

Prescription et réalisation d'un bilan biologique à la recherche d'une thrombophilie : propositions du GFHT 2022

Partie II : aspects méthodologiques et biologiques - v2.1

*Prescribing and performing a biological assessment for thrombophilia: GFHT 2022 proposals
Part II: methodological and biological aspects - v2.1*

Sous l'égide de Yves GRUEL¹ et Pierre MORANGE²

Coordonnateurs : Martine ALHENC-GELAS³, Élodie BOISSIER⁴, Isabelle GOUIN-THIBAUT⁵

Rédacteurs : Emmanuel DE MAISTRE⁶, Emmanuelle DE RAUCOURT⁷, Céline DESCONCLOIS⁸, Claire FLAUJAC⁹, Marie-Françoise HURTAUD¹⁰, Georges JOURDI¹¹, Sylvie LABROUCHE-COLOMER¹², Véronique LE CAM¹³, Dominique LASNE¹⁴, Laëtitia MAUGE³, Virginie SIGURET¹⁵

Relecteurs V1.0, 2020 : Thomas BRUNGS¹⁶, Luc DARNIGE³, Valérie ESCHWEGE¹⁷, Nathalie HEZARD², Léna LE FLEM¹⁸, Frédéric LORIDON¹⁹

Validation V2.0 et V2.1 : membres du GFHT.

Les propositions ont été soumises au vote et validées selon les critères suivants :

- Accord : 50 % d'accord ET moins de 20 % de désaccord ;
- Accord fort : 70 % d'accord ET moins de 20 % de désaccord.

1. CHRU de Tours, France.
2. AP-HM, CHU La Timone, Marseille, France.
3. AP-HP, HEGP, Paris, France.
4. CHU de Nantes, France.
5. CHU de Rennes, France.
6. CHU Bocage, Dijon, France.
7. AP-HP, CHU Beaujon, Clichy, France.
8. AP-HP, CHU Antoine Bécclère, Clamart, France.
9. CH Mignot, Le Chesnay, France.
10. AP-HP, CHU Robert Debré, Paris, France.
11. AP-HP, CHU Cochin, Paris, France.
12. CHU Pellegrin, Bordeaux, France.
13. CHU Charles Nicolle, Rouen, France.
14. AP-HP, CHU Necker, Paris, France.
15. AP-HP, CHU Lariboisière, Paris, France.
16. CHR La Source, Orléans, France.
17. CHU de Nancy, France.
18. Eurofins Biomnis, Lyon, France.
19. Biogroup, France.

Auteur correspondant : Docteur Isabelle GOUIN-THIBAUT

Courriel : isabelle.gouin@chu-rennes.fr

Article reçu le 24/06/2022 et accepté le 30/06/2022

RÉSUMÉ

Ce texte constitue une mise à jour des propositions relatives à la réalisation pratique des analyses de laboratoire de la thrombophilie chez l'adulte et l'enfant, validée par les membres du GFHT.

Après une mise au point sur les conditions pré-analytiques, une analyse des caractéristiques des méthodes d'études des inhibiteurs physiologiques de la coagulation est présentée et des algorithmes de conduite diagnostique sont proposés. Les causes d'anomalies acquises et d'interférences sont détaillées. En première intention, l'activité cofacteur de l'héparine de l'antithrombine et l'activité de la protéine C seront mesurées ainsi que l'activité de la protéine S ou sa mesure par méthode immunologique (mesure de l'antigène). La place de l'étude des gènes de l'antithrombine et des protéines C et S est discutée. Des propositions sont émises pour la mesure des inhibiteurs quand un traitement anticoagulant est en cours, notamment AOD.

Le FV Leiden et le variant G20210A (c.*97G>A) du gène *F2* peuvent être recherchés par différentes méthodes, commerciales ou « maison », et un résultat positif sera confirmé avec un nouveau prélèvement. Il est recommandé de ne pas rechercher une résistance à la protéine C activée pour détecter un facteur V Leiden. La recherche d'anomalies constitutionnelles du fibrinogène est parfois indiquée, et les méthodes à utiliser sont discutées.

Concernant la thrombophilie acquise, les tests nécessaires au diagnostic du syndrome des anticorps antiphospholipides sont présentés. La démarche diagnostique d'un anticoagulant circulant de type lupique chez un patient traité par anticoagulant et notamment par AOD, est décrite.

La mesure des D-dimères n'est proposée que pour participer à l'évaluation du risque de récurrence de thrombose veineuse.

Le texte aborde enfin des questions pratiques essentielles, relatives au moment optimal du prélèvement pour les analyses de laboratoire de la thrombophilie.

Mots clés : thrombophilie biologique, maladie thromboembolique veineuse, inhibiteurs physiologiques de la coagulation, analyse des gènes, FV Leiden, variant G20210A du gène *F2*, dysfibrinogénémie, syndrome des antiphospholipides, anticoagulant lupique, D-dimères.

ABSTRACT

This article is an update, validated by the members of the GFHT, of the practical recommendations for performing thrombophilia screening in adults and children.

After a review of the preanalytical conditions, features of the testing methods for the physiological coagulation inhibitors are presented and diagnostic strategy algorithms are proposed.

Causes of interferences and of acquired abnormalities are detailed. In first intention, heparin cofactor activity of antithrombin and activity of protein C will be measured as well as the activity of protein S or free protein S antigen assay. The role of genotyping for antithrombin and protein C and S genes is discussed. Proposals are made for the measurement of inhibitors in patients treated with anticoagulants, in particular with DOAC.

FV Leiden and the *F2* gene variant G20210A (c.*97G>A) can be investigated by different methods, commercial or "in-house", and any positive result should be confirmed on a new sample. It is recommended not to test for activated protein C resistance to detect Factor V Leiden. Testing for fibrinogen abnormalities is sometimes indicated and the methods that can be used are discussed.

Regarding acquired thrombophilia, the tests necessary for the diagnosis of antiphospholipid antibody syndrome are presented. The diagnostic approach of a lupus anticoagulant in a patient treated with an anticoagulant especially with DOAC, is described.

The measurement of D-dimer plasma levels is proposed only to contribute to the assessment of the risk of recurrence of venous thromboembolism.

Finally, the article addresses practical issues related to the optimal timing of thrombophilia testing.

Keywords: biological thrombophilia, venous thromboembolic disease, physiological coagulation inhibitors, gene analysis, FV Leiden, F2 gene variant G20210A, dysfibrinogenemia, antiphospholipid syndrome, lupus anti-coagulant, D-dimers.

Rev Francoph Hémost Thromb 2022 ; 4 (2) : 61-102.

QUEL PRÉLÈVEMENT ? COMMENT LE TRAITER ?

La préparation d'un plasma de qualité optimale pour la réalisation du bilan de thrombose doit prendre en compte les points suivants : 1) certaines protéines de la coagulation sont labiles, 2) la recherche d'anticoagulant lupique est extrêmement influencée par la présence de plaquettes résiduelles dans le plasma, et particulièrement lorsqu'elle est réalisée sur des échantillons plasmatiques qui ont été congelés. En effet, la congélation induit une extériorisation des phospholipides plaquettaires procoagulants qui réduisent la sensibilité des tests.

Le prélèvement et son traitement doivent donc être effectués en respectant scrupuleusement les recommandations nationales et internationales. Les recommandations que nous résumons ci-dessous sont celles du Groupe Français d'étude sur l'Hémostase et la Thrombose (GFHT) **1-4**, du *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI) **5,6**, complétées en ce qui concerne de la recherche d'anticoagulant lupique, par celles de l'*International Society of Thrombosis and Haemostasis* (ISTH) **7**.

Tubes de prélèvement et nature de l'anticoagulant

Les prélèvements d'hémostase doivent être réalisés sur des tubes contenant comme anticoagulant du citrate 0,105-0,109 M (3,2 %) (1 vol pour 9 vol de sang). Les tubes avec du citrate à 0,129 M (3,8 %) sont acceptables. Un prélèvement en 1^{re} position est acceptable si réalisé en ponction veineuse franche sinon un tube de purge neutre est nécessaire. Les tubes d'hémostase en matière plastique peuvent être en PET (polyéthylène téréphtalate) ou en polypropylène. Un remplissage ≥ 90 % est recommandé ; il est acceptable jusqu'à 80 %.

Conditions de température (transport, traitement du prélèvement)

Le transport de l'échantillon du site de prélèvement au laboratoire doit se faire préférentiellement à température ambiante, soit entre 15° et 25 °C (préférence pharmacopée européenne). Les conditions réfrigérées (2-8 °C) ne sont pas

recommandées car il y a un risque d'activation du FVII, de modification du facteur Willebrand et d'activation plaquettaire. Idéalement, le transport doit se faire dans l'heure qui suit le prélèvement.

Préparation du plasma

Les tests spécialisés d'hémostase doivent être réalisés sur du plasma contenant < 10 G/L de plaquettes résiduelles. Les conditions de centrifugation sont donc les suivantes : au moins 15 min à 1500-2000 g, ou au moins 10 minutes à 2000-2500 g. Un frein activé à la puissance maximale n'a pas d'impact sur le chiffre résiduel de plaquettes (< 10 G/L) et sur les résultats de plusieurs tests d'hémostase (INR, TCA, fibrinogène, facteurs II, V, X, anti-Xa héparine et antithrombine) **8**. Ainsi, par extrapolation, le frein peut être réglé à la puissance maximale (avis d'expert). Si le chiffre de plaquettes n'est pas < 10 G/L après la première centrifugation, une double centrifugation doit être réalisée avec une étape intermédiaire de décantation du plasma, en veillant à ne pas prélever les plaquettes résiduelles présentes au fond du tube. Il ne faut pas filtrer le plasma. Pour la recherche d'anticoagulant circulant de type lupique avec du plasma congelé, la double centrifugation est recommandée **9**. La centrifugeuse doit avoir une température contrôlée entre 15 et 25 °C.

Congélation des plasmas

Lorsque les examens ne peuvent pas être effectués dans un intervalle de temps acceptable, les plasmas déplaquetés doivent être congelés en aliquotes dans des tubes en matériau non mouillable avec bouchons à vis dont la capacité est adaptée au volume de l'échantillon (volume mort minimal). La congélation sera la plus rapide possible. La température de conservation recommandée est inférieure ou égale à -70 °C. Une congélation rapide à température inférieure ou égale à -20 °C est acceptable.

Transport du plasma congelé

Le transport en carboglace en quantité suffisante, dans un emballage approprié, en suivant les recommandations de transport des échantillons de sang humain est à privilégier.

Décongélation

La décongélation doit être effectuée rapidement (quelques minutes - à adapter au volume de plasma) à une température de 37 °C. Les plasmas doivent ensuite être homogénéisés et les tests effectués sans délai. Le temps de décongélation est à adapter au volume de l'échantillon (par exemple pour une aliquote de 500 µL, 2 à 4 min maximum). Le GFHT et le CLSI insistent sur l'importance de l'homogénéisation du plasma qui ne doit pas être réalisée à l'aide d'un vortex, mais par retournements (six allers retours) **10**.

Stabilité

DÉFICITS EN INHIBITEURS PHYSIOLOGIQUES DE LA COAGULATION

Antithrombine (AT)

Généralités

L'AT est une glycoprotéine monocaténaire de 464 acides aminés (AA) synthétisée par l'hépatocyte. L'AT circulante comporte 432 AA – masse moléculaire (MM) de 58 kDa ; sa concentration plasmatique moyenne est de l'ordre de 200 mg/L ; sa demi-vie plasmatique moyenne est de 60 heures. Le gène codant l'AT, *SERPINC1*, est situé sur le chromosome 1, il comporte sept exons et s'étend sur 13 480 paires de bases (pb). L'AT appartient à la famille des inhibiteurs de sérine protéase (serpines). Elle inhibe irréversiblement des facteurs activés de la coagulation (surtout FXa et FIIa). L'action est dite progressive dans les conditions

Tableau 1 : Stabilité des paramètres (sang total et plasma), d'après les propositions du GFHT.

