

Compte rendu de la 23^{ème} journée du Groupe d'Etude de la biologie des maladies hémorragiques (BIMHO)

Cette réunion s'est tenue le 16 juin 2023 et a rassemblé 36 biologistes.

1. Retour de congrès (Pierre Toulon)

La présentation est accessible sur demande auprès de Pierre Toulon

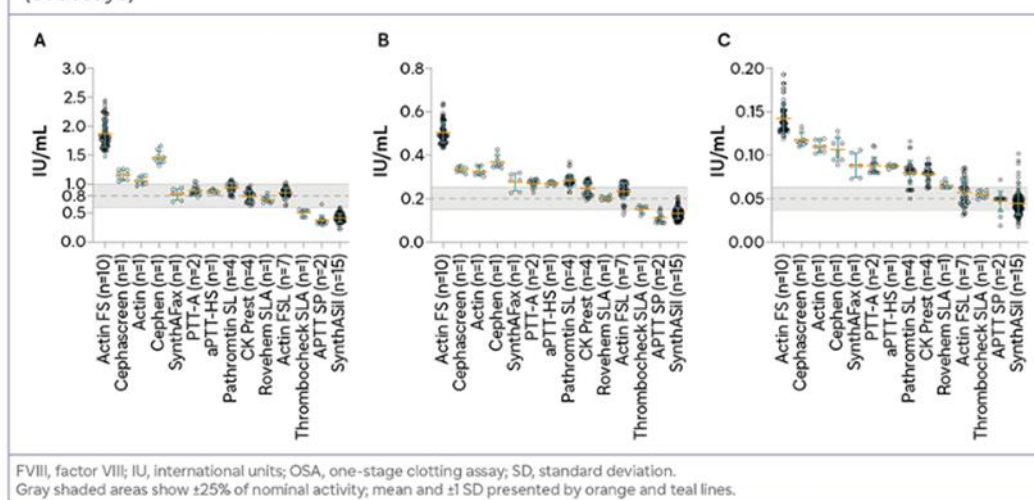
2. Présentation des résultats de la field study BIVV001 (rFVIII-Fc-VWF-XTEN) : Claire Pouplard et Christophe Nougier

L'éfanesoctocog alpha (nom provisoire : ALTUVIII[®] ; étude BIVV001) est un FVIII à demi-vie prolongée, en raison de la structure modifiée du FVIII qui comprend un fragment Fc (comme Elocta), une insertion de séquences d'acides aminés hydrophiles (insertions XTEN) et une liaison covalente au domaine D'D3 du facteur VIII. La demi-vie observée dans les études cliniques avoisine les 40h ce qui en fait un traitement substitutif prometteur. Afin d'évaluer la surveillance biologique de ce nouveau traitement une « field study » internationale a été organisée et 35 laboratoires dans le monde ont participé dont 7 laboratoires français (20%). L'objectif de cette étude était d'évaluer les performances analytiques des laboratoires participants pour la mesure de l'éfanesoctocog alpha avec les techniques utilisées en routine. Deux types d'échantillons ont été analysés à l'aveugle en triplicate sur 3 jours: plasmas contenant de l'ADVATE (5, 20 et 80%) et des plasmas contenant de l'éfanesoctocog alpha (5, 20, 80%).

L'étude montre (Figure 1) :

- des résultats hétérogènes en fonction du type de réactif utilisé pour le dosage chromométrique de FVIII : l'Actin FS surestime de 1.5 à 2 x l'activité, le cephascreen, l'Actin surestime de 1.2 à 1.5 x l'activité, l'APTT SP et le synthasIL sous-estime de 1.2 à 1.5 x fois le taux attendu notamment aux concentrations de 80 et 20%.
- Avec la technique chromogénique, une surestimation importante de 2 à 3 fois l'activité attendue de FVIII et ce, quel que soit le réactif utilisé (surestimation un peu moins importante pour le réactif Rossix)

Figure 1 OSA FVIII activity of efanesoctocog alfa at (A) 0.80, (B) 0.20, and (C) 0.05 IU/mL (51 assays)



En conclusion, les recommandations publiées par le BIMHO sur la surveillance biologique d'un traitement substitutif en FVIII chez un patient hémophile A sont à revoir puisqu'elles proposaient le

dosage chromogénique du FVIII en première intention. Une étude avec la molécule efanesoctocog serait intéressante à mener dans nos centres en 2024.

