel vers le haut sur le cadre sérigraphié (figure 12), les trous au bord le plus proche.
- 10) Rouler un cache plastique sur le gel (tailles différentes pour Hydragel 5 et 11), aligné avec les marqueurs sur le gel (figure 12). Éliminer les bulles d'air ; retirer et réappliquer immédiatement, le cas échéant.

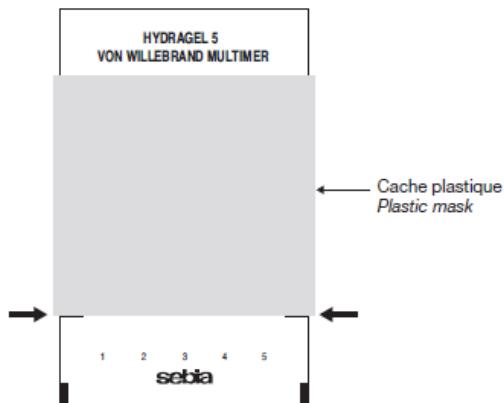


Figure 12. Analyseur Hydrasys

- 11) Abaisser doucement le porte-électrode sur le gel et fermer le module de migration.
- 12) À l'écran, appuyer sur START (►), puis confirmer. Cela prend cinq minutes.
- 13) Le bip signale la fin. Ouvrir le module de migration, soulever le support.
- 14) À l'aide d'une pipette de 10 µl à embout fin, sans toucher le côté ou le fond du puits, réinjecter 5 µl d'échantillon dans chaque puits. Hydragel 5 : ajouter le CQ normal au puits 5. Hydragel 11 : ajouter le CQ normal aux puits 1 et 11.
- 15) ****Éviter les bulles.**** Cela devrait être fait dans les deux minutes.
- 16) Abaisser doucement le porte-électrode et fermer le module de migration.
- 17) Appuyer sur START (►) à l'écran. Cela prend une centaine de minutes.
- 18) Sortir TTF1 et TTF2 du réfrigérateur et laisser liquéfier à température ambiante.

Immunofixation 1 (60 minutes)

- 19) Lorsque le bip retentit, le message ↓ANTISERUM VWF s'affiche.
- 20) Ouvrir le module, puis soulever et retirer le porte-électrode. Jeter les mèches et essuyer les électrodes avec un chiffon doux humidifié.
- 21) Hydragel 5 : dans un Z5, mélanger 2,5 ml de diluant pour antisérum avec 60 µl d'antisérum anti-FW.
- 22) Hydragel 11 : dans un Z5, mélanger 5 ml de diluant pour antisérum avec 135 µl d'antisérum anti-FW.
- 23) Retirer le masque et le jeter. Placer le masque AS VWF jaune sur le gel.
- 24) Tenir la pipette verticalement. Appliquer progressivement et soigneusement le mélange antisérum en une seule fois. ****Éviter les bulles.****
- 25) Fermer le module de migration et appuyer sur START (60 minutes).
- 26) Lorsque le bip retentit, ouvrir le couvercle et retirer l'antisérum.
- 27) Tenir la pipette verticalement, appuyer légèrement et retirer l'antisérum puis le jeter.
- 28) Retirer le masque et le nettoyer sous l'eau ; une petite brosse est recommandée. Laisser sécher.

Buvardage 1 (10 minutes)

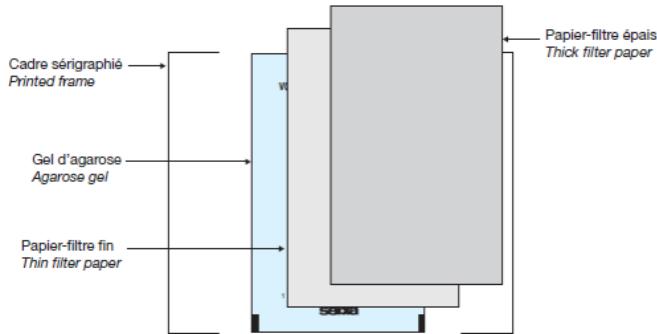


Figure 13. Analyseur Hydrasys

- 29) Appliquer un papier filtre fin et un papier filtre épais (côté lisse vers le bas) sur le gel (figure 13).
Ajouter le verre puis le poids.
- 30) Fermer le couvercle et appuyer sur START.

Lavage du gel 1 (20 minutes)

- 31) Retirer les papiers filtres et ajouter le masque orange de lavage/réhydratation.
- 32) Hydragel 5 : ajouter 4,5 ml de solution de lavage **rouge** au masque. ****Éviter les bulles.****
- 33) Hydragel 11 : ajouter 9,0 ml de solution de lavage **rouge** au masque. ****Éviter les bulles.****
- 34) Fermer le couvercle et appuyer sur START.

Buvardage 2 (10 minutes)

- 35) Retirer la solution de lavage **rouge**, puis le masque et ajouter les papiers filtres épais et fin, le verre et le poids.
- 36) Fermer le couvercle et appuyer sur START.
- 37) Laver le masque.

Lavage intermédiaire du gel puis buvardage sur papier fin (10 minutes + 5 secondes)

- 38) Ouvrir le couvercle. Retirer les papiers filtres et ajouter le masque de lavage/réhydratation orange.
- 39) Hydragel 5 : ajouter 4,5 ml de solution de lavage intermédiaire **verte**.
- 40) Hydragel 11 : ajouter 4,5 ml de solution de lavage intermédiaire **verte**.
- 41) Fermer le couvercle et appuyer sur START.
- 42) Ouvrir le couvercle et retirer la solution de lavage intermédiaire verte. N'appliquer qu'un papier filtre **fin**. Appuyer sur START. Après cinq secondes, retirer le papier fin.

Immunofixation 2 (30 minutes)

- 43) Hydragel 5 : mélanger 4 ml de diluant pour antisérum avec 2 µl d'anti-IgG-PER dans un Z5.
- 44) Hydragel 11 : mélanger 8 ml de diluant pour antisérum avec 4 µl d'anti-IgG-PER dans un Z5.
- 45) Appliquer le masque IgG-PER orange puis ajouter le mélange anti-IgG-PER.
- 46) Fermer le couvercle et appuyer sur START.

Buvardage 3 (10 minutes)

- 47) Ouvrir le couvercle, retirer l'anti-IgG-PER et le jeter. Retirer et laver le masque. Ajouter les papiers filtres fin et épais, le verre et le poids.
- 48) Fermer le couvercle et appuyer sur START.

Lavage du gel 2 (20 minutes)

- 49) Retirer les papiers filtres et ajouter le masque orange de lavage/réhydratation.
- 50) Hydragel 5 : Ajouter 4,5 ml de solution de lavage **rouge** au masque. ****Éviter les bulles.****
- 51) Hydragel 11 : ajouter 9,0 ml de solution de lavage **rouge** au masque. ****Éviter les bulles.****
- 52) Fermer le couvercle et appuyer sur START.

Buvardage 4 (10 minutes)

- 53) Retirer la solution de réhydratation, puis le masque et ajouter les papiers filtres épais et fin, le verre et le poids.
- 54) Fermer le couvercle et appuyer sur START.
- 55) Laver le masque.

Réhydratation du gel 1 (10 minutes)

- 56) Retirer les papiers filtres et ajouter le masque orange de lavage/réhydratation.
- 57) Hydragel 5 : ajouter 4,5 ml de solution de **réhydratation** au masque. ****Éviter les bulles.****
- 58) Hydragel 11 : ajouter 9,0 ml de solution de **réhydratation** au masque. ****Éviter les bulles.****
- 59) Fermer le couvercle et appuyer sur START.

Buvardage 5 (10 minutes)

- 60) Retirer la solution de réhydratation, puis le masque et ajouter les papiers filtres épais et fin, le verre et le poids.
- 61) Fermer le couvercle et appuyer sur START.
- 62) Laver le masque.

Réhydratation du gel 2 (10 minutes)

- 63) Retirer les papiers filtres et ajouter le masque orange de lavage/réhydratation.
- 64) Hydragel 5 : ajouter 4,5 ml de solution de **réhydratation** au masque. ****Éviter les bulles.****
- 65) Hydragel 11 : ajouter 9,0 ml de solution de **réhydratation** au masque. ****Éviter les bulles.****
- 66) Fermer le couvercle et appuyer sur START.
- 67) Agiter TTF1 et TTF2.
- 68) Hydragel 5 : ajouter 75 µl de TTF1 à 3,0 ml de solvant TTF dans un Z5. Retourner pour mélanger. Ajouter 75 µl de TTF2, retourner pour mélanger. Ajouter 3 µl de peroxyde d'hydrogène (30 %), retourner pour mélanger.
- 69) Hydragel 11 : ajouter 150 µl de TTF1 à 6,0 ml de solvant de visualisation TTF dans un Z5. Retourner pour mélanger. Ajouter 150 µl de TTF2, retourner pour mélanger. Ajouter 6 µl de peroxyde d'hydrogène (30 %), retourner pour mélanger.

Visualisation (10 minutes)

- 70) Éliminer la solution de réhydratation du masque. Placer le masque TTF1/TTF2 orange sur le gel.
- 71) Hydragel 5 : appliquer 2,5 ml de mélange TTF. ****Éviter les bulles.****
- 72) Hydragel 11 : appliquer 5 ml de mélange TTF. ****Éviter les bulles.****
- 73) Fermer le couvercle et appuyer sur START.

Buvardage 6 (5 minutes)

- 74) Retirer la solution TTF, puis le masque et ajouter les papiers filtres épais et fin, le verre et le poids.
- 75) Fermer le couvercle et appuyer sur START.
- 76) Laver le masque avec de l'eau et une lingette imbibée d'alcool.

Réhydratation du gel 3 (5 minutes)

- 77) Retirer les papiers filtres et ajouter le masque orange de lavage/réhydratation.
- 78) Hydragel 5 : ajouter 4,5 ml de solution de **réhydratation** au masque. ****Éviter les bulles.****
- 79) Hydragel 11 : ajouter 9,0 ml de solution de **réhydratation** au masque. ****Éviter les bulles.****
- 80) Fermer le couvercle et appuyer sur START.

Buvardage 7 (5 minutes)

- 81) Retirer la solution de réhydratation, puis le masque et ajouter les papiers filtres épais et fin, le verre et le poids.
- 82) Fermer le couvercle et appuyer sur START.
- 83) Laver le masque.

Séchage sur gel (10 minutes)

- 84) Ouvrir le couvercle et retirer les papiers filtres.
- 85) Fermer le couvercle et appuyer sur START.

Lavage et traitement final (25 minutes)

- 86) Ouvrir le couvercle et retirer le gel.
- 87) Le gel doit être immédiatement lavé dans le compartiment de coloration.
- 88) Ouvrir le support du gel et positionner le gel comme indiqué à la figure 14.

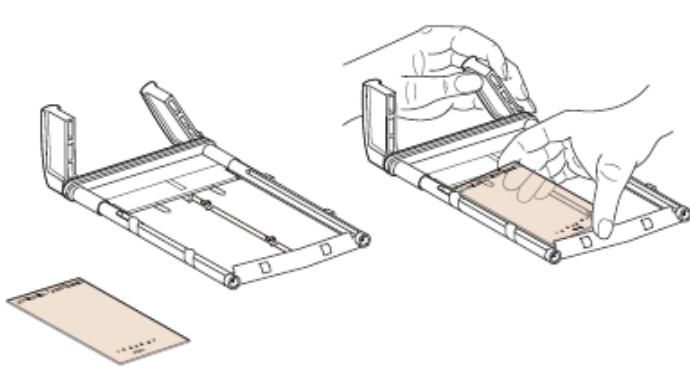


Figure 14. Analyseur Hydrasys

- 89) Fermer le support et le placer dans le module de traitement/coloration du gel.
- 90) S'assurer qu'au moins 400 ml de solution de décoloration sont présents et que le conteneur à déchets est vide.
- 91) Sélectionner le programme de lavage du FW dans le menu de l'instrument (écran RHS) et appuyer sur START.

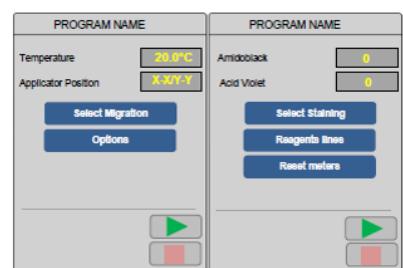


Figure 15. Analyseur Hydrasys

S'assurer que tous les masques sont lavés. Le masque TTP, l'unité de migration Hydrasys et les électrodes doivent être soigneusement nettoyés avec des lingettes alcoolisées.

Analyse du gel

- 92) Retirer le gel et le support du module de traitement/coloration du gel et les placer dans le module d'analyse.
- 93) ans le programme Phoresis, créer une liste de travail en regard de l'icône de tableau . Commencer par le numéro 1 et ajouter les détails du patient, y compris l'identifiant unique (SID), le nom, la date de naissance, la date de l'échantillon, le numéro de l'hôpital et l'hôpital demandeur (pour le RHH, ajouter le consultant).
- 94) Hydragel 5 : l'échantillon 5 est le contrôle normal (CQ).
- 95) Hydragel 11 : les échantillons 1 et 11 sont le contrôle normal (CQ).
- 96) Cliquer sur pour ouvrir la fenêtre d'analyse des gels et des échantillons.
- 97) La fenêtre suivante s'ouvrira :

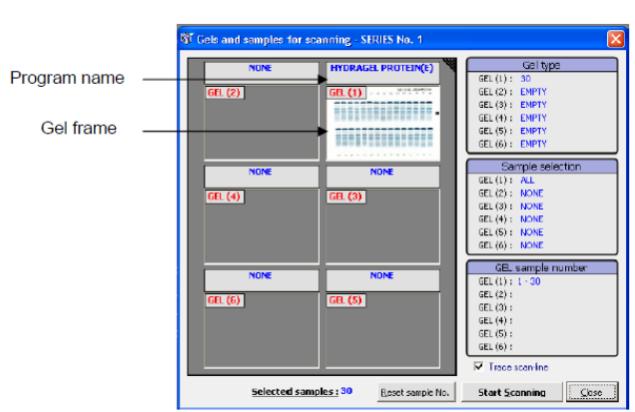


Figure 16. Analyseur Hydrasys

- 98) Sélectionner le programme du premier gel analysé en position 1. Appuyer sur la partie supérieure de l'écran RHS une fois pour Hydragel 5 et deux fois pour Hydragel 11 (une troisième pression ramène à 5).
- 99) Appuyer sur START.
- 100) Vérifier que le scanner a correctement identifié toutes les bandes. Dans certains cas, il passe à côté de la première bande des MBPM. Dans ce cas, choisir « Conservative gel localization mode to rescan the image », puis analyser à nouveau.
- 101) Lorsque les images apparaissent, cliquer sur l'analyse de la vue, puis sur la mosaïque de courbes pour accéder à la densitométrie.
- 102) Les tracés de densitométrie individuels apparaîtront dans les cases :

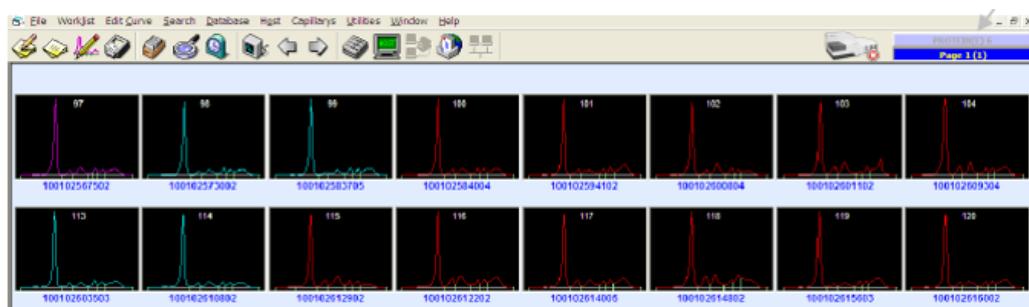


Figure 17. Analyseur Hydrasys

Cliquer sur la première pour l'ouvrir. **Commencer par le puits de CQ** 5 pour Hydragel 5 ou 1/11 pour Hydragel 11. Les résultats du CQ apparaissent :

NB : si les résultats ne peuvent pas être évalués le jour du test, ils peuvent être obtenus de manière rétrospective. Ouvrir le programme Phoresis et sélectionner la date du test où se trouve la flèche noire sur la figure 18, puis procéder comme suit.

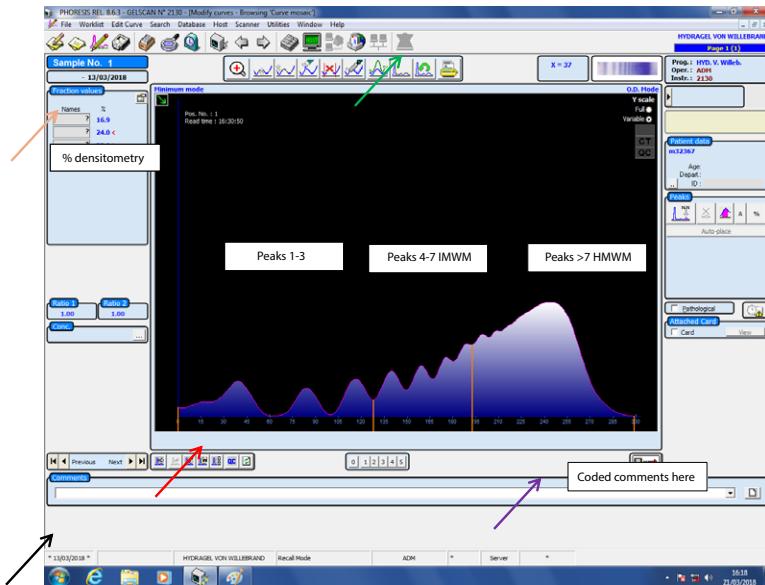


Figure 18. Analyseur Hydrasys

Définir le profil Reference en cliquant sur la 4^e icône sous la densitométrie (flèche rouge). Définir la courbe actuelle comme profil de référence. NB : choisir uniquement l'un des résultats de CQ pour Hydragel 11.

- 103) Cliquer sur la courbe de densitométrie pour définir les MBPM (pics 1–3), MPMI (pics 4–7) et MHPM (pics > 7).
- 104) Le pourcentage des pics apparaîtra et nécessitera un étiquetage (flèche orange).
- 105) Vérifier si les résultats du CQ se situent dans les plages attendues. Si ce n'est pas le cas, ne pas communiquer les résultats aux patients et prendre contact avec un spécialiste des tests. Enregistrer les résultats (icône de disquette) et passer aux patients suivants.
- 106) Répéter 101+102 avec chaque patient. Pour les résultats, cliquer pour superposer le schéma de CQ de référence (flèche verte).
- 107) À l'aide des plages de référence pour les adultes, décider si la densitométrie est normale ou anormale et choisir les commentaires appropriés dans la liste déroulante des commentaires (flèche violette). À noter qu'un seul commentaire peut être ajouté à chaque résultat. Le taux de MHPM est cliniquement le plus pertinent.

Tableau 29. Taux de MHPM et commentaire pouvant être ajouté aux résultats

Commentaires	Valeur
SRHMWM (légère réduction des multimères de haut poids moléculaire)	MHPM 30 %-bas de la plage normale
RHMWM (réduction des multimères de haut poids moléculaire)	MHPM 15-30 %
GRHMW (réduction brute des multimères de haut poids moléculaire)	MHPM < 15 %
SIHMWM (légère augmentation des multimères de haut poids moléculaire)	MHPM > haut de la plage normale
SILMWM (légère augmentation des multimères de bas poids moléculaire)	MHPM haut de la plage normale jusqu'à 26 %
ILMWM (augmentation des multimères de bas poids moléculaire)	MBPM > 26 %
QNORM/QNORM avec des quantités réduites	MBPM et MHPM dans les plages normales

- 108) Des tests répétés peuvent être nécessaires pour les échantillons avec des multimères très hauts ou très faibles. Parler à un expert en sciences biomédicales formé à ce dosage.
- 109) Une fois la fin de la liste des patients atteinte, cliquer sur l'onglet Edit curve, puis imprimer les rapports dans un fichier PDF via PDF Creator.
- 110) Cela exportera tous les résultats vers un dossier sur le Bureau (raccourci PDF). Trouver la date actuelle et la copier (ou l'envoyer) sur la clé USB.
- 111) Une copie JPEG du gel est également enregistrée dans les images. Copier (ou envoyer) sur la clé USB.
- 112) S'assurer que le gel est étiqueté avec la date d'analyse, le coller sur la feuille de travail et le classer dans le dossier des résultats.
- 113) S'assurer que les résultats de CQ normaux se situent dans les limites acceptables.
- 114) Effectuer et consigner le nettoyage mensuel au besoin.

Tableau 30. Plage de référence adulte pour les MBPM, MPMI et MHPM

	N	Moyenne (%)	Plage en % (IC à 95 %)
MBPM	51	17,3	11,8-23,6
MPMI	51	33,0	24,6-42,0
MHPM	51	49,9	35,0-58,5

Interprétation des tests du facteur Willebrand : la mW est le plus fréquent des troubles de la coagulation héréditaires avec une prévalence estimée pouvant atteindre 1 %. Seulement 10 % de ces personnes sont symptomatiques et 10 % des personnes symptomatiques se présentent à l'hôpital. Une estimation prudente de la prévalence est de 100 par million de personnes, dont environ 80 % dans le monde en développement. La mW est due à une déficience quantitative et/ou qualitative en FW, une protéine du plasma. Contrairement à la plupart des autres facteurs de coagulation, le FW est une protéine qui adhère à différents ligands incontournables dans la cascade de la coagulation. Il se lie au récepteur GPIb des plaquettes et du collagène sous-endothélial, entraînant une adhésion plaquettaire. Il agrège également les plaquettes en se liant au récepteur GPIIb/IIIa. L'autre fonction importante du FW est d'agir en tant que protéine porteuse du facteur VIII et de prévenir la dégradation protéolytique du facteur VIII. En l'absence de FW, la demi-vie du facteur VIII est réduite de 8 à 12 heures à deux heures. La mW peut être classée en trois principaux sous-types, en fonction des anomalies quantitatives (type 1 et 3) et qualitatives (type 2). La mW de type 2 est en outre subdivisée en quatre sous-types, 2A, 2B, 2M et 2N. Les phénotypes biologiques des différents sous-types sont repris dans le tableau 31.

- 1) mW de type 1 : anomalie quantitative partielle du FW.
- 2) mW de type 2 : anomalie qualitative. Une ou plusieurs fonctions du FW sont anormales, comme l'indique le dosage de l'activité du FW (décrit ci-dessous)..
 - a. mW de type 2A : perte ou déficit sélectif des MHPM. Les multimères les plus grands sont les formes les plus actives sur le plan fonctionnel. La perte sélective de ces multimères entraîne une diminution de l'adhésion plaquettaire dépendante du FW et de la capacité de liaison au collagène.
 - b. mW de type 2B : affinité accrue du FW pour le récepteur plaquettaire GPIb conduisant à une liaison spontanée du FW aux plaquettes qui est éliminé de la circulation, entraînant une perte de MHPM et une thrombocytopénie. De grosses plaquettes et des amas de plaquettes peuvent en outre apparaître sur le frottis périphérique. La mW de type plaquettaire (pseudo-mW) peut également présenter un phénotype similaire.
 - c. mW de type 2M : diminution de l'adhésion plaquettaire dépendante du FW sans perte de MHPM. Répartition multimérique normale.
 - d. mW de type 2N : moindre affinité de liaison du FW pour le facteur VIII.
- 3) TmW de type 3 : absence totale/taux indétectables de FW, généralement VWF:Ag < 3 UI/dl.

Variables pré-analytiques dans le diagnostic de la mW : les problématiques pré-analytiques peuvent considérablement influencer le diagnostic de la maladie de Willebrand. Le facteur Willebrand et le facteur VIII sont des réactifs de la phase aiguë qui peuvent augmenter après une inflammation, un traumatisme, un stress, une grossesse et une activité physique, masquant potentiellement un diagnostic de mW. Le prélèvement d'échantillons doit être évité à ces moments, ou le test doit être répété à un autre moment, avant d'exclure un diagnostic de mW. Une collecte, un transport et un traitement inadéquats des échantillons (tubes sous-remplis, échantillon ou sérum coagulé, retard dans le transport des échantillons ou transport d'un échantillon de sang total réfrigéré ou dans de la glace, gel-dégel inefficace ou cycles de gel-dégel répétés, etc.) peuvent compromettre le diagnostic de mW. Les échantillons de FW doivent idéalement être collectés et traités sur le même site pour éviter de telles erreurs.

Tests à disposition pour le diagnostic de la mW :

Tests de dépistage

Antécédents hémorragiques et outil d'évaluation des saignements (BAT pour bleeding assessment tool) : les antécédents hémorragiques peuvent être considérés comme le premier test de dépistage dans l'évaluation d'un patient présentant des symptômes hémorragiques. Un recueil minutieux quant à la nature et à la fréquence des saignements, associé aux antécédents familiaux, peut donner des indices importants sur le diagnostic. Les saignements cutanéomuqueux (p. ex. saignements cutanés, saignements des gencives, épistaxis, saignements de plaies mineures, saignements gastro-intestinaux et ménorragies) sont le schéma typique des saignements observés dans la mW. L'hémarthrose est rare et n'est généralement observée que dans la mW de type 3 lorsque le facteur VIII est considérablement abaissé. Les nouvelles lignes directrices soulignent l'importance des antécédents hémorragiques et de l'utilisation des BAT. Il existe de nombreux BAT : Vicenza, MCMDM-1, grille d'évaluation illustrée des pertes sanguines (*Pictorial Blood Loss Assessment Chart*, PBAC) et questionnaire sur les saignements pédiatriques. En 2010, l'ISTH a proposé un nouveau BAT comprenant 14 symptômes hémorragiques, chacun classé de 0 à 4. La plage de référence pour le BAT de l'ISTH, dérivée de 1040 adultes sains et 330 enfants, était < 3 pour les enfants, < 4 pour les hommes adultes et < 6 pour les femmes adultes. La principale valeur clinique du BAT est d'exclure un trouble de la coagulation. Dans un contexte de faible prévalence, Tosetto et al. ont constaté qu'un score ≤ 3 avait une valeur prédictive négative de 99,2 %, ce qui fondamentalement exclut un trouble de la coagulation. L'ISTH recommande d'utiliser un BAT validé pour dépister les patients ayant une faible probabilité de mW (en contexte de soins primaires notamment). Il n'est toutefois pas fiable d'utiliser un BAT lorsque la probabilité de mW est intermédiaire (p. ex. personnes orientées vers un hématologue) ou élevée (personnes dont un apparenté au premier degré est affecté entre autres).

Temps de saignement (TS) : le TS est un test *in vivo* pour l'hémostase primaire décrit pour la première fois en 1901 par le médecin français Milian, puis modifié par Duke en 1910. La sensibilité globale du TS pour le diagnostic de la maladie de Willebrand se situe autour de 60 % (21 à 72 %), mais elle est très bonne pour la forme sévère (100 % pour le type 3). Par conséquent, cela reste un test utile dans un contexte de ressources limitées pour différencier l'hémophilie A de la mW sévère.

Analyseur de la fonction plaquettaire 200 : l'analyseur PFA100/200 (Siemens, Dade Behring, Allemagne) est un appareil conçu pour mesurer l'hémostase primaire en cas de forces de cisaillement élevées. Il enregistre le temps qu'il faut au sang total d'un patient pour former un bouchon plaquettaire stable au niveau de l'ouverture de l'appareil, ce qui l'obstrue. Ce temps est consigné sous le nom de « temps d'occlusion ». Le PFA100/200 a montré une sensibilité globale d'environ 85 à 90 %, avec une sensibilité de près de 100 % à la mW de types 2 et 3. La sensibilité de la mW de type 1 variait en fonction des taux de FW. Le PFA100/200 est un instrument coûteux, qui n'est pas disponible dans la plupart des pays à revenu faible et intermédiaire.

Temps de céphaline activée (TCA) : le TCA n'est allongé que dans les cas de mW sévère lorsque le facteur VIII est également abaissé, généralement dans le type 3, le type 2N et certains sous-types du type 1 et 2, en fonction des taux de VWF:Ag.

Dosages spécifiques du facteur Willebrand pour le diagnostic de la maladie de Willebrand : la classification de la mW nécessite des tests pour à la fois quantifier la protéine FW et évaluer la fonction du FW. Le FW se lie (1) aux plaquettes et au collagène sous-endothélial pour favoriser l'adhésion plaquettaire, (2) aux plaquettes activées pour favoriser l'agrégation plaquettaire et (3) au facteur VIII pour prévenir sa dégradation prématurée. Les dosages fonctionnels pour la mW évaluent une ou plusieurs de ces fonctions du FW. Un écart entre le dosage fonctionnel et le dosage de l'antigène suggère une anomalie qualitative, vérifiée par le calcul du rapport entre le dosage de l'activité du FW et l'antigène. Un rapport < 0,6 ou < 0,7 peut être utilisé selon la préférence du laboratoire.

Antigène du facteur Willebrand (VWF:Ag) : le dosage mesure la quantité totale de protéine FW présente dans l'échantillon, sous les formes à la fois fonctionnelles et non fonctionnelles. La méthodologie la plus couramment utilisée est le LIA automatisé. Il est également possible de faire appel aux méthodes basées sur ELISA et, plus récemment, CLIA dans l'instrument HemosIL AcuStar.

Dosages de l'activité du facteur Willebrand dépendante des plaquettes ou de la GP1b : ils mesurent spécifiquement la capacité du FW à se lier aux plaquettes, et sont donc utilisés pour différencier la mW de type 1 de la mW de type 2A/2B/2M.

- 1) **Dosage du cofacteur de la ristocétine (VWF:RCo) :** en l'absence de contrainte de cisaillement, la ristocétine agit comme un substitut pour induire des altérations du FW et provoquer une agglutination plaquettaire-FW. Le degré d'agglutination est proportionnel à la quantité de FW fonctionnel présente dans le plasma, qui peut être mesurée soit à l'aide d'un agrégomètre, soit par l'augmentation de la turbidité par des méthodes automatisées. Le dosage VWF:RCo automatisé a montré une précision et une limite de détection améliorées par rapport aux méthodes basées sur l'agrégométrie.

Le dosage VWF:RCo présente des limites importantes, dont un CV inter- et intra-laboratoire élevé, avec un potentiel de résultats faussement élevés ou faussement faibles. En outre, la limite de détection inférieure est élevée, généralement comprise entre 8 et 20 UI/dl, ce qui pose un problème pour identifier les variants de type 2 lorsque les taux de VWF:Ag sont faibles. Certains polymorphismes couramment observés dans la population africaine peuvent conduire à des taux de VWF:RCo faussement bas, même en l'absence de mW.

- 2) VWF:GP1R : ce dosage est similaire au VWF:RCO, les plaquettes étant remplacées par des microparticules (billes de latex dans le LIA [HemosIL] et particules magnétiques dans le CLIA [AcuStar]), enrobées de fragments de GP1b de type sauvage recombinante. Le CV est moindre et les limites de détection sont inférieures à celles du dosage VWF:RCO original. Son utilité clinique dans la mW a été démontrée dans diverses études.
- 3) VWF:GP1M : contrairement aux autres dosages du FW dépendant des plaquettes, celui-ci ne fait pas appel à la ristocétine. Les plaquettes sont remplacées par des fragments de GP1b recombinante avec des mutations de gain de fonction auxquelles le FW se liera « spontanément ». Le VWF:GP1bM peut être mesuré par LIA (Siemens Innovance VWF Ac) ou même par quelques méthodes non commerciales basées sur ELISA. Le test bénéficie d'une bonne reproductibilité et d'une faible limite de détection et fournit des informations comparables aux tests VWF:RCO et VWF:GP1bR pour le diagnostic de mW de type 2.
- 4) VWF:Ab : ce test est basé sur des anticorps monoclonaux dirigés contre le site de liaison plaquettaire (c'est-à-dire GP1b) du FW. Bien qu'il ne s'agisse pas d'un véritable test fonctionnel, il peut être considéré comme un substitut de l'activité de liaison plaquettaire. Plusieurs études ont démontré l'utilité du test VWF:Ab automatisé (activité du FW HemosIL, IL, Bedford, Massachusetts) dans l'évaluation initiale et la sous-classification de la mW.

De nouvelles lignes directrices recommandent d'utiliser des dosages plus récents de l'activité de la fonction plaquettaire du FW, tels que VWF:GP1bR et VWF:GP1bM par rapport au VWF:RCO (automatisé ou non automatisé).

Dosage de la liaison au collagène (VWF:CB) : il évalue la capacité du FW à se lier au collagène et dépend de la présence de MHPM et d'un site de liaison au collagène intact. Il peut être utilisé en remplacement de l'analyse des multimères pour différencier le type 2A du type 2M. Le rapport VWF:CB/antigène est normal dans le type 2M et réduit dans le type 2A/2B. Le dosage VWF:CB s'est avéré plus efficace pour distinguer la mW de type 1 du type 2 (sauf 2M) que le dosage VWF:RCO. Il peut être utilisé pour distinguer la mW de type 1 sévère de la mW de type 3 en raison de sa meilleure limite de détection. Le VWF:CB peut être mesuré par divers tests ELISA commerciaux et non commerciaux, et plus récemment par la méthode CLIA.

Agglutination plaquettaire induite par la ristocétine (RIPA) : la réaction d'agglutination à des doses de ristocétine normales ($> 1 \text{ mg/ml}$) et faibles ($< 1 \text{ mg/ml}$) est l'un des tests utilisés dans le diagnostic de la mW. Bien que l'absence de réaction puisse être observée dans le type 3 et les sous-types de la mW sévère, sa principale utilité réside dans l'identification de la mW de type 2B et de type plaquettaire, où la réaction est observée même à de faibles doses de ristocétine. La différenciation entre type 2B et type plaquettaire peut être établie par provocation avec du cryoprecipité ou études de mélange avec du plasma normal et/ou des plaquettes témoins. Le cas échéant, il convient d'avoir recours à des tests génétiques.