Table 1: Stability of parameters (whole blood and plasma), based on GFHT proposals.

Paramètre	Sang total à T°C ambiante	Plasma frais à T°C ambiante	Plasma frais à T°C réfrigérée
Fibrinogène	au moins 24 h	au moins 24 h	au moins 24 h
D-dimères	au moins 24 h	DI	DI
Antithrombine (activité et antigène)	au moins 24 h	≤ 24 h	au moins 24 h
Protéine C (activité et antigène)	au moins 24 h	au moins 4 h	au moins 4 h
Protéine S (activité)	au moins 4 h	≤ 24 h	DI
Protéine S libre antigène	au moins 24 h	au moins 4 h	DA
Résistance à la protéine C activée	≤ 48 h	≤ 48 h	DA
Recherche d'anticoagulant circulant de type lupique	au moins 4 h	≤ 4 h et double centrifugation ou simple centrifugation si plaquettes < 10 G/L	DA

Légende : DI : données insuffisantes ; DA : données absentes ; T°C ambiante : 15-25°C selon la Pharmacopée Européenne ; T°C réfrigérée : 2-8°C selon la Pharmacopée Européenne ; « Au moins » correspond aux durées maximales étudiées et sans effet (pas de données au-delà de ces durées).

Tableau 2 : Stabilité des paramètres congelés, d'après les propositions du GFHT.

Table 2: Stability of frozen parameters, based on GFHT proposals.

Paramètre	Plasmas congelés à au moins -20°C	Plasmas congelés à au moins -70°C	Cycle de congélation/décongélation
Fibrinogène	au moins 24 mois	au moins 24 mois	
D-dimères	au moins 24 mois	au moins 36 mois	Pas d'impact de plusieurs cycles après congélation 1 à 2 semaines à au moins -60°C
Antithrombine (activité et antigène)	au moins 24 mois	au moins 24 mois	DA
Protéine C (activité et antigène)	au moins 24 mois	au moins 24 mois	DA
Protéine S (activité)	≤ 12 mois	≤ 18 mois	Pas de recongélation après décongélation
Protéine S libre antigène	au moins 3 mois	au moins 3 mois	Pas de recongélation après décongélation
Résistance à la protéine C activée	au moins 2 semaines	au moins 1 mois	Pas de recongélation après décongélation
Recherche d'anticoagulant circulant de type lupique	au moins 2 semaines	Au moins 1 semaine	Pas de recongélation après décongélation

Légende : DA : données absentes ; « Au moins » correspond aux durées maximales étudiées et sans effet (pas de données au-delà de ces durées).

17^e QUESTION : Avec quels tubes réaliser le bilan de thrombophilie ? Quel traitement pré-analytique ?

Proposition # 54 : Il est recommandé que les prélèvements sanguins soient réalisés dans des tubes contenant une solution citratée à la concentration de 0,105-0,109 M (1 vol pour 9 vol de sang) et collectés après un tube de purge ou en 1^{re} position si ponction veineuse franche. (Accord fort)

Proposition # 55 : Il est recommandé que le transport des tubes d'hémostase du site de prélèvement au laboratoire soit effectué le plus rapidement possible et à température ambiante (entre 15 et 25 °C). Idéalement, le transport doit se faire dans l'heure qui suit le prélèvement. Pour les plasmas congelés, le transport en carboglace en quantité suffisante, dans un emballage approprié, en suivant les recommandations de transport des échantillons de sang humain est à privilégier. (Accord fort)

Proposition # 56 : Il est recommandé de réaliser les tests avec du plasma contenant moins de 10 G/L de plaquettes. Les conditions de centrifugation sont : 1500-2000 g au moins 15 minutes ou 2000-2500 g au moins 10 minutes, à température contrôlée et comprise entre 15 et 25 °C ; le frein peut être réglé à la puissance maximale. Pour la recherche d'anticoagulant circulant de type lupique avec du plasma congelé, la double centrifugation systématique est recommandée. (Accord fort)

Proposition # 57 : Lorsque les examens ne peuvent pas être effectués dans un intervalle de temps acceptable, il est recommandé que le plasma déplaqueté soit congelé en aliquotes de petit volume dans des tubes en matériau non mouillable, avec une température de congélation de préférence inférieure ou égale à -70 °C, (une température inférieure ou égale à -20 °C est acceptable). (Accord fort)

Proposition # 58 : Il est recommandé que la décongélation du plasma déplaqueté soit effectuée rapidement (quelques minutes - à adapter au volume de plasma) à une température de 37 °C. Les plasmas doivent ensuite être homogénéisés par retournements, sans utilisation d'un vortex. (Accord fort)

physiologiques et elle est qualifiée d'immédiate lorsque l'AT se lie à certains glycosaminoglycanes dont l'héparine (accélération d'un facteur de 2000). Elle comprend deux sites fonctionnels fondamentaux : le site actif (*Reactive Site*, RS) d'inhibition des protéases qui comporte l'arginine 425 (nomenclature *Human Genome Variation Society*, HGVS) et la sérine 426, et le domaine de liaison à l'héparine (*Heparin Binding Site*, HBS) qui comporte la région des AAs 73 à 81 et 139 à 188 **11**.

La prévalence du déficit constitutionnel en AT dans la population générale serait de l'ordre de 1/5 000 **12**. Il est mis en évidence chez 1 à 2 % des patients atteints de maladie thromboembolique veineuse (MTEV). D'après la méta-analyse des études observationnelles réalisée par Di Minno *et al.*, le risque relatif de 1^{re} thrombose veineuse associé au déficit en AT serait de l'ordre de 15 et le risque de récurrence de l'ordre de 4 **13**. Ces données ne sont pas obtenues à partir d'études tenant compte des génotypes.

Le déficit constitutionnel en AT est de transmission autosomale dominante. La pénétrance est variable. Les manifesta-

tions cliniques les plus fréquentes sont des thromboses veineuses profondes et des embolies pulmonaires survenant spontanément mais aussi dans des situations à risque de thrombose (alitement, chirurgie, prise de contraceptifs œstroprogestatifs, grossesse et *post-partum*...), le plus souvent après l'âge de la puberté.

Les déficits sont de plusieurs types : quantitatifs (type I) – 80 % des cas environ – ou qualitatifs (type II). Pour les déficits quantitatifs, la concentration plasmatique de la protéine est diminuée, mais elle fonctionne normalement. Pour les déficits qualitatifs de type IIRS ou HBS, la fonction du site RS pour le premier ou du site HBS pour le second, est anormale ; la concentration de la protéine est normale (ou moins diminuée que l'activité). Pour les déficits de type IIPE (pléiotropiques), la stabilité de la protéine est modifiée ce qui explique que l'activité et la concentration d'AT sont peu diminuées ou à la limite inférieure des valeurs de référence. Les bases moléculaires ont été établies et de nombreux variants de *SERPINC1* ont été identifiés (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>).

Le phénotype clinique associé au déficit en AT est hétérogène. Il est habituellement grave pour le déficit de type I, lorsqu'il y a réduction importante de la concentration plasmatique de l'AT. Pour les types II, l'hétérogénéité est importante. En effet, il existe d'une part, des variants de *SERPINC1* qui entraînent des phénotypes cliniques plus graves que les déficits de type I par effet dominant négatif (par exemple variant IIRS, p.Arg425del, ou certains variants conformationnels) et d'autre part, des variants qui ont un effet modéré sur le plan fonctionnel et qui sont des facteurs de risque moins importants de thrombose comme le variant Cambridge II (p.Ala416Ser). Au sein du groupe HBS, certains variants apparaissent peu thrombogènes, mais le variant Budapest III (p.Leu131Phe) s'accompagne d'une augmentation du risque thrombotique équivalente à celui d'un type I, y compris en cas d'hétérozygotie **11,14**.

Les déficits homozygotes sont extrêmement rares, car probablement le plus souvent létaux avant la naissance, et ne sont rencontrés que pour des anomalies de type IIHBS (Budapest III, p.Arg79Cys...) ou d'autres variants relativement peu délétères (Cambridge II, Dublin (p.Val30Glu)...) **15-17**.

Le génotypage de *SERPINC1* (séquençage des régions codantes et recherche de grand remaniement génique) ne permet pas d'expliquer la totalité des anomalies constitutionnelles de l'AT. Certains déficits constitutionnels en AT sont dus à des anomalies de glycosylation dans le cadre du syndrome « *Congenital Disorder of Glycosylation* (CDG) » **11**. En cas de CDG, d'autres protéines peuvent aussi être touchées (PC, PS, FXI, transferrine...) et le déficit en AT se présente plutôt comme un déficit de type I, de profondeur variable selon l'anomalie génique. Le risque thrombotique lié à ces anomalies est mal évalué et semble hétérogène **18**.

Diagnostic biologique des déficits constitutionnels en AT

Mesure de l'activité cofacteur de l'héparine

La mesure de l'activité « cofacteur de l'héparine » évalue les capacités des sites fonctionnels RS et HBS. La méthode repose sur l'inhibition par l'AT de la thrombine ou du FXa ajoutés en quantité déterminée et en excès, en présence d'une forte concentration d'héparine. La quantité résiduelle d'enzyme est mesurée par son activité amidolytique sur un substrat chromogène spécifique. Pour que la mesure soit spécifique de l'AT et éviter l'interférence du cofacteur II de l'héparine, la thrombine est d'origine bovine. Il existe de nombreux coffrets commerciaux. Des différences dans leur composition concernent le substrat, la nature du tampon, la concentration d'héparine, la dilution de l'échantillon, le temps d'incubation du mélange de plasma dilué avec l'enzyme.

En Europe, d'après les données 2021 de l'*External quality Control of diagnostic Assays and Tests* (ECAT) impliquant 400 laboratoires, les réactifs les plus utilisés étaient :

- méthode reposant sur l'inhibition du FXa (n = 234) : Werfen HemosIL liquid Antithrombin®, Siemens Innovance antithrombi® ;
 - méthode reposant sur l'inhibition de la thrombine (n = 166) : Stago Stachrom ATIII®, Siemens AntithrombinIII®.
- Le biologiste doit connaître les performances et limites des réactifs qu'il utilise car elles ne sont pas équivalentes quant à la détection de certains variants thrombogènes (**Tableau 3**). Les déficits de type I sont détectés quel que soit le coffret. Pour les déficits de type II, certains variants (non HBS) thrombogènes peuvent ne pas être détectés parce qu'ils ont des effets mineurs ou transitoires sur le phénotype plasmatique. C'est le cas par exemple des variants Cambridge 2 et Dublin, et de variants conformationnels tels que p.Thr117Met ou p.Asp219Asn.

En ce qui concerne le type IIHBS, les variants sont mal détectés par certains coffrets. Les informations issues d'études réalisées pour sept coffrets commerciaux sont rapportées dans le **tableau 3 17,19-25**. Les valeurs de références utilisées sont celles proposées par le fabricant et non les valeurs de références usuelles de 80 à 120 %. Les performances du réactif Innovance® qui sont les plus décrites dans la littérature sont très satisfaisantes.

Mesure de l'activité progressive de l'AT

Cette méthode étudie la capacité de l'AT à neutraliser de la thrombine ou du FXa ajouté en excès, en l'absence d'héparine et pendant une incubation plus longue que celle de la méthode avec addition d'héparine. Elle permet en principe de classer les déficits de type II en types IIHBS (activité progressive normale) ou RS (activité progressive basse) en évaluant la capacité fonctionnelle du site d'inhibition des protéases sans être sensible aux anomalies du site de liaison à l'héparine. Il n'existe cependant pas à notre connaissance de coffret commercial ayant des performances satisfaisantes. L'intérêt de la méthode est limité par sa spécificité imparfaite (interférence de l'alpha 2 macroglobuline, trypsine inhibiteur...) et son manque de sensibilité **26**.

Par ailleurs, au sein du groupe HBS, l'estimation du risque thrombotique du déficit nécessite l'identification du variant sous-jacent **14**.