3. Anomalies congénitales de la glycosylation : quel impact sur l'hémostase ? Delphine Borgel

Le Congenital Disorder of Glycosylation (Syndrome CDG) est une maladie rare qui affecte le processus de glycosylation des protéines. La prévalence de la forme la plus fréquente est d'environ 1/500 000 mais elle est probablement sous-estimée. La glycosylation est un ensemble de modifications complexes post-traductionnelles résultant de l'ajout enzymatique d'hydrates de carbone, de sucres, de chaînes glycanes aux protéines. Plus de 50% des protéines sont glycosylées et les chaînes de glycanes sont impliquées dans de nombreuses fonctions (sécrétion des protéines, clairance des protéines ou les interactions protéine-protéine). Le nombre d'enzymes et de transporteurs impliqués dans le processus de glycosylation est élevé.

Il existe 2 types de glycosylation :

- la N-Glycosylation sur les résidus asparagine
- la O- Glycosylation sur les résidus sérine ou thréonine.

Le CDG affectant la N-Glycosylation est la forme la plus courante de CDG et il en existe 2 catégories:

- le CDG de type I (ou CDG-1) affecte principalement le nombre de chaînes de N-glycanes sur les protéines
- le CDG de type II (ou CDG-2) affecte principalement la composition de ces chaînes de N-glycanes sur les protéines.

Les CDG de type I

Ils sont les plus fréquents et représentent 94% des CDG qui affectent la N-Glycosylation. Ils sont majoritairement liés à un déficit en Phospho ManoMutase 2 (PMM2). D'autres enzymes ou transporteurs peuvent être affectés, comme la Mannose Phospho Isomerase (MPI). Le diagnostic est fait par l'analyse du profil de glycosylation de la transferrine par différentes méthodes avec mise en évidence d'un profil de glycosylation anormal. Le diagnostic est confirmé par l'étude génétique.

Phénotype clinique:

- **PMM2-CDG** : troubles multisystémiques (retard de développement, strabisme, dysmorphie, tendance thrombotique....)
- **MPI-CDG** : présentation clinique particulière avec des manifestations principalement hépatiques et digestives. Ils ont également une tendance aux manifestations thrombotiques mais aussi aux hémorragies, principalement digestives

Généralement, le diagnostic est posé dans l'enfance mais la gravité et donc l'âge d'apparition des symptômes est variable, allant de la létalité néonatale à la forme presque asymptomatique et donc diagnostiquée à l'âge adulte. Le CDG peut également être découvert dans le cadre d'une maladie thromboembolique ou dans le cadre d'un bilan hémostase préopératoire.

Le CDG a un impact sur la coagulation dans la mesure où les facteurs de coagulation sont glycosylés et principalement produits par le foie. L'étude de la littérature montre que le déficit en Antithrombine est fréquent (83%) ainsi que les déficits en facteur XI (69%) et en protéine C (60%); les déficits en PS et FIX, en revanche, ne sont présents que chez environ 1/3 des patients atteints de PMM2-CDG. La fréquence des déficits en facteurs de coagulation est très similaire dans le MPI-CDG, sauf celui de la PS qui est moins fréquent et aucun déficit en FIX n'a été rapporté dans le MPI-CDG. Ces anomalies de l'hémostase induisent majoritairement un phénotype prothrombotique, mais peuvent également être associés à des manifestations hémorragiques.

Il est recommandé de réaliser une exploration et une surveillance de la coagulation au moment du diagnostic (comme marqueur de gravité) et ensuite une fois tous les 1 ou 2 ans pendant le suivi des patients. La surveillance de la coagulation doit également être renforcée en cas d'épisode intercurrent aigu (fièvre prolongée, intervention chirurgicale) car ces situations aggravent les déséquilibres hémostatiques et augmentent le risque de manifestations thrombotiques ou hémorragiques. La surveillance de l'hémostase permet également de suivre les patients MPI-CDG traité au mannose.