Dosage de la liaison au facteur VIII : il s'agit ici d'évaluer la capacité du FW à se lier au facteur VIII. Un dosage VWF:FVIIIB faible et un moindre rapport VWF:FVIIIB/VWF:Ag suggèrent une mW de type 2N.

Analyse des multimères : l'évaluation des multimères du FW est un test établi dans l'évaluation de la mW, essentiellement pour différencier le type 2A du type 2M. Le test est toutefois très laborieux et technique-ment exigeant et disparaît rapidement de la plupart des laboratoires.

Test à la desmopressine : le type 1C (Vicenza) est un sous-type de la mW de type 1 associé à une clairance accrue du FW. Les patients présentent une réponse exagérée à la desmopressine, mais avec une durée de vie raccourcie. Un rapport propeptide du FW/VWF:Ag supérieur à la normale est aussi observé chez ces patients.

Tableau 31. Phénotype biologique des différents sous-types de mW

Type de mW	FVIII	Antigène du facteur Willebrand (VWF:Ag)	Dosages de l'activité du FW dépendante des plaquettes*	Dosage de la liaison au collagène (VWF:CB)	Dosage de la liaison au facteur VIII (VWF:FVIIIB)	Rapport activité de la fonction plaquettaire du FW/ Ag ^s	Rapport VWF:CB/ Ag ^s	Analyse des multimères	Agglutination plaquettaire induite par la ristocétine (RIPA)	Commentaires
mW type 1	Abaissé ou normal	Abaissé	Abaissé	Abaissé	Normal	Normal	Normal	Normal	Abaissé ou normal	Les taux de FW < 30 UI/dl ou compris entre 30 et 50 UI/dl avec saignement anormal correspondent à une mW de type 1 selon les nouvelles lignes directrices. Sinon, les taux de FW de 30 à 50 UI/dl peuvent être classés comme faibles avec léger risque de saignement.
mW type 2A	Abaissé ou normal	Abaissé ou normal	Abaissé	Abaissé	Normal	Abaissé	Abaissé	Perte des multimères de poids moléculaire haut et intermédiaire	Généralement abaissé	2A et 2B peuvent être distingués par RIPA.
mW type 2B	Abaissé ou normal	Abaissé ou normal	Abaissé	Abaissé	Normal	Abaissé	Abaissé	Perte des MHPM	Réaction observée à faible dose de ristocétine	Distinction type 2B versus plaquettaire par études de mélange RIPA ou tests génétiques
mW type 2M	Abaissé ou normal	Abaissé ou normal	Abaissé	Abaissé	Normal	Abaissé	Généralement normal	Normal	Abaissé ou normal	La mW de type 2M avec anomalie de liaison au collagène peut avoir un rapport VWF:CBA/Ag réduit.
mW type 2N	Abaissé (rapport FVIII/VWF:Ag généralement < 0,7)	Généralement normal [#]	Généralement normal [#]	Généralement normal [#]	Abaissé	Normal	Normal	Normal	Normal	Phénotype similaire à l'hémophilie A mineure/modérée ou au porteur ou à la porteuse. Confirmé avec dosage VWF:FVIIIB ou test génétique.
mW type 3	Abaissé, généralement 1-10 UI/dl	Abaissement prononcé < 2 UI/dl	Abaissement prononcé	Abaissement prononcé	S/O	S/O	S/O	Absent	Absence de réaction qui se corrige lors de l'ajout de cryoprecipité	Les rapports activité du FW/antigène ne doivent pas être calculés.

*Les dosages du FW dépendant des plaquettes comprennent VWF:RCO, VWF:GP1M, VWF:GP1R ou VWF:Ab.

Les dosages du VWF:Ag ou de l'activité peuvent être réduits dans la mW de type 2N, lorsqu'ils sont observés dans un état hétérozygote composite associé à des mutations nulles/quantitatives du FW.

\$ Pour déterminer une anomalie qualitative, le rapport entre le dosage de l'activité du FW et le dosage de l'antigène est calculé. Un rapport inférieur à 0,6 ou 0,7 peut être utilisé (selon la préférence du laboratoire) pour classer la mW de type 2.

Diagnostic de la maladie de willebrand dans les contextes pauvres en ressources : la mW est le plus fréquent des troubles de la coagulation héréditaires avec une prévalence estimée de 1 %. Une estimation prudente de la prévalence est de 100 par million de personnes, dont environ 80 % dans le monde en développement. Seuls 2,6 % du total des cas de mW déclarés sont originaires d'Asie du Sud et d'Afrique

subsaharienne, bien qu'ils représentent environ 40 % de la population mondiale totale. La mW comporte trois sous-types principaux. La mW de type 3 est due à un déficit quantitatif sévère en FW dû à des taux indétectables de FW. Le type 1 est dû à un déficit quantitatif partiel. La mW de type 2 est une anomalie qualitative et se subdivise en quatre sous-types, 2A, 2B, 2M et 2N. Il existe une grande disparité dans la répartition des sous-types de mW dans les différentes régions du monde. Dans la plupart des pays à revenu élevé et intermédiaire de la tranche supérieure (PRE et PRITS), le type 1 est le sous-type le plus courant (60 à 80 %), suivi du type 2. La mW de type 3 est rare et représente généralement moins de 5 % des cas. En revanche, la mW de type 3 est plus fréquente dans de nombreux pays à revenu faible et intermédiaire de la tranche inférieure (PRF et PRITI), atteignant 64 % dans certaines régions, ce qui est bien résumé dans un article de synthèse de Favaloro *et al.* Cette différence frappante dans la distribution peut s'expliquer par le fait que la plupart des données des PRITI proviennent de dossiers hospitaliers où seuls les patients les plus sévères sont susceptibles de se présenter, les cas plus légers n'étant pas détectés. Un autre facteur est une consanguinité accrue et les mariages au sein de petites communautés, ce qui augmente l'incidence de la mW de type 3, une maladie héréditaire autosomique récessive. La sous-déclaration de la maladie de Willebrand est considérable, en particulier dans les PRF et PRITI. Stonebraker *et al.* ont signalé que la prévalence moyenne de la mW dans les PRE, les PRITS, les PRITI et les PRF était de 60,3, 12,6, 2,5 et 1,1 par million, respectivement, ce qui était significativement différent par rapport à la classification des revenus, souvent < 1 par million dans de nombreux PRF. Cependant, la variabilité de la prévalence de la mW de type 3 est moins prononcée, ce qui suggère que les patients atteints du type 3 ont été diagnostiqués plus fréquemment que les autres sous-types dans ces pays.

Obstacles au diagnostic de la maladie de Willebrand dans un environnement pauvre en ressources

Priorité moindre pour les soins de santé et les troubles de la coagulation : les soins de santé sont très peu prioritaires, sur le plan social et politique, dans la plupart des pays en développement où seulement 1 à 2 % du produit intérieur brut leur est alloué. Sur ce budget limité, les questions plus urgentes d'importance pour la santé publique, telles que les maladies infectieuses, la mortalité infantile et maternelle et la malnutrition, prévalent sur des affections relativement plus rares comme les troubles héréditaires de coagulation, dont la mW.

Accès limité aux établissements de soins et coûts élevés des soins : dans de nombreux pays en développement, l'infrastructure des soins de santé est peu développée et les hôpitaux, moins nombreux, ne sont pas facilement accessibles à tous. Cela pourrait être la raison de l'incidence plus élevée de la mW sévère dans les pays en développement où seules les personnes à tendance hémorragique les plus sévères se présentent à l'hôpital. Le coût élevé des investigations, la non-prise en charge des frais de déplacement, l'obligation de cesser tout recrutement pour les investigations et la couverture minimale de l'assurance maladie contribuent tous au sous-diagnostic des cas de mW mineure.

Non-disponibilité des réactifs du FW et manque d'infrastructures de laboratoire : les nouvelles lignes directrices de 2021 pour la maladie de Willebrand suggèrent l'utilisation de dosages de l'activité plaquettaire, tels que VWF:GP1R et VWF:GP1M, pour le diagnostic de la maladie de Willebrand. Pourtant, ces kits ne sont pas disponibles ni utilisés dans la plupart des PRITI et PRF. D'autres problématiques, comme les retards d'approvisionnement en réactifs, le mauvais entretien des infrastructures de transport, la faible sous-traitance des échantillons, la courte durée de conservation des réactifs et le nombre réduit de centres de référence, contribuent également à la rareté des installations de test du FW.

Comment surmonter les obstacles au diagnostic de la maladie de Willebrand dans un environnement pauvre en ressources

Amélioration de l'identification des cas de maladie de Willebrand à l'aide de BAT et de tests de dépistage peu coûteux et facilement accessibles : les tests de dépistage de la mW comprennent le temps de saignement (TS) et le temps d'occlusion sur l'analyseur de la fonction plaquettaire (PFA200). Dans notre centre, nous avons soumis à analyse une vaste cohorte de patients (n = 444) présentant un FW abaissé

< 50 UI/dl parmi les patients évalués pour une suspicion de troubles de la coagulation sur une période de sept ans, de janvier 2012 à mars 2019. Le phénotype de la majorité des patients était de type 3 (48,3 %), conformément à d'autres études publiées en Inde. En fonction de la sévérité sur la base des taux VWF:RCO, les patients ont également été sous-classés comme étant des cas sévères (< 10 %), modérés (10-30 %) et légers (30 %), selon la classification proposée par Federici *et al.* (2014). La sensibilité globale du TS et du PFA200 était de 72 % et 95 %, comme le montre la figure 19. Il est important de noter que le TS présentait une sensibilité de 100 % dans l'identification de la mW de type 3 et une sensibilité très élevée de 92 % dans la mW sévère, y compris les cas de type 1 et de type 2 sévères. Le TS était comparable au PFA200 dans ces deux catégories. Dans l'ensemble, un score anormal du BAT de l'ISTH a été observé dans 75 % des cas de mW.

Depuis l'apparition du PFA200 en 1995, de nombreuses publications soutiennent son utilisation pour le diagnostic et le suivi de la mW, et il a remplacé le temps de saignement comme test de dépistage de la mW dans la plupart des pays développés. L'ensemble des lignes directrices découragent également l'utilisation du TS dans le bilan diagnostique de la mW. La sensibilité du TS et du PFA100/200 est similaire pour les dysfonctions plaquettaires et pour la mW sévère. Bien que le PFA100/200 ait une bonne sensibilité à la mW, il s'agit d'un instrument coûteux que la plupart des laboratoires des pays en développement ne peuvent pas utiliser et qui ne peut donc pas remplacer le TS dans ce contexte. La majorité des cas de mW dans les PRF et les PRITI se présentent avec une forme sévère dont le diagnostic souvent n'est pas établi ou est établi à tort comme une hémophilie A. En conditions de ressources limitées, où l'infrastructure de laboratoire, les installations et la disponibilité des réactifs sont restreintes, le temps de saignement est un test de dépistage d'un bon rapport coût-efficacité pour identifier la mW sévère chez les patients ayant des antécédents hémorragiques/familiaux importants. Les cas potentiels doivent de préférence être identifiés à l'aide d'un BAT, tel que celui de l'ISTH. Il est important de noter que le TS ne doit être utilisé que chez les patients suspectés d'avoir des troubles de la coagulation et non comme test de dépistage préopératoire ou pour évaluer la réaction aux médicaments antiplaquettaires. En outre, les cas plus légers de mW peuvent avoir un TS normal et ne pas être détectés.

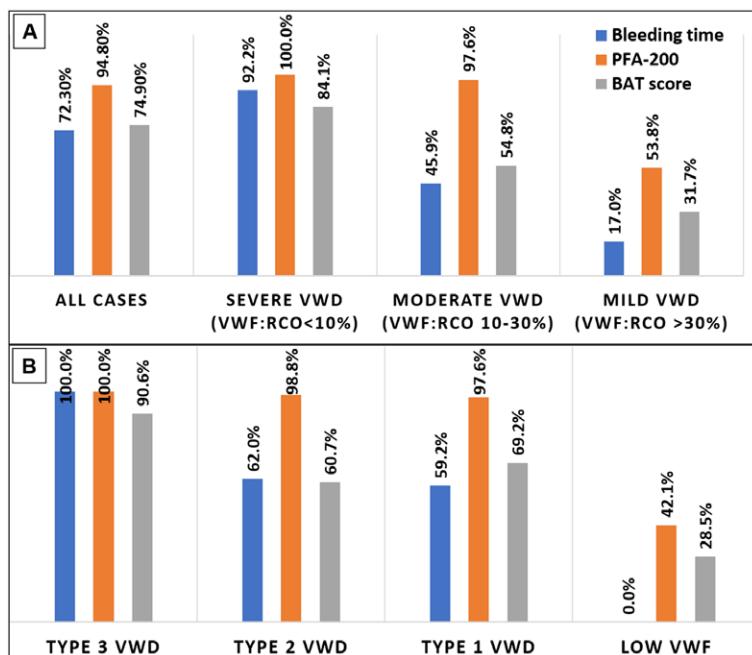


Figure 19. Sensibilité globale du TS et du PFA200

Approche d'un bon rapport coût-efficacité pour effectuer les dosages du FW : l'un des principaux revers des tests de la mW est que la plupart des kits du commerce sont coûteux et inabordables pour la plupart des laboratoires des PRF et PRITI. Cependant, de nombreux tests (antigène du FW, liaison au collagène et

liaison au facteur VIII notamment) peuvent également être effectués selon des méthodes ELISA internes manuelles qui réduisent considérablement le coût. L'utilisation d'un panel minimaliste comprenant TS, TCA, FVIII, VWF:Ag et VWF:CBA peut identifier la plupart des sous-types de mW (à l'exception du type 2M) et un diagnostic provisoire peut être posé avec une confiance raisonnable. Le diagnostic du type 2M nécessite un dosage de l'activité plaquettaire, tel que le dosage du cofacteur de la ristocétine, et le recours à ce seul panel risquerait de passer à côté du diagnostic.

Le dosage manuel du cofacteur de la ristocétine par agrégométrie est un test très laborieux et très chronophage, présentant le défaut d'un CV élevé et d'une limite de détection très élevée. L'automatisation du VWF:RCO en a nettement amélioré le CV et abaissé la limite de détection. Un autre avantage de l'automatisation est l'utilisation de volumes d'échantillons et de réactifs moins importants (la ristocétine est un réactif coûteux), ce qui réduit le coût par test. Cependant, l'utilisation continue de ce test nécessite suffisamment d'adressages de patients et de demandes de test. Peu d'études ont été publiées sur l'utilisation de méthodes ELISA non commerciales pour le FW:GP1bR et le FW:GP1bM, qui sont par ailleurs des options à explorer. Cela nécessite toutefois une expertise technique, la disponibilité de réactifs et un personnel motivé.

Étant donné que les tests manuels peuvent être sujets à erreurs, il est nécessaire de suivre des mesures de contrôle qualité strictes, telles que l'exécution en double ou en triple dans les analyses ELISA, l'analyse d'échantillons normaux (PNP) et anormaux en parallèle à chaque cycle, et le respect de la procédure d'assurance externe de la qualité pour assurer l'exactitude des résultats.

Récemment, un dispositif basé sur une carte de biologie délocalisée a été développé par l'*Indian Council of Medical Research (ICMR)-National Institute of Immunohematology (NIIH)*, Mumbai, pour le diagnostic de la mW sévère et de l'hémophilie sévère/modérée avec des taux de FVIII et de FW inférieurs à 5 UI/dl. Il s'agit d'un test rapide, d'un bon rapport coût-efficacité pouvant être utilisé dans les zones desservies par des unités mobiles pour un diagnostic provisoire d'hémophilie A sévère/modérée et de mW de type 3. Le dispositif est actuellement en attente d'études de validation avant utilisation sur le marché.

Conclusion : on estime que 80 % des cas de mW proviennent de pays en développement. Dans de nombreux PRF et PRITI, plus de 99 % des cas de maladie de Willebrand ne sont pas identifiés et/ou signalés. Les lignes directrices applicables dans le reste du monde pourraient ne pas être appropriées dans ce contexte en raison du manque de réactifs, de centres de formation et d'infrastructures de laboratoire. La première étape pour améliorer le signalement des cas consiste à accroître la sensibilisation à l'utilisation d'outils simples, allant du BAT pour identifier les patients présentant d'éventuels troubles de la coagulation au dépistage de cas suspects à l'aide de tests facilement disponibles tels que le TS et le TCA. D'autres tests (antigène du FW et/ou CBA) peuvent faire appel à la méthode ELISA, ou les patients peuvent, dans la mesure du possible, être orientés vers un centre tertiaire pour des tests plus spécialisés.

Références

- Appel IM, Griminck B, Geerts J, Stigter R, Cnossen MH, Beishuizen A. Age dependency of coagulation parameters during childhood and puberty. *J Thromb Haemost* 2012; 10(11): 2254-2263.
- Attard C, van der Straaten T, Karlaftis V, Monagle P, Ignjatovic V. Developmental hemostasis: Age-specific differences in the levels of hemostatic proteins. *J Thromb Haemost* 2013; 11(10): 1850-1854.
- Baker P, Plutton S, Gibson C, Gray E, Jennings I, Murphy P, Laffan M. Guidelines on the laboratory aspects of assays used in haemostasis and thrombosis. *Br J Haematol* 2020; 191(3): 347-362.
- Balluet R, Bourguignon A, Geay-Baillat MO, Le Quellec S. [Discrepancies in FVII:C levels depending on the thromboplastin: About a case]. *Ann Biol Clin (Paris)* 2020; 78(2): 198-200.
- Bowyer AE, Goodfellow KJ, Seidel H, Westhofen P, Stufano F, Goodeve A, Kitchen S, Makris M. Evaluation of a semi-automated von Willebrand factor multimer assay, the Hydragel 5 von Willebrand multimer, by two European Centers. *Res Pract Thromb Haemost* 2018; 2(4): 790-799.

Casonato A, Galletta E, Sarolo L, Daidone V. Type 2N von Willebrand disease: Characterization and diagnostic difficulties. *Haemophilia* 2018; 24(1): 134-140.

Casonato A, Pontara E, Zerbinati P, Zucchetto A, Girolami A. The evaluation of factor VIII binding activity of von Willebrand factor by means of an ELISA method: Significance and practical implications. *Am J Clin Pathol* 1998; 109(3): 347-352.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Determination of coagulation factor activities using the one-stage clotting assay, 2nd edition. CLSI standard H48. 2016. <https://clsi.org/standards/products/hematology/documents/h48/>.

Di Felice G, Vidali M, Parisi G, Pezzi S, Di Pede A, Deidda G, D'Agostini M, Carletti M, Ceccarelli S, Porzio O. Reference intervals for coagulation parameters in developmental hemostasis from infancy to adolescence. *Diagnostics (Basel)* 2022; 12(10): 2552.

Durda MA, Wolberg AS, Kerlin BA. State of the art in factor XIII laboratory assessment. *Transfus Apher Sci* 2018; 57(6): 700-704.

Favaloro EJ. Collagen binding assay for von Willebrand factor (VWF:CBA): Detection of von Willebrands disease (VWD), and discrimination of VWD subtypes, depends on collagen source. *Thromb Haemost* 2000; 83(1): 127-135.

Favaloro EJ. Clinical utility of the PFA-100. *Semin Thromb Hemost* 2008; 34(8): 709-733.

Favaloro EJ. Von Willebrand disease: Local diagnosis and management of a globally distributed bleeding disorder. *Semin Thromb Hemost* 2011; 37(5): 440-455.

Favaloro EJ. Utility of the von Willebrand factor collagen binding assay in the diagnosis of von Willebrand disease. *Am J Hematol* 2017; 92(1): 114-118.

Favaloro EJ. The role of the von Willebrand factor collagen-binding assay (VWF:CB) in the diagnosis and treatment of von Willebrand disease (VWD) and way beyond: A comprehensive 36-year history. *Semin Thromb Hemost* 2024; 50(1): 43-80.

Favaloro EJ, Dean E, Arunachalam S. Evaluating performance of contemporary and historical von Willebrand factor (VWF) assays in the laboratory identification of von Willebrand disease (VWD): The Australasian experience. *Semin Thromb Hemost* 2022; 48(6): 711-731.

Favaloro EJ, Pasalic L. Laboratory diagnosis of von Willebrand disease in the age of the new guidelines: Considerations based on geography and resources. *Res Pract Thromb Haemost* 2023; 7(5): 102143.

Federici AB, Bucciarelli P, Castaman G, Mazzucconi MG, Morfini M, Rocino A, Schiavoni M, Peyvandi F, Rodeghiero F, Mannucci PM. The bleeding score predicts clinical outcomes and replacement therapy in adults with von Willebrand disease. *Blood* 2014; 123(26): 4037-4044.

Flood VH, Gill JC, Friedman KD, Christopherson PA, Jacobi PM, Hoffmann RG, Montgomery RR, Haberichter SL. Collagen binding provides a sensitive screen for variant von Willebrand disease. *Clin Chem* 2013; 59(4): 684-691.

Fogarty H, Doherty D, O'Donnell JS. New developments in von Willebrand disease. *Br J Haematol* 2020; 191(3): 329-339.

Fu M, Liu J, Xing J, Dai Y, Ding Y, Dong K, Zhang X, Yuan E. Reference intervals for coagulation parameters in non-pregnant and pregnant women. *Sci Rep* 2022; 12(1): 1519.

James PD, Connell NT, Ameer B, Di Paola J, Eikenboom J, Giraud N et al. ASH ISTH NHF WFH 2021 guidelines on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood Adv* 2021; 5(1): 280-300.

Karimi M, Peyvandi F, Naderi M, Shapiro A. Factor XIII deficiency diagnosis: Challenges and tools. *Int J Lab Hematol* 2018; 40(1): 3-11.

Kohler HP, Ichinose A, Seitz R, Ariens RA, Muszbek L. Diagnosis and classification of factor XIII deficiencies. *J Thromb Haemost* 2011; 9(7): 1404-1406.

Kujovich JL. Coagulopathy in liver disease: A balancing act. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2015; 2015: 243-249.

Laffan MA, Lester W, O'Donnell JS, Will A, Tait RC, Goodeve A, Millar CM, Keeling DM. The diagnosis and management of von Willebrand disease: A United Kingdom Haemophilia Centre Doctors Organization guideline approved by the British Committee for Standards in Haematology. *British J Haematol* 2014; 167(4): 453-465.

Maas C, Renné T. Coagulation factor XII in thrombosis and inflammation. *Blood* 2018; 131(17): 1903-1909.

Mumford AD, Ackroyd S, Alikhan R, Bowles L, Chowdary P, Grainger J, Mainwaring J, Mathias M, O'Connell N. Guideline for the diagnosis and management of the rare coagulation disorders: A United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organization guideline on behalf of the British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol* 2014; 167(3): 304-326.

Nair SC, Viswabandya A, Srivastava A. Diagnosis and management of von Willebrand disease: A developing country perspective. *Semin Thromb Hemost* 2011; 37(5): 587-594.

Nesbitt IM, Goodeve AC, Guiliatt AM, Makris M, Preston FE, Peake IR. Characterisation of type 2N von Willebrand disease using phenotypic and molecular techniques. *Thromb Haemost* 1996; 75(6): 959-964.

Palla R, Peyvandi F, Shapiro AD. Rare bleeding disorders: Diagnosis and treatment. *Blood* 2015; 125(13): 2052-2061.

Platton S, Baker P, Bowyer A, Keenan C, Lawrence C, Lester W, Riddell A, Sutherland M. Guideline for laboratory diagnosis and monitoring of von Willebrand disease: A joint guideline from the United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation and the British Society for Haematology. *Br J Haematol* 2024; 204(5): 1714-1731.

Rodgers SE, Lerda NV, Favaloro EJ, Duncan EM, Casey GJ, Quinn DM, Hertzberg M, Lloyd JV. Identification of von Willebrand disease type 2N (Normandy) in Australia: A cross-laboratory investigation using different methods. *Am J Clin Pathol* 2002; 118(2): 269-276.

Sadler JE, Mannucci PM, Berntorp E, Bochkov N, Boulyjenkov V, Ginsburg D, Meyer D, Peake I, Rodeghiero F, Srivastava A. Impact, diagnosis and treatment of von Willebrand disease. *Thromb Haemost* 2000; 84(2): 160-174.

Salazar E, Long TA, Smock KJ, Wool GD, Rollins-Raval M, Chen D et al. Analysis of College of American Pathologists von Willebrand Factor Proficiency Testing Program. *Semin Thromb Hemost* 2022; 48(6): 690-699.

Seidizadeh O, Peyvandi F, Mannucci PM. Von Willebrand disease type 2N: An update. *J Thromb Haemost* 2021; 19(4): 909-916.

Sevenet PO, Kaczor DA, Depasse F. Factor VII deficiency: From basics to clinical laboratory diagnosis and patient management. *Clin Appl Thromb Hemost* 2017; 23(7): 703-710.

Srivastava A, Rodeghiero F. Epidemiology of von Willebrand disease in developing countries. *Semin Thromb Hemost* 2005; 31(5): 569-576.

Stonebraker JS, Iorio A, Lavin M, Rezende SM, Srivastava A, Pierce GF, Coffin D, Tootoonchian E, Makris M. Reported prevalence of von Willebrand disease worldwide in relation to income classification. *Haemophilia* 2023; 29(4): 975-986.

Toulon P, Berruyer M, Brionne-François M, Grand F, Lasne D, Telion C, Arcizet J, Giacomello R, De Pooter N. Age dependency for coagulation parameters in paediatric populations. Results of a multicentre study aimed at defining the age-specific reference ranges. *Thromb Haemost* 2016; 116(1): 9-16.

Vangenechten I, Mayger K, Smejkal P, Zapletal O, Michiels JJ, Moore GW, Gadisseur A. A comparative analysis of different automated von Willebrand factor glycoprotein Ib-binding activity assays in well typed von willebrand disease patients. *J Thromb Haemost* 2018; 16(7): 1268-1277.

Wakeman L, Munro R, Dorward N, Benton A, Gibb A, Al-Ismail S. New coagulation assays reference ranges for healthy adults using the modern Sysmex CA-1500 Coagulometer. *Blood* 2005; 106(11): 4025.

Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Colesse G, Gourmelin Y. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001; 12(4): 229-236.

Zheng C, Zhang B. Combined deficiency of coagulation factors V and VIII: An update. *Semin Thromb Hemost* 2013; 39(6): 613-620.

Zhao Y, Feng G, Feng L. Effects of pre-analytical storage time, temperature, and freeze-thaw times on coagulation factors activities in citrate-anticoagulated plasma. *Ann Transl Med* 2018; 6(23): 456.

SUJETS ABORDÉS

- ✓ Dosages basés sur le TP (dosage en un temps des facteurs II, V, VII et X)
- ✓ Dosages basés sur le TCA (dosage en un temps du FXI, du FXII, de la PKK ou du KHPM)
- ✓ Facteur XIII : dépistage, activité et antigène

Dosages basés sur le TP (dosage en un temps des facteurs II, V, VII et X) : les déficits en facteurs de coagulation II, V, VII ou X sont des troubles de la coagulation rares (Mumford et al., 2014). Les dosages de l'activité du facteur II, V, VII ou X peuvent être effectués à l'aide d'un dosage en un temps basé sur le TP. Celui-ci compare la capacité des dilutions d'un plasma étalon ou de référence et du plasma d'un patient à corriger le TP d'un plasma totalement déficient en facteur de coagulation à mesurer. Dans le dosage du facteur V par exemple (décris ci-dessous), le plasma est déficient en facteur V mais contient des quantités normales de tous les autres facteurs de coagulation, y compris II, VII, X, et du fibrinogène. Les facteurs de coagulation II, VII et X peuvent être analysés de manière similaire, en remplaçant le plasma déficient en facteur V dans l'exemple donné ci-dessous par le plasma déficient correspondant, et en utilisant un plasma de référence (étalon) avec une concentration connue du facteur à mesurer (Baker et al., 2020).

Réactifs :

- ✓ Plasma déficient en facteur. Il peut s'agir d'un déficit en facteur V congénital ou artificiel (plasma vieilli).
- ✓ Tampon véronal d'Owren.
- ✓ Plasma à tester citraté pauvre en plaquettes.
- ✓ Pour l'étalon, il est préférable d'utiliser un plasma de référence disponible dans le commerce ou, en cas d'indisponibilité, un pool de plasma normal pauvre en plaquettes de 20 personnes donneuses (maintenu à -70 °C au minimum).
- ✓ Plasma de contrôle interne de qualité, disponible dans le commerce ou d'origine locale (CLSI, 2016).
- ✓ Réactif thromboplastine qui doit contenir du chlorure de calcium. Il est recommandé d'utiliser la même thromboplastine que celle utilisée dans le TP, mais une autre thromboplastine peut être utilisée pour le diagnostic de patients inhabituels.

Méthode : décanter suffisamment de réactif thromboplastine dans un tube en verre de 75 × 12 mm. Laisser réchauffer à 37 °C pendant cinq minutes. Si le réactif thromboplastine ne contient pas de calcium, celui-ci doit être ajouté séparément. Décanter suffisamment de CaCl₂ M/40 dans un tube en verre de 75 × 12 mm. Laisser réchauffer à 37 °C pendant cinq minutes. Pour les plasmas à tester (en double), de CQ et de référence, préparer des dilutions dans des tubes en plastique, comme indiqué dans le tableau 32.

Tableau 32. Préparation des dilutions des plasmas à tester, de CQ et de référence pour le dosage en un temps des facteurs II, V, VII et X

Dilution	Plasma (ml)	TSO (ml)
1/5	0,1	0,4
1/10	0,1	0,9
1/20	0,5 (dilution 1/10)	0,5
1/40	0,5 (dilution 1/20)	0,5

Remarque : bien mélanger la dilution 1/10 avant de l'utiliser pour préparer la dilution 1/20. Bien mélanger la dilution 1/20 avant de l'utiliser pour préparer la dilution 1/40. Les dilutions de plasmas doivent être analysées immédiatement après leur préparation. Si la température du laboratoire dépasse 25 °C, il peut être nécessaire de conserver les dilutions sur de la glace fondante avant de procéder à l'analyse.

Tester chaque dilution du plasma de référence (étalon) comme suit :

- ✓ Pipeter 0,1 ml de la dilution 1/10 dans un tube en verre de 75 × 10 mm.
- ✓ Ajouter 0,1 ml de plasma déficient en facteur V.
- ✓ Laisser réchauffer à 37 °C pendant deux minutes.
- ✓ Ajouter 0,2 ml de réactif thromboplastine préchauffé.
- ✓ Déclencher le chronomètre et mélanger.

Remarque : si le réactif thromboplastine ne contient pas de calcium, 0,1 ml de thromboplastine est ajouté au mélange de dilution et de plasma déficient en facteur. Après un délai d'une à deux minutes pour le réchauffement à 37 °C, le mélange est coagulé avec 0,1 ml de calcium préchauffé (à 37 °C).

Noter le temps de coagulation :

- Répéter la dilution 1/10 puis analyser les dilutions 1/20 et 1/40 en double.
- Répéter pour les dilutions du plasma à tester et du CQ. Procéder en double.
- Pour les plasmas à tester censés être normaux, analyser les dilutions 1/10, 1/20 et 1/40. Pour les plasmas à tester dont les taux devraient être réduits, analyser les dilutions 1/5, 1/10 et 1/20.
- Un blanc doit également être analysé comme suit :
 - 0,1 ml de tampon véronal d'Ownen
 - 0,1 ml de plasma déficient en facteur V
 - 0,2 ml de réactif thromboplastine/calcium
- Le temps de coagulation du blanc reflète la qualité du plasma déficient et doit être équivalent à moins de 1 UI/dl (0,01 UI/ml).

Résultats : faire une moyenne de chaque résultat en double. Les temps en double doivent être à moins de 10 % les uns des autres pour être acceptables. Sur du papier logarithmique 3 cycles × 2 cycles, tracer les temps de coagulation des plasmas de référence, à tester et de CQ par rapport à la concentration du facteur V en pourcentage. Une valeur de 100 % est arbitrairement assignée à la dilution 1/10, donc la dilution 1/20 est équivalente à 50 %, 1/40 à 25 % et 1/5 à 200 %. Il est aussi possible de tracer la concentration sur une échelle logarithmique et le temps de coagulation sur une échelle linéaire. La quantité relative de facteur V dans le plasma à tester par rapport au plasma de référence est extrapolée à partir des graphiques. Un exemple est présenté à la section sur les dosages basés sur le TCA. Le temps de coagulation équivalent au test à 100 % (le point où la ligne du test coupe l'activité à 100 %) est lu à partir de la ligne de référence (donc, la concentration de la référence qui pourrait donner ce temps de coagulation particulier). On obtient la concentration du test en pourcentage de la référence. Ce pourcentage est multiplié par la valeur de la concentration du facteur de coagulation dans le plasma de référence (en UI/dl) pour donner la concentration dans le test (en UI/dl).