Mesures immunologiques

La mesure immunologique estime la concentration plasmatique de l'AT, sans préjuger de son activité. Elle est réalisée en seconde intention, en cas de diminution de l'activité cofacteur de l'héparine, afin de typer le déficit.

Tableau 3 : Performances des réactifs de mesure de l'antithrombine : pourcentage de variants type II hétérozygotes détectés (nombre total de patients étudiés).

Table 3: Performance of antithrombin reagents: percentage of heterozygous type II variants detected (total number of patients studied).

Coffrets (valeurs de références proposées par le fabricant)	Hemos IL® Werfen (83-128 %)	HemosIL liquid AT® Werfen (83-128 %)	Stachrom AT® Stago (80-120 %)	Innovance AT® Siemens (83-118 %)	Berichrom AT® Siemens (79,4-112 %)	Coamatic AT LR® Werfen (81-123 %)	Biophen AT (IIa) Hyphen® (80-120 %)	Références
Type II (non génotypés)	11 % (n = 104)		80 % (n = 104)	99 % (n = 104)	9 % (n = 104)			20
p.Arg56Cys (HBS)			100 % (n = 1)	100 % (n = 1)	100 % (n = 1)	0 % (n = 1)		19
p.Pro73Leu (HBS)	0 % (37 familles)			100 % (n = 3)	0 % (n = 3)			21
			100 % (n = 2)	100 % (n = 4)	0 % (n = 4)	0 % (n = 2)		19
			100 % (37 familles)	100 % (37 familles)	0 % (37 familles)			22
		0 % (n = 7)		100 % (n = 7)		14 % (n = 7)	0 % (n = 7)	24
p.Asn77His (HBS)		0 % (n = 1)		100 % (n = 1)		100 % (n = 1)	0 % (n = 1)	24
p.Arg79Cys (HBS)		100 % (n = 14)		100 % (n = 14)		100 % (n = 14)	92 % (n = 12)	24
p.Arg79His (HBS)				100 % (n = 4)	0 % (n = 5)	75 % (n = 4)		21
		0 % (n = 4)		100 % (n = 4)			0 % (n = 3)	24
p.Leu131Phe (HBS)				100 % (n = 12)	8 % (n = 12)			21
		100 % (n = 6)		100 % (n = 6)		83 % (n = 6)	0 % (n = 6)	24
				100 % (n = 59)				25
p.Ser148Pro (HBS)			100 % (n = 1)	100 % (n = 1)	100 % (n = 1)	100 % (n = 1)		19
p.Arg425Cys (RS)	100 % (n = 3)		100 % (n = 3)	100 % (n = 3)	100 % (n = 3)			22
p.Arg425His (RS)			100 % (n = 1)	100 % (n = 1)	100 % (n = 1)	100 % (n = 1)		19

En juin 2021, d'après les données de l'ECAT impliquant 51 laboratoires, les méthodes utilisées sont pour la plupart immunoturbidimétriques automatisées (n = 47). Les coffrets les plus utilisés étaient Liatest AT (Stago)® et Liaphen ATIII (Hyphen Biomed)®.

Les autres méthodes sont l'ELISA, l'immunoélectrophorèse ou l'immunodiffusion radiale.

Place du génotypage

En cas de déficit de type II, il est proposé de réaliser un génotypage de *SERPINC1*, plus informatif qu'une mesure de l'activité AT progressive pour évaluer le risque associé de thrombose.

Afin de ne pas méconnaître des variants thrombogènes à effet faible sur le phénotype plasmatique, le génotypage est également nécessaire devant des concentrations d'AT à la limite inférieure des valeurs de référence, ou même en l'absence d'anomalie plasmatique chez des sujets présentant

une histoire thrombotique majeure, dans des situations exceptionnelles et après concertation multidisciplinaire **27**. Devant une forte suspicion de déficit constitutionnel de type I, avec génotypage de *SERPINC1* négatif, l'intérêt d'une recherche d'anomalie de glycosylation est à discuter.

Valeurs usuelles ; variations physiologiques

La concentration plasmatique de l'AT est basse à la naissance. Les valeurs de référence de l'adulte sont comprises entre 80 et 120 %. Le vieillissement n'entraîne pas d'évolution significative de cette concentration **28** (Tableau 4).

Stratégie diagnostique du déficit en antithrombine

Les résultats des mesures doivent être interprétés en tenant compte des valeurs de référence (Tableau 4), de la sensibilité des coffrets (Tableau 3), des causes d'anomalies acquises (Tableau 5), des causes d'interférences (Tableau 6).

Tableau 4 : Valeurs de référence des inhibiteurs de la coagulation (%) chez les nouveau-nés à terme, les enfants et les adultes.
Table 4: Reference values for coagulation inhibitors (%) in term neonates, children and adults.

Références	J1	J3	J5	J15	J30	J90	J180	6-11 mois ou 7-12 mois	1-5 ans	6-10 ans	11-16 ans ou 11-18 ans	Adultes (> 16 ans) *
AT antigène												
29,30	63 ± 13		67 ± 13		78 ± 15	97 ± 12	104 ± 10		80-120			AT
AT activité												
31	76 58-90	74 60-89				109 72-134				80-120		80-120
32						105 81-126		110 90-132				
33					41 33-63	80 29-120		96 63-122	97 61-128	97 64-136	97 69-136	
PC antigène												
29,30	35 ± 9		42 ± 11		43 ± 11	54 ± 13	59 ± 11		66 40-92	69 45-93	83 55-111	PC
PC amidolytique												
31	36 24-44	44 28-54				71 31-112			96 65-127	100 71-129	94 66-118	
32						66 43-102		76 59-103		70-140		
33					39 27-48	51 23-95		80 47-151	93 59-148	101 46-154	99 72-155	70-140
PC coagulante												
31	32 24-40	33 24-51				77 28-124			94 50-134	94 64-125	88 59-112	
32						70 41-115		83 60-117	97 63-133	98 62-134	100 71-144	
33					38 30-115	82 28-128		85 44-151	86 61-144	91 39-170	95 66-127	
PS totale												
29,30	36 ± 12		50 ± 14		63 ± 15	86 ± 16	87 ± 16		86 54-118	78 41-114	72 52-92	PS
PS libre												
33					84 61-108	95 48-127		86 63-139	86 53-135	95 62-142	94 61-131	≥ 60 (hommes)
PS coagulante												
31	36 28-47	49 33-67				102 29-162			101 67-136	109 64-154	103 65-140	≥ 50 (femmes non ménopausées)
32						84 59-99		85 59-110	85 60-115	87 63-116	90 62-126	≥ 55 (femmes ménopausées)
33					90 29-115	82 33-154		88 52-138	98 60-149	105 67-162	99 53-147	

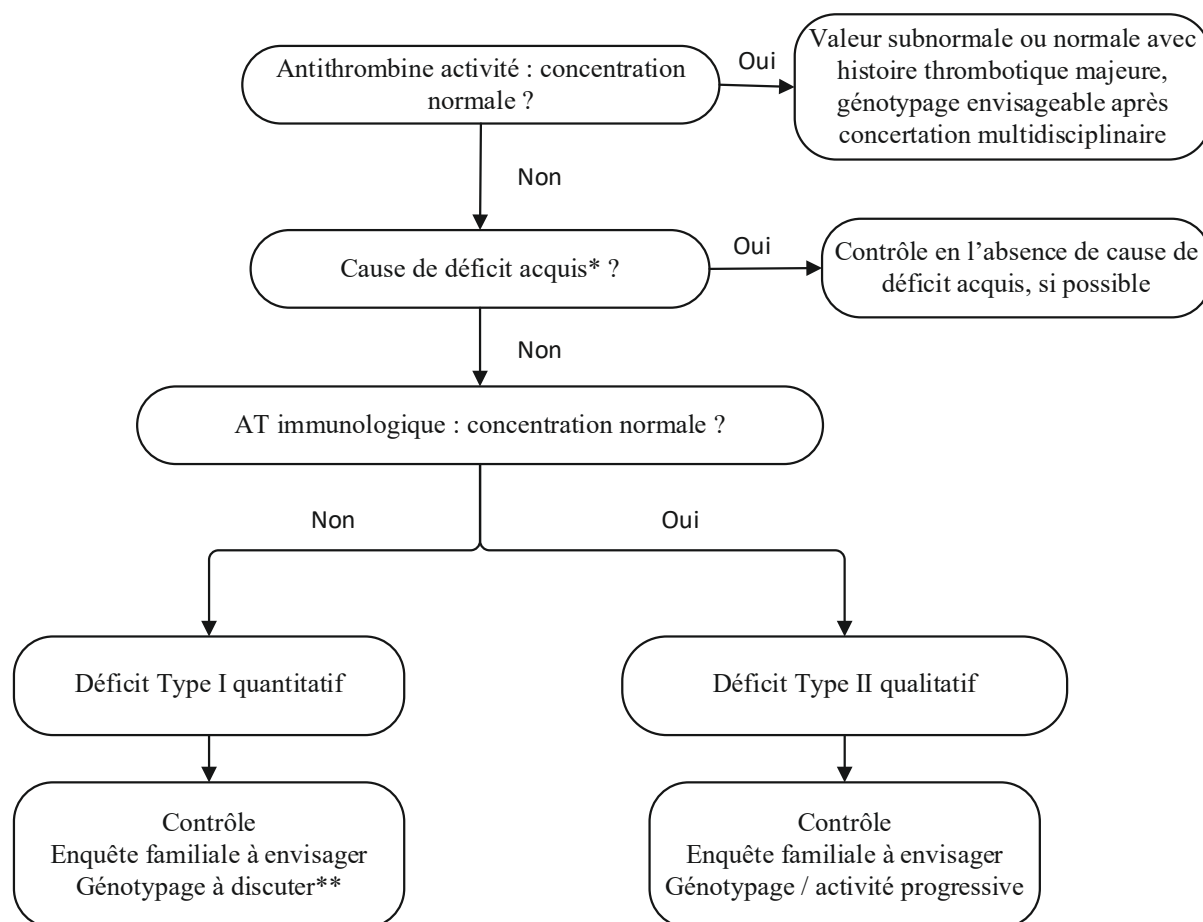
Légende : * [références : **28, 30, 33-36**] ; Andrew et al. : moyenne+1SD ou IC 95 % ; Monagle et al. : moyenne [limites : 95 % population] ; Appel et al. : médiane [IC 90 %] ; Toulon et al. : médiane [5^e -95^e percentile].

Tableau 5 : Causes de déficit acquis de l'antithrombine.

Table 5: Causes of acquired antithrombin deficiency.

Insuffisance hépato-cellulaire	Diminution de synthèse des protéines de la coagulation
Consommation (chirurgie, thrombose étendue, CIVD, LAM3, pré-éclampsie)	L'AT est consommée lors de la formation de caillots
Protéinurie (syndrome néphrotique)	Perte urinaire d'AT imparfaitement compensée
Dénutrition	Défaut de synthèse hépatique
Grossesse	Certains auteurs rapportent une diminution très modérée de la concentration d'AT (de l'ordre de 10 à 20 %) au cours de la grossesse alors que d'autres n'observent pas d'évolution significative 37, 38
Alcoolisme marqué	Défaut de glycosylation
Maladie de Crohn active	Une diminution de la concentration d'AT a été mise en évidence chez les patients souffrant de maladie de Crohn active, de cause vraisemblablement multifactorielle, dont pertes digestives, malnutrition...
Chylothorax	Perte d'AT dans le chylothorax après chirurgie cardiaque pédiatrique
Plasmaphérèse ; CEC	Hémodilution, consommation 39, 40
Anticoagulation à dose curative par HNF et HBPM comportant un pourcentage important de chaînes longues	Diminution modérée (de l'ordre de 20 %) de la concentration d'AT après quelques jours de traitement À contrôler 5 à 10 j après arrêt du traitement
Traitement oestrogénique (contraceptifs oraux contenant plus de 30 µg d'éthinylestradiol)	Certains traitements oestrogéniques sont susceptibles d'engendrer des déficits acquis en AT Après arrêt du traitement, contrôle après au moins deux cycles
Traitement par L-asparaginase	Probable diminution de synthèse hépatique de l'AT

Abréviations : AT : antithrombine ; CIVD : coagulation intravasculaire disséminée ; LAM3 : leucémie aiguë myéloïde de type 3 ; CEC : circulation extra-corporelle ; HNF : héparine non fractionnée ; HBPM : héparine de bas poids moléculaire.