Prise en charge thérapeutique :

- Le MPI-CDG peut bénéficier d'un traitement oral par mannose. Les manifestations cliniques cessent et les anomalies de la coagulation tendent à se normaliser sous l'effet du traitement.
- Concernant la gestion du risque thrombotique, il n'existe pas de spécificités pour la gestion du risque thrombotique et le traitement. La supplémentation en AT peut être discutée.
- Concernant le risque hémorragique, il est recommandé d'utiliser du plasma frais congelé ou des concentrés de complexe prothrombique. Les concentrés de FXI ou le rFVIIa sont contre indiqués en raison du risque thrombotique.

Le CDG de type II

Il est beaucoup moins fréquent que le CDG de type I (6 % des syndromes CDG). En dehors de l'impact sur la coagulation, il peut également affecter l'hémostase primaire.

En conclusion, la plupart des syndromes CDG ont un impact sur la coagulation et l'hémostase peut-être la porte d'entrée vers le diagnostic. Les patients ont une tendance thrombotique. **Penser au diagnostic** si profil incompréhensible de coagulation en particulier en cas de déficit combiné en AT and FXI!

Fiches de prise en charge en urgence: <https://filiere-g2m.fr/urgences>

4. Bibliographie Eve Anne Guéry

Colpani P, et al. **A comparative study in patients with type 2 von Willebrand disease using 4 different platelet-dependent von Willebrand factor assays.** Res Pract Thromb Haemost. 2023 Mar 30;7(3):100139. doi: 10.1016/j.rpth.2023.100139.

L'objectif de l'étude était de comparer les résultats de 4 techniques de dosage d'activité facteur willebrand (VWF :Act) pour des patients atteints d'une maladie de willebrand (VWD) de type 2 confirmée par l'étude génétique : activité cofacteur de la ristocétine sur agrégomètre, cofacteur de la ristocétine automatisé (BC von Willebrand Reagent®, Siemens), activité GPIbM automatisé (Innovance® Siemens), activité GPIbM technique ELISA. La concordance du ratio VWF :Act/VWF :Ag avec le type 2 de VWD a été évaluée. Les 4 tests ont été réalisés de façon rétrospective sur une cohorte de 76 patients pour lesquels le diagnostic avait été posé à l'aide du cofacteur de la ristocétine automatisé. Le seuil < 0.6 a été utilisé pour orienter vers un type 2 afin de garder le seuil utilisé au moment du diagnostic. La répartition des sous-types de VWD était la suivante : 26 types 2A, 19 types 2B, 10 types 2B avec multimères de haut poids moléculaire (variant New York), 9 types 2M, 12 types 2M/2A. Une bonne corrélation et concordance est décrite entre les 4 tests avec néanmoins quelques discordances notamment pour les types 2B. Une surestimation des résultats par technique GPIbM ELISA pour le type 2B est mise en évidence, mais ce test n'est pas utilisé en pratique courante. Les ratios obtenus pour les variant New York sont > 0.7 avec l'ensemble des techniques, ce qui est un résultat attendu pour ce variant. Les pourcentages de diagnostics corrects de type 2 selon le VWF :Act/VWF :Ag sont les suivants :

- VWF : RCo agrégométrie : 2A : 100%, 2M : 78%, 2M/2A : 100% 2B : 68%
- VWF : RCo automatisé : 2A : 88% 2M : 89% 2M/2A : 100% et 2B : 63%
- VWF GPIbM ELISA : 2A : 96%, 2M : 67%, 2M/2A : 67% et 2B : 0%
- VWF : GPIbM automatisé : 2A : 73%, 2M : 44%, 2M/A : 75% et 2B 84%

Concernant les types 2A, 5 patients au lieu de 7 seraient classés en type 1 au lieu de type 2 avec la technique VWF GPIbM automatisé, en utilisant comme seuil 0,7 et non 0,6 pour le ratio Act/Ag. La diminution du nombre de patients classés en type 1 avec l'utilisation du seuil à 0.7 est également observée pour les types 2M et 2M/2A.