Remarques : de faibles taux d'activité des facteurs II, V, VII ou X peuvent être relevés chez les patients atteints d'une maladie hépatique (Kujovich et al., 2015). La plage de référence chez l'adulte pour chacun de ces facteurs doit être déterminée en local, mais a souvent une limite inférieure de 50 à 70 UI/dl pour les facteurs V, VII et X. La limite de référence inférieure pour le facteur II est plus élevée (Appel et al., 2012 ; Wakeman et al., 2005). L'activité du facteur VII peut augmenter pendant la grossesse (Fu et al., 2022). Les personnes présentant un taux réduit de facteur V devraient également être soumises à un dosage de l'activité du facteur VIII pour exclure le déficit combiné en facteur V et VIII (Zheng et al., 2013). Les facteurs II, VII et X dépendants de la vitamine K peuvent naturellement être réduits à la naissance, augmentant tout au long de l'enfance pour atteindre les taux adultes. Les plages de référence pédiatriques peuvent être

établies en local ou tirées de la littérature en tenant compte de la variation des réactifs (Toulon et al., 2016 ; Attard et al., 2013 ; Di Felice et al., 2022). Dans certains cas de déficit en facteur VII (FVII Padoue, FVII Nagoya, FVII Tondabayashi/Shinjo), il peut y avoir un écart entre les taux de FVII:C obtenus, en fonction de l'origine de la thromboplastine. Il est donc conseillé de recourir à l'utilisation de thromboplastine humaine compte tenu du fait que les résultats sont plus susceptibles de refléter l'activité *in vivo*. Dans de rares cas, le résultat peut être très faible si de la thromboplastine de lapin est utilisée, mais plus élevé ou normal avec de la thromboplastine humaine ou de cerveau de bœuf. Cela peut expliquer pourquoi certains cas de déficit sévère apparent en facteur VII ne présentent pas de symptômes hémorragiques (Balluet et al., 2020 ; Sevenet et al., 2017).

Dosages basés sur le TCA (dosage en un temps du FXI, du FXII, de la PKK ou du KHPM) : le déficit en facteur XI est un trouble rare de la coagulation (Mumford et al., 2014), alors que les déficits en facteurs de contact FXII, PKK et KHPM ne sont pas associés à des saignements (Maas et al., 2018), mais provoquent un TCA significativement allongé. Le test de coagulation en un temps basé sur le TCA pour le facteur XI est décrit dans cette section. Celui-ci s'appuie sur la comparaison de la capacité des dilutions d'un plasma de référence et du plasma d'un patient à corriger le TCA d'un plasma totalement déficient en facteur XI, mais contenant tous les autres facteurs nécessaires à une coagulation normale. Pour le facteur XII, la PKK et le KHPM, le dosage est essentiellement le même que celui du facteur XI en un temps, en remplaçant le plasma déficient en facteur XI par un plasma déficient dans le facteur que l'on veut doser et en sélectionnant le plasma de référence approprié. Le réactif de TCA utilisé pour le dosage de la PKK ne peut pas utiliser l'acide ellagique comme activateur.

Réactifs :

- ✓ Plasma à tester citraté pauvre en plaquettes.
- ✓ Plasma étalon (de référence).
- ✓ Le plasma étalon (de référence) utilisé doit être soit un pool de plasma préparé en local et conservé à une température de -40 °C au minimum, soit un plasma du commerce. Dans un cas comme dans l'autre, ce plasma doit être calibré par rapport à l'étalon de référence international pour le facteur IX dans le plasma. Il n'est pas acceptable de présumer qu'un plasma normal poolé contient 100 UI/dl de facteur XI.

Plasma de contrôle interne de qualité (Baker et al., 2020) :

- ✓ Plasma déficient en facteur XI.
- ✓ Ce type de plasma est disponible dans le commerce ou peut être recueilli auprès d'une personne donneuse présentant un déficit sévère dans les conditions suivantes :
- ✓ Le taux de facteur XI est inférieur à 1 UI/dl, aucun antécédent d'anticorps anti-FXI, aucun traitement n'a été reçu pendant deux semaines, plus tests de la fonction hépatique normaux.
- ✓ Une fonction hépatique anormale pourrait entraîner une réduction des autres facteurs de coagulation, ce qui nuit à la spécificité du dosage. Ce plasma peut être conservé en aliquotes à -20 °C au minimum pendant environ trois mois (Zhao et al., 2018 ; Woodhams et al., 2001).
- ✓ Il est préférable d'utiliser du plasma déficient en facteur XI produit par immunodéplétion du facteur XI d'un plasma normal au moyen d'un anticorps monoclonal. Ce type de produit est disponible dans le commerce et présente l'avantage d'améliorer la sécurité virologique par rapport au plasma provenant de patients traités avec des produits issus du plasma.
- ✓ Toutefois, tous les plasmas immunodéplétés n'ont pas < 1 UI/dl de facteur et il faut prendre soin de le vérifier avant utilisation.
- ✓ Réactif pour la détermination du TCA sensible aux déficits en facteurs (CLSI, 2016). À noter que les réactifs du TCA qui sont activés par l'acide ellagique sont insensibles au déficit en prékallicréine.
- ✓ Solution tampon saline d'Owren (TSO ou glyoxaline).
- ✓ CaCl₂ 25 mM (à noter que le CaCl₂ Werfen fourni avec Synthasil est à 20 mM)

Méthode :

- ✓ Pour les facteurs XI et XII et le KHPM : Préparer dans des tubes en plastique des dilutions 1/10 des plasmas de référence, de CQ et du patient dans une solution tampon saline. (Commencer par une dilution 1/5 s'il est prévu que le plasma du patient aura une très faible teneur en facteur.) En utilisant des volumes de 0,2 ml, dans des tubes en plastique, préparer dans de la solution TSO des dilutions géométriques de plasma de référence, de CQ et à tester allant de 1/10 à 1/40. (Bien mélanger chaque dilution avant de faire le transfert vers le tube suivant.) Les dilutions de plasmas doivent être analysées immédiatement après leur préparation. Si la température du laboratoire dépasse 25 °C, il peut être nécessaire de conserver les dilutions sur de la glace fondante avant de procéder à l'analyse.
- ✓ Pour la prékallicréine uniquement, des dilutions plus élevées de 1/100, 1/200 et 1/400 sont généralement requises. Analyser d'abord le plasma de référence. Pipeter 0,1 ml de chaque dilution du plasma de référence dans un tube en verre de 75 × 10 mm. Ajouter 0,1 ml de plasma déficient en facteur XI, mélanger et transférer dans un bain-marie à 37 °C. Ajouter 0,1 ml de réactif de TCA, mélanger et incuber pendant deux à cinq minutes en fonction du temps d'incubation recommandé pour le réactif. À la fin du temps d'incubation, ajouter 0,1 ml de CaCl₂, mélanger en retournant le tube jusqu'à ce qu'un caillot soit visible. Noter le temps de coagulation. Répéter les étapes 4 à 7 en utilisant le CQ, puis le plasma du patient. Un blanc doit aussi être préparé en utilisant 0,1 ml de TSO à la place du plasma à tester. Le temps de coagulation du blanc doit être supérieur au temps correspondant à un taux de 1 % d'activité en facteur XI de l'étalement selon le graphique de l'étalement. Si le temps obtenu lui est inférieur, ceci indique que le plasma déficient n'est pas entièrement déficient en facteur XI et par conséquent ne convient pas.

Résultats : le tracé des résultats est identique à celui des dosages basés sur le TP (décris ci-dessus), nécessitant du papier log/log ou du papier log/linéaire. Pour les facteurs XI et XII et le KHPM, une valeur de 100 % est arbitrairement assignée à la dilution 1/10, une valeur de 50 % à la dilution 1/20 et une valeur de 25 % à celle de 1/40. La dilution 1/5, si elle est utilisée, a une valeur de 200 %. Pour la PKK, une valeur de 100 % est arbitrairement assignée à la dilution 1/100, une valeur de 50 % à la dilution 1/200 et une valeur de 200 % à celle de 1/400. La dilution 1/50, si elle est utilisée, a une valeur de 200 %. On doit obtenir des lignes droites, parallèles entre elles. Lire la concentration du CQ et de l'échantillon à tester comme pour les dosages basés sur le TP (décris ci-dessus). Dans cet exemple, la concentration en facteur XI dans l'échantillon à tester est de 7 % de celle de l'étalement. Si l'étalement a une concentration de 85 UI/dl, le calcul est de 85 UI/dl × 7 % = l'échantillon à tester a une concentration de 6 UI/dl. Si les droites ne sont pas parallèles, le dosage doit être répété. Vérifier les temps de coagulation de l'échantillon à tester. S'ils sont très longs, analyser une dilution 1/5 (ou 1/50 pour la PKK). Des droites non parallèles peuvent résulter d'erreurs techniques. Si l'erreur technique est exclue, il est possible que ces droites soient dues à la présence d'un inhibiteur qui peut agir spécifiquement contre le facteur XI, ou qui peut être de « type lupique », donnant une image convergente. Des droites divergentes sont typiques d'un échantillon activé (Baker et al., 2020).

Remarques : les déficits en facteur XII, PKK ou KHPM ne sont pas associés à un augmentation du risque hémorragique. Les réactifs du TCA activés par l'acide ellagique sont insensibles au déficit en prékallicréine. Si la concentration en facteur XI ou XII, en PKK ou en KHPM dans le plasma à tester est proche de zéro (c'est-à-dire que les temps de coagulation de toutes les dilutions sont semblables au blanc), des droites non parallèles peuvent être obtenues. La plage de référence normale doit être établie localement, mais a souvent une limite inférieure comprise entre 50 et 70 UI/dl pour chacun de ces facteurs. Des unités internationales ont maintenant été établies pour les facteurs XI et XII dans le plasma, mais il n'est pas prévu d'établir des unités internationales pour la PKK ou le KHPM.

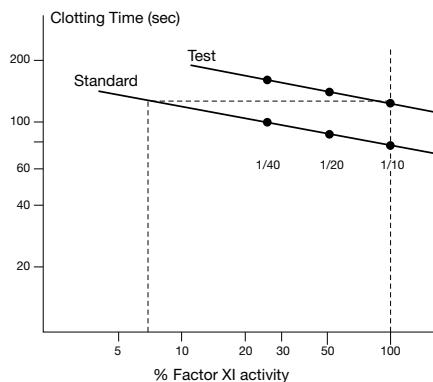


Figure 20. Graphique du dosage du facteur XI

Facteur XIII : dépistage, activité et antigène

Dépistage du facteur XIII (tests de solubilité du caillot) : le facteur XIII est impliqué dans la réticulation des chaînes α et γ de la fibrine. Le déficit en facteur XIII est classé comme un trouble rare de la coagulation et peut être dû à des mutations soit dans les sous-unités catalytiques FXIII-A, soit dans les sous-unités porteuses FXIII-B (Karimi et al., 2018). Les analyses qualitatives de la solubilité du caillot de fibrine ne sont actuellement pas recommandées en raison de l'absence de standardisation et d'une sensibilité médiocre. Il est recommandé de diagnostiquer le déficit en facteur XIII au moyen d'un dosage de l'activité fonctionnelle du facteur XIII plutôt que la solubilité du caillot (Mumford et al., 2014 ; Palla et al., 2015 ; Kohler et al., 2011), mais dans certaines régions du monde, seuls les tests de solubilité du caillot sont disponibles. Ceux contenant de l'urée 5 M sont plus spécifiques que ceux contenant de l'acide acétique, cependant, l'hypofibrinogénémie et la dysfibrinogénémie peuvent donner des résultats faussement positifs dans le test à base d'urée (Dorgalaleh et al., 2016). Les tests de solubilité du caillot contenant de l'acide chloroacétique à 1 % sont plus sensibles et plus rapides que les tests à base d'urée (Dorgalaleh et al., 2016). Il a été suggéré d'effectuer en parallèle les tests à base d'urée et d'acide acétique pour optimiser le diagnostic (Dorgalaleh et al., 2016). Un résultat positif ne sera observé qu'en cas de déficit sévère en facteur XIII, à une activité factorielle < 5-10 UI/dl, en fonction de la méthode utilisée.

Méthode : la thrombine et le calcium sont nécessaires pour activer le facteur XIII de manière à ce qu'il réticule la fibrine sous une forme stable. Dans cette méthode, malgré l'utilisation de plasma citraté, suffisamment d'ions calcium sont encore disponibles pour l'activation du facteur XIII. Un plasma normal anticoagulé à l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) est utilisé comme témoin. Dans ce plasma, l'EDTA entraîne une chélation complète des ions calcium, ce qui signifie que le facteur XIII n'est pas capable de réticuler la fibrine. L'ajout d'acide acétique 2 % ou d'urée 5 M entraîne la lyse des caillots non réticulés, alors que le plasma citraté avec > 10 U/dl d'activité du FXIII présente un caillot insoluble. Le test est généralement plus sensible avec de l'acide acétique (plutôt que de l'urée), car le caillot se dissoudra à des taux plus élevés de facteur XIII en présence d'acide acétique (Jennings et al., 2003).

Matériel et réactifs :

- ✓ Tubes en verre de 75 × 10 mm
- ✓ Solution saline 0,9 %
- ✓ Thrombine 30 U/ml
- ✓ Plasma EDTA normal
- ✓ Acide acétique 2 %

Méthode : ajouter 0,2 ml de plasma à tester citraté à 0,2 ml de solution saline 0,9 % dans un tube en verre. Pour un contrôle positif, répéter l'opération avec 0,2 ml de plasma EDTA. Pour un contrôle négatif, répéter avec 0,2 ml de plasma normal citraté. Ajouter 0,1 ml de thrombine 30 U/ml, mélanger. Laisser

30 minutes à 37 °C. Agiter les tubes pour détacher les caillots des parois. Ajouter 5 ml d'acide acétique 2 % et boucher le tube. Laisser à température ambiante pendant 12 heures.

Résultats : le plasma EDTA ne doit pas présenter de caillot visible. Il doit y avoir un caillot intact visible dans le plasma citraté normal. Si le caillot n'est pas visible, le sujet présente un déficit en facteur XIII.

Plage normale : chez les sujets normaux, un caillot est visible après 12 heures dans de l'acide acétique 2 %.

Remarques : l'urée 5 M peut être utilisée à la place de l'acide acétique 2 %. Le temps d'incubation pour la dissolution du caillot est alors de 18 heures. Cette méthode est moins sensible mais plus spécifique que l'acide acétique (décris ci-dessus). La coagulation avec du calcium et la lyse avec de l'urée ne produisent des résultats anormaux que lorsque les taux de facteur XIII sont inférieurs à 5 U/dl. Par comparaison, la coagulation avec de la thrombine 30 U/ml suivie d'une lyse avec de l'acide acétique 2 % produit des résultats anormaux à des taux inférieurs à 10 U/dl (Jennings et al., 2003). Les patients dont le taux de facteur XIII est supérieur à 5 U/dl peuvent parfois présenter des saignements (voir Bolton-Maggs et al., 2004 pour une revue de la littérature). Les patients atteints d'hypofibrinogénémie ou d'afibrinogénémie doivent être exclus de ces tests.

Dosage de l'activité du facteur XIII : le facteur XIII est impliqué dans la réticulation des chaînes α et γ de la fibrine. Le déficit en facteur XIII est classé comme un trouble rare de la coagulation et peut être dû à des mutations soit dans les sous-unités catalytiques FXIII-A, soit dans les sous-unités porteuses FXIII-B (Karimi et al., 2014 ; Mumford et al., 2014). Les méthodes actuellement disponibles pour les diagnostics cliniques de déficit en facteur XIII en laboratoire comprennent les dosages de solubilité du caillot, les dosages quantitatifs de l'activité du facteur XIIIa, les dosages de l'antigène du facteur XIII spécifiques au complexe FXIII-A₂B₂, à FXIII-A₂ ou à FXIII-B₂, et les tests génétiques (Palla et al., 2015). Il est recommandé de diagnostiquer le déficit en facteur XIII au moyen d'un dosage de l'activité fonctionnelle du facteur XIII plutôt que la solubilité du caillot (Mumford et al., 2014 ; Palla et al., 2011 ; Kohler et al., 2016). La plupart des dosages de l'activité du facteur XIII ne sont sensibles qu'aux déficits de la sous-unité FXIII-A. Tapisser de fibrinogène les puits d'une microplaqué. Des liaisons non spécifiques sont évitées par l'utilisation d'un agent bloquant spécial. Le facteur XIII présent dans l'échantillon est activé par la thrombine en présence d'ions calcium. Lors de l'étape d'incorporation, en présence de calcium, le facteur XIIIa dans le plasma du patient lie le substrat, la 5-biotinamidopentylamine (BAPA), au fibrinogène du substrat du facteur XIII qui tapisse la plaque. La quantité de BAPA liée est proportionnelle à l'activité du facteur XIII de l'échantillon du patient. À l'étape suivante, de la streptavidine conjuguée à de la phosphatase alcaline est ajoutée. Le conjugué se lie au BAPA immobilisé sur le fibrinogène. La phosphatase alcaline convertit le substrat synthétique de para-nitrophénylphosphate (pNPP) en phosphate et p-nitrophénol, qui peuvent être mesurés à 405 nm. Les réactifs pour la méthode décrite ci-dessous sont disponibles dans le commerce sous forme de trousse (dosage d'incorporation du facteur XIII Pefakit, Pentapharm, Suisse). À noter que d'autres dosages de l'activité sont disponibles auprès d'autres fabricants, notamment la trousse Berichrom FXIII (Siemens, Marbourg, Allemagne) qui repose sur le principe de la libération d'ammoniaque, et le dosage fluorogénique Technoflur (Technoclone, Vienne, Autriche).

Réactifs : tous les réactifs requis sont contenus dans la trousse disponible dans le commerce.

Méthode :

Jour 1

- ✓ Laisser les composants de la trousse atteindre la température ambiante pendant 30 minutes.
- ✓ Reconstituer le réactif de coating (R2) dans de l'eau distillée, selon le volume recommandé par le fabricant.
- ✓ Ajouter 100 μ l de réactif de coating dans les puits vides de la microplaqué.

- ✓ Congeler tout surplus de réactif de coating pour usage ultérieur. Il reste stable pendant six mois à -20 °C.
- ✓ Obturer les puits utilisés avec des feuilles plastiques adhésives fournies et incuber pendant la nuit (14 à 16 heures) à une température de 20 à 25 °C.

Jour 2

- ✓ Diluer 50 ml de TBS R1 (solution saline tamponnée Tris) concentrée 20× dans 950 ml d'eau distillée ou volume moindre, au besoin.
- ✓ Diluer 3 ml de réactif bloquant R3 dans 27 ml de TBS R1 dilué. Congeler l'excédent de R3.
- ✓ Jeter le réactif de coating de la microplaqué, retourner la microplaqué et la tapoter sur du papier absorbant pour éliminer les résidus.
- ✓ Ajouter 300 µl de réactif bloquant dilué dans chaque puits.
- ✓ Incuber pendant 60 à 90 minutes à 37 °C dans un incubateur.
- ✓ Reconstituer le R10 d'étalonnage dans 0,5 ml d'eau distillée et les trois contrôles, R11, R12 et R13, dans 0,2 ml d'eau distillée.
- ✓ Décongeler les plasmas à tester congelés pendant cinq minutes à 37 °C avant l'analyse.
- ✓ Préparer un mélange de quelques centaines de millilitres d'eau et de glace afin de faire un bain de glace fondante.
- ✓ Préparer des dilutions de tous les plasmas à tester et de contrôle, 10 µl de plasma et 1 ml de TBS R1 dilué (dilution 1/101). Agiter-mélanger (vortex).
- ✓ Préparer les dilutions suivantes pour l'étalon :

Étalon 1 : 30 µl R10 + 970 µl TBS R1

Étalon 2 : 20 µl R10 + 980 µl TBS R1

Étalon 3 : 75 µl R10 + 25 µl TBS R1

Étalon 4 : 25 µl R10 + 75 µl TBS R1

Étalon 5 : 10 µl R10 + 90 µl TBS R1

Remarque : les dilutions 1 et 2 sont prêtes à l'emploi. Diluer ensuite 10 µl des dilutions 3 à 5 dans 1 ml de TBS R1. Laver la microplaqué trois fois avec 300 µl/puits de TBS R1. Retourner et tapoter sur du papier absorbant pour éliminer l'excès de liquide. Reconstituer la partie A (R4) et la partie B (R5) du réactif activateur dans 5 ml d'eau distillée chacun. Conserver dans le bain de glace pendant 30 minutes maximum. Ajouter 25 µl de plasma étalon, de contrôle ou à tester dans les puits appropriés. Inclure un blanc de TBS R1. Mélanger les parties A et B du réactif activateur (R4 et R5) pour former le réactif d'incorporation final. Ajouter 75 µl du réactif d'incorporation final dans chaque puits, y compris le puits à blanc. Incuber pendant 30 minutes à 37 °C dans l'incubateur. Ajouter 200 µl/puits de solution R6 pour arrêter l'incorporation. Mélanger délicatement pendant 10 minutes sur l'agitateur. Reconstituer le réactif de détection R7 en ajoutant 12 ml d'eau distillée. Congeler le R7 dilué non utilisé. Laver la plaque quatre fois avec 300 µl de TBS par puits. Tapoter pour éliminer l'excès de liquide. Ajouter 100 µl/puits de réactif de détection R7. Incuber pendant 15 minutes à 37 °C dans l'incubateur. Laver la plaque quatre fois avec 300 µl de TBS par puits. Tapoter pour éliminer l'excès de liquide. Préparer la solution de substrat immédiatement avant de l'utiliser :

- ✓ Pour 96 puits (microplaqué entière), ajouter 9 comprimés R8b à 22,5 ml de tampon diéthanolamine R8a
- ✓ Pour 64 puits (8 barrettes), ajouter 6 comprimés à 15 ml de diéthanolamine
- ✓ Pour 32 puits (4 barrettes), ajouter 3 comprimés à 7,5 ml de diéthanolamine
- ✓ Pour 24 puits (3 barrettes), ajouter 2 comprimés à 5 ml de diéthanolamine

Ajouter 180 µl/puits de la solution de substrat. Incuber pendant 11 minutes à 37 °C dans l'incubateur. Ajouter 50 µl/puits de la solution d'arrêt R9 (NaOH 4 M). Faire la lecture des densités optiques dans les 15 minutes à 405 nm dans un lecteur de microplaques.

Remarque : plusieurs réactifs de la trousse peuvent être congelés pour usage ultérieur, comme décrit précédemment. Cependant, il ne faut pas congeler le substrat, les parties A et B du réactif activateur, les étalons et les contrôles. Des troupes de réactifs contenant les produits qui ne peuvent pas être conservés peuvent être achetées pour être utilisées avec les réactifs partiellement utilisés qui ont été congelés. Ceci réduira le coût par test si les échantillons à tester sont analysés en petits lots.

Calcul des résultats : les dilutions de l'étalon et les valeurs des contrôles sont fournies avec chaque trousse. À l'aide d'un logiciel de traitement de données approprié ou de papier graphique, dessiner une courbe d'étalonnage en traçant la concentration en fonction de la densité optique (DO) des dilutions des étalons après soustraction de la densité optique du blanc. Utiliser une échelle linéaire/linéaire. Soustraire la DO du blanc de la DO des dilutions de l'échantillon à tester/de contrôle et convertir les DO en activité de facteur XIII au moyen de la courbe d'étalonnage. Les résultats du patient peuvent être validés si les valeurs de l'échantillon de contrôle se situent dans la plage acceptable.

Références

- Dorgalaleh A, Tabibian S, Hosseini S, Shamsizadeh M. Guidelines for laboratory diagnosis of factor XIII deficiency. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2016; 27(4): 361-364.
- Dorgalaleh A, Tabibian S, Hosseini MS, Farshi Y, Roshanzamir F, Naderi M, Kazemi A, Zaker F, Aghideh AN, Shamsizadeh M. Diagnosis of factor XIII deficiency. *Hematology* 2016; 21(7): 430-439.
- Jennings I, Kitchen S, Woods TA, Preston FE. Problems relating to the laboratory diagnosis of factor XIII deficiency: A UK NEGAS study. *J Thromb Haemost* 2003; 1(12): 2603-2608.
- Karimi M, Peyvandi F, Naderi M, Shapiro A. Factor XIII deficiency diagnosis: Challenges and tools. *Int J Lab Hematol* 2018; 40(1): 3-11.
- Kohler HP, Ichinose A, Seitz R, Ariens RA, Muszbek L. Diagnosis and classification of factor XIII deficiencies. *J Thromb Haemost* 2011; 9(7): 1404-1406.
- Mumford AD, Ackroyd S, Alikhan R, Bowles L, Chowdary P, Grainger J, Mainwaring J, Mathias M, O'Connell N. Guideline for the diagnosis and management of the rare coagulation disorders: A United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organization guideline on behalf of the British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol* 2014; 167(3): 304-326.
- Palla R, Peyvandi F, Shapiro AD. Rare bleeding disorders: Diagnosis and treatment. *Blood* 2015; 125(13): 2052-2061.

SUJETS ABORDÉS

- ✓ Numération plaquettaire
- ✓ Test de la fonction plaquettaire
- ✓ Test de la fonction plaquettaire par cytométrie en flux

Numération plaquettaire : le sang est mélangé à un diluant qui provoque l'hémolyse des globules rouges. Un hémocytomètre est rempli de liquide pour dilution et les plaquettes sont comptées au microscope, de préférence à l'aide d'un microscope à contraste de phase, si disponible.

Matériel et équipement :

- ✓ Hématimètre mince à fond plat (hémocytomètre à contraste de phase avec quadrillage de Neubauer)
- ✓ Microscope à contraste de phase muni d'un condenseur de phase à distance de travail élevée, si disponible ; sinon, un microscope optique ordinaire
- ✓ Pipette de 20 µl
- ✓ Pipette graduée de 2 ml
- ✓ Tube de 12 × 75 mm
- ✓ Agitateur mécanique

Réactif : liquide pour dilution : oxalate d'ammonium 1 % dans de l'eau distillée. Conserver au réfrigérateur et toujours filtrer juste avant utilisation.

Échantillon : si l'échantillon sanguin provient d'une piqûre au doigt, la ponction doit être propre et le sang doit s'écouler librement. Essuyer la première goutte de sang. Si l'échantillon provient de sang veineux, il doit être prélevé dans une seringue en plastique (ou en verre siliconé) sèche munie d'une aiguille courte de calibre 21 minimum. L'aiguille doit être retirée avant de mettre le sang dans un récipient en plastique contenant l'EDTA. Le sang et l'anticoagulant doivent être mélangés délicatement sans délai afin d'éviter la formation de mousse.

Méthode : pipeter 0,38 ml de liquide pour dilution dans un tube à essai. Remplir la pipette de 20 µl jusqu'au repère et essuyer l'extérieur de la pipette. Expulser le contenu de la pipette dans le liquide pour dilution et nettoyer la pipette en tirant et expulsant le sang dans le tube à plusieurs reprises. Agiter pendant au moins 10 minutes à la main ou, de préférence, au moyen d'un agitateur mécanique. Remplir l'hémocytomètre, comme décrit ci-dessous. Placer la chambre dans une boîte de Pétri pendant 10 à 20 minutes pour permettre aux plaquettes de se déposer. Poser un morceau de coton ou de papier filtre humide au fond du récipient afin d'éviter l'évaporation. Au microscope, compter les plaquettes dans les grands carrés de 1 mm (= 0,1 µl). Compter les plaquettes dans autant de carrés qu'il faut pour en compter au moins 100. Les plaquettes ont une apparence ronde ou ovale et leur structure granulaire interne et leur lustre violacé permettent de les distinguer des débris. Des images parasites des globules rouges qui ont été lysés par l'oxalate d'ammonium peuvent être aperçues en arrière-plan. Si le contraste de phase n'est pas disponible, un microscope optique ordinaire peut être utilisé, à condition que le condenseur soit baissé pour obtenir une lumière de faible intensité. Calculer le nombre de plaquettes par litre de sang selon la formule ci-dessous.

Hémocytomètre : la chambre de comptage de l'hémocytomètre, avec quadrillage Neubauer ou Neubauer amélioré, est construite de sorte que la distance entre la paroi inférieure du couvre-objet et la surface de la chambre soit de 0,1 mm. La surface de la chambre contient deux aires spécialement quadrillées avec les dimensions indiquées à la figure 21. L'aire de 1 mm² au centre comporte des frontières doubles ou triples. La partie centrale contient 25 carrés dans le quadrillage Neubauer amélioré et 16 carrés dans le quadrillage Neubauer. Chaque carré a une aire de 0,04 mm² (0,2 × 0,2 mm). Ces carrés sont, à leur tour, divisés en plus petits carrés mesurant chacun 0,0025 mm² (0,05 × 0,05 mm). Les quadrants à l'extérieur de la partie quadrillée sont chacun de 1 mm² et sont divisés en 16 carrés.

Calculs

La formule servant à calculer la numération cellulaire est la suivante :

$$\text{Numération (cellules/l)} = N \times D/A \times 10 \times 10^6$$

Où N = nombre total des cellules comptées

D = dilution

A = aire totale comptée (en mm²)

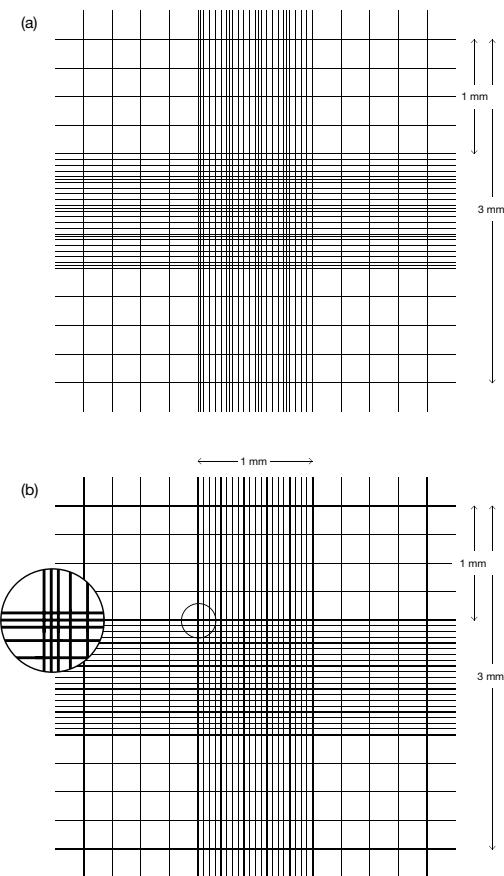
10 = facteur servant à calculer le volume en µl à partir de l'air (en mm²) et la profondeur de la chambre (0,1 mm)

10⁶ = acteur de conversion de numération/µl à numération/l

Sources d'erreur dans la numération cellulaire : lorsque du sang capillaire est utilisé, une goutte coulant librement doit être obtenue. Lorsque du sang anticoagulé est utilisé, le spécimen doit être mélangé avec soin en inversant le tube de sang au moins 20 fois avant d'en prélever un échantillon. Ne pas agiter le tube, car cela crée de la mousse, ce qui nuit à la précision du pipetage. Incliner le tube bien mélangé à un angle de 45° ou un peu plus et pipeter du rebord du tube, en suivant la même procédure que celle utilisée pour le sang capillaire. Les pipettes pour échantillons sanguins doivent être propres et sèches. La pipette doit être remplie rapidement et le sang prélevé de façon précise en utilisant un dispositif d'aspiration fixé à la pipette, la remplissant jusqu'au repère souhaité. Si la ligne est légèrement dépassée, l'excédent de sang peut être expulsé en touchant le bout de la pipette avec un morceau de papier filtre ou un mouchoir. Si la ligne est dépassée, une nouvelle pipette doit être utilisée. Aucune bulle d'air ne doit être présente dans la colonne de sang. Tout sang se trouvant sur l'extérieur de la pipette doit être essuyé (en prenant soin de ne pas extraire de sang du bout de la pipette) avant de l'introduire dans le liquide pour dilution. Une fois le contenu de la pipette versé dans le diluant, le liquide pour dilution doit ensuite être aspiré de façon régulière dans la pipette et ce à plusieurs reprises, afin d'assurer que tout le sang est expulsé dans le liquide. Le tube qui contient le sang dilué doit être agité doucement pendant au moins deux minutes à la main ou, de préférence, au moyen d'un agitateur mécanique. Une fois le tube agité, la chambre est remplie immédiatement au moyen d'une pipette Pasteur ou d'un tube capillaire. La chambre est remplie par capillarité, avec l'écoulement du liquide de la pipette ou du capillaire réglé de sorte qu'il remplisse la chambre de manière régulière et rapide. Elle doit être remplie complètement, mais le liquide ne doit pas déborder jusqu'aux cavités. Laisser les cellules se déposer dans l'aire de la numération pendant 10 à 20 minutes et procéder au dénombrement. La chambre de l'hémocytomètre et le couvre-objet doivent être propres et secs avant d'être utilisés. Des empreintes digitales ou un film huileux peuvent causer des erreurs importantes. Un nombre suffisant de cellules doit être compté pour réduire l'erreur due à la distribution aléatoire des cellules. En pratique, au moins 100 cellules doivent être comptées. En guise de vérification additionnelle concernant la distribution correcte des cellules dans la chambre, le nombre de cellules comptées dans chaque aire (p. ex. dans les grands carrés) ne devrait pas différer de plus de 10 %.

Contrôles : deux dilutions doivent être effectuées et la moyenne des deux dénombrements doit être calculée ; les deux dénombrements ne doivent pas différer de plus de 10 %.

Sources d'erreur dans la numération plaquettaire : le sang obtenu par ponction veineuse est préférable au sang capillaire, puisque les plaquettes adhèrent à la blessure et les dilutions successives obtenues d'une piqûre au doigt ne sont pas toujours reproductibles. Les erreurs générales du pipetage et de l'hémocytométrie sont décrites ci-dessus. De plus, une attention particulière doit être portée pour garantir la propreté irréprochable de la chambre de comptage, car des saletés et des débris peuvent être comptés comme des plaquettes. Laver la chambre à l'eau savonneuse, puis la rincer à l'eau distillée, la laisser sécher et l'essuyer avec un chiffon non pelucheux. S'assurer que le couvre-objet est propre avant de l'utiliser. La présence d'amas de plaquettes empêche des numérations fiables. Si l'échantillon contient des amas, un échantillon frais doit être prélevé. Le diluant à base d'oxalate d'ammonium doit être conservé au réfrigérateur et doit être jeté s'il y a des signes de contamination bactérienne. L'échantillon doit être soumis au comptage dans les trois heures suivant le prélèvement.