Légende : *Causes de déficit acquis : Tableau 5 ; **Génotypage de SERPINC1 : lorsque les résultats des tests plasmatiques sont d'interprétation difficile, ou lorsque l'enquête familiale est impossible ou non-informative.

Protéine C

Généralités

La protéine C (PC) est une glycoprotéine de 461 AAs ; sa forme circulante comporte 419 AAs. Elle a une MM de 62 kDa. La PC est synthétisée par l'hépatocyte de manière vitamine K dépendante. Sa concentration plasmatique est de l'ordre de 4 mg/L, sa demi-vie moyenne est de 7 heures. Le gène de la PC (*PROC*), situé sur le chromosome 2, s'étend sur 11,6 kb et comprend 9 exons. L'extrémité N-terminale de la protéine comporte 9 résidus d'acide gamma carboxyglutamique (GLA). Il existe un site de clivage par la thrombine (Arg211-Leu212, nomenclature HGVS) et un domaine serine protéase du côté C-terminal (AAs 227 à 461). La PC est un zymogène qui est activé en sérine protéase par la thrombine fixée sur la thrombomoduline présente à la surface luminale de l'endothélium vasculaire. L'EPCR (*endothelial protein C receptor*) lie la PC par son domaine GLA et la présente au complexe thrombine-thrombomoduline. Le clivage par la thrombine transforme la PC en PC activée (PCa) capable d'inactiver ses substrats, les facteurs Va et VIIIa, par protéolyse. Cette activité s'exerce pleinement à la surface de phospholipides chargés négativement, en présence d'ions calcium, de protéine S (PS) et de facteur V. Le système de la PC joue un rôle majeur dans la régulation du processus thrombogène, tout particulièrement au niveau de la microcirculation où le contact entre les protéines et la surface endothéliale est important **42**. La prévalence du déficit en PC dans la population générale serait de l'ordre de 0,2 % **12**. Il existe des déficits constitutionnels quantitatifs (type I) et qualitatifs (type II) plus rares (moins de 20 %), qui sont la conséquence d'anomalies du site actif (type IIa ou IIAM (amidolytique)) ou d'autres régions de la protéine qui sont impliquées dans le fonctionnement du système de la PC (interactions PC/phospholipides, /PS, /FVa, /FVIIIa) [type IIb ou IIAC (anticoagulant)]. Les méthodes commerciales de mesure de l'activité ne permettent pas de détecter les anomalies d'interaction de la PC avec le complexe thrombine-thrombomoduline.

Deux formes de déficit constitutionnel quantitatif en PC ont été distinguées :

- une forme dominante, mise en évidence chez environ 3 % des patients atteints de MTEV, de transmission autosomale dominante, à pénétrance variable, avec des manifestations cliniques chez les hétérozygotes similaires à celles qui sont observées en cas de déficit en AT. D'après la méta-analyse des études observationnelles réalisée par Di Minno *et al.*, le risque relatif de 1^{re} thrombose associée au déficit en PC serait de l'ordre de 7 et le risque de récurrence de l'ordre de 3 **13**. Ces données ne sont pas obtenues à partir d'études tenant compte des génotypes ;

- une forme récessive, dont la prévalence estimée par Tait *et al.* dans une population de donneurs de sang sains écossais était de l'ordre de 1/200 à 1/700 **43**. Les enfants porteurs à l'état homozygote de cette forme de déficit présentent une absence totale de PC fonctionnelle circulante. Ils sont symptomatiques et peuvent présenter une pathologie thrombotique gravissime telle que *purpura fulminans* ou syndrome thrombotique grave dès la naissance. Ils sont issus de familles asymptomatiques. Les variants du gène *PROC* présents chez ces enfants ne sont pas différents de ceux mis en évidence dans la forme dominante, ce qui a conduit à suggérer il y a plus de 20 ans que le déficit en PC pouvait être un facteur de risque relativement faible, n'entraînant de manifestations cliniques qu'en présence d'autres variants génétiques délétères. Cette hypothèse ne tient pas compte d'une possible hétérogénéité dans la thrombogénicité des différents variants.

Les bases moléculaires du déficit en PC ont été établies et de nombreux variants de *PROC* ont été identifiés (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>). Il existe deux polymorphismes fréquents du promoteur -228C>T et -215G>A (nomenclature HGVS) qui sont associés significativement à la concentration de PC circulante. Les homozygotes pour l'allèle CG ont des concentrations de PC légèrement plus basses que les porteurs d'autres génotypes. Le risque relatif de thrombose associé à la présence de cet allèle est significatif mais très modeste (homozygotie pour CG comparée à l'homozygotie pour TA : RR 1,4) **44** et la recherche systématique de ce polymorphisme chez les sujets qui présentent une MTEV n'est pas recommandée. Peu de données sont disponibles concernant l'influence de la concentration de PC ou du type de déficit sur le risque thrombotique. Selon une étude récente, le type de déficit ne semble pas avoir d'influence sur le risque **45**. Mais ces résultats doivent être vérifiés avec une plus large cohorte, certains déficits qualitatifs étant faiblement représentés.

Le génotypage de *PROC* (séquençage des régions codantes et recherche de grand remaniement génique) ne permet pas d'expliquer la totalité des anomalies constitutionnelles de la PC. Des déficits en PC liés à des anomalies constitutionnelles de la glycosylation peuvent être associés à des événements thrombotiques comme décrits dans le CDG syndrome **46**.

Diagnostic biologique des déficits constitutionnels en protéine C

Mesure de l'activité anticoagulante

De nombreux coffrets commerciaux permettent de réaliser cette mesure chronométrique. D'après l'ECAT impliquant 75 laboratoires en juin 2021, les réactifs les plus utilisés

Table 6: Analytical interferences on coagulation inhibitor measurements.

		Antithrombine			Protéine C			Protéine S		
		Activité cofacteur de l'héparine (méthode anti-Xa)	Activité cofacteur de l'héparine (méthode anti-IIa)	Activité progressive	Antigène	Activité anticoagulante	Activité amydo lytique	Antigène	Activité cofacteur de la PC	Antigène (libre et totale)
AVK	warfarine fludione acénocoumarol	Pas d'interférence	Pas d'interférence	Pas d'interférence	Pas d'interférence	Non interprétable Diminution acquise par défaut de synthèse vitamine K dépendante Prélever après 2 semaines d'arrêt des AVK 41	Interprétation délicate Diminution acquise par défaut de synthèse vitamine K dépendante Interprétation nécessitant une expertise		Non interprétable Diminution acquise par défaut de synthèse vitamine K dépendante Prélever après 3 semaines d'arrêt des AVK 41	Interprétation délicate Diminution acquise par défaut de synthèse vitamine K dépendante Interprétation nécessitant une expertise
Anti-IIa direct	Argatroban bivalirudine dabigatran	Pas d'interférence	Surestimation Privilégier une méthode anti-Xa		Pas d'interférence	Surestimation Prélever après 1 semaine d'arrêt du dabigatran			Surestimation Prélever après 1 semaine d'arrêt du dabigatran	
HNF	Héparine sodique Héparine calcique	Pas d'interférence l'absence de surdosage (cf. préconisations fabricant) Si administration sous-cutanée, prélever en résiduel pour limiter l'interférence*			Pas d'interférence analytique Mais diminution acquise (consommation) lors d'un traitement à dose curative : contrôle après 5 à 10 j d'arrêt du traitement				Pas d'interférence analytique en l'absence de surdosage (cf. préconisations fabricant)	Pas d'interférence
HBPM	Tinzaparine Enoxaparine Dalteparine Nadroparine	Mais diminution acquise (consommation) lors d'un traitement à dose curative : contrôle après 5 à 10 j d'arrêt du traitement		Non réalisable						
Anti-Xa inj.	Fondaparinux Danaparouide		Pas d'interférence		Pas d'interférence					
Anti-Xa oral direct	Apixaban Edoxaban Rivaroxaban	Surestimation Privilégier une méthode anti-IIa	Pas d'interférence		Pas d'interférence	Surestimation Prélever après 1 semaine d'arrêt			Surestimation Prélever après 1 semaine d'arrêt	
Autres						FVIII élevé, ACC lupique, RPCa (cf. préconisations fabricant) ⇄ surestimation			FVIII élevé, ACC lupique, RPCa (cf. préconisations fabricant) ⇄ surestimation	Facteur rhumatoïde (cf. préconisations fabricant)

* Avis d'experts

Avis d'experts

Abbreviations : ACC : anticoagulant circulant ; AVK : antagonistes de la vitamine K ; HNF : héparine non fractionnée ; HBPM : héparine de bas poids moléculaire ; RPCa : résistance à la protéine C activée.

étaient : Stago Staclot Protein C® (n = 27), Siemens Protein C reagent® (n = 19), Werfen Hemosil IL Proclot C® (n = 15), Hyphen Hemoclot Protein C® (n = 13).

Le **tableau 7** reprend quelques caractéristiques de coffrets avec les interférences possibles. Toutes les méthodes comportent une première étape de transformation de la PC en PCa à l'aide du Protac, qui est une enzyme spécifique extraite du venin d'*Agkistrodon contortrix*. Toutes mesurent ensuite l'activité anticoagulante de la PCa, dans un mélange du plasma du patient et d'un plasma commercial spécifiquement déplété en PC, mais elles diffèrent par le niveau de déclenchement de la coagulation (test de type TCA ou temps de coagulation secondaire à l'activation du FX par le venin de vipère Russel (RVV)). Quel que soit le test, l'activité du site protéasique de la PCa intervient. Dans les tests de type TCA, les interactions avec les cofacteurs Va, VIIIa, la PS, les phospholipides et le calcium sont prises en compte. Ces réactifs ne sont pas tous équivalents en termes de sensibilité aux variants thrombogènes **47**. Cette méthode est soumise à des interférences plus nombreuses et à une incertitude plus grande qu'avec la méthode amidolytique (**Tableau 8**).

Le génotypage réalisé dans le cadre d'enquête familiale a démontré les limites des tests plasmatiques. En effet, des valeurs subnormales, voire normales, ne permettent pas d'exclure avec certitude la présence de variants délétères **48**. De plus, les mesures d'activité sont réalisées dans des conditions non physiologiques (activation de la PC par le Protac) qui peuvent conduire à une interprétation erronée en présence de certains variants de type II. C'est le cas pour le variant p.Thr357Ala dont l'activation est anormale lorsqu'elle est réalisée à l'aide du Protac, mais plutôt augmentée lorsqu'elle est réalisée à l'aide du complexe thrombine-thrombomoduline. Ce variant pourrait ne pas être thrombogène **49**. À l'inverse, compte tenu du mode d'activation de

la PC, aucun coffret disponible n'évalue les capacités de la PC à interagir avec le complexe thrombine-thrombomoduline ou avec son récepteur endothélial.

Mesure de l'activité amidolytique

La mesure de l'activité amidolytique évalue la capacité fonctionnelle du site catalytique. Il existe de nombreux coffrets commerciaux aux performances équivalentes. D'après l'ECAT impliquant 335 laboratoires en juin 2021, les réactifs les plus utilisés étaient : Berichrom Protein C® (n = 144), IL Hemosil Protein C® (n = 104), Stago Stachrom Protein C® (n = 53).

Les méthodes utilisent toutes le Protac pour activer la PC en PCa et étudient la capacité de la PCa à cliver un substrat chromogène. Il y a peu de causes d'interférences (**Tableau 6**).