En conclusion, une bonne corrélation est retrouvée avec les 4 méthodes de dosage. Le VWF :RCo automatisé surestime le type 2 B avec ou sans multimères de haut poids comparé au VWF :Gp1bM

automatisé. Les tests VWF:RCo semble à l'inverse mieux détecter les types 2M et 2M/2A. Les auteurs concluent également que l'utilisation d'un seuil à 0.7 permettrait de mieux diagnostiquer le type 2.

5. Ibrutimid et fonctions plaquettaire : Sophie Voisin

La présentation est accessible sur demande.

6. Surveillance biologique d'un traitement par facteur Willebrand : discordances entre les différentes techniques disponibles : Christophe Nougier et Thomas Sinegre

Monitoring recombinant and plasma-derived VWF concentrates: an *in vitro* study

M. Daniel¹, A. Lebreton², T. Sinegre², C. Nougier¹

¹Hospices civils de Lyon, Service d'Hémostase Biologique, Centre de Biologie et de Pathologie Est, Lyon, France, ²Centre Hospitalo-Universitaire de Clermont-Ferrand, Service d'Hématologie Biologique, Hôpital d'Estaing, Clermont-Ferrand, France

Several Von Willebrand factor (VWF) concentrates are available for replacement therapy in patients with Von Willebrand's disease. However, there is no consensus on the laboratory monitoring of those treatments: some recommend the use of only factor VIII activity while others suggest that VWF activity and antigen levels are necessary for treatment adaptation. Moreover several VWF assays are available for measuring those parameters. The aim of this study was to compare different VWF assays in the context of monitoring VWF replacement therapy.

Human VWF deficient plasma was alternatively spiked with four different concentrates of VWF (three plasma-derived and one recombinant concentrates). We measured VWF antigen (VWF:Ag) and different VWF activities using four different analyzers in two French laboratories: VWF:Ag and VWF:GPIbR (HemosIL®) on AcuStar and ACL-Top700 (Werfen®), VWF:CB (HemosIL®) on AcuStar, VWF:Ag and VWF:Rco on STAR-Max (Stago®), VWF:Ag and VWF:GPIbM (Innovance®) on CS-2100i (Sysmex®). Assays were performed in triplicates using four different final concentrations of VWF (1, 0.5, 0.25 and 0.1 IU/mL).

For VWF:Ag, there was no significant difference between techniques with all VWF concentrates tested at all 4 concentrations. In contrast, VWF activities were different depending on the assays used. VWF:RCo and VWF:GPIbM assays underestimated VWF activity for all plasma-derived molecules whereas VWF:GPIbR or VWF:CB assays showed a good accuracy. For recombinant concentrate monitoring, VWF:GPIbR was the most accurate.

Not all VWF activity assays are equivalent and professionals to remain cautious when interpreting VWF activity levels in the context of monitoring a VWF substitutive therapy.

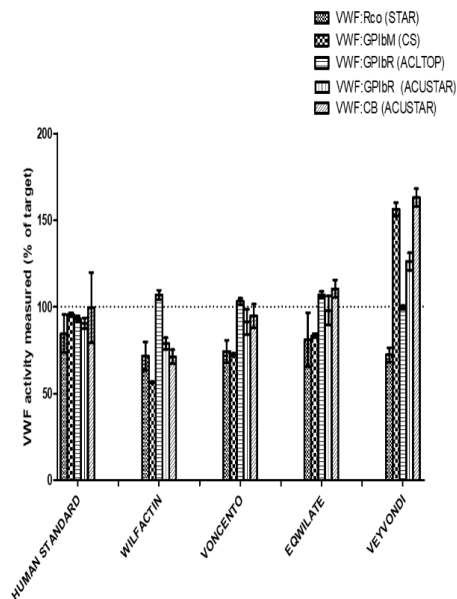


Figure: VWF activity measured for 1 IU/mL final concentration of VWF

7. Nouvelles recommandations sur le titrage d'un anti FVIII ou IX : Catherine Ternisien et Claire Pouplard

Des recommandations sur le titrage des inhibiteurs anti-facteur VIII ou IX ont récemment été publiées par Meijer P et al (*Int J Lab Hematol.* 2023 Aug;45(4):413-24). Elles sont en accès libre (<https://doi.org/10.1111/ijlh.14109>).