10.2 Test de la fonction plaquettaire

10.3 Rétraction du caillot

10.4 Measurement of Platelet Aggregation

Figure 21. Chambre de comptage de l'hémocytomètre (a) Neubauer et (b) Neubauer amélioré

Test de la fonction plaquettaire : le rôle principal des plaquettes est de contribuer à l'hémostase par la formation d'un bouchon plaquettaire au niveau des sites de lésion vasculaire. Lorsque le vaisseau sanguin est lésé et que les microfibrilles sous-endothéliales et les fibres de collagène sont exposées, les plaquettes se lient à la paroi du vaisseau, un processus appelé « adhésion plaquettaire ». En présence de forces de cisaillement élevées sur le site de lésion vasculaire, les plaquettes se lient indirectement aux vaisseaux à l'aide de multimères du FW de haut poids moléculaire. Le FW se lie au collagène exposé par l'intermédiaire de son domaine A3 et les plaquettes se lient au FW lié au collagène par l'intermédiaire de son récepteur GPIba. Les plaquettes peuvent en outre directement adhérer au collagène dans le sous-endothélium avec

les récepteurs glycoprotéine VI (GPVI) et intégrine $\alpha 2\beta 1$. Une fois que les plaquettes adhèrent à la paroi du vaisseau, elles subissent une série de changements : grâce à la réorganisation du cytosquelette plaquettaire, elles passent de petites structures en forme de disque à des sphères spiculées avec le développement des filopodes. Les phospholipides procoagulants anioniques, la phosphatidylsérine essentiellement, sont transloqués de l'autre côté de la membrane (« flip-flop ») à la surface externe des plaquettes, ce qui constitue une bonne plateforme pour la génération de thrombine. Les plaquettes libèrent le contenu des granules alpha (fibrinogène, FV, FW et facteurs de croissance entre autres) et des granules denses (ADP, ATP, calcium, sérotonine, etc.). Cela provoque une activation plaquettaire supplémentaire. La formation de thromboxane A₂ (TXA₂) se produit à partir de l'acide arachidonique via la phospholipase A2, la cyclo-ox-ygénase-1 (COX-1) et la TXA₂ synthase. Les agonistes plaquettaires (ADP, TXA₂ et thrombine) se lient à des récepteurs membranaires spécifiques et initient l'agrégation plaquettaire par activation du récepteur de l'intégrine, $\alpha 2\beta 3$ (GPIIb-IIIa), qui se lie au fibrinogène et/ou au FW pour former le bouchon plaquettaire. Les anomalies dans l'une de ces voies provoquant l'adhésion, l'activation, la dégranulation et l'agrégation plaquettaires peuvent provoquer une anomalie des plaquettes. Les dysfonctions plaquettaires comprennent à la fois des anomalies quantitatives (thrombocytopénie) ou qualitatives et peuvent être héréditaires ou acquises. Les symptômes hémorragiques sont principalement cutanéomuqueux, comme les ecchymoses, le saignements des gencives, la tendance aux ecchymoses, la ménorragie, l'hémorragie post-partum et les saignements gastro-intestinaux (méléna, hématémèse ou hématochécie). Ils peuvent être légers ou sévères en fonction de l'anomalie. Une liste des dysfonctions plaquettaires héréditaires avec les principales caractéristiques cliniques et biologiques qui y sont associées est présentée dans le tableau 33. La prévalence réelle des dysfonctions plaquettaires n'est pas connue. On pense qu'elles sont plus fréquentes qu'auparavant en raison du sous-diagnostic. Dans les régions du monde où la consanguinité est courante, les troubles autosomiques récessifs comme la thrombasthénie de Glanzmann et le syndrome de Bernard-Soulier ont une prévalence plus élevée. Alors que le diagnostic de la thrombasthénie de Glanzmann et du syndrome de Bernard-Soulier est relativement aisé en raison du motif typique de l'agrégométrie, le diagnostic de la plupart des autres dysfonctions plaquettaires héréditaires est lourd et nécessite des tests complexes. En cas de suspicion de dysfonctions plaquettaires héréditaires, il est important de recueillir des antécédents cliniques détaillés, y compris les antécédents personnels et familiaux. Le recours à un BAT validé comme celui de l'ISTH est fortement encouragé. Les antécédents doivent par ailleurs inclure les antécédents médicamenteux, la prise alimentaire récente pouvant éventuellement interférer avec la fonction plaquettaire et la présence d'autres caractéristiques (p. ex. eczéma, infections récurrentes, cas familiaux de myélodysplasie, LAM) et de caractéristiques syndromiques potentielles (perte auditive, malformations cardiaques, dysmorphisme facial ou osseux, albinisme, etc.) pouvant contribuer au diagnostic. Il convient que les examens de laboratoire préliminaires comprennent la numération formule sanguine, dont la numération plaquettaire, l'examen d'un film sanguin pour rechercher la morphologie des plaquettes et d'autres caractéristiques des cellules sanguines (voir ci-dessous), la détermination du temps de saignement (décris à la section 11), les bilans d'hémostase secondaire (TP et TCA) et le dosage du fibrinogène pour exclure d'autres troubles de la coagulation. Il est recommandé d'effectuer des tests de dépistage de la mW (c'est-à-dire activité et antigène du FW) soit simultanément, soit avant un bilan plus approfondi des dysfonctions plaquettaires. Une mW, une mW de type 2B et une mW de type plaquettaire peuvent en outre être présentes avec une macrothrombocytopénie et doivent aussi être envisagées chez les patients dont le nombre de plaquettes est faible. Un autre test simple pouvant donner une indication sur la présence d'une anomalie de la fonction plaquettaire est la méthode de rétraction du caillot, décrite ci-dessous.

Rétraction du caillot : la rétraction du caillot dans le sang total coagulé peut donner une indication du nombre et de la fonction des plaquettes. Lorsque le caillot se rétracte, le sérum est exprimé et le degré de rétraction du caillot peut être mesuré.

Méthode : prélever 1 ml de sang dans un tube à essai en verre (75 × 10 mm) et le placer à 37 °C. Examiner le tube visuellement jusqu'à ce qu'un caillot solide soit présent. Laisser reposer à 37 °C pendant une heure supplémentaire. Mesurer la distance de la base du tube au ménisque. Retirer délicatement le caillot avec un bâtonnet mince en bois (p. ex. un cure-dents), en laissant s'écouler dans le tube le sérum présent dans

le caillot. Mesurer la distance de la base du tube au ménisque du sérum. Diviser la hauteur du ménisque du sérum par la hauteur totale initiale et multiplier par 100 pour obtenir un pourcentage.

Interprétation : normalement, plus de 40 % du sérum est retrouvé. Une diminution de l'extrusion du sérum est observée dans certaines déficiences plaquettaires, notamment dans la thrombasthénie de Glanzmann. Elle peut également être anormale dans les cas de thrombocytopénie sévère, de syndrome de Wiskott-Aldrich et de syndrome de Stormorken.

Remarques : les tubes et le cure-dents en bois doivent absolument être propres afin d'éviter que le caillot n'adhère au tube. Le caillot doit être retiré avec précaution et en douceur pour éviter de le presser et d'augmenter ainsi la libération de sérum.

Numération plaquettaire, morphologie et examen du frottis de sang périphérique : le test initial pour une suspicion de dysfonction plaquettaire doit inclure une numération formule sanguine ainsi qu'une évaluation du frottis de sang périphérique. Cela aide à détecter les anomalies du nombre, de la taille et de la morphologie des plaquettes, ce qui peut fournir des indices importants pour les analyses biologiques ultérieures. La numération plaquettaire peut être effectuée selon une méthode microscopique manuelle, par comptage automatisé dans des analyseurs d'hématologie et par marquage immunologique basé sur la cytométrie en flux. La numération plaquettaire doit être estimée sur le frottis périphérique pour confirmer la numération plaquettaire, en particulier en cas de macrothrombocytopénie ou d'anisocytose plaquettaire. Dans un frottis bien préparé et coloré, le nombre moyen de plaquettes est compté dans 10 champs à immersion dans l'huile (100×). Cette valeur doit être multipliée par 15 000 pour déterminer le nombre de plaquettes/ μ l. Il est important de vérifier le frottis pour évaluer les amas plaquettaires, ainsi que la taille, la morphologie et la granularité des plaquettes. Il convient d'exclure la pseudo-thrombocytopénie due à l'agrégation plaquettaire dépendante de l'EDTA et au satellitisme (rosettes leucoplaquettaires). Il est important de garder à l'esprit que des amas plaquettaires peuvent également être observés dans la mW de type plaquettaire ou de type 2B et ne doivent pas être confondus avec des amas induits par l'EDTA. Dans la mW de type plaquettaire, le frottis peut aussi présenter de grosses plaquettes. Des plaquettes de taille anormale sont souvent caractéristiques de dysfonctions plaquettaires héréditaires (avec ou sans anomalie plaquettaire) comme indiqué ci-après :

- Petites plaquettes : syndrome de Wiskott-Aldrich, thrombocytopénie liée au chromosome X, déficit en ADAP
- Grosses plaquettes ou plaquettes géantes : syndrome de Bernard-Soulier (géantes), syndrome MYH9 (géantes), syndrome des plaquettes grises et syndromes de déficit en granules alpha, mW de type plaquettaire, thrombocytopénie liée à ITGA2B/ITGB3 (variante GT), filaminopathie, thrombocytopénie liée à SLFN14, anomalies de GATA1, syndrome vélocardiofacial
- Plaquettes normales : toutes les dysfonctions restantes

Le volume plaquettaire moyen (VPM) est un paramètre facilement disponible sur les analyseurs d'hématologie de numération plaquettaire reposant sur l'impédance et fournit une estimation de la taille des plaquettes. Les laboratoires doivent établir leurs propres plages de référence, car le VPM peut varier d'un instrument à l'autre. Il est facile de passer à côté des petites plaquettes dans la microscopie optique et un VPM réduit pourrait être un premier indice d'un éventuel syndrome de Wiskott-Aldrich. Divers facteurs peuvent affecter la mesure du VPM et interférer avec la numération plaquettaire basée sur l'impédance, comme les anomalies des globules rouges et des plaquettes. La présence de globules rouges microcytaires et fragmentés peut surestimer le nombre de plaquettes, tandis qu'il est possible de passer à côté de plaquettes grosses et/ou géantes, ce qui entraîne une sous-estimation de leur nombre. Dans ces scénarios, la numération plaquettaire et le VPM ne seront pas fiables. Il est très utile d'examiner simultanément l'histogramme plaquettaire qui peut identifier les anomalies de la taille des plaquettes et les éventuelles interférences/contamination. Dans la macrothrombocytopénie, la numération plaquettaire optique ou fluorescente donne une numération plus proche de la vérité. De grosses plaquettes pâles avec un cytoplasme gris bleuté avec absence ou nombre nettement réduit de granules azurophiles peuvent être

observées dans le syndrome des plaquettes grises en raison d'un déficit en granules alpha. Le syndrome de Paris-Trousseau présente des plaquettes grosses à géantes, certaines d'entre elles montrant des granules alpha agglomérés/fusionnés formant un gros granule aggloméré. L'anisocytose plaquettaire (c'est-à-dire la variation de la taille des plaquettes) et l'anisogranularité (soit la variation de leur granularité) avec la présence de plaquettes vides et pâles est une caractéristique classique de la dysfonction plaquettaire acquise avec éosinophilie (APDE). Cette dysfonction est une diathèse hémorragique transitoire associée à l'éosinophilie, se manifestant fréquemment chez les enfants d'Asie du Sud-Est, qui se résout lors du traitement de l'éosinophilie. Des anomalies morphologiques peuvent également être observées dans d'autres cellules sanguines. Présence d'inclusions de type corps de Döhle dans les neutrophiles dans le syndrome MYH9, de granules cytoplasmiques géants positifs à la peroxydase dans les neutrophiles et/ou d'autres leucocytes dans le syndrome de Chediak-Higashi, de corps de Howell-Jolly dans le syndrome de Stormoken et de dysérythropoïèse dans les mutations GATA-1.

Test de l'agrégation plaquettaire par transmission lumineuse : l'agrégométrie optique (LTA) est la norme pour les tests de la fonction plaquettaire. Elle a été décrite pour la première fois de manière indépendante par O'Brien et Born dans les années 1960. Le principe repose sur les variations de la densité optique du plasma riche en plaquettes (PRP) à mesure que les plaquettes sont activées et forment des agrégats. Le PRP, par rapport au PPP, est trouble en raison des plaquettes en suspension. Après l'ajout d'agonistes au PRP, les plaquettes forment des agrégats et se déposent, clarifiant ainsi le plasma et laissant passer plus de lumière. La variation de la transmission lumineuse est mesurée dans le temps par un agrégomètre et représentée sous forme de graphique. En comparant le schéma d'agrégation par rapport à chaque agoniste, il est possible d'émettre des hypothèses et de diagnostiquer le type de dysfonction plaquettaire. Ont été publiées un certain nombre d'excellentes revues et lignes directrices pour le test de la fonction plaquettaire et le diagnostic des dysfonctions plaquettaires héréditaires.

Précautions à prendre avant d'explorer l'agrégation plaquettaire (variables pré-analytiques) : il convient de collecter les échantillons de sang pour la LTA après une courte période de repos. Les sujets doivent s'abstenir de fumer pendant au moins 30 minutes et de prendre de la caféine au moins deux heures avant l'examen. Il y a lieu de consigner tous les médicaments, y compris les médicaments naturels/à base de plantes pris au cours des 10 derniers jours. Pour une liste des médicaments susceptibles d'interférer avec la fonction plaquettaire, voir les lignes directrices de la *British Society for Haematology* référencées ci-dessous. Les médicaments connus pour inhiber la fonction plaquettaire de manière réversible (AINS notamment) doivent être arrêtés au moins trois jours avant le prélèvement. Les médicaments connus pour inhiber la fonction plaquettaire de manière irréversible (aspirine, thiénopyridines, etc.) doivent être arrêtés au moins 10 jours avant le prélèvement, à moins que leur effet ne soit spécifiquement étudié. Les patients doivent idéalement être à jeun (une nuit de préférence). En l'absence de jeûne, éviter de prélever des échantillons après un repas riche en graisses. De nombreux autres composants alimentaires « normaux », notamment l'alcool, les oignons, l'ail, le poivre et le gingembre, peuvent également inhiber l'agrégation plaquettaire. Cela doit être pris en compte lors de l'évaluation des résultats. Le sang doit être prélevé avec un temps de pose du garrot minimal ou nul à l'aide d'une aiguille de calibre 21 au moins dans un anticoagulant tamponné au citrate de sodium 109 mM ou 129 mM. Les trois ou quatre premiers millilitres de sang prélevés doivent être jetés ou utilisés pour des tests autres que la LTA (p. ex. TP/TCA). Lorsque le prélèvement est difficile, les tubes insuffisamment remplis ne peuvent être utilisés que pour exclure les anomalies sévères de la fonction plaquettaire, tels que la thrombasthénie de Glanzmann ou le syndrome de Bernard-Soulier.

Préparation du plasma riche et pauvre en plaquettes : les échantillons de sang doivent être laissés au « repos » à température ambiante pendant au moins 15 minutes avant la centrifugation. La réfrigération des plaquettes pouvant provoquer une activation, les échantillons doivent toujours être maintenus à température ambiante. Le PRP est préparé par centrifugation à 200 g pendant 10 minutes à température ambiante (~21 °C), sans frein. En présence de très grosses plaquettes, dans le syndrome de Bernard-Soulier notamment, le PRP doit être préparé par sédimentation sanguine pendant 30 minutes. Le PRP est

soigneusement décanté, en évitant toute contamination par des globules rouges ou la couche leucocytaire (l'agrégation sera réduite en présence de l'un ou l'autre), dans un tube en polypropylène bouché maintenu en position verticale à 20-25 °C. Le PPP doit être préparé par centrifugation du sang total ou des tubes de sang dont le PRP a été retiré, à température ambiante à 1500 g pendant 15 minutes. Les échantillons grossièrement hémolysés doivent être rejetés. Si l'échantillon est lipémique, l'indiquer dans le rapport final. Il est nécessaire de vérifier la numération plaquettaire du PRP. Les résultats des examens de LTA pourraient être inexacts lorsque la numération plaquettaire de l'échantillon de PRP est inférieure à $150 \times 10^9/l$. Les échantillons à faible numération plaquettaire doivent être interprétés avec prudence, mais peuvent être analysés pour exclure les dysfonctions plaquettaires sévères, comme la thrombasthénie de Glanzmann, le syndrome de Bernard Soulier, la mW de type 2B et la mW de type plaquettaire. La numération plaquettaire des échantillons de PRP NE doit PAS être ajustée à une valeur normalisée avec le PPP autologue. La numération plaquettaire du PRP d'échantillons provenant de sujets ayant une numération plaquettaire normale ($200-600 \times 10^9/l$) n'affecte pas les résultats des examens de LTA. L'ajustement de la numération plaquettaire dans le PRP à l'aide du PPP autologue dans cette plage peut inhiber la réactivité plaquette. C'est probablement dû au fait que le PPP peut contenir des substances libérées par les plaquettes lors du traumatisme supplémentaire de la centrifugation à vitesse supérieure utilisée dans la préparation du PPP. L'incertitude demeure quant à la meilleure pratique à suivre lorsque la numération plaquettaire dans le PRP dépasse $600 \times 10^9/l$. Pour les numérations excessivement élevées ($> 1000 \times 10^9/l$), il peut être bénéfique d'ajuster la numération plaquettaire à un niveau plus approprié avec le PPP du patient.

Agents agrégants ou agonistes : il existe deux types d'agonistes, les agonistes faibles et les agonistes forts. Les agonistes faibles (par exemple l'ADP et l'épinéphrine) aux concentrations critiques montrent une vague d'agrégation primaire initiale due à l'effet directement induit par les agonistes, suivie d'une vague d'agrégation secondaire provoquée par la libération de granules plaquettaires et la synthèse de TXA₂. Les agonistes forts (thrombine, collagène, TXA₂, etc.) en revanche ne montrent qu'une seule courbe sans distinction entre l'agrégation primaire et secondaire, car ces agonistes induisent directement l'agrégation plaquette, la synthèse de TXA₂ et la libération des granules. Sont illustrées à la figure 22 les différentes phases de l'agrégation plaquette, qui ne se manifestent qu'avec les agonistes faibles.

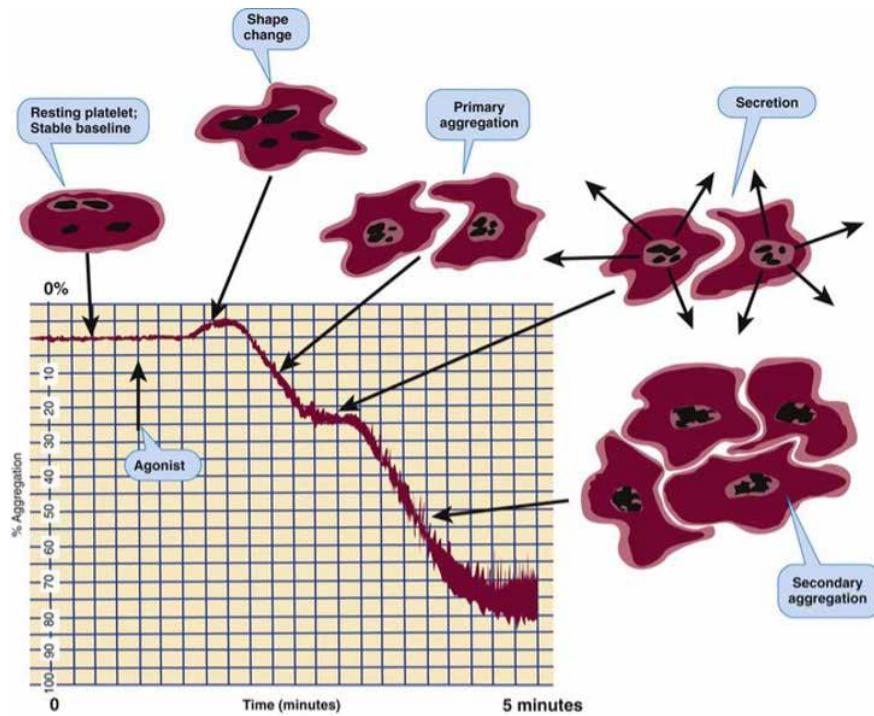


Figure 22. Image d'après Rodak's Hematology: Clinical Principles and Applications, 5^e édition

Tableau 33. Récapitulatif des agonistes recommandés ainsi que des concentrations pouvant être utilisées comme panel initial et panel étendu (d'après les lignes directrices de l'ISTH)

Agoniste	Panel initial et concentration	Panel étendu et concentration
ADP*	2 µM	5 µM, 10 µM
Épinéphrine*	5 µM	10 µM
Collagène (HORM ou type 1 fibrillaire)	2 µg/ml	
Acide arachidonique	1 mM	
Ristocétine (faible dose)	0,5-0,7 mg/ml	
Ristocétine (dose élevée)	1,2-1,5 mg/ml	
Peptide activant le récepteur de la thrombine (TRAP)*, PAR1	-	10 µM
Thromboxane A2 mimétique U46619	-	1 µM

* Il convient d'utiliser des concentrations plus élevées si des résultats anormaux sont observés avec la concentration initiale.

Adénosine-5-diphosphate (ADP) : une solution mère de 1 mM/l de sel disodique est préparée dans du TSO et stockée en petites quantités à -40 °C. Elle est stable pendant au moins trois mois. Une fois décongelée, la solution doit être utilisée dans les trois heures ou jetée. À des fins d'utilisation, d'autres dilutions sont préparées dans le TSO. Le schéma de réponse à l'ADP dépend de sa concentration finale. À 2 µmol/l, des vagues primaires et secondaires clairement définies peuvent être observées : la première représente l'effet direct induit par les agonistes et la seconde est due à la libération d'ADP endogène et à la génération de TXA₂, qui agrège les plaquettes. En dessous de 2 µmol/l, progressivement, de moins en moins de sujets normaux présentent une réponse secondaire, et généralement la vague primaire s'inverse à mesure de la dégradation enzymatique de l'ADP. Au-delà de 3 µmol/l, la phase primaire est habituellement si intense que la distinction d'avec la phase secondaire est masquée. L'ADP induit un changement de forme des plaquettes qui passent d'un disque à une sphère spiculée. Cela provoque initialement une légère hausse de la densité optique de la suspension plaquettaire, ce qui ne peut être observé que si l'agrégation primaire est altérée.

Adrénaline (épinéphrine) : une solution mère de 1 mM/l de sel de bitartrate est préparée dans le TSO. Elle doit être stockée et utilisée comme pour l'ADP. Avec l'adrénaline, les concentrations utilisées et les schémas de réponse sont similaires à ceux de l'ADP. Cependant, en l'absence de vague secondaire, la vague primaire ne s'inverse pas et n'est jamais si intense que la vague secondaire se trouve masquée.

Collagène : une suspension très stable de fibrilles de collagène de tendon équin (1 mg/ml), (Hormon-Chemie, Munich, Allemagne) est largement utilisée. Un certain nombre d'autres réactifs conviennent également. Cette suspension est conservée à 4 °C et doit être bien mélangée avant d'être diluée dans la solution tampon qui l'accompagne dans l'emballage. Elle doit être utilisée à une concentration finale de 0,5-2,0 µg/ml dans le PRP ; les suspensions diluées sont stables pendant une semaine à 4 °C. Il n'y a pas de première vague avec le collagène. La réponse est habituellement définie par le délai entre l'ajonction de l'agoniste et le début de l'agrégation (temps de latence) et par l'intensité de celle-ci. Une légère augmentation de la densité optique causée par le changement de forme précède l'agrégation. Du collagène provenant de plusieurs sources différentes est utilisé. Le type de collagène et l'espèce servant à la préparation (p. ex. équine ou bovine) peuvent avoir une influence importante sur les résultats obtenus. En effet, une gamme de concentrations variant selon un facteur > 100 est nécessaire selon l'origine du matériau. Il est donc important de choisir une source appropriée et d'établir pour ce réactif un intervalle de référence local qui doit être réévalué s'il y a changement de réactif. Voir Jennings *et al.* (2008) pour une revue de la littérature.

Ristocétine : à une concentration finale de ristocétine de 1 mg/ml dans le PRP, la première et la deuxième vague peuvent généralement être observées de manière distincte, mais à une concentration supérieure, l'effet est si intense que les deux vagues convergent. La première vague est une mesure de la quantité de facteur Willebrand présent dans le plasma, tandis que la seconde vague est due à la libération de substances endogènes.

Acide arachidonique : l'arachidonate de sodium (pureté de 99 %) est dissous dans le TSO à une concentration de 10 mM/l. De petites aliquotes sont placées dans des flacons en verre foncé remplis d'azote afin d'empêcher l'oxydation, puis bien bouchés et conservés à une température inférieure à -20 °C. L'agrégation est généralement monophasique et précédée par une courte phase de latence.

Réactifs : quelques exemples de concentrations et de dilutions de réactifs sont présentés ci-dessous.

Remarque : ces concentrations sont valables si une partie de réactif est ajoutée à neuf parties de PRP. Les dilutions peuvent être faites dans de l'eau distillée ou une solution saline, ou conformément aux instructions du fabricant.

✓ ADP (solution mère 1000 µM)

Préparer une dilution 1/10 = 100 µM (soit 0,1 ml solution 1000 µM + 0,9 ml TSO). Préparer à partir de celle-ci deux solutions de travail de concentrations différentes : 20 µM (soit 0,2 ml 100 µM + 0,8 ml TSO), concentration finale dans le PRP de 2-50 µM (soit 0,5 ml 100 µM + 0,5 ml TSO), concentration finale dans le PRP de 5 µM. Dans les cas où l'hyperagrégabilité est à tester, des concentrations plus faibles peuvent être nécessaires (p. ex. 10 µM, 5 µM).

- ✓ Adrénaline (épinéphrine) : diluer comme l'ADP pour obtenir une solution de travail de 50 µM. Cela donnera une concentration finale dans le PRP de 5 µM.
- ✓ Collagène : bien mélanger et diluer dans du TSO/autres diluants : 1/500 (soit 0,1 ml solution mère + 4,9 ml TSO) = 20 µg/ml, concentration finale dans le PRP de 2 µg/ml
- ✓ Ristocétine : celle-ci peut être utilisée avec deux concentrations différentes, selon les résultats obtenus : une dose normale de ristocétine à 15 mg/ml ou 12,5 mg/ml et une faible dose de ristocétine à 7,5 mg/ml ou 5 mg/ml. Cela donnera une concentration finale dans le PRP de 1,5 mg/ml ou 1,25 mg/ml, et une faible dose de ristocétine de 0,75 mg/ml ou 0,5 mg/ml respectivement selon la concentration utilisée.

Méthode/procédure : les examens de LTA doivent être terminées dans les quatre heures suivant le prélèvement sanguin. En raison de la refractarité des plaquettes à l'agrégation après la centrifugation, les échantillons de PRP doivent être laissés à température ambiante pendant au moins 15 minutes avant le test. Le PRP doit être conservé dans des tubes pleins et bien bouchés jusqu'au moment du test. Avant de commencer, porter les réactifs/agonistes à température ambiante. Préparer des dilutions fraîches de réactifs si nécessaire. Mettre l'agrégomètre et l'ordinateur/enregistreur sous tension et attendre que la température de l'agrégomètre atteigne 37 °C. Réglér la vitesse d'agitation sur 1000 tr/min, sauf indication contraire du fabricant de l'agrégomètre. Mettre 450 µl de PRP dans une cuvette en verre qui contient un bras magnétique pour agiter le mélange. Le nombre de cuvettes utilisées dépend du nombre d'agonistes à tester. Préchauffer les cuvettes de PRP dans les puits d'incubation entourant le bloc chauffant pendant deux à cinq minutes. Pipeter 500 µl de PPP dans une autre cuvette en verre sans bras de mélange et placer dans le puits de référence à blanc correspondant. Le PRP et le PPP autologue doivent être utilisés pour régler la transmission de la lumière à 0 % et à 100 % dans l'agrégomètre. Attendre une minute avant d'ajouter l'agoniste. Pipeter 50 µl d'agoniste au fond de la cuvette de PRP sans produire de bulles. Le volume d'agoniste ajouté pour la LTA doit être reproductible et ne doit jamais dépasser 10 % du volume total de l'échantillon. Un échantillon témoin connu doit être analysé parallèlement à l'échantillon du patient. Il convient de surveiller l'agrégation plaquettaire pendant au moins trois minutes après l'ajout

d'un agoniste, et jusqu'à 10 minutes pour les agonistes qui n'atteignent pas l'agrégation maximale d'ici trois à cinq minutes. Répéter la procédure pour chaque agoniste.

Remarques : si une réponse anormale est observée avec le panel initial d'agonistes, un panel étendu supplémentaire (tableau 35) peut être ajouté avec la libération d'ATP par lumi-agrégométrie (voir ci-dessous). Des concentrations plus élevées d'agonistes (par exemple ADP, épinéphrine) doivent être utilisées si une réponse anormale est observée à la concentration initiale. Si aucune réponse d'agrégation n'est observée avec l'acide arachidonique, ajouter l'agoniste, analogue du récepteur du TXA₂ (TRA), U46619. Dans les anomalies de la synthèse du TXA₂ (déficit en COX/TXA₂ synthase) ou sous l'effet de l'aspirine, une réponse normale est observée avec le TRA. En cas d'anomalie du récepteur du TXA₂, des réponses anormales sont observées à la fois avec l'acide arachidonique et le TRA. Une réponse anormale isolée avec l'épinéphrine est observable chez certains sujets sains. Ce peut toutefois être la seule caractéristique du syndrome plaquettaire du Québec dans la LTA. Lors de l'étude de l'agrégation plaquettaire dans le cadre d'une évaluation d'hyperagrégabilité, l'ADP et l'adrénaline sont utilisées à des concentrations plus faibles pour obtenir une courbe dose-réponse. Les concentrations utilisées sont : 2 µM, 1 µM, 0,5 µM et 0,1 µM (concentration finale dans le PRP). Une agrégation spontanée est également réalisée avant de tester les agonistes restants. Une hyperagrégation des plaquettes avec 0,5 mg/ml de ristocétine indique une éventuelle mW de type 2B ou une mW de type plaquettaire. Rechercher une éventuelle agrégation spontanée en surveillant le PRP dans les mêmes conditions d'agitation sur l'agrégomètre, sans ajouter d'agoniste pour stimuler l'agrégation. Réaliser des études de mélange pour différencier les deux sous-types. Cela peut être fait selon deux méthodes. Procédure de base : mélanger des volumes égaux de plasma du patient et des plaquettes normales (soit 225 µl de PPP du patient + 225 µl de PRP de contrôle). Ce mélange est ensuite dosé avec de la ristocétine à 0,5 mg/ml. En cas d'agglutination, cela suggère une mW de type 2B. Une absence d'agglutination peut être due à une mW de type plaquettaire. Il est important de noter qu'une absence de réponse peut également être due à la dilution supplémentaire du PRP.

Procédure alternative : laver les plaquettes du patient et de contrôle à trois reprises avec du PBS-EDTA dans des tubes à centrifugation de 15 ml (faible vitesse de centrifugation pour un culot plaquettaire). Remettre délicatement en suspension les plaquettes du patient dans le plasma normal et les plaquettes normales dans le plasma du patient. Ajuster la numération plaquettaire à 400×10^6 de culot plaquettaire. (À noter que le PBS-EDTA est préparé en ajoutant de l'EDTA disodique 9 mM au PBS et en ajustant le pH à 7,0. Le PBS utilisé contient du NaCl 135 mM, du KCl 2,6 mM, du Na₂HPO₄ 8 mM et du KH₂PO₄ 1,5 mM, avec un pH de 7,4.) Procéder à un nouveau test avec de la ristocétine à 0,5 mg/ml. Les réactions doivent correspondre à l'un des modèles ci-dessous.

Tableau 34. Interprétation de la mW de type 2B et de la mW de type plaquettaire

Tube 1	Plaquettes du patient lavées + PPP té-moin	Pas d'agglutination	Agglutination
Tube 2	Plaquettes lavées témoin + PPP du pa-tient	Agglutination	Pas d'agglutination
	INTERPRÉTATION	mW de type 2B	mW de type plaquettaire

Les lignes directrices de 2021 sur la mW sont en faveur du recours à des tests génétiques ciblés pour le diagnostic de la mW de type 2B et de type plaquettaire. Cela peut toutefois ne pas être possible pour de nombreux laboratoires en raison de contraintes de coûts. L'étude de mélange RIPA est maintenue comme l'un des tests de l'algorithme de diagnostic selon l'ISTH.