À noter que le substrat contenu dans le kit Chromogenix Coamatic Protein C® peut être clivé par d'autres enzymes que la PCa comme le facteur XIIa, la kallikréine, la thrombine, la plasmine et le tPA, lié à un prélèvement difficile, la présence d'une CIVD ou après fibrinolyse thérapeutique. Ainsi, en cas de PC > 200 UI/dL ou de suspicion d'activation du prélèvement, l'activité amidolytique non spécifique peut être mise en évidence en répétant le test avec remplacement du Protac par du sérum physiologique **50**.

Mesure immunologique

L'antigène de la PC peut être évalué à l'aide de méthodes ELISA ou ELFA (sur Vidas® bioMérieux). D'après l'ECAT impliquant 67 laboratoires en juin 2021, les réactifs les plus utilisés étaient : Stago Asserachrom Protein C® (Stago) (n = 26) et Vidas Protein C® Biomerieux (n = 14). Il y a peu de causes d'interférences (**Tableau 6**).

Tableau 7 : Caractéristiques des principaux réactifs de mesure de l'activité anticoagulante de la protéine C.

Table 7: Characteristics of the main reagents for measuring protein C anticoagulant activity.

Réactif	Type d'activation	Dilution plasma (fournisseur)	Interférences signalées par le fabricant				Nb utilisateurs ECAT (juin 2021)
			FVIII (%)	HNF (UI/mL)	Anticoagulant circulant type lupique	FV Leiden hétérozygote	
Cryocheck Clot C®	Venin vipère Russell (RVV-X)	1/10	> 600	> 1,2	-	-	1
Werfen Hemosil IL Proclot®	TCA (silice + PL synthétiques)	pur	> 250	> 1,5	+	+	15
Hyphen Hemoclot Protein C®	TCA	1/10	+	> 1	+	?	13
Siemens Protein C reagent®	TCA (acide ellagique + PL soja)	1/10	+	> 2	+	+	19
Stago Staclot PC®	TCA	1/10	> 250	> 1	?	-	27

Abréviation : PL : phospholipides.

Tableau 8: CV moyen de la mesure de la protéine C par méthode chromogénique et chronométrique des évaluations externes de la qualité ECAT en 2020 et 2021.

Table 8: Average CV of protein C measurement by chromogenic and chronometric method of ECAT external quality assessments in 2020 and 2021.

Taux de Protéine C	CV moyen des méthodes chromogéniques (340 laboratoires)	CV moyen des méthodes chronométriques (80 laboratoires)
90 - 110 %	5 %	8 %
40 - 60 %	6 %	11 %
< 20 %	16 %	26 %

Place du génotypage

Le génotypage de PROC est nécessaire pour permettre le conseil génétique et des diagnostics anténataux précoces dans la forme récessive du déficit. Il peut être utile pour affirmer l'origine constitutionnelle d'un déficit, devant des phénotypes plasmatiques d'interprétation difficile, pour le conseil thérapeutique dans le cadre d'enquêtes familiales ou même

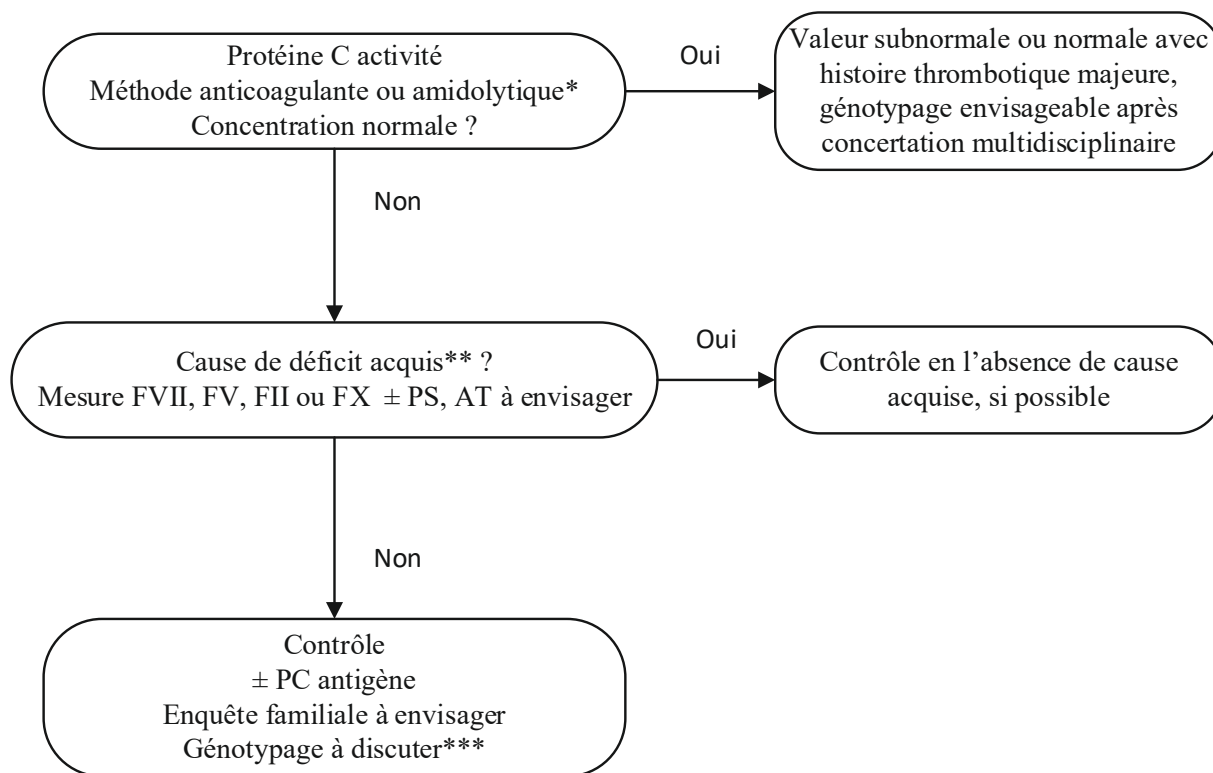
en l'absence d'anomalie plasmatique chez des sujets présentant une histoire thrombotique majeure, après concertation multidisciplinaire. La place d'une recherche génétique d'anomalie constitutionnelle de glycosylation n'est pas établie. Il est recommandé de discuter la réalisation d'une étude du gène de la protéine C (PROC) avec un centre expert.

Valeurs usuelles et variations physiologiques

La concentration de PC est basse à la naissance. À partir de 16 ans, et quelle que soit la méthode utilisée, les valeurs de référence sont comprises entre 70 et 140 % **30**. La concentration de PC est indépendante de l'âge et du sexe (**Tableau 4**).

Stratégie diagnostique du déficit en PC

Les résultats des mesures doivent être interprétés en tenant compte des valeurs de référence (**Tableau 4**), des caractéristiques des coffrets (**Tableau 7**), des causes d'interférences (**Tableau 6**), des causes d'anomalies acquises (**Tableau 9**). Les recommandations de l'ISTH préconisent d'utiliser la méthode amidolytique en première intention et de compléter les investigations par une mesure d'activité chronométrique en cas de résultat normal si une thrombophilie constitutionnelle est fortement suspectée **50**.



Légende : *La méthode amidolytique expose à un défaut de diagnostic des déficits de type IIb (Type II anticoagulant) ; ** Causes de déficit acquis : **Tableau 9** ; *** Le génotypage de PROC est nécessaire pour permettre le conseil génétique et les diagnostics anténataux précoces dans la forme récessive du déficit. Il peut être utile pour affirmer l'origine constitutionnelle d'un déficit, devant des phénotypes plasmatiques d'interprétation difficile.

En effet, la mesure de l'activité anticoagulante est sujette à des interférences plus nombreuses et à une incertitude plus grande qu'avec la méthode amidolytique (Tableau 8). Cependant, cette attitude peut conduire à un défaut de diagnostic des déficits de type IIb. Dans le cas où l'activité anticoagulante n'a pas pu être réalisée et que le résultat de l'activité amidolytique est dans les valeurs de référence, il est important de mentionner que ce résultat ne permet pas d'exclure tous les types de déficits en PC.

Protéine S

Généralités

La PS est une glycoprotéine vitamine K dépendante de 676AAs. Sa forme circulante de MM 70 kDa comporte 635AAs. Sa concentration plasmatique est d'environ 25 mg/L et sa demi-vie est de l'ordre de 48 heures. Le gène codant la PS (*PROS1*) est situé sur le chromosome 3. Il comporte 15 exons s'étendant sur plus de 80 kb. Il existe un pseudogène (*PROS2P*) non codant qui a 97 % d'homologie avec le gène codant. La synthèse de la PS n'est pas exclusivement hépatocytaire ; elle est aussi produite par les cellules endothéliales, les mégacaryocytes, les cellules de Leydig et le cerveau. La partie N terminale de la protéine mature contient un domaine GLA qui lie les ions calcium et dont la présence conditionne l'affinité de la PS pour les phospholipides anioniques. Elle est suivie par une boucle sensible à la thrombine. La partie C-terminale comporte un domaine de liaison à la C4b *binding protein* (C4bBP). Dans le plasma, la PS circule principalement sous deux formes, une forme libre (PSL) (40 %) et une forme liée (60 %) à la C4bBP. La PSL est un cofacteur non enzymatique de la PCa pour la protéolyse des

facteurs Va et VIIIa **42**. Le clivage par la thrombine entraîne la perte de cette fonction. De plus, la PS possède des activités anticoagulantes indépendantes de la PCa en agissant comme cofacteur du TFPI pour inhiber le FXa, et en inhibant directement les FXa et FVa au sein du complexe prothrombinase **53,54**.

Le déficit constitutionnel en PS, facteur de risque de MTEV, est de transmission autosomale dominante, à pénétrance variable. Sa prévalence dans la population générale pourrait être comprise entre 0,03 et 0,13 % **12**. Des déficits en PS hétérozygotes seraient détectés chez 2 à 3 % des patients thrombophiliques. D'après la méta-analyse des données observationnelles de Di Minno *et al.*, le risque relatif de 1^{re} thrombose associé au déficit en PS serait de l'ordre de 5 et le risque relatif de récurrence de l'ordre de 2,5 mais non statistiquement significatif **13**. Ces données sont probablement relativement inexactes car elles ne sont pas obtenues à partir d'études tenant compte des génotypes. Des déficits homozygotes en PS avec absence de protéine circulante ont été rapportés ; la symptomatologie est identique à celle du déficit homozygote en PC **55,56**.

Plusieurs études ont montré que les déficits constitutionnels thrombogènes sont ceux pour lesquels la concentration en PSL plasmatique est fortement diminuée, avec un seuil de risque (30-40 %) plus bas que la limite inférieure des valeurs de référence **57,58**.

Les déficits héréditaires sont de types quantitatifs (I et III) ou qualitatifs (plus rares). Les déficits qualitatifs de type II associent une concentration de PSL normale et une activité cofacteur de la PCa diminuée. Dans le type I, la PST et la PSL sont diminuées de façon proche ; dans le type III, seule la PSL est basse. Les déficits de types I et III peuvent être des

Tableau 9 : Causes de déficit acquis de la protéine C.

Table 9: Causes of acquired protein C deficiency.

Insuffisance hépato-cellulaire	Diminution de synthèse des protéines de la coagulation
Hypovitaminose K	Diminution de la synthèse de PC pleinement carboxylée
Consommation (chirurgie, thrombose étendue, CIVD, LAM3, pré-éclampsie)	La PC est consommée lors de la formation de caillots
Grossesse	Selon certains auteurs, PC inchangée ou augmentation modérée (de 20 % maximum, entre la 6 ^e et la 20 ^e semaine), persistant quelques jours en <i>post-partum</i> 51
Alcoolisme marqué	Défaut de glycosylation
Plasmaphérèse ; CEC	Hémodilution et consommation
Drépanocytose homozygote	La PC est diminuée chez les patients souffrant d'une drépanocytose homozygote 52
Auto-anticorps anti-protéine C	Très rare
Traitement par AVK	Diminution de la synthèse de protéine C pleinement carboxylée
Traitement par L-asparaginase	Probable diminution de synthèse hépatique de la protéine C

Abréviations : AbAVK : antagonistes de la vitamine K ; CIVD : coagulation intravasculaire disséminée ; LAM3 : leucémie aiguë myéloïde type 3 ; CEC : circulation extra-corporelle.

phénotypes différents d'un même variant. La mesure de PSL apparaît plus pertinente que la mesure de PS totale pour le diagnostic de déficit en PS et l'évaluation de la thrombogénicité **59,60**.