Elles ont fait l'objet d'une discussion notamment sur 3 points qui divergent avec nos pratiques actuelles :

1) Préanalytique : Traitement par la chaleur de l'échantillon à tester

Les échantillons de patients utilisés pour la détection des inhibiteurs peuvent contenir du FVIII ou du FIX exogène en raison de perfusions récentes de concentrés de facteurs ou du FVIII ou du FIX ou de facteurs endogène si le test est effectué chez un hémophile modéré ou mineur. Il a été montré que la présence de FVIII ou de FIX exogène pouvait affecter de manière significative la détection des inhibiteurs entraînant une sous-estimation du titre d'inhibiteur voire même des résultats faussement négatifs. Le traitement thermique préalable des échantillons de patients pendant 30 minutes à 56°C permet de dissocier les complexe antigène-anticorps et de dénaturer le FVIII. Une procédure plus vigoureuse a également été suggérée, à savoir un chauffage pendant 90 minutes à 58°C. Cependant, ce chauffage pendant 90 minutes à 58°C entraîne une diminution significative des niveaux d'IgG4 anti-FVIII et même le chauffage pendant 30 minutes à 58°C peut entraîner une diminution des niveaux d'IgG4 anti-FVIII. **Par conséquent, une procédure de préchauffage de 30 minutes à 56°C est maintenant recommandée.**

Pour le FIX, il a été montré qu'en plus du traitement thermique, un prétraitement à froid par l'ajout de plasma normal froid pour l'étape de mélange donne une meilleure sensibilité à la détection de l'inhibiteur.

Dans un objectif de standardisation, il est recommandé que le **plasma patient et le plasma contrôle soit préchauffé même si aucune activité FVIII ou FIX résiduelle n'est attendue chez le patient.**

2) Mélange contrôle

Afin de réduire le coût du plasma déficient en facteur VIII utilisé dans la méthode Nijmegen, les auteurs proposent le mélange : Plasma normal + BSA 4% tamponné en Imidazole

3) Positivité du test

Le seuil de positivité serait de 0,5 UB/mL pour l'anti-FVIII et de 0,3 UB/ml pour l'anti-Facteur IX

Avant de revoir nos procédures, des précisions aux auteurs vont être demandées par le BIMHO sur ces 3 points.

8 - Le point sur les projets en cours :

8.1 Etude multicentrique FVIII porcin recombinant : Véronique Le Cam-Duchez

L'objectif de cette première phase était d'une part de valider la méthode de dosage du rFVIII porcin et la dilution au 1/11^{ème} donnée par la notice pour la reconstitution du substrat et d'autre part de vérifier la stabilité du rFVIII porcin dilué dans du déficient en FVIII Siemens ou dans du tampon Imidazole après 2 heures d'incubation à 37°C.

Les résultats de cette première phase montraient que le taux de rpFVIII dans le flacon de substrat dilué au 1/11 n'était pas de 100% mais en moyenne corrigée de 136% avec un écart type de 7,7 et un CV de 5,6% et que la stabilité du rpFVIII dilué en tampon imidazole était très peu différente de celle du rpFVIII dilué en déficient en FVIII.

La deuxième phase de l'étude consistait donc à réaliser des titrages d'anticorps anti-rpFVIII selon nos techniques habituelles, en diluant seulement le rpFVIII, dilué au 1/11 puis ramené à 1 U/mL en eau distillée, en déficient VIII Siemens pour établir la référence. Ensuite chacun utilisait sa technique habituelle avec dilution en tampon Imidazole et réalisation de 6 « dilutions » pur, 1/2, 1/5, 1/10, 1/20 et 1/30 selon les préconisations de l'ECAT.