Interprétation et communication des résultats : le tracé de l'agrégation plaquettaire doit être évalué en fonction de la présence d'un changement de forme, de la durée de la phase de latence (certains agonistes comme le collagène peuvent avoir une phase de latence plus longue), de l'agrégation maximale (méthode la plus pratique et la plus couramment utilisée pour communiquer les résultats), de la pente de l'agrégation (indique le taux d'agrégation), de l'examen visuel des tracés de l'agrégation (c'est-à-dire la désagrégation, la présence d'une vague secondaire, particulièrement distincte pour l'épinéphrine et les

faibles doses d'ADP). La désagrégation avec l'ADP est particulièrement frappante dans les anomalies de P2Y12 héréditaires. Du PRP préparé de la même manière issu d'une personne donneuse normale saine doit être traité et analysé en même temps que celui du patient comme moyen de vérification des réactifs. Cela est particulièrement important en cas de résultats anormaux chez les patients, car certains agonistes sont labiles, en particulier une fois dilués aux concentrations de travail. Les laboratoires cliniques doivent établir des intervalles de référence appropriés pour la concentration de chaque agoniste. Les résultats des sujets normaux sains testés en même temps que les patients peuvent être utilisés pour établir des plages de référence. Il convient de faire preuve d'une grande prudence lors de l'interprétation des schémas d'agrégation plaquettaire. Un certain nombre de facteurs techniques peuvent influencer les résultats. Garder à l'esprit qu'il existe des différences importantes entre l'agrégation déterminée par la néphéломétrie et celle qui intervient dans le corps. Néanmoins, il est possible d'obtenir des informations diagnostiques utiles, et quelques exemples de schémas d'agrégation sont présentés au tableau 35.

Tableau 35. Résultats de l'agrégation plaquettaire dans diverses dysfonctions

Dysfonction	ADP	Collagène	Ristocétine 1,25 mg/ml	Ristocétine 0,5 mg/ml	Acide arachido- nique	Adrénaline
mW de type 1 et 2A	N	N	A/R**	A	N	N
mW de type 2B	N	N	N	H	N	N
Syndrome de Bernard-Soulier	N	N	A	A	N	N
Thrombasthénie de Glanzmann	A	A	N	A	A	A
Maladie du pool vide	P/N	R/N	N	A	R/N	P/N
Anomalie de la cyclooxygénase*	R/N	R	N	A	R/A	R/N

N = normal ; A = absence ; R = réduction ; H = hausse (réponse accrue) ; P = vague primaire uniquement

* Ou effet de l'aspirine

** Peut être normal dans la mW de type 1 mineure

Examen plus approfondi de la fonction plaquettaire : si un schéma d'agrégation anormal est observé chez une personne, il est conseillé de répéter l'évaluation au moins une fois de plus pour vérifier la cohérence de l'anomalie. En présence d'une agrégation anormale, un examen plus approfondi peut être utile. Il s'agit notamment de la mesure de la teneur en nucléotides et de leur libération au cours de l'agrégation plaquettaire. La quantification des glycoprotéines membranaires peut être effectuée pour le diagnostic sans équivoque du syndrome de Bernard-Soulier et de la thrombasthénie de Glanzmann (voir ci-dessous).

Libération d'ATP par lumi-agrégométrie : la lumi-agrégométrie est la méthode la plus largement utilisée pour évaluer la fonction de libération des granules denses des plaquettes. Elle présente l'avantage de pouvoir mesurer en même temps l'agrégation plaquettaire par transmission lumineuse et la libération de l'ATP des granules denses. Elle repose sur le principe de la réaction luciférine-luciférase. Lorsque les plaquettes sont activées, les granules denses libèrent l'ATP et l'ADP qu'elles ont stockées. L'ATP libérée réagit avec la luciférine en présence de luciférase pour donner une luminescence qui peut être quantifiée, par rapport à un étalon d'ATP. La sécrétion d'ATP peut être défective à la fois dans le déficit en granules denses et dans les anomalies de la sécrétion primaire. La distinction entre les deux entités nécessite des analyses supplémentaires, comme la mesure de la teneur totale en ATP-ADP par la bioluminescence, l'étude de la sécrétion de sérotonine marquée au carbone 14 (¹⁴C-5-HT), le test à la mépacrine par la cytométrie en flux (voir ci-dessous) ou l'évaluation des granules denses par microscopie électronique à transmission (MET) sur préparation d'échantillons entiers.

Tableau 36. Facteurs techniques influençant la fonction plaquettaire

Anticoagulant	1/10 ^e du volume de citrate trisodique.
Temps	Commencer les tests 30 minutes après la préparation du PRP. Effectuer les explorations dans les quatre heures suivant le prélèvement de sang.
Centrifugation	Doit être suffisante pour éliminer les globules rouges et blancs, mais pas les grosses plaquettes. Doit être effectuée à température ambiante, et non à 4 °C. Les grosses plaquettes peuvent être séparées par sédimentation.
Numération plaquettaire	Les numérations < 100 × 10 ⁹ /l provoquent des réponses lentes et faibles. Les numérations > 1000 × 10 ⁹ /l peuvent montrer une réponse moindre.
pH	Un pH < 7,7 inhibe l'agrégation. Un pH > 8,0 améliore l'agrégation.
Vitesse de mélange	Une vitesse < 800 tr/min montre une agrégation réduite. Une vitesse > 1200 tr/min brise les amas plaquettaires.
Hématocrite	> 55 % : progressivement moins d'agrégation, en particulier inhibition de la deuxième phase en raison de l'augmentation de la concentration de citrate.
Température	< 35 °C : diminution de l'agrégation avec des doses régulières de tous les agonistes, mais réponse accrue à de faibles doses d'ADP.
Lipémie	L'augmentation des chylomicrons entraîne une diminution de l'agrégation.
Cuvette sale	Peut provoquer une agrégation spontanée apparente.
Pas de bras de mélange	Pas de réponse à l'ajout d'agent agrégant.
Bulles d'air	Oscillations rapides et importantes du stylo avant l'agrégation. Également dues à une faible numération plaquettaire.

Différences entre les conditions *in vivo* et *in vitro* pour l'agrégation plaquettaire : avec les tests sanguins *in vitro*, le sang est anticoagulé, les globules rouges et blancs sont retirés, les composants vasculaires ne sont pas impliqués, la coagulation n'est pas impliquée, la population plaquettaire est sélectionnée, les produits d'activation et de libération des plaquettes sont conservés, les réactifs utilisés ne sont pas physiologiques dans leur composition et leur dose, les plaquettes sont instables hors du corps et les médicaments peuvent présenter des effets plus ou moins marqués qu'*in vivo*.

Test de la fonction plaquettaire par cytométrie en flux : la cytométrie en flux peut fournir des informations utiles pour le diagnostic et la classification des dysfonctions plaquettaires. Elle peut servir à l'analyse des récepteurs glycoprotéines, aux tests de la fonction plaquettaire après stimulation des agonistes, à la mesure de la fonction procoagulante des plaquettes (liaison à l'annexe V entre autres) et à l'évaluation de la teneur en granules alpha et denses. Elle présente essentiellement l'avantage de nécessiter de petits volumes d'échantillons, de pouvoir être pratiquée sur du sang total et de ne pas se limiter à la thrombocytopénie. Cela devient particulièrement utile chez les sujets pédiatriques et thrombocytopéniques.

Analyse des glycoprotéines de surface des plaquettes par cytométrie en flux : la thrombasthénie de Glanzmann, qui se caractérise par une $\alpha IIb\beta 3$ anormale ou absente, peut être détectée avec des anticorps monoclonaux GPIIb (CD41) ou CDIIIa (CD61) marqués par fluorescence, et le syndrome de Bernard-Soulier, caractérisé par une GP1b/V/IX anormale ou absente, peut être diagnostiqué à l'aide d'anticorps dirigés contre les anticorps GPIb (CD42b) ou GPIX (CD42a). De plus, d'autres dysfonctions plaquettaires héréditaires moins courantes affectant les récepteurs $\alpha 2\beta 1$ (CD49/CD29), GPIV (CD36) ou GPVI peuvent également être diagnostiqués à l'aide des anticorps respectifs. L'analyse des molécules de surface peut être effectuée jusqu'à 24 heures après le prélèvement. Le test d'activation plaquettaire par cytométrie en flux (PACT) permet de mesurer simultanément un large éventail de marqueurs d'activation de la fonction plaquettaire, permettant ainsi une analyse plus complète des différentes voies impliquées. Les plaquettes peuvent être identifiées à l'aide de leurs propriétés caractéristiques de diffusion frontale (*forward scatter*,

FSC) ou de diffusion latérale (side scatter, SSC) du faisceau incident et, de préférence, par l'ajout d'un récepteur glycoprotéine spécifique (par exemple CD41). Certains des marqueurs d'activation couramment utilisés sont : PAC-1 (anticorps monoclonal qui se lie spécifiquement à la forme de conformation activée de $\alpha IIb\beta 3$), CD62P ou P-sélectine (l'un des contenus des granules α , peut être utilisé comme marqueur de la libération de ces granules) et CD63 (peut être utilisé comme marqueur de la libération des granules δ). Le test peut être effectué à l'aide d'une combinaison d'agonistes pour cibler des voies différentes, telles que l'ADP, le TRAP et la convulxine. L'expression des marqueurs d'activation sur les plaquettes est mesurée (en MFI et/ou %) à l'inclusion (avant l'ajout de l'agoniste) et après la stimulation par l'agoniste. Une expression réduite après stimulation par l'agoniste suggère un défaut/anomalie de la voie spécifique. Il est important de simultanément analyser un échantillon témoin similaire à la LTA.

Liaison du FW induite par la ristocétine par cytométrie en flux : la fonction du récepteur GP1b/V/IX et du FW peut également être évaluée par cytométrie en flux en mesurant l'expression du FW sur les plaquettes après l'ajout de doses normales et faibles de ristocétine. Il est possible d'utiliser un anticorps monoclonal contre le FW. Les études de mélange avec le plasma du patient et le plasma témoin, et inversement, à de faibles doses de ristocétine peut différencier le type 2B et le type plaquettaire.

Dosage de l'absorption et de la libération de la mépacrine par cytométrie en flux : il peut aussi servir à évaluer les anomalies des granules δ . La mépacrine est un dérivé fluorescent de l'acridine qui se lie aux nucléotides de l'adénosine avec une grande affinité. Après son incubation avec les plaquettes à 37 °C pendant 30 minutes, elle est absorbée de manière sélective par les granules denses, ce qui peut être mesuré par l'augmentation de la fluorescence dans la cytométrie en flux. La fonction de libération peut par ailleurs être évaluée en mesurant la fluorescence de la mépacrine après une stimulation par l'agoniste (p. ex. convulxine ou TRAP). La fluorescence est mesurée à l'inclusion (plaquettes uniquement), après l'ajout de mépacrine (plaquettes + mépacrine) et après l'ajout d'agoniste (plaquettes + mépacrine + agoniste). Les ratios d'absorption et de libération peuvent être calculés. Une diminution de l'absorption et de la libération est observée en cas de déficit en granules denses, tandis qu'une absorption normale avec une libération réduite est observée en cas d'anomalies de sécrétion.

Activité procoagulante plaquettaire : lors de la stimulation simultanée des plaquettes avec la convulxine et la thrombine, un sous-ensemble de plaquettes exprime la phosphatidylsérine, une phospholipide anionique, à la surface des plaquettes activées. Il est possible d'évaluer cela à l'aide de l'annexine V ou de la lactadhéchine marquée par fluorescence qui se lie à la phosphatidylsérine. La translocation des phospholipides procoagulants facilite l'assemblage des facteurs de coagulation pour la génération de thrombine à la surface des plaquettes. La cytométrie en flux permet de détecter une activité procoagulante altérée (syndrome de Scott) ou augmentée (syndrome de Stormoken) et ses syndromes associés.

Tableau 37a. Récapitulatif des dysfonctions plaquettaires héréditaires avec caractéristiques cliniques et biologiques

Dysfonction	Anomalie génétique	Numération plaquette et morphologie/ autres caractéristiques du PBS	LTA	Caractéristiques biologiques supplémentaires	Clinique supplémentaire (\pm caractéristiques syndromiques)
Défauts des récepteurs glycoprotéines					
Thrombasthénie de Glanzmann	ITGA2B, ITGB3	Normal	Absence de réponse à tous les agonistes, à l'exception de l'agglutination à la ristocétine	La cytométrie en flux identifie un déficit en GPIIb/GPIIIa.	Saignement autosomique récessif, sévère
Thrombocytopénie liée à ITGA2B/ ITGB3	ITGA2B, ITGB3	Macrothrombocytopénie avec anisocytose	Ab-sence/ altération de la réponse à tous les ago-nistes, à l'exception de l'agglutination à la ristocétine	Réduction de l'expression de GPIIb/GPIIIa. Anomalie de l'expression de PAC1	Saignement autosomique dominant, léger à modéré
Syndrome de Bernard-Soulier	GP1BA, GP1BB, GP9	Macrothrombocytopénie	Absence de réponse d'agglutination à la ristocétine	La cytométrie en flux identifie le déficit en Gp1b/ IX/V.	Saignement autosomique récessif, modéré à sévère
Syndrome de Di-George/ vélocardiofacial/de délétion 22q11.2	del22q11.2	Numération plaquette normale/légèrement réduite avec de grosses plaquettes	Agrégation normale/variable (réponse réduite à la ristocétine dans ~30 % des cas)	Réduction de l'expression de GP1b/IX/V par cytométrie en flux	Fente palatine, malformations cardiaques, faciès anormal, troubles du développement, immunodéficience, saignements légers à importants
mW de type plaquettaire	Mutation gain de fonction dans GP1BA	Macrothrombocytopénie, amas de plaquettes	Agglutination accrue avec faible concentration de la ristocé-tine	Réduction des multimères du FW de HPM (réduction de l'activité du FW)	Saignement autosomique dominant, léger à modéré
Défauts des récepteurs du collagène	GP6 ND	Normal	Réponse d'agrégation réduite isolée au collagène	Déficit en GPVI ou en $\alpha 2\beta 1$ par cytométrie en flux	Saignement autosomique récessif, léger

Tableau 37b. Récapitulatif des dysfonctions plaquettaires héréditaires avec caractéristiques cliniques et biologiques

Dysfonction	Anomalie génétique	Numération plaquettaire et morphologie/autres caractéristiques du PBS	LTA	Caractéristiques biologiques supplémentaires	Clinique supplémentaire (\pm caractéristiques syndromiques)
Anomalies des récepteurs couplés aux protéines G					
Défaut du récepteur TXA ² (TP)	TBXA2R	Normal	Agrégation anormale avec les analogues AA et TXA ₂ (U46619)		Diathèse hémorragique autosomique récessive, légère
Anomalie du récepteur ADP (P2Y12)	P2Y12	Normal	Réponse d'agrégation à l'ADP nettement altérée (vague primaire uniquement) ; une réponse réduite avec d'autres agonistes peut également être observée.	Diminution de l'expression des marqueurs d'activation sur stimulation par l'ADP	Saignement autosomique récessif, léger après un traumatisme/ une intervention chirurgicale
Anomalies des granules plaquettaires (isolées/syndromiques)					
Anomalies des granules α					
Syndrome des plaquettes grises	NBEAL2	Macrothrombocytopenie ; grosses plaquettes avec cytoplasme gris bleuté et absence de granules azurophiles	Anomalies légères et variables ; peut être normal	Absence/ diminution des granules α par microscopie électronique (ME) Expression moindre/absente de la P-sélectine par cytométrie en flux/ELISA	Saignement autosomique récessif, léger, myélofibrose progressive avec splénomégalie
Syndrome d'arthrogrypose - insuffisance rénale - cholestase (ARC)	VPS33B, VIPAS39	Grosses plaquettes grises	Anomalies légères et variables ; peut être normal	Absence/ diminution des granules α par ME P-sélectine réduite chez certains et normale chez d'autres	Contractures de flexion, hypotonie, jaunisse cholestatique, acidose tubulaire rénale, retard de croissance staturo-pondérale, ichtyose, infection, diathèse hémorragique légère
Syndrome de Paris-Trousseau/ Jacobsen	del11q23, dont FL1	Grosses plaquettes, peu avec des granules α fusionnés	Variable	Granules α géants fusionnés en ME, dysmégacaryopoïèse	Diathèse hémorragique légère, retard de développement, malformations cardiaques, anomalies craniofaciales

Tableau 37c. Récapitulatif des dysfonctions plaquettaires héréditaires avec caractéristiques cliniques et biologiques

Dysfonction	Anomalie génétique	Numération plaquettaire et morphologie/autres caractéristiques du PBS	LTA	Caractéristiques biologiques supplémentaires	Clinique supplémentaire (\pm caractéristiques syndromiques)
Défauts des granules denses					
Déficit isolé en granules denses/maladie du pool vide		Normal	Variable. May be decreased to several agonists: ADP, collagen and epinephrine, or normal	Diminution de la libération d'ATP par lumi-agrégométrie Réduction de l'ADP plaquettaire et augmentation du rapport ATP/ADP Réduction/absence de granules denses par MET sur préparation d'échantillons entiers CD63 réduit et diminution de l'absorption et de la libération de mépacrine par cytométrie en flux	
Syndrome de Hermansky-Pudlak	HPS1, AP3B1 (HPS2), HPS3, HPS4, HPS5, HPS6, DNTBP1 (HPS7), BLOC1S3 (HPS8), et BLOC1S6 (HPS9)	Normal	Variable		Albinisme oculocutané, immunodéficience, diathèse hémorragique légère, fibrose pulmonaire, colite granulomateuse et neutropénie
Thrombocytopénie liée à SLFN14	SLFN14	Macrothrombocytopénie	Variable		
Syndrome de Chediak-Higashi	LYST	Plaquettes gris pâle par microscopie optique	Variable		Albinisme oculocutané variable, infections récurrentes menaçant le pronostic vital, diathèse hémorragique légère
Dysfonctions combinées granules α/granules δ	ND	Plaquettes gris pâle par microscopie optique	Variable	Absence/réduction des granules α et δ sur la MET, et autres caractéristiques observées dans les dysfonctions des granules α et denses	Diathèse hémorragique légère à modérée
Granule secretion defect or primary secretion defect	ND	Normal	Variable	Diminution de la libération d'ATP par lumi-agrégométrie ; absorption normale et libération moindre de la mépacrine par cytométrie en flux Réduction de l'expression de CD63 par cytométrie en flux ; granules α et denses normaux par ME	Diathèse hémorragique légère à modérée

Tableau 37d. Récapitulatif des dysfonctions plaquettaires héréditaires avec caractéristiques cliniques et biologiques

Dysfonction	Anomalie génétique	Numération plaquettaire et morphologie/autres caractéristiques du PBS	LTA	Caractéristiques biologiques supplémentaires	Clinique supplémentaire (\pm caractéristiques syndromiques)
Défauts des facteurs de transcription					
Thrombopénie familiale avec prédisposition à la leucémie aigüe myéloïde	RUNX1	Thrombocytopénie	Agrégation anormale en réponse à plusieurs agonistes	Sécrétion des granules δ défective	Prédisposition au développement d'une SMD ou d'une LAM
Anomalie des granules δ liée à FLI1	FLI1	Thrombocytopénie	Moindre agrégation au collagène et au TRAP	Sécrétion des granules δ défective	
Anomalie de GATA1	GATA1	Macrothrombocytopénie	Moindre agrégation au collagène et à la ristocétine	Réduction de la teneur en granules α et de leur libération	
Anomalie liée à GFI1B	GFI1B	Macrothrombocytopénie, dysérythropoïèse	Normal	Diminution de la libération des granules α	Autosomique dominant
Anomalies de la protéine de transduction du signal					
Anomalie de la phospholipase cytosolique A2/déficit en cyclooxygénase/déficit en TXA ₂ synthase	PLA2G4A/ND/TBXAS1	Normal	Absence de réponse avec AA et réponse normale avec TXA ₂		
Anomalie CalDAG-GEFI	RASGRP2	Normal	Réponse nettement réduite/absente à l'ADP, à l'épinéphrine, réponse réduite/normale au collagène, au TRAP et à la ristocétine	Expression de GPIIb/GPIIIa normale Anomalie de l'expression de PAC1	Saignement autosomique récessif, sévère
Déficit en adhésion leucocytaire-III	FERMT3	Leucocytose	Structure semblable à GT	Expression de GPIIb/GPIIIa normale Anomalie de l'expression de PAC1	Infection bactérienne autosomique récessive, sévère, mauvaise cicatrisation des plaies, saignement sévère

Tableau 37e. Récapitulatif des dysfonctions plaquettaires héréditaires avec caractéristiques cliniques et biologiques

Dysfonction	Anomalie génétique	Numération plaquettaire et morphologie/autres caractéristiques du PBS	LTA	Caractéristiques biologiques supplémentaires	Clinique supplémentaire (\pm caractéristiques syndromiques)
Défauts des protéines du cytosquelette					
Syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS)/thrombocytopénie liée au chromosome X	WAS	Microthrombocytopénie		Diminution des sous-ensembles de lymphocytes T, fonction des cellules tueuses naturelles, diminution des granules α et δ par MET	WAS : transmission liée au chromosome X ; eczéma, déficit immunitaire, tumeurs malignes et auto-immunité
Syndrome MYH9 (anciennement connu sous le nom de syndromes de Sebastian, May-Hegglin, Fechtner et Epstein)	MYH9	Macrothrombocytopénie, inclusion de type corps de Döhle dans les neutrophiles	Normal		Autosomal dominant; variable association with sensorineural hearing loss, cataracts, and nephritis
Déficit en ADAP	FYB	Microthrombocytopénie		Expression accrue de P-sélectine et de PAC-1, mais altération de l'expression lors de l'activation	
Anomalies des phospholipides membranaires					
Syndrome de Scott	TMEM16F	Normal	Normal	Réduction de la liaison à l'annexine par cytométrie en flux	Autosomal récessif
Syndrome de Stormorken	STIM1, ORAI1	Anémie (corps de Howell-Jolly)	Normal	Liaison à l'annexine V améliorée et expression de PAC-1 défective	Dysmorphisme facial, ichtyose, myopathie
Augmentation de l'activité fibrinolytique plaquettaire					
Syndrome plaquettaire du Québec	PLAU (duplication)	Thrombocytopénie variable	Réponse anormale à l'épinéphrine	Excès d'activateur plasminogène de l'urokinase plaquettaire provoquant la protéolyse des protéines des granules α et une fibrinolyse	Saignement autosomique dominant, à apparition tardive après une intervention chirurgicale/un traumatisme, pas de réponse aux antifibrinolytiques mais une réponse aux antifibrinolytiques

Références

- Bolton-Maggs PH, Chalmers EA, Collins PW, Harrison P, Kitchen S, Liesner RJ et al. A review of inherited platelet disorders with guidelines for their management on behalf of the UKHCDO. *Br J Haematol* 2006; 135(5): 603-633.
- Bourguignon A, Tasneem S, Hayward CP. Screening and diagnosis of inherited platelet disorders. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2022; 59(6): 405-444.
- The British Society for Haematology Haemostasis and Thrombosis Task Force. Guidelines on platelet function testing. *J Clin Pathol* 1988; 41(12): 1322-1330.
- Cai H, Mullier F, Frotscher B, Briquel ME, Toussaint M, Massin F, Lecompte T, Latger-Cannard V. Usefulness of flow cytometric mepacrine uptake/release combined with CD63 assay in diagnosis of patients with suspected platelet dense granule disorder. *Semin Thromb Hemost* 2016; 42(3): 282-291.
- Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, Hayward CP, Kenny D, Nugent D et al. Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry: A consensus of the working party from the platelet physiology subcommittee of SSC/ISTH. *J Thromb Haemost* 2013; 11(6): 1183-1189.
- Cattaneo M, Hayward CP, Moffat KA, Pugliano MT, Liu Y, Michelson AD. Results of a worldwide survey on the assessment of platelet function by light transmission aggregometry: A report from the platelet physiology subcommittee of the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2009; 7(6): 1029.
- Cattaneo M, Lecchi A, Zighetti ML, Lussana F. Platelet aggregation studies: Autologous platelet-poor plasma inhibits platelet aggregation when added to platelet-rich plasma to normalize platelet count. *Haematologica* 2007; 92(5): 694-697.
- Chanarin I (ed). *Laboratory Haematology: An Account of Laboratory Techniques*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1989.
- Dave RG, Geevar T, Chellaiya GK, Mammen JJ, Vijayan R, Samuel A, Gowri M, Nair SC. Stability and utility of flow cytometric platelet activation tests: A modality to bridge the gap between diagnostic demand and supply. *Platelets* 2022; 33(7): 1043-1051.
- Franchini M, Montagnana M, Lippi G. Clinical, laboratory and therapeutic aspects of platelet-type von Willebrand disease. *Int J Lab Hematol* 2008; 30(2): 91-94.
- Frontroth JP, Favaloro EJ. Ristocetin-induced platelet aggregation (RIPA) and RIPA mixing studies. *Methods Mol Biol* 2017; 1646: 473-494.
- Gomez K, Anderson J, Baker P, Biss T, Jennings I, Lowe G, Platton S. Clinical and laboratory diagnosis of heritable platelet disorders in adults and children: A British Society for Haematology guideline. *Br J Haematol* 2021; 195(1): 46-72.
- Gresele P. Diagnosis of inherited platelet function disorders: Guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2015; 13(2): 314-322.
- Gresele P, Bury L, Mezzasoma AM, Falcinelli E. Platelet function assays in diagnosis: An update. *Expert Rev Hematol* 2019; 12(1): 29-46.
- Gresele P, Falcinelli E, Bury L. Laboratory diagnosis of clinically relevant platelet function disorders. *Int J Lab Hematol* 2018; 40 Suppl 1: 34-45.
- Jennings I, Woods TA, Kitchen S, Walker ID. Platelet function testing: practice among UK National External Quality Assessment Scheme for Blood Coagulation participants, 2006. *J Clin Pathol* 2008; 61(8): 950-954.
- Le Blanc J, Mullier F, Vayne C, Lordkipanidzé M. Advances in platelet function testing-light transmission aggregometry and beyond. *J Clin Med* 2020; 9(8): 2636.
- Linnemann B, Schwonberg J, Mani H, Prochnow S, Lindhoff-Last E. Standardization of light transmittance aggregometry for monitoring antiplatelet therapy: An adjustment for platelet count is not necessary. *J Thromb Haemost* 2008; 6(4): 677-683.
- Rand ML, Reddy EC, Israels SJ. Laboratory diagnosis of inherited platelet function disorders. *Transfus Apher Sci* 2018; 57(4): 485-493.
- van Asten I, Schutgens REG, Baaij M, Zandstra J, Roest M, Pasterkamp G, Huisman A, Korporaal SJA, Urbanus RT. Validation of flow cytometric analysis of platelet function in patients with a suspected platelet function defect. *J Thromb Haemost* 2018; 16(4): 689-698.

SUJETS ABORDÉS

- ✓ Critères de classification et de diagnostic pour le SAPL
- ✓ Anticoagulant de type lupique
- ✓ Anticorps antiphospholipides

Les anticorps antiphospholipides sont un groupe hétérogène d'anticorps pouvant causer un allongement du TCA ; ils réagissent généralement avec les épitopes présents sur des protéines qui forment un complexe avec des phospholipides chargés négativement. Beaucoup de ces anticorps ont besoin de la bêta-2-glycoprotéine 1, une protéine qui se lie aux phospholipides. D'autres peuvent être dirigés contre la prothrombine. L'identification correcte de ces anticorps permettra de caractériser le syndrome des anticorps antiphospholipides (SAPL) (Ruiz-Irastorza *et al.*, 2010 ; Schreiber *et al.*, 2018). Il est important de noter que ces anticorps peuvent interférer avec les réactions de coagulation au laboratoire, allongeant les tests dépendant des phospholipides tels que le TCA et parfois le TP, mais ils ne sont pas associés à des saignements, sauf dans de rares cas où il existe un déficit acquis en prothrombine important. Paradoxalement, ces anticorps sont clairement associés à la thrombose veineuse et artérielle par des mécanismes qui ne sont pas bien compris. Dans les centres de diagnostic des troubles de la coagulation, il est indispensable de pouvoir détecter ces anticorps à l'aide de tests spécifiques pour étudier l'allongement du TCA (Barbosa *et al.*, 2019). Il existe actuellement des lignes directrices spécifiques pour la bonne exécution des tests diagnostiques du SAPL en laboratoire qui peuvent servir à l'actualisation des informations biologiques, voir ci-dessous.

- Devreese, K.M.J.; de Groot, P.G.; de Laat, B.; Erkan, D.; Favaloro, E.J.; Mackie, I.; Martinuzzo, M.; Ortel, T.L.; Pengo, V.; Rand, J.H.; *et al.* Guidance from the Scientific and Standardization Committee for lupus anticoagulant/antiphospholipid antibodies of the International Society on Thrombosis and Haemostasis: Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection and interpretation. *J. Thromb. Haemost.* 2020; 18, 2828–2839.
- Devreese KM, Pierangeli SS, de Laat B, Tripodi A, Atsumi T, Ortel TL; Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Phospholipid/Dependent Antibodies. Testing for antiphospholipid antibodies with solid phase assays: guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2014; 12(5): 792-795.
- Vandeveld A, Gris JC, Moore GW, Musiał J, Zuijly S, Wahl D, Devreese KMJ. Toward harmonized interpretation of anticardiolipin and anti-β2-glycoprotein I antibody detection for diagnosis of antiphospholipid syndrome using defined level intervals and likelihood ratios: communication from the ISTH SSC Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibodies. *J Thromb Haemost.* 2024; S1538-7836(24)00236-8.

Critères de classification et de diagnostic pour le SAPL : puisqu'il est devenu clair que les anticorps antiphospholipides étaient significativement associés à la thrombose vasculaire et à la morbidité de la grossesse, la nécessité de critères consensuels pour le SAPL a abouti aux critères de Sydney, tableau 38 (Miyakis *et al.*, 2006). Les patients sont considérés comme étant atteints du SAPL lorsqu'un événement clinique survient avec au moins un critère biologique positif. Les critères biologiques définissant le SAPL sont la présence d'anticoagulant de type lupique, d'IgG/IgM anticardiolipines (aCL) ou d'IgG/IgM a2GPI, persistante, pendant au moins 12 semaines. Actuellement, une nouvelle initiative internationale est en cours pour développer de nouveaux critères. Les critères biologiques proposés comprennent uniquement les anticorps des critères actuels (anticoagulant de type lupique, IgG/IgM aCL et IgG/IgM a2GPI).

Tableau 38. Critères de Sydney de 2006 pour la classification du SAPL

Critères cliniques	Critères biologiques
1. Thrombose vasculaire	1. Anticoagulant lupique
Veineuse, artérielle ou microvasculaire	≥ 2 résultats positifs
Confirmée par des critères validés objectifs	Au moins 12 semaines d'intervalle
Aucun signe d'inflammation de la paroi vasculaire	
et/ou	
2. Morbidité de la grossesse	2. IgG et/ou IgM anticorps anticardiolipine
≥ 1 mort fœtale inexplicable à la 10e semaine de gestation ou	Sérum et plasma
≥ 1 naissance prématurée < 34e semaine de gestation en raison de : éclampsie ou pré-éclampsie sévère, insuffisance placentaire	Titrage moyen ou élevé (> 40 GPL ou MPL, ou > 99e percentile)
≥ 3 avortements consécutifs inexplicables < 10e semaine de gestation	Mesuré par ELISA standardisé
	≥ 2 résultats positifs
	Au moins 12 semaines d'intervalle
et/ou	
	3. IgG et/ou IgM anticorps anti-β2 glycoprotéine I
	Sérum et plasma
	Titrage moyen ou élevé (> 40 GPL ou MPL, ou > 99e percentile)
	Mesuré par ELISA standardisé
	≥ 2 résultats positifs
	Au moins 12 semaines d'intervalle

Anticoagulant lupique

Comment choisir le test ? L'anticoagulant de type lupique peut être détecté par différents tests de coagulation dépendant des phospholipides. La dernière mise à jour des lignes directrices de l'ISTH sur la détection des anticoagulants lupiques recommande d'utiliser deux tests en parallèle, le temps de venin de vipère de Russell dilué (dRVVT) et le TCA (Devreese et al., 2020). Le dRVVT est plus spécifique, tandis que le TCA est plus sensible aux anticoagulants lupiques (dépendant grandement des réactifs utilisés). Les deux dosages sont complémentaires, car les anticorps ne réagissent pas toujours dans les deux. Le dRVVT repose sur l'activation directe de FX par une enzyme présente dans le venin des vipères de Russell. Le TCA s'appuie sur l'activation de la voie de contact (intrinsèque) de la cascade de coagulation. Le choix des réactifs appropriés pour la recherche d'anticoagulants lupiques est important, car plusieurs réactifs sont disponibles, en particulier pour le TCA (Favaloro et al., 2019). Deux aspects doivent être pris en considération dans la sélection du réactif pour le TCA : le choix de l'agent activant et la composition et la concentration des phospholipides. Le temps de coagulation de la silice (SCT) peut être utilisé en remplacement du TCA. La réalisation des dosages des anticoagulants lupiques doit être validée ou vérifiée avant leur mise en œuvre dans la pratique clinique. Il convient qu'une partie du processus de vérification comprenne l'analyse d'échantillons dont la teneur en anticoagulant de type lupique est connue et des valeurs moyennes bien caractérisées (Gardiner et al., 2021a ; Gardiner et al., 2021b).