Les bases moléculaires du déficit en PS ont été établies et de nombreux variants de *PROS1* ont été identifiés (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>). Le génotypage de *PROS1* (séquençage des régions codantes et recherche de grands remaniements géniques) ne permet pas d'expliquer la totalité des anomalies constitutionnelles de la PS.

Des déficits en PS liés à des anomalies constitutionnelles de la glycosylation peuvent être associés à des événements thrombotiques comme décrits dans le CDG syndrome **46**.

Quelques données concernant les relations génotype-phénotype clinique sont disponibles **58,61**. Tous les variants ne semblent pas équivalents en termes de thrombogénicité. Ainsi, les variants de type II pourraient être moins thrombogènes que les variants de type quantitatif. La présence d'un variant délétère de type quantitatif et la concentration de PSL circulante ont une influence conjointe sur le risque d'événements thrombotiques **62**.

Le variant Heerlen (p.Ser501Pro, nomenclature HGVS) modifie un site de glycosylation de la PS ce qui entraîne une réduction de sa durée de vie dans la circulation et une diminution modeste de sa concentration plasmatique de PS. Les données de la littérature concernant ses conséquences cliniques sont à ce jour contradictoires **58,63,64**.

Diagnostic biologique des déficits constitutionnels en protéine S

Mesure de l'activité (cofacteur de la PCa) de la PS

La mesure de l'activité de la PS présente l'intérêt de détecter les déficits qualitatifs (type II) et quantitatifs (types I et II) avec une sensibilité supérieure à 90 % mais avec une spécificité de 40 à 70 % (risque de faux-positifs liés à de nombreuses interférences) **62**.

D'après l'ECAT impliquant 170 laboratoires en juin 2021, les réactifs les plus utilisés étaient : Stacot PS® Stago (n = 69), HemosIL PS activity® Werfen (n = 50) et Protein S AC® Siemens (n = 39).

Le **tableau 10** reprend quelques caractéristiques des coffrets avec leurs interférences. Les tests mesurent l'allongement du temps de coagulation d'un mélange de plasma à étudier et d'un plasma commercial déplété en PS, en présence de PCa. La coagulation est déclenchée par du facteur tissulaire, ou du FIXa, ou par activation endogène du FX par du RVV en présence de calcium et de phospholipides. D'après l'ECAT impliquant 170 laboratoires sur l'année 2021, le CV de la méthode était de 12 % pour les concentrations de PS > 60 % et 22 % pour les concentrations de PS < 60 %.

Mesures immunologiques de la PS

Les mesures immunologiques comprennent : la mesure de la PS libre (PSL) et la protéine S totale (PST). La PSL peut être mesurée avec une méthode immunoturbidimétrique automatisée ou avec une méthode ELISA classique de type sandwich.

D'après l'ECAT impliquant 321 laboratoires en juin 2021, les réactifs les plus utilisés étaient : Coamatic free PS®/HemosIL free Protein S® (n = 120), Siemens Innovance free PS antigen® (n = 112) et Stago Liatest free Protein S® (n = 62) et Stago Asserachrom free PS® (n = 15). Tous emploient des anticorps monoclonaux pour la capture de la protéine et sa révélation, excepté les méthodes IL® pour lesquelles la capture se fait à l'aide de particules de latex recouvertes de C4bBP et Asserachrom®, pour laquelle elle se fait à l'aide de fragments F(ab')₂ d'un anticorps monoclonal. D'après l'ECAT impliquant 320 laboratoires durant l'année 2021, le CV de la méthode était de 7,5 %, indépendamment de la concentration de PS.

Pour la mesure de la PST, d'après l'ECAT impliquant 54 laboratoires en juin 2021, les réactifs les plus utilisés étaient Stago Asserachrom total PS® (n = 23) et Stago Liatest Protein S® (n = 11).

Place du génotypage

Le génotypage de *PROS1* est nécessaire pour permettre le conseil génétique et des diagnostics anténataux précoces. Il peut être utile pour affirmer l'origine constitutionnelle d'un déficit ou lorsque les résultats des mesures sont d'interprétation difficile et pour le conseil thérapeutique dans le cadre d'enquêtes familiales. La place d'une recherche génétique d'anomalie constitutionnelle de glycosylation n'est pas établie. Il est recommandé de discuter la pertinence de la réalisation d'une étude du gène de la protéine S (*PROS1*) avec un centre expert.

Valeurs usuelles et variations physiologiques

La concentration de la PS est basse à la naissance. Chez l'adulte, les valeurs de référence diffèrent en fonction du sexe, et de l'âge chez les femmes (**Tableau 4**) **34-36**.

Stratégie diagnostique du déficit en PS

Les résultats des mesures doivent être interprétés en tenant compte des valeurs de référence (**Tableau 4**), des caractéristiques des coffrets (**Tableau 10**), des causes d'interférences (**Tableau 6**), des causes d'anomalies acquises (**Tableau 11**).

Les recommandations de l'ISTH préconisent d'utiliser la méthode immunologique de mesure de la PSL en première intention à cause des nombreuses causes d'interférence lors

de la mesure de l'activité. Si la PSL est normale et la suspicion clinique de thrombophilie est forte, une mesure de la PS activité doit être associée pour ne pas méconnaître un déficit de type II **62**. Dans le cas où l'activité anticoagulante n'a pas pu être mesurée et que le résultat de la PSL se situe dans les valeurs de référence, il est important de mentionner que ce résultat ne permet pas d'exclure tous les types de déficits en PS. Il n'y a pas lieu de mesurer systématiquement la C4bBP ou la PS totale. En effet, ces mesures n'apportent pas à ce jour d'information susceptible d'avoir une influence sur l'évaluation de la thrombogénicité.

FV LEIDEN ET VARIANT G20210A (C.*97G>A) DU GÈNE F2

Texte de référence : Middeldorp et van Hylckama Vlieg, 2008 **67**.

Généralités

Le variant Leiden du facteur V (FV), qui résulte du remplacement du nucléotide G par un A en position 1601 (ancienne nomenclature 1691) du gène du FV, affecte l'Arg 534 (ancienne nomenclature 506) du FV de la coagulation. Le FV possède des fonctions pro- et anti-coagulantes. En effet, il est procoagulant en tant que cofacteur (sous sa forme ac-

Tableau 10 : Caractéristiques des principaux réactifs de mesure de l'activité anticoagulante de la protéine S.

Table 10: Characteristics of the main reagents for measuring protein S anticoagulant activity.

Réactif	Type d'activation	Dilution du plasma (fournisseur)	Interférences signalées par le fabricant			
			FVIII (%)	HNF (UI/mL)	Anticoagulant circulant type lupique	FV Leiden hétérozygote
Cryocheck ClotS® Cryopep	PCa/RVV/PL/Ca	1/10	> 600	> 1	+	+
Hyphen Hemoclot PS® Sysmex	PCa/FIXa/PL/Ca	1/10	> 200	> 1	+	+
HemosIL PS activity® Werfen	PCa/rhTF/PL/Ca	pur	?	> 1,6	?	?
Staclot PS® Stago	PCa/FVa/PL/Ca	1/10	> 150	> 1	+	?
Protein S AC® Siemens	PCa/RVV/PL/Ca	1/10	> 400	> 3	+	+

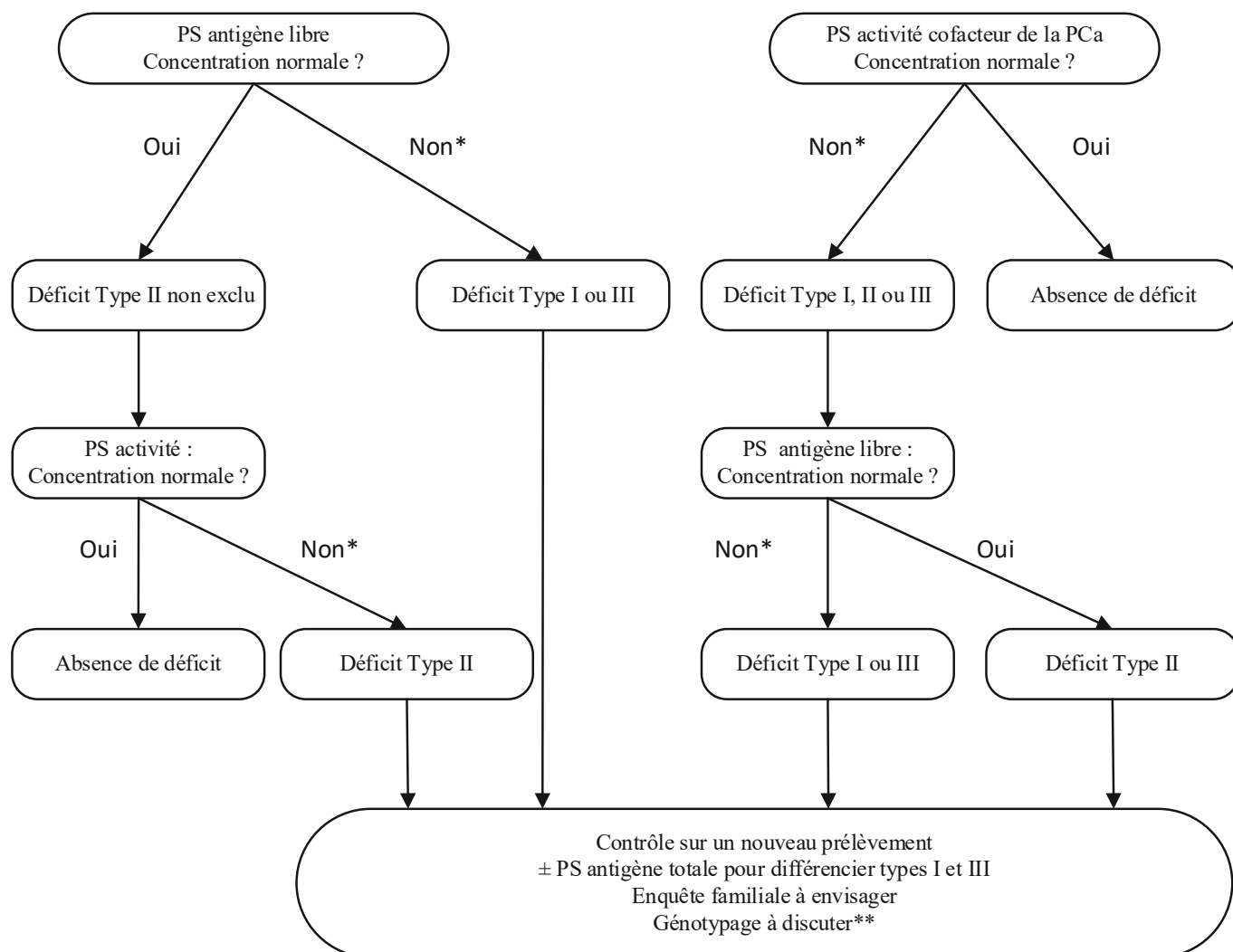
Abréviations : Ca : calcium ; PCa : protéine C activée ; PL : phospholipides ; RVV : venin de Vipère Russell ; rhTF : facteur tissulaire recombinant humain.

Tableau 11 : Causes d'anomalies acquises de la protéine S.

Table 11: Causes of acquired protein S defects.