Les mêmes plasmas étaient titrés dans deux centres différents (5 binômes) et chaque centre réalisait un titrage ou 2 du contrôle faible d'anti-VIII cryopep.

Les résultats de 4 binômes sur 5 ont été présentés. Sur 3 des binômes la concordance des titres était totale. Pour un binôme il y avait des discordances de titre, peu importantes et ne générant pas de conséquence particulière puisque le titre empêchant l'utilisation de l'Obizur® en pratique clinique est à 20 UB/ml et qu'aucune de ces discordances n'était dans cette zone de mesure.

Par ailleurs, il y avait sur les résultats présentés 28 plasmas de patients atteints d'hémophilie A acquise et 11 plasmas contenant des allo anti-VIII. Dans chaque groupe il y avait 7 titres positifs d'anticorps anti-rpFVIII soit 25% des auto anti-VIII contre 64% des allo anti-VIII dont 1 > 20 UB/ml dans ce dernier groupe.

En conclusion, nos techniques habituelles permettent de dépister de façon fiable le anticorps anti rpFVIII.

8.2 Résultats CIL Von Kaulla (VK) 2022 : Véronique Le Cam

10 laboratoires ont participé au CIL. Le VK a été réalisé sur 2 plasmas : le plasma A dont le résultat devait témoigner d'une hyperfibrinolyse et un plasma B sans hyperfibrinolyse.

- Tous les laboratoires sauf 1 sont concordants pour répondre hyperfibrinolyse pour le plasma A
- Tous les laboratoires sont concordants pour répondre absence d'hyperfibrinolyse pour le plasma B. Pour les 4 laboratoires qui sont allés au bout de la lyse, concordance de la réponse « résultat normal » sans hypofibrinolyse.

8.2 Dosage FIX et traitement par rFIX long acting : François Grand, Christophe Nougier

Travail sur l'intérêt d'une calibration spécifique en FIX pour le dosage des FIX-EHL qui fait suite aux travaux BIMHO :

- Etude impact médico-économique d'une surveillance FIX-FP : CFH2022 (Florence Blanc-Jouvan, C.Nougier)
- Etude préalable calibration spécifique (Tours-Poitiers-Lyon): BIMHO Nov 2022 (Eve-Anne Guerry, Claire Pouplard, François Grand, Christophe Nougier)

L'objectif était de recenser les centres voulant participer à une étude multicentrique pour le dosage de FIX EHL sur des aliquots spikés en utilisant une calibration standard (classique en place au laboratoire) et une calibration spécifique à l'aide de calibrants envoyés (calibrant Idelvion et calibrant Alprolix).

19 centres ont répondu au questionnaire en ligne et 2 en séance soit 21 centres participants, ce qui permettra d'avoir une bonne représentation des couples automates/réactifs disponibles.

Le calendrier : début de l'étude septembre 2023, envoi plasma en Octobre, présentation des résultats en Novembre

8.3 Le Facteur VIII CSA dans ses valeurs basses : Claire Flaujac, Emmanuelle Jeanpierre, Dominique Lasne et Eve Anne Guéry