Comment le test est-il effectué ? L'évaluation des anticoagulants lupiques consiste en une procédure en trois étapes : le dépistage, le mélange et la confirmation (Devreese et al., 2020). Du PPP est nécessaire pour éviter les résultats faussement négatifs en raison de l'interaction des phospholipides et des plaquettes. La phase de dépistage comprend des tests avec des réactifs pour le dRVVT et le TCA à de faibles concentrations phospholipidiques. Un déficit en facteur de coagulation ou des inhibiteurs autres

que l'anticoagulant de type lupique peuvent provoquer un dépistage positif ; il est donc nécessaire de procéder à un mélange et un test de confirmation. La procédure par étapes peut réduire les coûts, car elle évite d'effectuer inutilement l'étape de mélange et de confirmation si l'étape de dépistage est négative. Dans l'étape de confirmation, un excès de phospholipide anionique est ajouté au réactif de test, et l'excès de phospholipide peut réduire ou neutraliser les anticorps. Dans le dRVVT, les dosages de dépistage et de confirmation sont effectués en parallèle, et le résultat de l'étape de confirmation est exprimé sous la forme d'un rapport normalisé selon le calcul : [(dépistage résultat du patient) / (dépistage résultat du pool)] / [(confirmation résultat du patient) / (confirmation résultat du pool)]. Dans l'étape de mélange, le test de dépistage est effectué sur un mélange 1/1 de plasma de patient et de pool de plasma normal. Le test de mélange est exprimé en rapport normalisé [(dépistage mélange) / (dépistage pool de plasma normal)]. Lorsque le temps de coagulation est allongé dans le dosage de confirmation, une étape de mélange supplémentaire avec les réactifs de confirmation (mélange de confirmation) peut être effectuée, et le rapport est plus robuste et moins affecté par l'interférence des déficits en facteurs congénitaux ou acquis. Il existe des tests intégrés qui effectuent les trois étapes en une seule procédure. Les tests de dépistage et de confirmation sont effectués en parallèle sur le plasma du patient mélangé à du PNP et les résultats sont principalement exprimés par la différence entre les deux.

Valeurs limites : pour interpréter les résultats des anticoagulants lupiques, il est nécessaire de déterminer des valeurs limites pour définir la positivité à toutes les étapes. Tout d'abord, il est recommandé que les laboratoires déterminent les valeurs limites en s'appuyant sur une population d'au moins 120 sujets sains, le point limite étant le 99^e percentile après le rejet des valeurs aberrantes (Devreese et al., 2020). Nombre de laboratoires peuvent toutefois avoir des difficultés à recruter 120 personnes. Une approche qui nécessite moins de volontaires est le transfert des valeurs limites recommandées par le fabricant. Cela suppose que les points limites de fabrication reposent sur une vaste population de référence de personnes saines avec des données démographiques adéquates, une méthode statistique correcte et une combinaison réactif-instrument correcte (Castellone, 2017). Lorsque ces conditions sont remplies, les valeurs limites du fabricant doivent être vérifiées avant le transfert en testant 20 volontaires sains représentant la démographie de la population locale. Après avoir rejeté les valeurs aberrantes et les avoir remplacées par de nouveaux résultats provenant des volontaires sains, les résultats (population sans valeurs aberrantes) doivent être comparés à la valeur limite suggérée.

Interférences et limites : la protéine C réactive interfère *in vitro* avec le test du TCA par son affinité aux phospholipides, conduisant à des résultats faussement positifs. Bien que cet effet n'ait pas été observé pour le dRVVT, il peut varier d'un réactif à l'autre. De plus, l'activité coagulante accrue du facteur VIII est liée à un TCA plus court donnant des résultats faussement négatifs. Des taux élevés de facteur VIII peuvent être observés pendant la grossesse, une intervention chirurgicale, une inflammation, ainsi qu'en présence d'une tumeur maligne et d'autres affections. Il n'est pas recommandé de rechercher des anticoagulants lupiques pendant un épisode thrombotique ou une anticoagulothérapie (Devreese et al., 2020). Les lignes directrices les plus récentes de l'ISTH ne recommandent pas de prétiluer les échantillons en présence d'AVK (Devreese et al., 2020). Les anticoagulants oraux directs (AOD) inhibent directement la thrombine (p. ex. le dabigatran) ou le facteur Xa (apixaban, bêtrixaban, edoxaban, rivaroxaban, etc.), avec divers effets sur les tests de coagulation, ce qui conduit à l'interprétation de résultats faux négatifs et faux positifs. Le TCA et le TP doivent être réalisés avant de procéder au test des anticoagulants de type lupique afin d'avoir plus d'informations sur l'échantillon, mais cela n'exclut pas la présence d'AOD ou d'HBPM.

Anticorps antiphospholipides

Comment choisir le test ? Les anticorps anticardiolipine et anti-β₂-glycoprotéine 1 sont identifiés par des immunodosages en phase solide. Les critères de classification du SAPL indiquent la mesure de ces anticorps par ELISA standardisé. Cependant, d'autres techniques de détection des anticorps sont désormais disponibles, notamment la chimiluminescence, les enzymes de fluorescence et les immuno-dosages multiplex (Devreese et al., 2014). Par rapport aux méthodes ELISA manuelles traditionnelles, les techniques les plus récentes sont plus faciles à utiliser et bénéficient d'une meilleure fidélité de mesure.

Les tests diffèrent en termes de phase solide, de principe de détection, de coating, de source d'antigènes et d'anticorps, d'agents bloquants pour prévenir une liaison non spécifique, de protocole de dilution, d'étalonnage et d'unités (Devreese et al., 2014). Il est recommandé d'effectuer les tests de suivi du patient dans le même laboratoire, car les plateformes ne peuvent pas être utilisées de manière interchangeable.

Comment effectuer le test ? Il est possible d'avoir recours à du sérum ou du PPP pour les aCL et a2GPI (Devreese et al., 2018). La nécessité d'effectuer le test en double dépend des caractéristiques de performances. Elle est particulièrement recommandée pour les analyses ELISA manuelles ou si la mesure inter et intra-cycles n'est pas fidèle à > 10 % (Devreese et al., 2014). À chaque cycle, le matériau de contrôle interne de qualité doit être analysé aux titrages pertinents. Les courbes d'étalonnage doivent être déterminées à chaque cycle ELISA ou pour chaque lot de réactifs dans les systèmes automatisés. Chaque étalonnage doit être évalué et rejeté lorsqu'il ne répond pas aux exigences du fabricant ou lorsque le coefficient de corrélation entre les résultats et les valeurs cibles est inférieur à 0,90 (Devreese et al., 2014). Malheureusement, il n'y a pas d'uniformité dans le matériel de référence pour l'étalonnage des tests. Des efforts sont déployés pour développer de nouvelles normes monocloniales et polyclonales pour l'aCL et l'a2GPI, dans le but de créer des normes de l'OMS avec l'UI/ml comme unité universelle.

Valeurs limites et profil des anticorps : 40 GPL/MPL comme point limite de l'aCL reposait sur des études montrant une meilleure corrélation de cette valeur avec le SAPL (Levine et al., 1997). Cependant, la différence peut être marquée entre 40 GPL/MPL et le 99^e percentile pour l'aCL (Vandevelde et al., 2024). Le comité scientifique et de normalisation de l'ISTH ne recommande pas d'utiliser 40 GPL/MPL comme point limite. Il est suggéré de calculer une valeur limite spécifique au laboratoire pour la positivité sur la base d'un 99^e percentile non paramétrique d'au moins 120 sujets de référence. Le rejet des valeurs aberrantes selon la méthode Dixon/Reed est recommandé pour éviter la surestimation des valeurs limites. Le transfert des points limites du fabricant après vérification sur au moins 20 sujets de référence est une alternative valable si le point limite du fabricant est calculé sur une population de référence suffisamment importante et qu'une méthodologie statistique appropriée a été appliquée. Chaque résultat d'aCL et d'a2GPI au-dessus du point limite doit être signalé comme positif, accompagné de la valeur numérique et de la valeur limite interne (Vandevelde et al., 2024). La positivité de l'un des tests (anticoagulant de type lupique, IgG aCL, IgM aCL, IgG a2GPI ou IgM a2GPI) est suffisante pour diagnostiquer le SAPL. L'interprétation combinée de différents profils d'anticorps antiphospholipides a été suggérée pour identifier les patients à haut risque, par rapport à l'évaluation individuelle. Chez les personnes porteuses d'antiphospholipides asymptomatiques, la double et triple positivité était un facteur de risque pour le développement d'événements thrombotiques, mais la positivité unique de l'aCL ou de l'a2GPI ne l'était pas (Mustonen et al., 2014).

Interférences : la présence de facteur rhumatoïde peut entraîner des résultats faussement positifs pour les IgM aCL et les IgM a2GPI (Devreese et al., 2014 ; Forastiero et al., 2014). Contrairement à la recherche d'anticoagulants lupiques, la recherche d'anticorps par immunodosages en phase solide n'est pas soumise à l'interférence analytique des réactifs de la phase aiguë ou d'une anticoagulothérapie. Toutefois, une hausse transitoire d'aCL et d'a2GPI est observée en conditions inflammatoires (Exner et al., 2020 ; Laureano et Crowthe, 2018).

Références

Barbosa ACN, Montalvão SAL, Barbosa KGN, Colella MP, Annichino-Bizzacchi JM, Ozelo MC, De Paula EV. Prolonged APTT of unknown etiology: A systematic evaluation of causes and laboratory resource use in an outpatient hemostasis academic unit. *Res Pract Thromb Haemost* 2019; 3(4): 749-757.

Castellone DD. Establishing reference intervals in the coagulation laboratory. *Int J Lab Hematol* 2017; 39 Suppl 1: 121-127.

Devreese KMJ, de Groot PG, de Laat B, Erkan D, Favaloro EJ, Mackie I et al. Guidance from the Scientific and Standardization Committee for lupus anticoagulant/antiphospholipid antibodies of the International Society on Thrombosis and Haemostasis: Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection and interpretation. *J Thromb Haemost* 2020; 18(11): 2828-2839.

Devreese KMJ, Ortel TL, Pengo V, de Laat B. Laboratory criteria for antiphospholipid syndrome: Communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2018; 16(4): 809-813.

Devreese KM, Pierangeli SS, de Laat B, Tripodi A, Atsumi T, Ortel TL. Testing for antiphospholipid antibodies with solid phase assays: Guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2014; 12(5): 792-795.

Exner T, Rigano J, Favaloro EJ. The effect of DOACs on laboratory tests and their removal by activated carbon to limit interference in functional assays. *Int J Lab Hematol* 2020; 42 Suppl 1: 41-48.

Favaloro EJ, Kershaw G, Mohammed S, Lippi G. How to optimize activated partial thromboplastin time (APTT) testing: Solutions to establishing and verifying normal reference intervals and assessing APTT reagents for sensitivity to heparin, lupus anticoagulant, and clotting factors. *Semin Thromb Hemost* 2019; 45(1): 22-35.

Forastiero R, Papalardo E, Watkins M, Nguyen H, Quirbach C, Jaskal K et al. Evaluation of different immunoassays for the detection of antiphospholipid antibodies: Report of a wet workshop during the 13th international Congress on Antiphospholipid Antibodies. *Clin Chim Acta* 2014; 428: 99-105.

Gardiner C, Coleman R, de Maat MPM, Dorgalaleh A, Echenagucia M, Gosselin RC, Ieko M, Kitchen S. International Council for Standardization in Haematology (ICSH) laboratory guidance for the evaluation of haemostasis analyser-reagent test systems. Part 1: Instrument-specific issues and commonly used coagulation screening tests. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(2): 169-183.

Gardiner C, Coleman R, de Maat MPM, Dorgalaleh A, Echenagucia M, Gosselin RC, Ieko M, Kitchen S. International Council for Standardization in Haematology (ICSH) laboratory guidance for the verification of haemostasis analyser-reagent test systems. Part 2: Specialist tests and calibrated assays. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(5): 907-916.

Harris EN, Gharavi AE, Patel SP, Hughes GR. Evaluation of the anti-cardiolipin antibody test: Report of an international workshop held 4 April 1986. *Clin Exp Immunol* 1987; 68(1): 215-222.

Laureano M, Crowther MA. Higher-risk aps: Do we dare to DOAC? *Blood* 2018; 132(13): 1357-1358.

Levine SR, Salovich-Palm L, Sawaya KL, Perry M, Spencer HJ, Winkler HJ, Alam Z, Carey JL. IgG anticardiolipin antibody titer > 40 GPL and the risk of subsequent thrombo-occlusive events and death. A prospective cohort study. *Stroke* 1997; 28(9): 1660-1665.

Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4(2): 295-306.

Mustonen P, Lehtonen KV, Javela K, Puurunen M. Persistent antiphospholipid antibody (aPL) in asymptomatic carriers as a risk factor for future thrombotic events: A nationwide prospective study. *Lupus* 2014; 23(14): 1468-1476.

Ruiz-Irastorza G, Crowther M, Branch W, Khamashta MA. Antiphospholipid syndrome. *Lancet* 2010; 376(9751): 1498-1509.

Schreiber K, Sciascia S, de Groot PG, Devreese K, Jacobsen S, Ruiz-Irastorza G, Salmon JE, Shoenfeld Y, Shovman O, Hunt BJ. Antiphospholipid syndrome. *Nat Rev Dis Primers* 2018; 4: 17103.

Vandeveldé A, Gris JC, Moore GW, Musiał J, Zuily S, Wahl D, Devreese KMJ. Toward harmonized interpretation of anticardiolipin and anti-β2-glycoprotein I antibody detection for diagnosis of antiphospholipid syndrome using defined level intervals and likelihood ratios: Communication from the ISTH SSC Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibodies. *J Thromb Haemost* 2024; 22(8): 2345-2362.

SUJETS ABORDÉS

- ✓ Temps de lyse du caillot de plasma induit par le tPA
- ✓ Test de génération de plasmine

La fibrinolyse est une série de réactions enzymatiques qui dégradent la fibrine insoluble, et dépend de la quantité et de la qualité de diverses enzymes fibrinolytiques, telles que l'activateur du plasminogène de type tissulaire (tPA) et la plasmine, leurs inhibiteurs respectifs, l'inhibiteur des activateurs du plasminogène de type 1 (PAI-1) et l'alpha-2-antiplasmine (α 2AP), ainsi que de la structure du caillot (Longstaff et Kolev, 2015). En contexte clinique, l'augmentation du taux de fibrinolyse sert à inverser l'occlusion thrombotique (p. ex. tPA recombinant pour le traitement immédiat de l'accident vasculaire cérébral, de l'infarctus du myocarde ou de l'embolie pulmonaire), tandis que l'abaissement du taux de fibrinolyse est employé pour atténuer les saignements (acide tranexamique pour le traitement immédiat de l'accident vasculaire cérébral, de l'infarctus du myocarde ou de l'embolie pulmonaire entre autres) (Draxler et Medcalf, 2015 ; Illich et al., 2017 ; Kwaan et al., 2017). Récemment, dans l'hémophilie, on a eu recours à des tests mesurant la formation de caillots et la fibrinolyse pour faciliter les comparaisons directes et fonctionnelles entre les agents hémostatiques nouveaux et émergents qui présentent différents mécanismes d'action (Holle et al., 2024). Les tests généraux visant à identifier le potentiel fibrinolytique d'une personne ne sont toutefois pas largement mis en œuvre. En revanche, la recherche fondamentale sur la fibrinolyse repose généralement sur la quantification des différents facteurs fibrinolytiques. Les concentrations totales sont mesurées à l'aide de dosages à base d'antigènes et de tests fonctionnels spécifiques pour déterminer leur activité. Malgré la variété des dosages disponibles, il reste difficile d'assigner les facteurs fibrinolytiques individuels qui contribuent au résultat fibrinolytique global, et ce en raison de la nature dynamique de l'environnement entourant le caillot (Longstaff, 2018). Pendant des décennies, le temps de lyse du caillot avec surveillance de la turbidité a été utilisé comme méthode standard pour quantifier le potentiel fibrinolytique global d'un échantillon, et des variations de ce test global et simpliste ont été développées pour traiter la ou les fonctions des facteurs fibrinolytiques. Ainsi, deux dosages ont été étudiés dans le contexte de la pratique clinique et montrent des résultats prometteurs pour l'évaluation du potentiel fibrinolytique global.

Temps de lyse du caillot de plasma induit par le tPA : les temps de lyse du caillot de plasma induits par l'activateur du plasminogène sont fréquemment rapportés pour évaluer et quantifier la propriété fibrinolytique globale d'un échantillon (Longstaff, 2018). Ce test est pratiqué en ajoutant simultanément au plasma citraté des agonistes pour initier la coagulation (facteur tissulaire et Ca²⁺ par exemple) et la fibrinolyse (tPA notamment). Sinon, des caillots peuvent être générés en premier, puis recouverts de tPA pour imiter le scénario clinique dans lequel le tPA est perfusé pour dégrader les thrombus ischémiques existants (Longstaff et al., 2011). La simplicité du système de réaction et le traitement minimal des échantillons font de ce dosage une méthode idéale pour étudier la sensibilité des caillots de plasma à la fibrinolyse (Holle et al., 2024). En outre, le test est sensible aux molécules inhibitrices qui ciblent des facteurs spécifiques, tels que PAI-1 et α 2AP, qui peuvent être inclus pour inférer les rôles respectifs de PAI-1 et d' α 2AP dans la fibrinolyse générale (Zheng et al., 2023).

Réactifs et méthode :

- Phospholipides [4 µM final]
 - CaCl₂ [10 mM final]
 - Facteur tissulaire [dilution 1/15 000 d'Innovin, facteur tissulaire final 1 pM]
 - Solution saline tamponnée à l'HEPES (HEPES 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM)
 - tPA (0,5 µg/ml final)
- 1) Dans une plaque à 96 puits à fond en U, pipeter 10 µl de facteur tissulaire/phospholipides/tPA dans chaque puits (pipetage inversé au fond du puits)
 - 2) Ajouter 40 µl de PPP dans chaque puits (pipetage inversé sur le côté du puits en haut)
 - 3) Préchauffer la plaque dans l'incubateur pendant cinq minutes
 - 4) Après cinq minutes de préchauffage, utiliser une pipette multicanaux pour transférer 10 µl de Ca, bien mélanger et éviter la formation de bulles
 - 5) Mettre rapidement la plaque dans le lecteur et commencer la lecture
 - 6) Surveiller la réaction pendant deux heures en mesurant la turbidité à 405 nm toutes les 12 secondes à l'aide d'un lecteur de plaques

Test de génération de plasmine : les tests de génération de plasmine développés par différents groupes ont certains éléments en commun (Longstaff, 2018 ; Zheng *et al.*, 2023). De manière générale, l'activité procoagulante est initiée par l'ajout de facteur tissulaire exogène au plasma recalcifié, et l'activité fibrinolytique est déclenchée par l'ajout de tPA exogène. La génération de plasmine est détectée par le clivage d'un substrat fluorogène, et les paramètres sont définis à partir de l'accumulation de fluorescence ou par une dérivée mathématique de cette courbe de fluorescence. Les différences subtiles entre ces tests comprennent les concentrations de facteur tissulaire et de tPA utilisées et l'utilisation ou non de plasma dilué. Certaines variations de ces tests détectent simultanément la thrombine et la plasmine, tandis que d'autres effectuent ces mesures séparément, mais en parallèle. Des études montrent que ces tests sont spécifiques pour la plasmine et sensibles à l'α2AP, l'activité mesurée représentant la plasmine libre. La génération de plasmine est également sensible à l'acide tranexamique. Compte tenu des concentrations élevées de tPA requises pour déclencher une génération de plasmine mesurable, le test n'est pas sensible aux concentrations plasmatiques de PAI-1 (Miszta *et al.*, 2021). Cependant, la génération de plasmine en réponse à l'ajout de tPA exogène est dose-dépendante. Un nombre croissant de travaux suggèrent que les tests de génération de plasmine, en particulier lorsqu'ils sont utilisés avec les tests de génération de thrombine et de mesure de la turbidité, produisent une vue multidimensionnelle des effets intégrés des activités procoagulantes et fibrinolytiques chez les sujets sains et malades (Misztal *et al.*, 2021 ; Zheng *et al.*, 2023).

Réactifs et méthode :

- Tampon TBS, contenant du Tris 66 mM et du NaCl 130 mM
 - CaCl₂ 34 mM
 - facteur tissulaire 10 pM (facteur tissulaire humain recombinant lipidé, Innovin, Siemens Healthcare, Erlangen, Allemagne)
 - tPA 900 ng/ml (activateur tissulaire du plasminogène à deux chaînes recombinant, Actylise, Boehringer Ingelheim, Biberach an der Riss, Allemagne)
 - Alpha-thrombine (BOC-VAL-Pro-ARG-MCA, Peptides International, 5 mg)
 - Plasmine (BOC-GLU-LYS-LYS-MCA, Peptides International, 5 mg)
- 1) Préparer la solution de réactif de CaCl₂ 34 mM, facteur tissulaire 10 pM et tPA 900 ng/ml dans la solution de TBS. La concentration finale des réactifs dans le plasma était de 5 pM pour le facteur tissulaire et 450 ng/ml pour le tPA.
 - 2) Deux substrats ont été préparés avec une concentration finale de 100 µM et utilisés pour la détection des enzymes : l'α-thrombine et la plasmine.

- 3) Les deux premiers puits de la plaque (Grelner, 96 puits, fond plat, noir/transparent) doivent être utilisés comme blanc, et les échantillons ont été analysés en double dans des rangées parallèles pour chaque substrat, en évitant les interférences et/ou les interactions potentielles dans la détection des signaux.
- 4) Ajouter les solutions de substrat (20 µl) dans les puits de la plaque, puis 90 µl des échantillons et du blanc (solution de TBS).
- 5) À l'aide d'une pipette automatisée à pointes multiples, ajouter 90 µl de la solution de réaction préchauffée (37 °C pendant trois minutes) dans chaque puits de la plaque.
- 6) Enfin, la plaque doit être lue dans le fluoromètre à une longueur d'onde d'excitation de 340 nm et d'émission de 450 nm pendant quatre heures à des intervalles de 45 secondes.
- 7) L'analyse des données pourrait être effectuée à l'aide du logiciel Microsoft® Excel®. Il y a lieu de générer les courbes pour la thrombine et la plasmine en calculant la moyenne à chaque point temporel pour les puits de plasma dupliqués, en soustrayant les valeurs de lecture du blanc (pour la thrombine et la plasmine séparément). Paramètres à calculer dans les deux tests, à l'aide des outils de l'application Shiny : début (temps jusqu'au point d'inflexion avant l'augmentation de la turbidité), vitesse maximale (pente d'une ligne ajustée à la vitesse maximale d'augmentation de la turbidité en utilisant 5 à 10 points pour déterminer la ligne), temps jusqu'au plateau/pic (temps jusqu'au plateau de turbidité [formation d'un caillot] ou au pic [fibrinolyse]), variation de la turbidité (turbidité maximale du caillot moins la turbidité de départ) et aire sous la courbe (AUC) (calculée comme la somme des trapézoïdes formés par les courbes de turbidité).

Références

- Draxler DF, Medcalf RL. The fibrinolytic system-more than fibrinolysis? *Transfus Med Rev* 2015; 29(2): 102-109.
- Holle LA, Pantazis JC, Turecek PL, Wolberg AS. Clot formation and fibrinolysis assays reveal functional differences among hemostatic agents in hemophilia A plasma. *Res Pract Thromb Haemost* 2024; 8(1): 102337.
- Ilich A, Bokarev I, Key NS. Global assays of fibrinolysis. *Int J Lab Hematol* 2017; 39(5): 441-447.
- Kwaan H, Lisman T, Medcalf RL. Fibrinolysis: Biochemistry, clinical aspects, and therapeutic potential. *Semin Thromb Hemost* 2017; 43(2): 113-114.
- Longstaff C. Development of Shiny app tools to simplify and standardize the analysis of hemostasis assay data: Communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2017; 15(5): 1044-1046.
- Longstaff C. Measuring fibrinolysis: From research to routine diagnostic assays. *J Thromb Haemost* 2018; 16(4): 652-662.
- Longstaff C, Kolev K. Basic mechanisms and regulation of fibrinolysis. *J Thromb Haemost* 2015; 13 Suppl 1: S98-105.
- Longstaff C, Thelwell C, Williams SC, Silva MM, Szabó L, Kolev K. The interplay between tissue plasminogen activator domains and fibrin structures in the regulation of fibrinolysis: Kinetic and microscopic studies. *Blood* 2011; 117(2): 661-668.
- Miszta A, Huskens D, Donkervoort D, Roberts MJM, Wolberg AS, de Laat B. Assessing plasmin generation in health and disease. *Int J Mol Sci* 2021; 22(5): 1-17.
- Zheng Z, Mukhametova L, Boffa MB, Moore EE, Wolberg AS, Urano T, Kim PY. Assays to quantify fibrinolysis: Strengths and limitations. Communication from the International Society on Thrombosis and Haemostasis Scientific and Standardization Committee on fibrinolysis. *J Thromb Haemost* 2023; 21(4): 1043-1054.

SUJETS ABORDÉS

- ✓ Hémostase développementale
- ✓ Paramètres de la coagulation chez les nouveau-nés et les enfants par rapport aux adultes

L'équilibre hémostatique pédiatrique, différent de celui des adultes, est un processus évolutif à mesure que le système hémostatique change et devient mature de la vie fœtale à la vie adulte, en particulier au cours des premiers mois de la vie. La compréhension du concept d'hémostase développementale, désormais universellement accepté, est essentielle pour assurer un diagnostic et un traitement optimaux des maladies hémorragiques et thrombotiques chez l'enfant.

Hémostase développementale : l'hémostase est un mécanisme complexe impliquant à la fois des facteurs procoagulants et anticoagulants. Elle permet en fin de compte au sang de rester liquide lorsqu'il circule dans des vaisseaux intacts. Elle empêche aussi à la fois des saignements excessifs en favorisant la formation de caillots après une lésion endothéliale et une coagulation excessive en limitant la formation de caillots au niveau d'une lésion. L'équilibre hémostatique dépend essentiellement de paramètres nombreux, dont les plaquettes ainsi que les facteurs et les inhibiteurs de la coagulation, même si les cellules endothéliales et sanguines jouent un rôle important. Les enfants ne sont pas seulement des adultes « miniatures », du moins pour l'hémostase, puisque l'équilibre hémostatique pédiatrique est différent de celui des adultes. De plus, il s'agit d'un processus évolutif, comme l'ont montré Andrew *et al.* (1987), il y a plus de 30 ans, tant chez les nourrissons prématurés que chez ceux nés à terme. Ces auteurs ont démontré que le système hémostatique changeait et se développait tout au long de la vie fœtale et jusqu'à l'âge adulte, principalement au cours des premiers mois de la vie, et ont mis en avant le concept d'« hémostase développementale ». Les facteurs de coagulation d'origine maternelle ne sont pas en mesure de franchir la barrière placentaire en raison de leur taille. La synthèse par le fœtus des facteurs de coagulation commence tôt (à savoir au cours de la cinquième semaine de gestation pour le fibrinogène) et le sang est coagulable après onze semaines de gestation. Les plages de référence fœtales pour les paramètres de la coagulation ont été étudiées dans différents groupes d'âge gestationnel, et les taux plasmatiques médians se situaient, chez les fœtus âgés de 19 à 23 semaines, entre 10 et 30 % des valeurs adultes en fonction du paramètre évalué, augmentant progressivement jusqu'à des taux compris entre 10 et 50 % entre 30 et 38 semaines de gestation. Les premiers résultats d'Andrew *et al.* (1987) ont été confirmés par plusieurs études évaluant différentes populations pédiatriques dans des conditions techniques variées (c.-à-d. combinaisons de réactifs/analyseurs). Les critères de sélection des sujets étaient relativement homogènes entre ces études, certaines avaient cependant des critères d'inclusion/non-inclusion et des groupes d'âge légèrement différents. La principale différence entre les études était le nombre de sujets évalués dans chaque groupe d'âge, qui variait de 10 à plus de 500. Le processus de prélèvement, point clé à prendre en compte puisque le prélèvement de sang chez les nourrissons ou les nouveau-nés pourrait être plus problématique que chez les adultes, était comparable dans les différentes études, le sang étant prélevé par ponction veineuse dans des tubes contenant du citrate à 3,2 % (1 vol./9 vol.) au moyen d'aiguilles de calibre 18 à 24, en fonction de l'âge des patients. La plupart de ces études se sont principalement concentrées sur les dosages de l'activité pour la majorité des paramètres impliqués dans le système de coagulation, tandis qu'une seule étude a évalué les concentrations d'antigènes de divers

analytes. L'ensemble de ces études ont montré que, à la naissance, les taux plasmatiques de la majeure partie des protéines de la coagulation étaient d'environ la moitié de ceux mesurés chez l'adulte, à l'exception du FVIII:C et du FW, qui sont élevés, les nourrissons prématurés ayant des taux inférieurs à ceux des nourrissons nés à terme. Les valeurs adultes étaient atteintes à quelques mois de vie et jusqu'à l'âge de 16 ans pour des paramètres spécifiques tels que le facteur de coagulation VII ou la protéine C, comme indiqué dans le tableau 39. Alors que la tendance globale est cohérente entre les études, les différences en valeurs absolues sont probablement dues à des différences dans les réactifs et/ou les instruments utilisés pour mesurer ces paramètres, en particulier les tests de coagulation généraux tels que le TP ou le TCA. Le sous-comité du comité scientifique et de normalisation de l'ISTH recommande donc que chaque laboratoire définisse ses plages de référence en fonction de l'âge, selon les conditions techniques qui lui sont propres. Pour se conformer à la ligne directrice EP28-A3c (anciennement C28-A3c) du *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), les plages de référence doivent être établies en testant au moins 30 personnes différentes, dans chaque groupe d'âge. L'obtention de suffisamment de plasma pour effectuer de nombreux tests auprès d'un grand nombre d'enfants « apparemment » sains soulève des problèmes logistiques qui dépasseraient de loin les capacités de nombreux laboratoires. Pour contourner cette difficulté, il est courant de se référer aux données de la littérature, en tenant compte de conditions techniques identiques, même si le processus pré-analytique, et en particulier le prélèvement de sang, pourrait être différent de celui utilisé dans un établissement donné. Les conditions techniques (c'est-à-dire la combinaison de réactifs et d'instruments) utilisées dans les principales publications sont rapportées dans le tableau 40. L'hémostase primaire a été moins étudiée. Cependant, la numération plaquettaire est généralement normale ou élevée à la naissance, atteignant les valeurs adultes dans l'année qui suit les hausses transitoires. Malgré l'hyporéactivité des plaquettes, en particulier en période néonatale, le temps de saignement et le temps d'occlusion (PFA100®) se sont révélés être plus courts chez les nouveau-nés, suggérant un potentiel hémostatique accru. La normalisation a eu lieu avant la fin du premier mois de vie. Ont été rapportés chez les nouveau-nés des taux de FW significativement plus élevés, qui ont ensuite baissé pour atteindre les valeurs adultes après une année de vie, à un moment où apparaît la hausse significative des taux plasmatiques dans les groupes sanguins non O par rapport aux groupes sanguins O.

Conclusions

La compréhension du concept d'hémostase développementale, désormais universellement accepté, est essentielle pour assurer une prévention, un diagnostic et un traitement optimaux des maladies hémorragiques et thrombotiques chez l'enfant. Il est donc obligatoire que le laboratoire utilise des plages de référence spécifiques à l'âge pour les paramètres de coagulation. Il semble impossible de demander à chaque laboratoire d'établir ses propres intervalles de référence pour chaque paramètre de coagulation dans les conditions techniques qui lui sont propres, impliquant de tester au moins 120 personnes saines dans chaque groupe d'âge, comme le recommande la ligne directrice EP28-A3c (anciennement C28-A3c) du CLSI. Par conséquent, la meilleure option pour un laboratoire serait de traduire les résultats de la littérature en plages de référence locales pour les nouveau-nés et les enfants, en tenant compte de son environnement technique spécifique. À cet égard, des données sont déjà disponibles pour les combinaisons de réactifs et d'analyseurs des fabricants actuels. Dans le cas des nouveaux arrivants, il conviendrait de réaliser des études spécifiques, de préférence multicentriques, afin d'établir les plages de référence pédiatriques spécifiques à l'aide de ces nouvelles combinaisons de réactifs et analyseurs.

Tableau 39. Paramètres de la coagulation chez les nouveau-nés et les enfants par rapport aux adultes : synthèse des résultats de test et de l'effet potentiel sur l'hémostase (d'après Toulon *et al.*, 2016)

Composant	Paramètre	Période néonatale (valeur moyenne)*	Normalisation	Impact sur l'hémostase
Hémostase primaire	Plaquettes FW Temps d'occlusion (PFA100®)	Normal ou augmentation Augmentation (153 %)* Raccourcissement	1 an (après les hausses transitoires) 3 mois 2 à 4 semaines	Hémostase primaire renforcée
Coagulation	FII, FVII, FIX, FX, FXI, FXII, PK, KHPM FV FVIII Fibrinogène TP TCA	Baisse (40-66 %)* Baisse (37-54 %)* Normal ou baisse (70 %)* Normal ou augmentation (100 %)* Normal** Allongement ou normal Allongement	1 an (jusqu'à 16 ans pour FVII) 1 an 1 an (jusqu'à 16 ans) 1 mois 1 an 1 an 1 an (jusqu'à 16 ans)	Potentiel de coagulation réduit
Inhibiteurs naturels de la coagulation	Antithrombine Protéine C Protéine S	Baisse (63 %) Baisse (35 %) Baisse (36 %)*	3 mois 16 ans 3 mois	Potentiel régulateur/inhibiteur réduit
Fibrinolysis	Plasminogène Alpha-2-antiplasmine tPA D-dimère	Baisse (36 %)* Normal ou baisse (85 %)* Augmentation Augmentation	6 mois 6 mois 1 semaine 16 ans	Augmentation de l'activité fibrinolytique

* En pourcentage (%) des valeurs adultes, d'après Andrew *et al.* (1987). ** Le fibrinogène fœtal peut être présent.