Dysfonction hépatique	Diminution de synthèse des protéines de la coagulation
Hypovitaminose K	Diminution de la synthèse de PS pleinement carboxylée
Consommation (chirurgie, thrombose étendue, CIVID, LAM3, pré-éclampsie)	La PS est consommée lors de la formation de caillots
Grossesse	Dès 13 à 20 semaines de grossesse, la PS est diminuée chez 50 % des femmes enceintes La recherche d'un déficit constitutionnel en PS n'est pas recommandée pendant la grossesse et jusqu'à 3 mois en <i>post-partum</i> , car l'interprétation des résultats des dosages est très délicate 37
Alcoolisme marqué	Défaut de glycosylation
Protéinurie (syndrome néphrotique)	Perte urinaire imparfaitement compensée
Drépanocytose homozygote	La PS est diminuée chez les patients souffrant d'une drépanocytose homozygote 52
Auto-anticorps anti-protéine S	Très rare
Syndrome inflammatoire	Risque de faux diagnostic (positif ou négatif, en fonction des médiateurs de l'inflammation mis en jeu) 65, 66
Traitement par AVK	Diminution de la synthèse de PS pleinement carboxylée
Traitement oestrogénique (contraceptifs oraux, hormono-substitution de la ménopause)	Diminution moyenne de l'ordre de 20 %, en fonction de la classe de l'oestrogène
Traitement par L-asparaginase	Probable diminution de synthèse hépatique de la PS

Abréviations : AVK : antagonistes de la vitamine K ; CIVID : coagulation intravasculaire disséminée ; LAM3 : leucémie aiguë myéloïde type 3 ; PS : protéine S.



Légende : *Après exclusion des causes de déficit acquis (Tableau 11) et des interférences (Tableau 6) ; **Le génotypage de *PROS1* est nécessaire pour permettre le conseil génétique et les diagnostics anténataux précoces. Il peut être utile pour affirmer l'origine constitutionnelle d'un déficit franc, devant des phénotypes plasmatiques d'interprétation difficile.

tivé par la thrombine) de l'action du FXa sur la prothrombine et anticoagulant en tant que cofacteur de la PCa pour l'inactivation du FVIIIa. La PCa inactive le FVa par clivage au niveau des Arg 334 (306), 534 (506), 707 (679). Le clivage en 534 intervient en premier et il est prépondérant lorsque le FVa et la PCa sont présents en faible concentration mais l'inactivation n'est totale qu'après clivage en 334. L'activité du FV en tant que cofacteur de la PCa pour l'inactivation du FVIIIa nécessite le clivage en 534. En cas de variant Leiden, l'Arg 534 est remplacée par une glutamine, ce qui entraîne un gain de fonction du FV. Ce variant engendre une « résistance à l'action de la PCa » (RPCa) qui peut être mise en évidence par des tests de coagulation. L'importance du rôle anticoagulant du FV est bien démontrée par le phénotype RPCa pseu-

do-homozygote des patients hétérozygotes composites porteurs du variant Leiden du FV sur un allèle et d'une mutation « null » sur l'autre allèle qui abolit complètement l'activité du gène. La répartition géographique du variant Leiden du FV est hétérogène. Dans le nord de l'Europe et aux États-Unis, le variant à l'état hétérozygote est présent avec une fréquence moyenne de 5 % dans la population générale ; la fréquence diminue du Nord au Sud de l'Europe, avec des fréquences de l'ordre de 2 % chez les hispaniques ; elle est plus faible chez les noirs américains et africains (1 %) et chez les asiatiques (0,5 %). La fréquence des homozygotes a été évaluée à 0,02 % chez les caucasiens. Les porteurs du FV Leiden ont un risque accru de présenter des épisodes thromboemboliques veineux (risque relatif (RR) de 1^{re} thrombose

18^e QUESTION : Quelles méthodes et quelle stratégie pour explorer les inhibiteurs AT, PC et PS ?

Proposition # 59 : *Il est recommandé d'interpréter les résultats en tenant compte des valeurs de référence, des pathologies sous-jacentes, du contexte hormonal chez la femme (grossesse, COC, THS) et des médicaments associés (notamment les anticoagulants). (Accord fort)*

Antithrombine (cf. algorithme) (Accord fort)

Proposition # 60 : *Pour la détection d'un déficit en AT, il est recommandé, en première intention, de mesurer l'activité cofacteur de l'héparine de l'AT à l'aide d'un réactif de sensibilité optimale. (Accord fort)*

Proposition # 61 : *Si l'activité cofacteur de l'héparine est diminuée, il est proposé, dans un second temps, de réaliser la mesure immunologique pour distinguer les déficits en AT de type I de ceux de type II. (Accord fort)*

Proposition # 62 : *En cas de déficit de type II, il est proposé de réaliser un génotypage de SERPINC1, plus informatif qu'une mesure de l'activité AT progressive pour évaluer le risque associé de thrombose. (Accord fort)*

Protéine C et Protéine S (cf. algorithmes) (Accord fort)

Proposition # 63 : *Pour la détection d'un déficit en PC, il est recommandé en première intention de mesurer l'activité de la PC (anticoagulante ou amidolytique). La méthode amidolytique peut conduire à un défaut de diagnostic des déficits de type IIb (type II anticoagulant). (Accord fort)*

Proposition # 64 : *Pour le dépistage d'un déficit en PS, en cas de diminution de l'activité, la mesure immunologique de la PS libre est à réaliser pour caractériser le déficit (anomalie quantitative ou qualitative). La mesure immunologique de la PS libre seule ne permet pas de dépister les déficits qualitatifs. La mesure de l'activité anticoagulante permet de dépister les déficits quantitatifs et qualitatifs. (Accord fort)*

Proposition # 65 : *En cas de déficit en PC ou PS, ou de phénotypes plasmatiques d'interprétation difficile, il est recommandé d'évaluer avec un centre expert la pertinence de réaliser un génotypage de PROC ou PROS1. (Accord fort)*

Dépistage des anomalies rares de l'AT, de PC et de PS

Proposition # 66 : *En cas d'histoire personnelle et familiale de thromboses documentées et sévères associées à des investigations de thrombophilie négatives, il est proposé d'évaluer avec un centre expert la pertinence de réaliser un génotypage (SERPINC1, PROC, PROS1). (Accord fort)*

Comment rechercher un déficit en AT, PC, PS lorsque le patient est traité par anticoagulant ?

Proposition # 67 : (Accord fort)

- HNF/HBPM : une diminution de l'AT plasmatique mise en évidence chez un patient traité à dose curative par HNF ou par une HBPM doit entraîner un contrôle après 5 à 10 j d'arrêt du traitement.
- AVK : la recherche de déficit en PC ou PS chez un patient anticoagulé par AVK n'est pas recommandée. Les contrôles programmés après arrêt des AVK doivent être réalisés à au moins 2 semaines de l'arrêt pour la PC et 3 semaines pour la PS.
- AOD : l'activité de l'AT doit être évaluée à l'aide d'une méthode basée sur l'inhibition du facteur Xa, en cas de traitement par dabigatran ou par une méthode basée sur l'inhibition de la thrombine en cas de traitement par un AOD anti-Xa. Les méthodes chronométriques de mesure de l'activité de PC et PS ne doivent pas être utilisées, car elles peuvent conduire à une surestimation de la PC ou PS.

de l'ordre de 3 à 5 chez les hétérozygotes) ; l'influence du variant sur le risque de récurrence est faible (RR 1,5). Le variant Leiden du FV est responsable d'au moins 95 % des RPCA FV dépendantes d'origine génétique.

Le variant c.*97G>A (ancienne nomenclature G20210A) du gène de la prothrombine (FII) se situe en aval de la séquence codante, dans la région 3' non traduite (3'UTR). Elle est située dans une région fonctionnelle qui conditionne la maturation des ARN messagers (ARNm). Le variant augmente l'efficacité du clivage et de la maturation, entraîne une accumulation d'ARNm mature dans le cytoplasme et une augmentation de la synthèse protéique. Ce mécanisme explique l'association significative du variant à des concentrations de FII 30 % plus élevées chez les hétérozygotes que chez les personnes non porteuses du variant. Cette augmentation de concentration pourrait, par son impact sur la génération de thrombine, expliquer l'influence du variant sur le risque thrombotique. La prévalence du variant en Europe est aux alentours de 2 %, avec un gradient croissant Sud-Nord. Elle est rare dans les populations d'Afrique et d'Asie. Le risque relatif de 1^{re} thrombose veineuse chez les hétérozygotes est de l'ordre de 2 à 3 ; l'influence du variant sur le risque de récurrence est faible (RR 1,5).

Comment rechercher ces variants ?

La recherche de ces deux mutations ponctuelles est simple et de nombreuses méthodes d'analyse des gènes *F5* et *F2* peuvent être employées (PCR-RFLP, PCR spécifique d'allèle, flap endonuclease + FRET, analyse de courbes de fusion, PCR en temps réel, discrimination allélique à l'aide de sondes fluorescentes...). Certains laboratoires ont développé des méthodes « maison ». D'autres travaillent à l'aide de réactifs commerciaux. En Europe, les méthodes de PCR en temps réel sont maintenant plus utilisées que les méthodes RFLP (EEQ DGKL RFP 2017-18). Une enquête auprès des laboratoires français hospitaliers et privés réalisant ces analyses a permis d'identifier cinq trousse commerciales employées en France au 1^{er} trimestre 2019. Leurs principales caractéristiques et performances sont rapportées dans le **tableau 12**. De plus, LACAR® et Vienna Lab® commercialisent des trousse permettant la recherche simultanée des deux variants ainsi que pour Vienna Lab, un tampon (D2PCR™ Buffer) qui permet d'éviter l'extraction préalable d'ADN **68-74**. D'après les données de la littérature, les performances analytiques (sensibilité, spécificité) des méthodes sont globalement bonnes, supérieures à 98 % **75**. Avec les méthodes commerciales, pour éviter les diagnostics erronés, il convient de lire attentivement les informations données par le fabricant et d'examiner systématiquement les don-

nées brutes d'analyse (profil des courbes de fusion, valeur de Ct...) avant de conclure quant au génotype. De façon générale, des variations de séquence proches des variants recherchés peuvent en effet induire des profils anormaux. Ils sont généralement interprétés comme invalides par les systèmes de mesure. Cependant, dans certains cas, des diagnostics erronés restent possibles (**Tableau 12**). Toute discordance ou ambiguïté doit être levée par l'utilisation d'une autre méthode de détection voire par le séquençage bidirectionnel de la région d'intérêt du gène **76**.

En tant qu'examen à des fins médicales touchant les caractéristiques génétiques d'une personne à des fins médicales, la recherche des variants thrombogènes de *F2* et *F5* est régie en France par le code de la santé publique (titre III, partie législative - articles L1131-1 à 3 et réglementaire - articles R 1131-1 à 21) que ce soit pour les conditions de prescription, de réalisation de l'analyse, de communication et d'archivage des résultats. De plus, devant l'importance d'établir un diagnostic fiable à 100 % et d'après le rapport d'évaluation technologique de 2011 de l'HAS concernant les recherches de ces variants, « *tout au moins lorsque le résultat d'une recherche est positif, un contrôle sur un deuxième prélèvement paraît devoir être conseillé* ».

RÉSISTANCE À LA PROTÉINE C ACTIVÉE (RPCA)

L'observation d'une résistance à la protéine C activée (RPCa) est, dans au moins 95 % des cas, la conséquence de la présence du FV Leiden. Le résultat de ce test ne permet pas d'affirmer la présence du variant et de déterminer le statut génétique (hétérozygotie/homozygotie). De plus, il n'est pas totalement sensible et spécifique vis-à-vis de ce variant. Compte tenu de ces éléments, l'HAS a recommandé en 2006 de rechercher directement le FV Leiden par génotypage et l'analyse RPCa n'est plus inscrite à la NABM.