22 centres ont répondu au recueil de données réalisés dans le but de faire un état des lieux des réactifs utilisés pour le dosage chromogénique du facteur VIII et de leurs performances analytiques. Parmi ces 22 centres, 8 utilisent le FVIII Chromogenic assay® Siemens, 7 le Biophen FVIII:C®, 4 le Coamatic FVIII® Chromogenic, 4 le Trinichrom Tcoag®, 1 le Biophen FVIII :C variant®, 1 le Technoclon® Stago. Concernant le réactif Trinichrom, 3 centres sont en cours de changement de réactif en raison de problèmes de répétabilité et de résultats > 1% pour des patients hémophiles A sévères. Ces centres s'orientent vers l'utilisation du FVIII Chromogenic assay® Siemens. Deux centres utilisent deux réactifs différents (l'un origine humaine et l'autre d'origine bovine). Les réactifs Biophen VIII :C et Coamatic FVIII sont utilisés avec deux gammes de calibration. Les réactifs Trinichrom et Technoclon sont utilisés avec une seule gamme de calibration. Le réactif FVIII Chromogenic Assay est utilisé majoritairement avec une seule gamme de calibration, excepté 1 centre qui utilise deux gammes. La valeur du point tampon (diluant échantillon) évaluée par 14 centres est toujours <1%. Les limites de quantifications rapportées par 18 centres sont ≤ 1% sauf pour le FVIII Chromogenic Siemens pour lequel trois centres rapportent un résultat > 1% allant jusqu'à environ 3%. Les modalités de détermination de cette limite de quantification sont très hétérogènes et il est proposé de trouver une méthodologie commune pour la déterminer de façon plus homogène. Parmi les 14 centres ayant transmis des données de reproductibilité pour des taux de FVIII ≤ 10%, 11 ont utilisé un CIQ dilué et 3 un CIQ commercial < 10%. Les fournisseurs et dilutions réalisées de CIQ sont hétérogènes. Dans la majorité des cas, un CIQ possédant un FVIII aux alentours de 30% est dilué. Des dilutions au 1/10, 1/5, 1/6, 1/3 sont utilisées afin d'évaluer la reproductibilité et/ou répétabilité du dosage pour des taux de FVIII entre 3 et 10%. Il est important de noter également que les CV de reproductibilité et de répétabilité n'ont pas été déterminés à partir du même nombre de valeurs dans tous les centres.

Concernant les données de reproductibilité, les CV observés pour :

- FVIII Chromogenic Assay Siemens : 2,5% à 16,9%
- Biophen FVIII:C : 7,99 à 14,1% (Cible CIQ dilué entre 3 et 5%) et de 4,75 à 9,3% lorsque la cible du CIQ est proche de 10%. A noter un centre pour lequel le CV passe de 8.2 à 19% respectivement entre les données du dossier de vérification de méthode et le CV annuel.
- Coamatic FVIII : CV = 11,9% (Cible 10%) ; 12.07% (Cible annoncée 2% mais plutôt 1.2%) et 12,3% (Cible 2%) à l'aide de CIQ non dilués. A noter que le CV à 12.3 est un CV mensuel augmentant à 28.3 lorsqu'il

est calculé avec les données annuelles. Les CV sont de 8.12% (Cible à 11%) et 7.7 (Cible à 3.3%) pour les deux centres utilisant un CIQ dilué

- Biophen FVIII :C variant : le CV de 11.35% pour une cible de CIQ dilué à 2.9%
- Trinichrom : CV 25.7% et 18.6% avec une cible de CIQ dilué entre 3 et 6%

Concernant les données de répétabilité, les CV observés pour :

- FVIII Chromogenic Assay : 1.3 à 3.7%, déterminée à l'aide des CIQ <10%. Un centre a étudié la répétabilité du dosage à l'aide de deux échantillons de patients. Les CV sont respectivement de 39 et 7% pour des échantillons dont le FVIII est en moyenne à 2,3 et 3.9 %.
- Biophen FVIII :C les 3 CV renseignés sont 3.3 ; 2.89 et 4.26%
- Biophen FVIII :C variant : les CV sont de 17.9% et 3% respectivement pour des FVIII à 0.5% et 2.9%
- Coamatic FVIII : les CV renseignés par 3 centres sont 4.6 - 12.3 (CIQ commercial) et 1.4% (CIQ dilué)
- Trinichrom : les CV renseignés par un centre sont de 17.25 et 11.27% (obtenus sur deux STARmax différent à l'aide de plasma de sujet sain dilué FVIII moyen = 7.7%)

En conclusion, il existe une hétérogénéité des pratiques. Une étude va être proposée afin d'essayer d'évaluer selon une méthodologie commune les performances analytiques de nos méthodes pour le dosage du FVIII : CSA.

9. Questions diverses

Création d'un espace de partage via teams

Recommandations sur les dosages à réactualiser : un groupe de travail va se mettre en place

La prochaine réunion se tiendra le 24 Novembre 2023 sur Paris