Tableau 40. Conditions techniques (marques d'instruments et de réactifs) utilisées dans les principales études rapportant les valeurs habituelles des paramètres de coagulation dans les populations pédiatriques (* indique que l'instrument et/ou les réactifs ne sont plus disponibles dans le commerce)

Auteurs	Instruments	Réactifs
Andrew <i>et al.</i> (1987, 1988)	ACL (Werfen)*	Divers*
Flanders <i>et al.</i> (2005, 2006)	STA-R (Stago)BCS (Siemens)	Principalement Stago
Monagle <i>et al.</i> (2006, 2011)	STA Compact (Stago)	Stago
Apple <i>et al.</i> (2012)	BCS (Siemens)CA-1500 (Sysmex)	Siemens
Attard <i>et al.</i> (2013)	Lecteur de microplaques	Stago
Toulon <i>et al.</i> (2016)	ACL TOP 500/700 (Werfen)	Siemens

Références

- Andrew M. Developmental hemostasis: Relevance to hemostatic problems during childhood. *Semin Thromb Hemost* 1995; 21(4): 341-356.
- Andrew M, Paes B, Milner R, Johnston M, Mitchell L, Tollesen DM, Powers P. Development of the human coagulation system in the full-term infant. *Blood* 1987; 70(1): 165-172.
- Andrew M, Paes B, Milner R, Johnston M, Mitchell L, Tollesen DM, Castle V, Powers P. Development of the human coagulation system in the healthy premature infant. *Blood* 1988; 72(5): 1651-1657.
- Andrew M, Vegh P, Johnston M, Bowker J, Ofori F, Mitchell L. Maturation of the hemostatic system during childhood. *Blood* 1992; 80(8): 1998-2005.
- Appel IM, Griminck B, Geerts J, Stigter R, Cnossen MH, Beishuizen A. Age dependency of coagulation parameters during childhood and puberty. *J Thromb Haemost* 2012; 10(11): 2254-2263.
- Attard C, van der Straaten T, Karlaftis V, Monagle P, Ignjatovic V. Developmental hemostasis: Age-specific differences in the levels of hemostatic proteins. *J Thromb Haemost* 2013; 11(10): 1850-1854.
- Flanders MM, Crist RA, Roberts WL, Rodgers GM. Pediatric reference intervals for seven common coagulation assays. *Clin Chem* 2005; 51(9): 1738-1742.
- Flanders MM, Phansalkar AR, Crist RA, Roberts WL, Rodgers GM. Pediatric reference intervals for uncommon bleeding and thrombotic disorders. *J Pediatr* 2006; 149(2): 275-277.
- Horowitz GL, Altaie S, Boyd JC, Ceriotti F, Garg U, Horn P, Pasce A, Sine HE, Zakowski J. CLSI Document EP28-A3C. Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline—Third Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA. 2010; Vol.28, n°30.
- Ignjatovic V, Kenet G, Monagle P; Perinatal and Paediatric Haemostasis Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Developmental hemostasis: Recommendations for laboratories reporting pediatric samples. *J Thromb Haemost* 2012; 10(2): 298-300.
- Lippi G, Franchini M, Montagnana M, Guidi GC. Coagulation testing in pediatric patients: The young are not just miniature adults. *Semin Thromb Hemost* 2007; 33(8): 816-820.
- Monagle P, Barnes C, Ignjatovic V, Furmedge J, Newall F, Chan A et al. Developmental haemostasis. Impact for clinical haemostasis laboratories. *Thromb Haemost* 2006; 95(2): 362-372.
- Monagle P, Massicotte P. Developmental haemostasis: Secondary haemostasis. *Semin Fetal Neonatal Med* 2011; 16(6): 294-300.
- Roschitz B1, Sudi K, Köstenberger M, Muntean W. Shorter PFA-100 closure times in neonates than in adults: Role of red cells, white cells, platelets and von Willebrand factor. *Acta Paediatr* 2001; 90(6): 664-670.
- Toulon P. Developmental hemostasis: Laboratory and clinical implications. *Int J Lab Hematol* 2016; 38 Suppl 1: 66-77.
- Toulon P, Berruyer M, Brionne-François M, Grand F, Lasne D, Telion C, Arcizet J, Giacomello R, De Pooter N. Age dependency for coagulation parameters in pediatric populations. Results of a multicenter study aimed at defining the age-specific reference ranges. *Thromb Haemost* 2016(1); 116: 9-16.
- Williams MD, Chalmers EA, Gibson BE; Haemostasis and Thrombosis Task Force, British Committee for Standards in Haematology. The investigation and management of neonatal haemostasis and thrombosis. *Br J Haematol* 2002; 119(2): 295-309.

SUJETS ABORDÉS

- ✓ Caractéristiques moléculaires des gènes et des protéines liés à l'hémophilie
- ✓ Spectre des variantes causales dans l'hémophilie
- ✓ Autres phénotypes associés au gène F8
- ✓ Autres phénotypes associés au gène F9
- ✓ Protection contre la thrombose veineuse profonde (TVP)
- ✓ Spectre des approches pratiques appliquées aux tests génétiques
- ✓ Nomenclature normalisée et potentiel pathogène des variantes

L'analyse génétique de l'hémophilie est importante pour définir la cause sous-jacente du trouble de la coagulation chez les personnes affectées et les membres de leur famille. La compréhension de la variante génétique associée au phénotype peut aider à prédire la sévérité du trouble, y compris le risque de développement d'inhibiteurs. Elle contribue également à identifier les porteuses de l'hémophilie, qui peuvent se voir proposer un diagnostic prénatal. Il est important que les personnes soumises à une évaluation génétique bénéficient au préalable d'un conseil génétique approprié. Les récentes Lignes directrices pour la prise en charge de l'hémophilie de la FMH (3^e édition) (Srivastava *et al.*, 2019) comportent un chapitre consacré à l'évaluation génétique des personnes atteintes d'hémophilie A et B. Cette partie du présent manuel de laboratoire décrit la base génétique de l'hémophilie A et B et met en évidence l'hétérogénéité des approches pratiques actuellement disponibles dans le monde susceptibles d'être utilisées pour étudier les variantes génétiques sous-jacentes. Elle détaille aussi le recours à une nomenclature normalisée pour la description des variantes génétiques, et la classification de leur pathogénicité, et souligne l'importance d'un bilan d'interprétation clair et concis qui reprend le résultat génétique et les implications pour la personne et sa famille.

Caractéristiques moléculaires des gènes et des protéines liés à l'hémophilie : les caractéristiques moléculaires des gènes de l'hémophilie, F8 et F9, sont présentées au tableau 41. Le tableau 41 montre les coordonnées génomiques sur GRCh38 (hg38), la taille des gènes et la localisation cytogénétique de F8 et F9, la complexité de leur structure (nombre d'exons), les versions organisées mises à jour des fichiers RefSeq (c.-à-d. NG_..., NM_..., NP_...), et la taille moléculaire pertinente des principales transcriptions des gènes et de leurs isoformes polypeptidiques dérivées.

Tableau 41. Caractéristiques moléculaires des gènes F8 et F9

Symbol officiel HGNC	Nom du gène	Localisation cytogénétique	GRCh38 (hg38) (coordonnées) NC_000023.11 (longueur [pb])	Génomique RefSeq (plage de coordon- nées)	Transcription principale* RefSeq (lon- gueur [nts]) (exons)	Protéine principale* RefSeq (lon- gueur [aa])	N° OMIM
F8	Facteur de coagulation VIII	Xq28	complément (154,835,792- 155,022,723) (186,931)	NG_011403.2 (5,001-191,932)	NM_000132.4 (9032) (26)	NP_000123.1 (2351)	300841
F9	Facteur de coagulation IX	Xq27.1	(139,530,739- 139,563,459) (32,720)	NG_007994.1 (5,001-37,723)	NM_000133.4 (2800) (8)	NP_000124.1 (461)	300746

HGNC : comité de nomenclature des gènes HUGO. Longueur [unités] : [pb], paires de base ; [nts], nucléotides ; [aa], acides aminés. * Seul le variant de transcription le plus long (le plus significatif) et son isoforme principale dérivée sont indiqués. OMIM, *Online Mendelian Inheritance in Man* (<https://omim.org/>) ; n°, numéro d'accès. Les données ont été collectées auprès du NCBI (National Center from Biotechnology Information), consulté le 18 janvier 2024 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). RefSeq indique les fichiers de référence pour les séquences de la plateforme de navigation du NCBI.

De plus, le tableau 42 présente les caractéristiques les plus pertinentes des protéines des facteurs de coagulation VIII et IX. Il compile les données des principales isoformes des protéines, la cartographie des acides aminés (aa) des domaines des protéines reconnaissables (spécifiées par la base de données UNIPROT) et les fichiers de la base de données des protéines (PDB) associés aux modèles de structure 3D (coordonnées tridimensionnelles des atomes FVIIIa et FIXa).

Tableau 42. Caractéristiques moléculaires des protéines des facteurs de coagulation VIII et IX

Symbol de la protéine	Nom de la protéine isoforme principale	Isoforme RefSeq (longueur [aa])	N° UNIPROT*	Domaines des isoformes : UNIPROT (coordonnées aa)	Structure 3D ID PDB (coordonnées aa)
FVIII	Facteur de coagulation VIII isoforme 1 préprotéine	NP_000123.1 (2351)	P00451	Peptide signal : (1-19) A1 : F5/8 type A 1 (20-348) A2 : F5/8 type A 2 (399-730) B : région B (760-1667) A3 : F5/8 type A 3 (1713-2040) C1 : F5/8 type C 1 (2040-2188) C2 : F5/8 type C 2 (2193-2345)	FVIIIa mature 2R7E. pdb** A : chaîne lourde A1-A2 (traditionnellement 1-725) B : chaîne légère A3-C1-C2 (traditionnellement 1689-2332)
FIX	Facteur de coagulation IX isoforme 1 préprotéine	NP_000124.1 (461)	P00740	Peptide signal : (1-28) – Propeptide : (29-46) Gla : riche en γ-carboxyglutamate (47-92) EGF1 : EGF-like de liaison au Ca++ 1 (93-129) EGF2 : EGF-like 2 (130-171) Act_peptide : peptide d'activation (192-226) Tryp_SPc : protéase sérine de type trypsine (227-457)	Homology model FIXa.pdb*** L : chaîne légère Gla-EGF1-EGF2 (47-171) H: chaîne lourde Tryp_SPc (227-461)

* Base de données de séquences de protéines UNIPROT (URL : <https://www.uniprot.org/>). ** Shen et al, 2008. *** Directeurs du projet de bases de données de variantes EAHAD (Rallapalli et al., 2013 ; McVey et al., 2020). La plupart des données ont été collectées à partir des bases de données sur les variantes des facteurs de coagulation de l'EAHAD (*European Association for Haemophilia and Allied Disorders*) (URL : <https://dbs.eahad.org/>) consultées le 18 janvier 2024. Les codons et les acides aminés (aa) sont numérotés selon les règles de la *Human Genome Variation Society* (HGVS) (à savoir codon +1 codant pour le premier résidu (Met) du polypeptide primaire dans le FVIII et le FIX). Dans la numérotation traditionnelle, le codon/ acide aminé +1 fait référence à celui codant pour le premier acide aminé de la protéine FVIII mature (à l'exclusion de 19 aa du peptide signal) et de la protéine FIX (à l'exclusion de 46 aa du peptide signal et du pro-peptide). Bien que la numérotation de l'HGVS soit recommandée, la numérotation traditionnelle a été largement utilisée dans les publications antérieures.

Spectre des variantes causales dans l'hémophilie : la plupart des variantes pathogènes affectant le gène F8 provoquent l'hémophilie A, tandis que la plupart des variantes pathogènes de F9 provoquent l'hémophilie B. La base de données *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) (<https://www.omim.org>) compile un vaste ensemble d'informations complètes sur les gènes humains, indique les variantes affectant leur fonction et décrit et classe les phénotypes qui leur sont associés. Elle indique que les variantes F8 sont associées à deux phénotypes différents : hémophilie A (n° 306700) et thrombophilie 13 (liée au chromosome X, due à une anomalie de FVIII) (n° 301071) (THPH13) ; tandis que pour F9, il y a quatre phénotypes : hémophilie B (n° 306900), thrombophilie 8 (liée au chromosome X, en raison d'une anomalie de FIX) (n° 300807) (THPH8), protection contre la thrombose veineuse profonde (TVP) (n° 300807) et sensibilité à la warfarine (n° 301052). Les tableaux 43 et 44, respectivement, présentent le spectre des mutations de F8 à l'origine de l'hémophilie A selon les taux d'activité du facteur de coagulation VIII (FVIII:C), ainsi que des mutations de F9 provoquant l'hémophilie B, associées aux taux du facteur IX (FIX:C). La majeure partie des prévalences relatives des variantes causales de l'hémophilie A et B, répertoriées dans les tableaux 43 et 44, ont été extraites des bases de données de l'EAHAD. La base de données des variantes de F8 de l'EAHAD exclut les inversions prévalentes associées à l'hémophilie A sévère impliquant près de la moitié des patients. Afin de présenter une prévalence non biaisée des mutations à l'origine de l'hémophilie A sévère, leurs fréquences relatives ont été fusionnées en tenant compte des moyennes mondiales des inversions de l'intron 22 de F8 (Inv22) rapportées par Antonarakis *et al.* (1995), et de celles estimées pour l'inversion de l'intron 1 du gène F8 (Inv1) à partir d'une série internationale de patients atteints d'hémophilie A (Rossetti *et al.*, 2004) (tableau 43).

Tableau 43. Variantes de F8 à l'origine de l'hémophilie A les plus typiques chez les patients hémizygotes provenant de sources internationales

Type de variante par effet	Sévère non-inversions Nb de cas (%)	Sévère total Nb de cas (%)	Modéré Nb de cas (%)	Mineur Nb de cas (%)	Références
Faux-sens	1418 (30,2)	(16,2)	1340 (79,9)	3048 (95,8)	F8_var_db EAHAD*
Sans décalage du cadre de lecture-indel	70 (1,5)	(0,8)	19 (1,1)	32 (1,0)	F8_var_db EAHAD*
Décalage du cadre de lecture-indel	1487 (31,7)	(17,0)	142 (8,5)	27 (0,9)	F8_var_db EAHAD*
Anomalie d'épissage	320 (6,8)	(3,7)	98 (5,8)	68 (2,1)	F8_var_db EAHAD*
Non-sens	968 (20,6)	(11,1)	59 (3,5)	4 (0,1)	F8_var_db EAHAD*
Grande délétion (SV)	426 (9,1)	(4,9)	19 (1,1)	3 (0,1)	F8_var_db EAHAD*
Total non-inversions	4689 (100)	(53,7)	1677 (100)	3182 (100)	F8_var_db EAHAD*
Inv22 (SV) type 1		740 (35,4)			Antonarakis <i>et al.</i> , 1995
Inv22 (SV) type 2		140 (6,7)			
Inv22 (SV) autres types		25 (1,1)			
Total Inv22		2093 (43,2)			
Inv1 (SV)		19 (3,1)			Rossetti <i>et al.</i> , 2004
Total Inv1		622 (3,1)			

SV indique les variantes structurelles, y compris les variations du nombre de copies (CNV) comme les grandes délétions de F8, les grandes inversions de F8 (non-CNV), l'inversion de l'intron 22 (Inv22) et l'inversion de l'intron 1 (Inv1). Les données des patients pour lesquels il n'y a pas d'informations sur les inversions du gène F8 proviennent des bases de données de l'EAHAD enregistrant des patients individuels. * Base de données des variantes de F8 (<http://f8-db.eahad.org/>).

La variante la plus caractéristique et la plus récurrente provoquant une hémophilie A sévère dans le monde est l'inversion de l'intron 22 de F8, une grande inversion parfaite de 600 kb médiée par la recombinaison entre des répétitions inversées de 10 kb (int22h ou h), perturbant la structure de F8 et empêchant l'épissage normal de l'ARN entre les exons 22 et 23 (Lakich et al., 1993 ; Naylor et al., 1993). Il existe une copie intragénique d'int22h dans l'intron 22 (h1) et deux copies extragéniques (h2 et h3). En fonction de la copie extragénique qui se recombine avec la copie intragénique, l'Inv22 présente un schéma de type 1 (h1/h3) ou de type 2 (h1/h2). L'Inv22 provient presque exclusivement des cellules germinales mâles (Rossiter et al., 1995) et, par conséquent, la majorité des mères des personnes avec Inv22 sont porteuses (Tizzano et al., 1995). Le mécanisme moléculaire de la recombinaison homologue non allélique entre les grandes répétitions inversées dans la méiose masculine étaye la récurrence d'Inv22 comme cause la plus répandue de l'hémophilie A sévère dans le monde (tableau 43). De même, l'inversion de l'intron 1 du gène F8 (Inv1) est une grande inversion parfaite de l'ADN due à la recombinaison entre des répétitions inversées de 1 kb (int1h), perturbant la structure de F8 au niveau de l'intron 1 (Bagnall et al., 2001) et impliquant une moyenne estimée de 3 % de patients atteints d'hémophilie A sévère dans le monde (tableau 43).

Le groupe restant de patients atteints d'hémophilie A sévère, modérée ou mineure (tableau 43), pour lesquels on ne dispose pas des informations escomptées pour les inversions de F8, ainsi que tous les patients atteints d'hémophilie B (tableau 44) présentent un spectre typique de variantes délétères, comme des substitutions de nucléotides uniques (SNV) prédisant les anomalies de faux-sens, de non-sens ou d'épissage ; de petites insertions/délétions (indel) prédisant les décalages du cadre de lecture ou les changements sans décalage ; ou, moins fréquemment, les grandes variations du nombre de copies (CNV), principalement les grandes délétions.

Tableau 44. Variantes de F9 à l'origine de l'hémophilie B les plus typiques chez les patients hémizygotes provenant de sources internationales

Type de variante par effet	Sévère Nb de cas (%)	Modéré Nb de cas (%)	Mineur Nb de cas (%)	Références
Faux-sens	999 (52,3)	1039 (85,1)	719 (95,0)	F9_var_db EAHAD*
Sans décalage du cadre de lecture-indel	27 (1,4)	9 (0,7)	1 (0,1)	F9_var_db EAHAD*
Décalage du cadre de lecture-indel	185 (9,7)	42 (3,4)	2 (0,3)	F9_var_db EAHAD*
Anomalie d'épissage	135 (7,1)	66 (5,8)	30 (4,0)	F9_var_db EAHAD*
Non-sens	459 (24,0)	62 (5,1)	5 (0,7)	F9_var_db EAHAD*
Grande délétion (SV)	107 (5,6)	3 (0,3)		F9_var_db EAHAD*
Total	1912 (100)	1221 (100)	757 (100)	F9_var_db EAHAD*

SV indique les variantes structurelles comme les grandes délétions affectant partiellement ou totalement le gène F9. Les données des patients atteints d'hémophilie B ont été obtenues à partir des bases de données de l'EAHAD enregistrant des patients individuels. * Base de données des variantes de F9 (<https://f9-db.eahad.org/>).

Les informations sur les variantes de F8 et F9 sont compilées dans des bases de données accessibles au public, telles que celles développées par les CDC (Centers for Disease Control and Prevention) nommées CHAMP et CHBMP pour l'hémophilie A et l'hémophilie B, respectivement (<https://www.cdc.gov/ncbddd/hemophilia/champs.html>), et par l'EAHAD pour F8 (<http://f8-db.eahad.org/>) et F9 (<http://f9-db.eahad.org/>) (tableaux 43 et 44). Consultées le 18 janvier 2024, les bases de données de l'EAHAD contiennent des informations provenant de 3052 variantes de F8 uniques correspondant à 10 144 cas individuels, et de 1244 variantes de F9 uniques correspondant à 4713 cas individuels. Dans les tableaux 43 et 44, les variantes génétiques sont classées selon leur effet prédit à partir des données probantes de la séquence nucléotidique de l'ADN observée (c.-à-d. faux-sens, sans décalage du cadre de lecture-indel, décalage du cadre de lecture-indel, anomalie d'épissage, non-sens, grande délétion). Les variantes de F8 et F9,

respectivement, énumérées dans les tableaux 43 et 44 représentent les variantes causales de l'hémophilie avec des fréquences significatives dans le monde entier, par rapport aux variantes prévalentes constatées dans des populations particulières généralement associées à des phénotypes non sévères (p. ex. duplication de l'exon 13 de F8 prévalente dans la population italienne d'hémophilie A mineure, Acquila *et al.*, 2004).

Autres phénotypes associés au gène F8

Thrombophilie 13 (liée au chromosome X, due à une anomalie de FVIII) : Shen *et al.* (2013) ont évalué les taux d'activité FVIII:C et le nombre de copies du gène F8 chez les patients atteints de thrombo-embolie veineuse (TEV) par rapport aux témoins sains. Les patients atteints de TEV ont montré un FVIII:C significativement plus élevé et un plus grand nombre de copies du gène F8. Simioni *et al.* (2021) ont fait état de deux familles italiennes atteintes de thrombophilie 13 et identifié une duplication en tandem de F8 partielle, ce qui est cohérent avec le mode de transmission dominant lié au chromosome X, car les patients hémizygotes de sexe masculin sont plus gravement touchés que les femmes porteuses.

Autres phénotypes associés au gène F9

La thrombophilie 8 (due à une anomalie de FIX) est un phénotype héréditaire récessif lié au chromosome X, associé à une TEV d'apparition précoce due à un défaut de faux-sens de F9, R338L ou une variante Padoue, rapporté par Simioni *et al.* (2009). Il a été signalé que le FIX Padoue améliorait la résistance fibrinolytique des caillots plasmatiques (Ammollo *et al.*, 2014).

Protection contre la thrombose veineuse profonde (TVP) :

La variante polymorphe commune FIX Mälmo (fréquence des allèles mineurs de 0,32), p.(Thr148Ala) en raison d'une SNV G>A, s'associe à une protection contre le risque de TVP avec un odds ratio de 0,8 chez les hommes et de 0,89 chez les femmes (Bezemer *et al.*, 2008). Cependant, les mécanismes moléculaires de protection contre la TVP conférés par le polymorphisme FIX Mälmo sont restés inconnus.

La warfarine est un anticoagulant largement prescrit pour la prévention des événements thrombo-emboliques chez les patients « à risque ». La sensibilité à la warfarine (liée au chromosome X, due à des variantes de FIX) fait référence à une complication du phénotype hémorragique pendant une anticoagulothérapie avec des antagonistes de la vitamine K. Pezeshkpoor *et al.* (2018) ont fait état d'une association entre les variantes faux-sens de F9 affectant le pro-peptide, tels que p.(Ala37Thr) et p.(Ala37Val), et la sensibilité à la warfarine caractérisée par une réduction disproportionnée des taux de FIX:C au cours d'une anticoagulothérapie.

La relation de cause à effet entre une variante génétique donnée (par exemple Inv22 de F8) et un phénotype particulier (par exemple l'hémophilie A sévère chez un patient hémizygote) peut dans de rares cas être modifiée par l'implication d'un mosaïcisme génétique, défini comme la coexistence chez une personne d'au moins deux clones génétiquement différents (par exemple des cellules Inv22 positives et négatives). Un mosaïcisme génétique peut partiellement ou totalement impliquer certains ou tous les organes/tissus d'une personne affectée, entraînant notamment des phénotypes plus légers s'il affecte les cellules somatiques (p. ex. cellules productrices de FVIII/FIX dérivées de l'endothélium hépatique) et l'héritabilité de la variante du gène s'il affecte les cellules germinales (p. ex. un patient de sexe masculin atteint d'hémophilie avec mosaïque germinale pourrait être le père de filles non porteuses) (Abelleyro *et al.*, 2018).

En tant que paradigmes historiques des troubles récessifs liés au chromosome X, l'hémophilie A (OMIM n° 306700) et l'hémophilie B (OMIM n° 306900) s'expriment généralement chez les hommes hémizygotes (46,XY), et les femmes hétérozygotes (46,XX), généralement asymptomatiques. Selon un point de vue consensuel parmi les hématologues, une nouvelle classification de l'hémophilie féminine prend en compte les taux d'activité de coagulation des facteurs, indiquant une maladie sévère en présence de < 1 UI/dl, modérée de 1 à 5 UI/dl et mineure de 5 à 40 UI/dl ; et lorsque les taux sont > 40 UI/dl, les personnes sont classées comme porteuses symptomatiques et asymptomatiques (van Galen *et al.*, 2021). La base moléculaire de l'hémophilie féminine implique l'expression altérée ou le silence des allèles de F8 ou F9

médiés par le phénomène d'inactivation du chromosome X (ICX), qui réduit au silence l'expression des gènes en cis d'un X dans chaque cellule pour compenser les doses chez les hommes. L'ICX intervient tôt dans l'embryogenèse, normalement de manière aléatoire dans chaque cellule, et cet état est à hérédité clonale chez les femmes dans leur vie adulte. On s'attend à ce qu'une femme porteuse homozygote et une personne hétérozygote composite expriment l'hémophilie, de même que personnes porteuses hétérozygotes avec ICX biaisée réduisant préférentiellement au silence l'allèle normal (Radic et al., 2015). De plus, Garagiola et al. (2021) ont démontré une association significative entre les taux d'activité de coagulation des FVIII/FIX et le profil d'ICX mesuré dans les leucocytes du sang périphérique de personnes porteuses de l'hémophilie A hétérozygotes avec ≤ 50 UI/dl.

Spectre des approches pratiques appliquées aux tests génétiques : en fonction de la disponibilité des ressources et de l'expertise, il existe une variété de techniques qui peuvent servir à l'exploration des variantes génétiques associées à l'hémophilie A et B. Cette partie fournit des exemples de ces approches pratiques et des références, le cas échéant. Un certain nombre de techniques différentes sont disponibles pour l'étude de l'inversion de l'intron 22 de F8, notamment le southern blot, la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) à longue portée et la PCR à décalage inverse (Lakich et al., 1993 ; Liu et al., 1998 ; Bagnall et al., 2006 ; Rossetti et al., 2008 ; Abelleyro et al., 2016 ; Ding et al., 2016 ; Hudecova et al., 2017 ; Pan et al., 2014 ; Kumar et al., 2015 ; Edison et al., 2016). L'inversion de l'intron 1 du gène F8 peut être détectée par des techniques telles que la PCR double ou inverse (Bagnall et al., 2002 ; Rossetti et al., 2008). L'analyse des SNV dans F8 et F9 peut être réalisée par une gamme de techniques, y compris la PCR et le séquençage de Sanger, ou des technologies de séquençage à haut débit, telles que le séquençage de nouvelle génération (NGS) (Al-Allaf et al., 2019 ; Li et al., 2014 ; Lyu et al., 2016 ; Manderstedt et al., 2019 ; Edison et al., 2016). Lorsque les ressources sont limitées, une approche de dépistage avant le séquençage de Sanger pourrait être utilisée (Salviato et al., 2019), par exemple par analyse hétéroduplex utilisant l'électrophorèse sur gel sensible à la conformation (*conformation sensitive gel electrophoresis* ou CSGE). Pour l'analyse des CNV dans les gènes F8 et F9, il existe un certain nombre de techniques telles que la gap-PCR, l'amplification multiplex de sonde nucléique dépendant des ligatures (MLPA), la PCR en temps réel quantitative et la NGS (Rossetti et al., 2004 ; Payne et al., 2012 ; Costa et al., 2004 ; Belvini et al., 2017 ; Kinkle et al., 2017 ; You et al., 2013 ; Wu et al., 2014 ; Fernandez-Loper et al., 2007 ; Tizzano et al., 2005 ; Johnsen et al., 2017). Dans les cas d'hémophilie A et B où une variante génétique sous-jacente n'est pas trouvée dans les régions essentielles des gènes F8 ou F9 à l'aide des techniques décrites ci-dessus, l'analyse des régions introniques profondes à la recherche d'anomalies d'épissage potentielles peut être disponible par séquençage massivement parallèle (SMP) ciblé ou séquençage du génome entier (SGE) (Jourdy et al., 2018 ; Jourdy et al., 2020 ; Bach et al., 2015 ; Inaba et al., 2017 ; Castaman et al., 2011 ; Chang et al., 2019). L'analyse des liens peut aussi être envisagée dans le cadre d'études familiales où il n'y a pas de variante de gène F8 ou F9 identifiable (Sun et al., 2015). L'étude des personnes présentant des phénotypes atypiques susceptibles d'être dus à des rearrangements génomiques complexes peut se faire au moyen de l'analyse cytogénétique par biopuces (Jourdy et al., 2016 ; Jourdy et al., 2017 ; Janczar et al., 2016 ; Lannoy et al., 2018). L'analyse de l'inactivation du chromosome X peut être effectuée par un certain nombre de techniques telles que l'enzyme de restriction spécifique à l'état de méthylation, la PCR et l'analyse des fragments, ou d'autres techniques quantitatives (Nisen et al., 1989 ; Coleman et al., 1993 ; Johansson et al., 2023 ; Machado et al., 2014).

Nomenclature normalisée et potentiel pathogène des variantes : l'exactitude de la description univoque des variantes génétiques est essentielle pour la recherche et les soins cliniques. Pour répondre à cette exigence, le comité de la nomenclature des variantes de la *Human Genome Variation Society* (HGVS), sous l'égide de la *Human Genome Organization* (HUGO), a élaboré un ensemble de recommandations. Il s'agit notamment de décrire les variantes génétiques au niveau le plus élémentaire, le niveau de l'ADN, et d'éventuellement fournir en sus des descriptions au niveau de l'ARN et/ou des protéines, en général prédites à partir des données probantes sur l'ADN (<https://hgvs-no-menclature.org/stable/>) (den Dunnen et al., 2016). La nomenclature de l HGVS recommande une numérotation spécifique pour les positions des gènes indiquant le codon +1 codant pour le premier résidu (Met) du polypeptide primaire et le nucléotide

+1 pour le A du codon d'initiation AUG. Dans certaines publications antérieures sur l'hémophilie, la numérotation traditionnelle du codon/acide aminé +1 fait référence à celle codant pour le premier acide aminé de la protéine mature (c'est-à-dire dans la numérotation de l'HGVS, le codon 20 du FVIII et le codon 47 du FIX). Pour ajuster et normaliser la nomenclature des variantes en fonction de l'HGVS, le site Web Mutalyzer propose des algorithmes efficaces pour rechercher et vérifier leur description correcte à partir des recommandations de l'HGVS (<https://mutalyzer.nl/>) (Lefter et al., 2021). Il convient de classer toutes les variantes détectées en fonction de leur potentiel à provoquer le phénotype observé conformément aux lignes directrices produites par l'*American College of Medical Genetics and Genomics/Association for Molecular Pathology* (ACMG/AMP) (Richards et al., 2015). Les recommandations de l'ACMG peuvent être appliquées aux tests génétiques basés sur le séquençage de nouvelle génération ou conventionnel utilisés dans les laboratoires cliniques et comprennent un système de classification à cinq niveaux pour les variantes pertinentes pour les maladies mendéliennes : (1) pathogène, (2) probablement pathogène, (3) signification incertaine, (4) probablement bénin et (5) bénin. Pour parvenir à cette catégorisation, l'ACMG/AMP recommande une analyse approfondie (a) des données de population, (b) des données de calcul, (c) des données fonctionnelles et (d) des données de ségrégation.

Par exemple, l'analyse des variantes de F8 et F9 implique :

- (a) L'étude de la variante génotypée dans la population générale et sa fréquence chez les personnes hémizygotes, hétérozygotes, etc. en consultant gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>), ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) et les bases de données spécifiques aux gènes F8/HA et F9/HB, telles que celles de l'EAHAD et CHAMP (référencées ci-dessus).
- (b) L'application d'outils bioinformatiques *in silico* pour analyser les changements faux-sens en prédisant les éventuels changements structurels ou fonctionnels à l'aide de PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), MutationTaster (<https://www.mutationtaster.org/>) et Varsome (<https://varsome.com/>) entre autres ; ou pour évaluer les éventuelles anomalies d'épissage, tels que NNSplice (https://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html), NetGene2 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetGene2-2.42/>) et ESEFinder pour la recherche des différences dans les séquences d'activateur d'épissage exonique (ESE) (esefinder.ahc.umn.edu) ; et de nombreux autres outils de calcul pour estimer l'impact des variantes sur le promoteur, 5'- ou 3'-UTR, etc.
- (c) Les données expérimentales obtenues à partir d'études fonctionnelles *in vitro* et *in vivo* de la version mutée par rapport à la version normale à tester, ou une partie de celle-ci, fournissent des informations importantes pour établir l'impact d'une variante génétique.
- (d) Les données sur la ségrégation associées à un mode de transmission récessif lié au chromosome X et à la coségrégation avec l'hémophilie chez plusieurs membres de la famille touchés sont indicatives de la pathogénicité. En tenant compte de cette analyse, l'ACMG/AMP indique les critères de classification des variantes pathogènes considérant les données probantes comme très solides (PVS), solides (PS), modérées (PM) et favorables (PP) ; et les critères de classification de l'impact bénin ou neutre des variantes classant les preuves comme autonomes (BA), solides (BS) et favorables (BP). La classification finale dans une catégorie pour estimer la pathogénicité (1-5) résulte de la combinaison des scores de données probantes P_ et B_ (Richards et al., 2015).

Comptes rendus d'interprétation : les comptes rendus d'interprétation doivent être clairs et concis et aborder le diagnostic de la personne faisant l'objet de l'investigation. Au-delà de son principal objectif consistant à fournir une conclusion moléculaire générale en réponse à la question génétique, un compte rendu d'interprétation doit inclure suffisamment de détails pour permettre l'identification de la variante dans d'autres laboratoires (c.-à-d. indiquer les approches pratiques utilisées, les limites des techniques, la séquence de référence génomique utilisée et la classification de la pathogénicité selon les lignes directrices de l'ACMG, y compris les preuves appliquées pour la classification et les références ; Lignes directrices de l'ACGS, 2020 ; Deans et al., 2022 ; Claustres et al., 2014 ; Gomez et al., 2019). Les comptes rendus

d'interprétation doivent inclure des informations expliquant l'étendue réelle du diagnostic moléculaire en langage clair avec une indication précise des risques spécifiques de développer des phénotypes spécifiques dans la famille, par exemple.

Assurance qualité : dans les tests génétiques, l'assurance qualité couvre tous les aspects du processus de diagnostic, de l'extraction des acides nucléiques et des procédures analytiques à la classification et à la description des variantes détectées et à la production d'un compte rendu d'interprétation. Le contrôle interne de qualité (CIQ) des tests génétiques doit être effectué régulièrement pour s'assurer de la validité des résultats obtenus. Des programmes d'évaluation externe de la qualité (EEQ) formels sont disponibles pour s'assurer que le processus de diagnostic et les procédures de communication sont en accord avec d'autres laboratoires (*Genomics Quality Assessment* [GenQA] notamment et, en particulier, l'évaluation génétique de l'hémophilie par le *National External Quality Assessment Service Uni* [UK NEQAS] britannique). Il y a lieu que les laboratoires de génétique soient périodiquement soumis à une accréditation, le cas échéant, par rapport aux normes internationalement reconnues, par un organisme agréé. Cela garantit une prestation de qualité en matière de diagnostic génétique.

Références

- Abelleyro MM, Rossetti LC, Curto Mde L, Radic CP, Marchione VD, De Brasi CD. F8 intron 22 inversions and SNP rs73563631 in unrelated families with severe haemophilia A: Clinical features and gene testing implications. *Thromb Haemost* 2016; 115(3): 678-681.
- Abelleyro MM, Marchione VD, Elhelou L, Radic CP, Rossetti LC, Neme D, De Brasi CD. Somatic/germinal mosaicism of a F8 promoter deletion confounds clinical predictions in a family with haemophilia A: Key role of genotype quantitation. *Thromb Haemost* 2018; 118(3): 617-620.
- Acquila M, Pasino M, Lanza T, Bottini F, Molinari AC, Bicocchi MP. Duplication of exon 13 causes one third of the cases of mild hemophilia A in northern Italy. *Haematologica* 2004; 89(6): 758-759.
- Al-Allaf FA, Abduljaleel Z, Bogari NM, Owaïdah TMA, Taher MM, Athar M et al. Identification of six novel factor VIII gene variants using next generation sequencing and molecular dynamics simulation. *Acta Biochim Pol* 2019; 66(1): 23-31.
- Ammollo CT, Semeraro F, Colucci M, Simioni P. Factor IX-Padua enhances the fibrinolytic resistance of plasma clots. *Thromb Haemost* 2014; 111(2): 226-232.
- Antonarakis SE, Rossiter JP, Young M, Horst J, de Moerloose P, Sommer SS et al. Factor VIII gene inversions in severe hemophilia A: Results of an international consortium study. *Blood* 1995; 86(6): 2206-2212.
- Association for Clinical Genomic Science. ACGS Best Practice Guidelines for Variant Classification in Rare Disease. 2020. <https://www.acgs.uk.com/quality/best-practice-guidelines/>.
- Bach JE, Wolf B, Oldenburg J, Müller CR, Rost S. Identification of deep intronic variants in 15 haemophilia A patients by next generation sequencing of the whole factor VIII gene. *Thromb Haemost* 2015; 114(4): 757-767.
- Bagnall RD, Giannelli F, Green PM. Int22h-related inversions causing hemophilia A: A novel insight into their origin and a new more discriminant PCR test for their detection. *J Thromb Haemost*. 2006; 4(3): 591-598.
- Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood* 2002; 99(1): 168-174.
- Castaman G, Giacomelli SH, Mancuso ME, D'Andrea G, Santacroce R, Sanna S, Santagostino E, Mannucci PM, Goodeve A, Rodeghiero F. Deep intronic variations may cause mild hemophilia a. *J Thromb Haemost* 2011; 9(8): 1541-1548.
- Chang CY, Perng CL, Cheng SN, Hu SH, Wu TY, Lin SY, Chen YC. Deep intronic variant c.5999-277G>A of F8 gene may be a hot spot mutation for mild hemophilia A patients without mutation in exonic DNA. *Eur J Haematol* 2019; 103(1): 47-55.
- Claustres M, Kožich V, Dequeker E, Fowler B, Hehir-Kwa JY, Miller K et al. Recommendations for reporting results of diagnostic genetic testing (biochemical, cytogenetic and molecular genetic). *Eur J Hum Genet* 2014; 22(2): 160-170.
- Coleman R, Genet SA, Harper JI, Wilkie AO. Interaction of incontinentia pigmenti and factor VIII mutations in a female with biased X inactivation, resulting in haemophilia. *J Med Genet* 1993; 30(6): 497-500.

- Deans ZC, Ahn JW, Carreira IM, Dequeker E, Henderson M, Lovrecic L, Öunap K, Tabiner M, Treacy R, van Asperen CJ. Recommendations for reporting results of diagnostic genomic testing. *Eur J Hum Genet* 2022; 30(9): 1011-1016.
- den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan-Jordan J, Roux AF, Smith T, Antonarakis SE, Taschner PE. HGVS recommendations for the description of sequence variants: 2016 update. *Hum Mutat* 2016; 37(6): 564-569.
- Ding Q, Wu X, Lu Y, Chen C, Shen R, Zhang X, Jiang Z, Wang X. AccuCopy quantification combined with pre-amplification of long-distance PCR for fast analysis of intron 22 inversion in haemophilia A. *Clin Chim Acta* 2016; 458: 78-83.
- Edison E, Konkle BA, Goodeve AC. Genetic analysis of bleeding disorders. *Haemophilia* 2016; 22 Suppl 5(Suppl 5): 79-83.
- Garagiola I, Mortarino M, Siboni SM, Boscarino M, Mancuso ME, Biganzoli M, Santagostino E, Peyvandi F. X chromosome inactivation: A modifier of factor VIII and IX plasma levels and bleeding phenotype in haemophilia carriers. *Eur J Hum Genet* 2021; 29(2): 241-249.
- Gomez K, Laffan M, Keeney S, Sutherland M, Curry N, Lunt P. Recommendations for the clinical interpretation of genetic variants and presentation of results to patients with inherited bleeding disorders. A UK Haemophilia Centre Doctors' Organisation Good Practice Paper. *Haemophilia* 2019; 25(1): 116-126.
- Hudecova I, Jiang P, Davies J, Lo YMD, Kadir RA, Chiu RWK. Noninvasive detection of F8 int22h-related inversions and sequence variants in maternal plasma of hemophilia carriers. *Blood* 2017; 130(3): 340-347.
- Inaba H, Shinozawa K, Amano K, Fukutake K. Identification of deep intronic individual variants in patients with hemophilia A by next-generation sequencing of the whole factor VIII gene. *Res Pract Thromb Haemost* 2017; 1(2): 264-274.
- Janczar S, Kosinska J, Ploski R, Pastorczak A, Wegner O, Zalewska-Szewczyk B, Paige AJ, Borowiec M, Mlynarski W. Haemophilia A and cardiovascular morbidity in a female SHAM syndrome carrier due to skewed X chromosome inactivation. *Eur J Med Genet* 2016; 59(1): 43-47.
- Johansson J, Lidéus S, Höijer I, Ameur A, Gudmundsson S, Annerén G, Bondeson ML, Wilbe M. A novel quantitative targeted analysis of X-chromosome inactivation (XCI) using nanopore sequencing. *Sci Rep* 2023; 13(1): 12856.
- Jourdy Y, Chatron N, Carage ML, Fretigny M, Meunier S, Zawadzki C, Gay V, Negrier C, Sanlaville D, Vinciguerra C. Study of six patients with complete F9 deletion characterized by cytogenetic microarray: Role of the SOX3 gene in intellectual disability. *J Thromb Haemost* 2016; 14(10): 1988-1993.
- Jourdy Y, Chatron N, Fretigny M, Carage ML, Chambost H, Claeysseens-Donadel S, Roussel-Robert V, Negrier C, Sanlaville D, Vinciguerra C. Molecular cytogenetic characterization of five F8 complex rearrangements: Utility for haemophilia A genetic counselling. *Haemophilia* 2017; 23(4): e316-e323.
- Jourdy Y, Frétiigny M, Lassalle F, Lillicrap D, Négrier C, Vinciguerra C. The highly prevalent deletions in F8 intron 13 found in French mild hemophilia A patients result from both founder effect and recurrent de novo events. *J Thromb Haemost* 2020; 18(5): 1087-1093.
- Jourdy Y, Janin A, Fretigny M, Lienhart A, Négrier C, Bozon D, Vinciguerra C. Recurrent F8 intronic deletion found in mild hemophilia A causes Alu exonization. *Am J Hum Genet* 2018; 102(2): 199-206.
- Kumar P, Husain N, Soni P, Faridi NJ, Goel SK. New protocol for detection of intron 22 inversion mutation from cases with hemophilia A. *Clin Appl Thromb Hemost* 2015; 21(3): 255-259.
- Lakich D, Kazazian HH, Jr., Antonarakis SE, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nat Genet* 1993; 5(3): 236-241.
- Lannoy N, Hermans C. Review of molecular mechanisms at distal Xq28 leading to balanced or unbalanced genomic rearrangements and their phenotypic impacts on hemophilia. *Haemophilia* 2018; 24(5): 711-719.
- Lefter M, Vis JK, Vermaat M, den Dunnen JT, Taschner PEM, Laros JFJ. Mutalyzer 2: Next generation HGVS nomenclature checker. *Bioinformatics* 2021; 37(18): 2811-2817.
- Li T, Miller CH, Driggers J, Payne AB, Ellingsen D, Hooper WC. Mutation analysis of a cohort of US patients with hemophilia B. *Am J Hematol* 2014; 89(4): 375-379.
- Liu Q, Nozari G, Sommer SS. Single-tube polymerase chain reaction for rapid diagnosis of the inversion hotspot of mutation in hemophilia A. *Blood* 1998; 92(4): 1458-1459.

Lyu C, Xue F, Liu X, Liu W, Fu R, Sun T et al. Identification of mutations in the F8 and F9 gene in families with haemophilia using targeted high-throughput sequencing. *Haemophilia* 2016; 22(5): e427-e434.

Machado FB, Machado FB, Faria MA, Lovatel VL, Alves da Silva AF, Radic CP et al. 5meCpG epigenetic marks neighboring a primate-conserved core promoter short tandem repeat indicate X-chromosome inactivation. *PLoS One* 2014; 9(7): e103714.

Manderstedt E, Nilsson R, Lind-Halldén C, Ljung R, Astermark J, Halldén C. Targeted re-sequencing of F8, F9 and VWF: Characterization of Ion Torrent data and clinical implications for mutation screening. *PLoS One* 2019; 14(4): e0216179.

McVey JH, Rallapalli PM, Kemball-Cook G, Hampshire DJ, Giansily-Blaizot M, Gomez K, Perkins SJ, Ludlam CA. The European Association for Haemophilia and Allied Disorders (EAHAD) Coagulation Factor Variant Databases: Important resources for haemostasis clinicians and researchers. *Haemophilia* 2020; 26(2): 306-313.

Nisen PD, Waber PG. Nonrandom X chromosome DNA methylation patterns in hemophiliac females. *J Clin Invest* 1989; 83(4): 1400-1403.

Pan TY, Chiou SS, Wang CC, Wu SM. Separation of intron 22 inversion type 1 and 2 of hemophilia A by modified inverse-shifting polymerase chain reaction and capillary gel electrophoresis. *Talanta* 2014; 130: 328-335.

Pezeshkpoor B, Czogalla KJ, Caspers M, Berkemeier AC, Liphardt K, Ghosh S, Kellner M, Ulrich S, Pavlova A, Oldenburg J. Variants in FIX propeptide associated with vitamin K antagonist hypersensitivity: Functional analysis and additional data confirming the common founder mutations. *Ann Hematol* 2018; 97(6): 1061-1069.

Radic CP, Rossetti LC, Abelleyro MM, Tetzlaff T, Candela M, Neme D et al. Phenotype-genotype correlations in hemophilia A carriers are consistent with the binary role of the phase between F8 and X-chromosome inactivation. *J Thromb Haemost* 2015; 13(4): 530-539.

Rallapalli PM, Kemball-Cook G, Tuddenham EG, Gomez K, Perkins SJ. An interactive mutation database for human coagulation factor IX provides novel insights into the phenotypes and genetics of hemophilia B. *J Thromb Haemost* 2013; 11(7): 1329-1340.

Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015; 17(5): 405-424.

Rossetti LC, Candela M, Bianco RP, de Tezanos Pinto M, Western A, Goodeve A, Larripa IB, De Brasi CD. Analysis of factor VIII gene intron 1 inversion in Argentinian families with severe haemophilia A and a review of the literature. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2004; 15(7): 569-572.

Rossetti LC, Radic CP, Larripa IB, De Brasi CD. Developing a new generation of tests for genotyping hemophilia-causative rearrangements involving int22h and int1h hotspots in the factor VIII gene. *J Thromb Haemost* 2008; 6(5): 830-836.

Salviato R, Belvini D, Radossi P, Tagariello G. High resolution melting for F9 gene mutation analysis in patients with haemophilia B. *Blood Transfus* 2019; 17(1): 72-82.

Shen BW, Spiegel PC, Chang CH, Huh JW, Lee JS, Kim J, Kim YH, Stoddard BL. The tertiary structure and domain organization of coagulation factor VIII. *Blood* 2008; 111(3): 1240-1247.

Shen W, Gu Y, Zhu R, Zhang L, Zhang J, Ying C. Copy number variations of the F8 gene are associated with venous thromboembolism. *Blood Cells Mol Dis* 2013; 50(4): 259-262.

Simioni P, Cagnin S, Sartorello F, Sales G, Pagani L, Bulato C et al. Partial F8 gene duplication (factor VIII Padua) associated with high factor VIII levels and familial thrombophilia. *Blood* 2021; 137(17): 2383-2393.

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; 361(17): 1671-1675.

Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, Kitchen S, Sutherland M, Pipe SW et al. WFH guidelines for the management of hemophilia, 3rd edition. *Haemophilia* 2020; 26 Suppl 6: 1-158.

Sun P, Ma L, Diao G, Li CQ, Lin FZ. Application of indirect linkage analysis and direct genotyping to hemophilia A carrier detection in Sichuan, China. *Genet Mol Res* 2015; 14(3): 8229-8235.

van Galen KPM, d'Oiron R, James P, Abdul-Kadir R, Kouides PA, Kulkarni R et al. A new hemophilia carrier nomenclature to define hemophilia in women and girls: Communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2021; 19(8): 1883-1887.

SUJETS ABORDÉS

- ✓ Résultats inattendus sur un échantillon à tester individuel
- ✓ Résultats de CIQ hors limites
- ✓ Comment mener des investigations sur les résultats hors consensus dans les enquêtes d'évaluation externe de la qualité

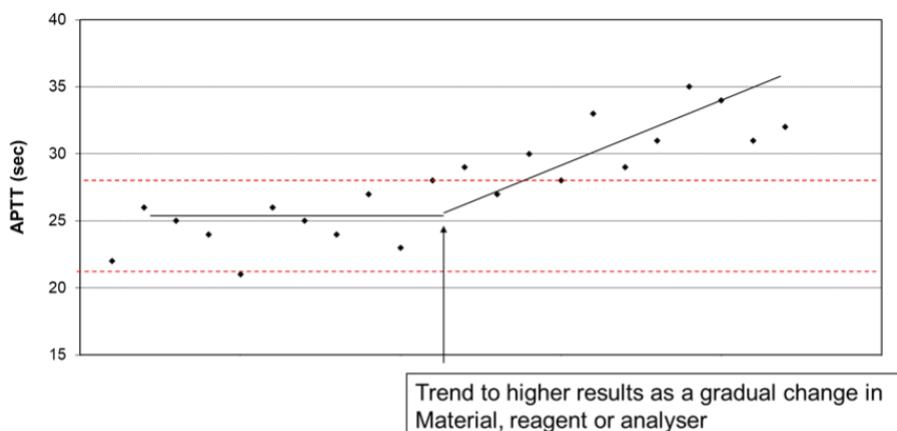
Résultats inattendus sur un échantillon à tester individuel : dans tous les laboratoires surviennent des problèmes liés aux tests de coagulation, quels que soient les méthodes, les réactifs et les équipements utilisés. Il est possible que des résultats soient inexacts à la suite de problèmes liés à un échantillon en particulier. Cela peut être la conséquence d'un prélèvement ou d'une conservation inadéquat de l'échantillon avant l'analyse. Ces points sont abordés dans la partie 3 de ce manuel. Des recommandations sur la vérification des variables pré-analytiques sont également disponibles, spécifiquement liées à l'hémophilie et aux troubles connexes (Kitchen et al., 2020), de même que sur le prélèvement des échantillons (Kitchen et al., 2021a) et leur traitement (Kitchen et al., 2021b) quant à tous les aspects des tests de laboratoire d'analyse de la coagulation, et ne sont pas détaillées plus avant ici. Des problèmes spécifiques peuvent survenir lors de l'analyse d'un échantillon, en lien avec la manipulation du réactif ou de l'échantillon, et ce malgré une analyse réussie des échantillons adjacents juste avant ou juste après l'échantillon dont le résultat est sujet à caution. De nombreux analyseurs font appel à une sonde pour aspirer automatiquement les échantillons et ces sondes s'abaissent parfois jusqu'à détection d'un liquide, puis aspirent un volume approprié pour effectuer le test. La présence de bulles à la surface de l'échantillon peut entraîner l'échantillonnage d'un volume insuffisant et donner des résultats faussement anormaux (allongement ou activité faible) dans des dosages calibrés. Un pipetage erroné des réactifs peut également conduire à des résultats inexacts, par exemple, si une sonde n'est plus alignée. Cela affecterait probablement les résultats de plusieurs échantillons. Il peut être utile d'analyser le même échantillon à 10 reprises pour évaluer la fidélité de mesure, susceptible d'être compromise en cas de désalignement des sondes. Les zones de réactifs sur les analyseurs sont généralement maintenues à une température constante, souvent refroidies en dessous de la température ambiante, mais avec des mélanges réactionnels chauffés à 37 °C pendant l'analyse. La plupart des résultats des tests de coagulation dépendent fortement de la température. Par conséquent, toute dérive en dehors d'une plage acceptable étroite quant au refroidissement des réactifs ou au préchauffage particulier des mélanges réactionnels peut entraîner des résultats inexacts. Les faux résultats normaux sont beaucoup plus rares que les faux résultats anormaux et sont souvent constatés par rapport à un faux raccourcissement du TCA à la suite de problèmes pré-analytiques (hémolyse *in vitro* entre autres). Les coagulomètres entièrement automatisés font souvent appel à des solutions de lavage/ nettoyage qui rincent les sondes entre les opérations de pipetage successives. Ce processus est supposé éviter le transfert d'échantillon ou de réactif d'un test au mélange réactionnel suivant, mais il arrive que de tels événements se produisent. Par exemple, un transfert partiel d'échantillon dans le mélange suivant s'est déjà produit en relation avec des composants pathologiques (anticorps antiphospholipides ou para-protéines) ou des médicaments (dont l'émicizumab). Cela peut provoquer un faux raccourcissement du TCA. Des composés réactifs tels que le neutralisant de l'héparine ont été transférés dans les échantillons suivants, ce qui pourrait entraîner une perte d'activité de l'héparine si elle est présente dans l'échantillon. Les effets de transfert de réactifs ont été largement éradiqués par l'utilisation combinée de réactifs et d'instruments du même fabricant. Il pourrait plus probablement y avoir un problème si le réactif d'un fabricant est utilisé sur l'analyseur d'un autre fabricant et si l'utilisation de cette combinaison n'a pas été validée. Il

est essentiel que les laboratoires respectent les instructions quant aux intervalles de l'entretien préventif afin de minimiser les risques de générer des résultats qui ne peuvent pas être communiqués en toute sécurité pour les décisions de prise en charge des patients. Il est important que les laboratoires reçoivent suffisamment d'informations cliniques/sur les patients pour que le personnel de laboratoire expérimenté puisse dans la mesure du possible identifier les résultats inattendus ou inhabituels. Tout résultat inattendu doit faire l'objet d'une nouvelle analyse afin d'exclure la possibilité d'une erreur analytique. Lorsque l'erreur d'analyse est exclue en tant qu'explication d'un résultat inattendu qui ne semble pas correspondre au tableau clinique du patient, un nouvel échantillon doit être obtenu pour confirmer le résultat.

Résultats de CIQ hors limites : comme décrit dans la partie 2 de ce manuel, il est utile de consigner sous forme de tableau les résultats de CIQ concernant chaque matériau de CIQ. De nombreux analyseurs ont recours à l'approche de Levey-Jennings comme le montre la figure 23. Il existe des systèmes de CIQ destinés à aider les laboratoires à résoudre les problèmes, tels que les règles de Westgard (www.westgard.com) qui s'appuient sur cinq règles de contrôle différentes. Ces systèmes déclenchent peu de fausses alarmes et contribuent à assurer la détection d'erreurs. En revanche, les modèles de test de CIQ requis pour une utilisation efficace de ces systèmes ne sont pas bien adaptés à une utilisation régulière dans la plupart des laboratoires d'analyse de la coagulation. Les conséquences cliniques potentielles d'une erreur biologique sur la prise en charge des patients atteints d'hémophilie et de troubles apparentés signifient qu'une approche prudente vis-à-vis des résultats de CIQ hors limites est plus sûre pour les patients. Pour cette raison, tout CIQ hors limites doit faire l'objet d'une évaluation et la communication des résultats aux patients doit être suspendue. Il est utile d'identifier le cas d'un CIQ hors limites pour éviter de futurs retards dans le traitement des échantillons. Si une nouvelle analyse sur le même flacon de matériau de CQ génère un résultat clairement dans la plage, l'analyseur peut avoir rencontré un problème. Pour évaluer cela, procéder à 10 analyses répétées sur le même échantillon. Un problème d'analyseur est à envisager s'il y a une grande variabilité entre les réplicats. Le plus souvent dans les tests de coagulation de routine, un test répété sur le même matériau est à nouveau hors limites, et le remplacement du matériau par un nouveau flacon ou aliquote génère un résultat dans la plage, confirmant que le matériau de CIQ était lui-même la source du problème. Dans ce cas, les résultats peuvent être communiqués en toute sécurité. Si, en revanche, l'analyse d'un nouveau flacon/aliquote de CIQ génère également un résultat hors limites similaire, il y a un problème avec le système, ce qui aura des répercussions sur les résultats. Dans ce cas, les réactifs utilisés doivent être remplacés successivement par un nouveau CIQ après chaque changement de réactif. Dès lors qu'un réactif de remplacement conduit à un résultat de CIQ dans la plage, le réactif était la source du problème. Cela doit être noté dans les dossiers de CIQ afin que des schémas puissent être identifiés et qu'une nouvelle évaluation de la stabilité et de l'utilisation des réactifs puisse être lancée. Si le remplacement de tous les réactifs concernés reste associé à des résultats hors limites, cet analyseur doit être retiré de l'utilisation en attendant son examen par le fabricant. Le laboratoire doit passer à un équipement de secours, idéalement un autre coagulomètre donnant les mêmes résultats ou, pour les tests avec point final de la coagulation, une technique manuelle (voir la partie 4 de ce manuel). Tout résultat obtenu depuis le précédent résultat de CIQ dans la plage doit être examiné, avec réanalyse, pour établir où le problème peut avoir débuté dans la séquence de test. Si les résultats des échantillons analysés après la communication du précédent CIQ dans la plage, le laboratoire doit retester et rappeler tous les résultats qui ne sont pas conformes, et doit également passer ses protocoles de CIQ en revue, car il ne devrait pas être nécessaire de rappeler les résultats des patients. La figure 23 reprend le diagramme de Levey-Jennings des résultats de CIQ du TCA. Les lignes rouges en pointillés indiquent les limites supérieure et inférieure de la plage acceptable pour ce matériau. La première série de résultats se situe dans la plage, à l'exception d'une sur la limite inférieure. La deuxième partie montre une hausse progressive des temps de coagulation. Cette tendance se produit si un composant du test change progressivement au fil du temps. Il est peu probable que cela se produise en ce qui concerne le matériau de CIQ du commerce lyophilisé et conservé conformément aux instructions du fabricant, mais cela peut se produire si le matériau a été préparé en local, comme décrit dans la partie 2. Les autres causes pourraient être un changement progressif de l'un des réactifs s'il n'est pas conservé de manière appropriée ou une dégradation progressive de certains aspects du système de détection de point final utilisé (p. ex.

dégradation de la source lumineuse d'un système photo-optique). Ce type de problème est rare avec les coagulomètres automatisés modernes.

IQC - APTT results showing a trend



IQC chart APTT- Unstable IQC sample

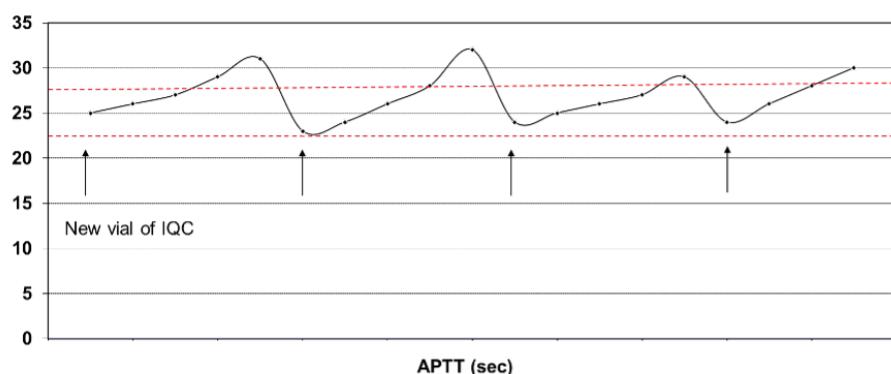


Figure 23. Diagramme de Levey-Jennings des résultats de TCA sur un matériau de CIQ instable. Les lignes rouges en pointillés indiquent les limites supérieure et inférieure de la plage acceptable pour ce matériau. Chaque flèche noire pleine indique le moment où un nouveau flacon de CIQ a été chargé sur l'analyseur. Pour chaque nouveau flacon, il y a une hausse progressive du TCA. Cet exemple est dû à un matériau de CIQ congelé préparé en local, qui était instable après la décongélation. Cela peut en principe également se produire après la reconstitution d'échantillons lyophilisés s'ils ne sont pas correctement préparés ou si l'eau utilisée pour la reconstitution est contaminée.

Comment mener des investigations sur les résultats hors consensus dans les enquêtes d'évaluation externe de la qualité : la participation à des essais d'aptitude ou à l'évaluation externe de la qualité (EEQ) est une exigence essentielle pour un laboratoire afin de s'assurer de l'exactitude des résultats qu'il fournit. Les organismes d'accréditation qui s'appuient sur les normes ISO (ISO 15189, 2022 par exemple) l'exigent pour tous les tests où l'EEQ est disponible. Il existe un programme international d'évaluation externe de la qualité (IEQAS) axé sur l'hémophilie et les troubles apparentés supervisé par la FMH (voir la partie 2 de ce manuel). Les résultats obtenus dans les exercices d'EEQ peuvent servir à identifier des problèmes importants liés à la fidélité et à l'exactitude des tests de coagulation, à condition que le matériau du programme d'EEQ soit interchangeable avec les échantillons de patients (c'est-à-dire se comporte de la même manière dans une méthode particulière que les échantillons de patients). Une résolution de problèmes efficace est importante en matière de résultats d'EEQ qui ne sont pas dans la plage qui fait consensus dans d'autres laboratoires, et ce de manière à assurer une prise en charge sûre des patients.

Lors de l'examen de résultats d'EEQ aberrants, un certain nombre de points doivent être pris en compte. Un résultat local en dehors de la cible dérivée des résultats d'autres centres est moins préoccupant si la différence n'est pas suffisamment importante pour avoir des conséquences sur la prise en charge des patients. Une différence cliniquement significative est beaucoup plus problématique qu'une différence statistique qui ne devrait pas modifier le diagnostic ou la prise en charge d'un patient.

Il conviendrait d'étudier plus avant un résultat unique nettement différent de la moyenne ou de la médiane des résultats d'autres centres, dans la mesure où la prise en charge des patients serait affectée. Cela pourrait inclure ce qui suit :

- i) Vérifier que l'échantillon a été correctement stocké à réception et reconstitué de manière correcte et que le test a été effectué conformément à la procédure écrite pour cette méthode. Si le problème est considéré comme limité à l'analyse de l'échantillon d'EEQ, les résultats des patients ne devraient pas être affectés.
- ii) Vérifier que le CIQ était satisfaisant au moment où le test d'EEQ a été effectué. Si ce n'est pas le cas, il y a probablement eu un problème qui pourrait affecter les résultats des patients, qu'il faut donc examiner.
- iii) Prendre en compte les particularités de l'échantillon à tester. L'obtention de résultats anormaux pourrait être la conséquence d'une anomalie spécifique de l'échantillon d'EEQ.

Lorsqu'un laboratoire constate des résultats aberrants dans un certain nombre d'enquêtes consécutives, une investigation est nécessaire et doit tenir compte de la relation entre les résultats en local et la moyenne ou la médiane des résultats d'autres centres utilisant une méthodologie similaire. En plus des investigations après un seul résultat aberrant mentionné ci-dessus, il faut tenir compte des points suivants :

- i) L'impact clinique des résultats doit être évalué. Il est possible que, pour un dosage dont la fidélité est très bonne, un laboratoire puisse être constamment hors consensus, mais enregistre néanmoins des résultats relativement proches de la cible, sans conséquences cliniques. Il est également possible que si une plage de référence déterminée localement est utilisée, tout biais dans les résultats des patients est compensé par une plage de référence appropriée.
- ii) Les résultats constamment élevés ou constamment faibles par rapport au résultat moyen ou médian d'autres centres sont souvent liés à l'étalonnage. En règle générale, les laboratoires présentant de tels problèmes ont une courbe d'étalonnage établie dans le passé qui n'est pas appropriée pour les tests actuels, soit en raison d'un changement de numéro de lot d'un composant, soit parce que la variabilité quotidienne des résultats nécessite un nouvel étalonnage parallèlement à l'analyse des échantillons. Le réétalonnage résout généralement ce problème dans les centres qui s'appuient sur une courbe d'étalonnage obsolète. La possibilité qu'une puissance inappropriée ait été attribuée à l'étalon, bien que rare, doit être envisagée. Lorsqu'est étudiée la possibilité d'un problème lié à l'étalonnage, il peut être utile d'analyser un échantillon avec une valeur attribuée de manière indépendante test pour vérifier dans quelle mesure les résultats sont surestimés ou sous-estimés. Ce matériau peut également servir à effectuer un nouvel étalonnage. Le programme IEQAS de la FMH est habilité à fournir un flacon de l'étalon de plasma du comité scientifique et de normalisation de l'ISTH pour ce type d'investigation. Celui-ci a des valeurs attribuées pour un certain nombre de paramètres de coagulation différents. L'effet d'un nouvel étalonnage peut être évalué en analysant un petit groupe d'échantillons avant et après le nouvel étalonnage. L'étalon de plasma du comité scientifique et de normalisation n'est pas prévu pour une utilisation de routine dans l'étalonnage des méthodes de dosage locales.
- iii) Les résultats supérieurs à la moyenne ou à la médiane dans certaines enquêtes, et inférieurs à la moyenne ou à la médiane dans d'autres, suggèrent que la mesure n'est pas fidèle. Cela peut se produire en raison d'instruments mal entretenus, d'une manipulation inadéquate des réactifs (reconstitution, stockage, etc.), d'une instabilité des réactifs ou de problèmes liés à la formation ou aux compétences du personnel.

Dans la mesure du possible, l'analyse répétée d'échantillons après l'investigation et la mise en œuvre des améliorations requises est utile pour confirmer ou infirmer le succès des interventions. Il convient de procéder à l'examen rétrospectif des résultats des enquêtes d'EEQ antérieures, avant l'apparition de résultats aberrants, ainsi que des dossiers de laboratoire où les changements de lot sont consignés, des étalonnages, de l'entretien des instruments et des changements de méthodologie, afin d'évaluer si l'évolution des performances correspond à un éventuel changement apporté en interne. L'analyse des données d'EEQ et les rapports de performances sont par nature rétrospectifs, puisque l'analyse et l'établissement de rapports ont normalement lieu un certain temps après que les tests ont été effectués au laboratoire. Par conséquent, tout problème identifié peut avoir affecté les résultats des patients sur la même période. Le laboratoire doit examiner avec les cliniciens les anciens résultats de patients pour tous les tests où l'EEQ indique qu'une inexactitude cliniquement pertinente aurait pu être présente. Cet examen doit déterminer si le diagnostic ou la prise en charge aurait pu être affecté. Un nouveau test peut être nécessaire si le schéma des résultats aberrants a pu avoir un impact négatif sur les patients.

Références

- Kitchen S, Adcock DM, Dauer R, Kristoffersen AH, Lippi G, Mackie I, Marlar RA, Nair S. International Council for Standardisation in Haematology (ICSH) recommendations for collection of blood samples for coagulation testing. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(4): 571-580.
- Kitchen S, Adcock DM, Dauer R, Kristoffersen AH, Lippi G, Mackie I, Marlar RA, Nair S. International Council for Standardization in Haematology (ICSH) recommendations for processing of blood samples for coagulation testing. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(6): 1272-1283.
- Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, Kitchen S, Sutherland M, Pipe SW et al. WFH guidelines for the management of hemophilia, 3rd edition. *Haemophilia* 2020; 26 Suppl 6: 1-158.

1184 rue Sainte-Catherine Ouest
Bureau 500
Montréal, Québec H3B 1K1 Canada
Tél.: (514) 875-7944
Fax: (514) 875-8916
Courriel : wfh@wfh.org
www.wfh.org