Dans un nombre restreint de situations cliniques (transplantation hépatique, greffe de cellules souches hématopoïétiques), la recherche du FV Leiden réalisée avec l'ADN extrait des leucocytes n'est pas pertinente ; la recherche d'une RPCa reste alors indiquée **78,79**.

Le test de recherche de RPCa développé initialement reposait sur la mesure d'un TCA réalisé en présence et en l'absence de PCa (Chromogenix Coatest-APCR®) **77**. Pour améliorer la spécificité, il a ensuite évolué vers une version dans laquelle le plasma du patient à étudier est dilué dans du plasma déficient en FV (Coatest APCR-V®). D'autres tests de principes un peu différents ont ensuite été développés (**Tableau 13**). Ils diffèrent par :

- le mode de déclenchement de la coagulation : en aval de la tenase, ou dans un système de protéines purifiées ;

- l'état de la PC dans le système : certaines méthodes sont réalisées en présence ou en l'absence de PCa d'origine exogène ; dans d'autres coffrets, l'ajout d'un extrait de venin de serpent, le Protac, génère la PCa à partir de la PC endogène ;
- la présence ou l'absence d'ajout de plasma normal ou de protéines purifiées susceptibles de compenser les anomalies plasmatiques de l'échantillon testé (anomalies du FV exceptées).

Une méthode permet la quantification du FV Leiden (Hemoclot Quanti V-L®, Hyphen Biomed). Le résultat d'une méthode en deux temps ($\pm$ PCa) peut être exprimé soit à l'aide du ratio des deux temps, soit à l'aide d'un ratio normalisé. Chaque laboratoire doit déterminer localement et pour chaque lot de réactif la zone de normalité et la zone de résistance. Certaines de ces méthodes restent sensibles à des variations de concentrations de facteurs. La sensibilité à la présence des anticoagulants lupiques est diminuée lorsque l'activation de la coagulation a lieu en aval de la ténase (activation des facteurs V, X ou II), et par optimisation de la concentration en phospholipides. Il convient de tenir compte des limites des méthodes indiquées par les fabricants. Les mesures de RPCa sont pour la majorité des tests possibles chez les patients traités par héparine à dose thérapeutique en l'absence de surdosage, compte tenu de la présence d'inhibiteur d'héparine dans les réactifs. Les tests pour la plupart sont insensibles aux AVK, en particulier lorsqu'ils sont réalisés avec un mélange du plasma du patient et d'un plasma commercial déficient en FV.

Quelques données sont disponibles concernant l'effet du dabigatran et du rivaroxaban sur les tests de RPCa réalisées à l'aide des réactifs Coatest APCR V® et Pefakit®. Le dabigatran est susceptible d'engendrer de faux-négatifs avec ces 2 tests ; Pefakit® est moins influencé par le rivaroxaban que Coatest® **80**. Il n'est pas conseillé de rechercher une RPCa chez un patient anticoagulé par AOD.

ANOMALIES CONSTITUTIONNELLES DU FIBRINOGENE : DYSFIBRINOGENEMIES ET HYPODYSFIBRINOGENEMIES

Textes de référence : Casini *et al.*, 2015, 2017, 2018 **81-83**.

Aspects moléculaires

Le fibrinogène est une glycoprotéine de grande taille (340 kD), composée de trois chaînes polypeptidiques α , β et γ en double (six chaînes au total) unies par des ponts disulfures inter- et intra-chaînes et formant une structure trinodulaire, avec un nodule central E (région aminotermi-nale) et deux nodules latéraux D (région carboxyterminale). Les gènes codant pour les trois chaînes sont situés sur le

chromosome 4. La synthèse des chaînes est effectuée dans l'hépatocyte et leur assemblage s'effectue dans le réticulum endoplasmique ; de nombreuses modifications post-traductionnelles ont lieu dans l'appareil de Golgi. La synthèse du fibrinogène est augmentée dans les contextes inflammatoires. Le fibrinogène est le substrat de la thrombine, avec formation de monomères de fibrine après clivage par la thrombine de l'extrémité aminotermi-nale des chaînes α et β (libération des fibrinopeptides A et B). Les monomères de fibrine vont s'assembler pour former le réseau de fibrine, qui sera stabilisé par l'action du facteur XIIIa (liaisons covalentes). Le réseau de fibrine est dégradé par le système de la fibrinolyse (forte affinité du plasminogène et de son activateur, le tPA, pour la fibrine), avec libération de produits de dégradation de la fibrine (D-dimères).

La recherche d'une (hypo)dysfibrinogénémie après un événement thrombotique inexplicé fait tout particulièrement suite aux travaux sur le fibrinogène Paris V (Dusart), mis en évidence dans une famille avec une symptomatologie thrombotique veineuse et artérielle grave débutant à un âge jeune **84**. La mutation p.Cys554Arg de la chaîne Aa du fibrinogène induit un trouble de la polymérisation de la fibrine responsable d'une anomalie structurale du caillot de fibrine, dense et résistant à la fibrinolyse **85**. Un certain nombre de cas ont depuis été rapportés dans la littérature et leurs bases moléculaires ont été établies. Les dysfibrinogénémies sont la plupart du temps la conséquence de la présence de mutations faux-sens de l'un des gènes qui codent pour les chaînes du fibrinogène. Dans les hypodysfibrinogénémies, différents mécanismes moléculaires ont été rapportés. Il existe des variants qui affectent la formation et/ou la sécrétion d'une chaîne, d'autres qui induisent une augmentation de clairance de la protéine variante ; des hétérozygoties composites pour des variants responsables d'un déficit d'une part, et d'autre part d'une anomalie de fonction ont été décrites.

Tous les variants publiés et les phénotypes cliniques associés sont recensés dans une base de données française, en accès libre sur le site du GFHT (<https://site.geht.org/base-fibrinogene/>), tenue à jour régulièrement **86**.

Le phénotype clinique des dysfibrinogénémies est très hétérogène. Il peut n'y avoir aucun signe clinique au moment du diagnostic (55 %), en particulier lors d'une découverte fortuite (investigations de laboratoire sans point d'appel ou en pré-opératoire), mais des manifestations cliniques peuvent survenir ultérieurement. La symptomatologie peut être hémorragique (25 %) avec un tableau clinique souvent modéré (signes cutanéomuqueux). L'incidence annuelle de saignements majeurs est estimée à 2,5/1000 patients-années.

Tableau 12 : Variants thrombogènes de F5 et F2 : coffrets commerciaux CE-IVD, utilisés en France en 2019 (enquête GFHT).
Table 12: Thrombogenic variants of F5 and F2: commercial CE-IVD sets, used in France in 2019 (GFHT survey).

Coffret	FV Leiden kit FII (prothrombin) G20210 kit (FDA 2003)	Lightmix <i>in vitro</i> Diagnostics kit FII G20210 FV (Leiden)	LC-FII-IP_24 ou LC-FII-IP_96 (rs1799963) LC-FV_24 ou LC-FV_96 (rs6025)	Xpert HemosIL FII & FV test (FDA 2009)	FV Leiden RealFast assay PTH 20210G>A RealFast assay
Fournisseur	Roche Diagnostic	Tibmolbiol (vendu par Roche)	LACAR	Cepheid	Vienna Lab Diagnostics GmbH
Méthode d'amplification	PCR temps réel	PCR temps réel	Amplification isotherme (LAMP, « Loop-mediated isothermal amplification DNA ») 77	PCR temps réel	PCR temps réel
Méthode d'analyse	Analyse de courbe de fusion	Analyse de courbe de fusion	Analyse de courbe de fusion	Analyse de Ct, courbe d'amplification	Discrimination allélique
Méthode d'identification	Sondes FRET 70-73 - 1 sonde d'ancrage - 1 sonde spécifique de l'allèle sauvage	Hybridization SimpleProbe® canal 519 reconnaissant allèle « sauvage » 78	Hybridation simple : sonde reconnaissant : allèle muté (FII), allèle sauvage (FV) 78	Sondes Scorpion 76, 78	Sonde Hydrolyse TaqMan® 76, 78
Appareillages et compatibilité	LC® 2.0	LC® 1.1 x LC® 2.0 LC® 480 I et II LC® Nano LC® 96 Cobas 2480	LC-GENIE III™ CFX96™ LC® 480I et II	GENEXPERT INFINITY	AB 7500 Fast ABStepOne™ CFX96™ LC® 480 Mx3005P Rotor-Gene® 6000
Type d'échantillon	ADN	ADN	Sang total EDTA ADN	Sang total EDTA ou citrate frais, conservé à +4 °C jusqu'à l'analyse* ou congelé	Sang total EDTA ADN
Préparation échantillon intégrée ?	Non	Non	Oui : manuelle	Oui : plateforme intégrée automatisée autonome et fermée	Oui : manuelle avec utilisation du tampon D2PCR™
CIQ	Synthétique : hétérozygote	Synthétiques : - hétérozygote - homozygote muté - homozygote « sauvage »	Synthétiques : - « sauvage » - homozygote muté	ADN synthétique des F2 et F5 contenu dans une matrice équivalente au sang (hétérozygote)	Synthétique : - « sauvage » - homozygote muté
Analyse simultanée des variants de F2 et F5 ?	Non	Non	Oui avec trousse Lamp Human FII&FVL Duplex KIT (rs1799963/rs6025)	Oui	Oui avec trousse FV-PTH mpx RealFast™ assay
Durée du test	< 1 h	60-100 min	< 1 h	~ 30 min	< 90 min
Sensibilité analytique	Limite de détection : 202 copies	Limite de détection : 250 copies (1.5 ng)	Limite de détection : Leucocytes : 0.2x10 ³ /mm ³ ADN : 5ng/mL et fonction de l'appareil utilisé	50 µL sang total	Limite de détection : 0,2 ng
Robustesse Interférences	Héparine ?		Pas d'interférence si Bilirubine < 5 mg/dL Cholestérol < 250 mg/dL EDTA < 10 mg/mL Triglycérides < 500 mg/dL	Pas d'interférence si (75) Héparine < 14,3 USP/mL, Bilirubine < 16 mg/dL Cholestérol < 250 mg/dL Triglycérides < 1 932 mg/dL	
Risques de diagnostics erronés	Faux positifs FV Leiden : A1692C G1689A A1696G	Faux positifs FV Leiden : G1689A		Erreurs de statut : si sang total congelé/décongelé ou leucocytes très augmentés	

Tableau 13 : Résistance à la protéine C activée. Caractéristiques des méthodes les plus utilisées fin 2018 en Europe d'après l'ECAT.

Table 13: Activated protein C resistance. Characteristics of the most commonly used methods at the end of 2018 in Europe according to ECAT.

Méthodes	Milieu réactionnel	Interférences signalées par le fabricant
Chromogenix/Hemosil APC™Resistance –V (Werfen)	TCA en présence de : - Plasma déficient en FV - PCa - Inhibiteur d'héparine	Anticorps anti- PL
Pefakit APC-R Factor V Leiden® (Pentapharm)	- Plasma déficient en FV - PCa - Activateur de la prothrombine FV dépendant PL indépendant (noscarine) - Activateur du FV (RVV-V de Daboia russelli) - Inhibiteur d'héparine	FV < 50 % Inhibiteurs directs de la thrombine
PROC global/FV® (Siemens)	- Plasma déficient en FV - PROTAC - Calcium++ - Inhibiteur d'héparine	Au moins 24 h
Staclot APC-R(r) (Stago)	- Plasma déficient en FV+PL - Venin de crotale - PCa - Calcium++	FV < 50 % Inhibiteurs directs de la thrombine

19^e QUESTION : Comment détecter les variants thrombogènes fréquents FV Leiden et F2 c.*97G>A (anciennement 20210A) ?

Proposition # 68 : Pour la recherche des variants thrombogènes, un consentement signé par le patient (après information préalable) et par le prescripteur est indispensable, conformément aux articles R.1131-4 et R.1131-5 du code de la santé publique en France. (Accord fort)

Proposition # 69 : La recherche des deux variants thrombogènes de F2 et F5 peut être effectuée à l'aide de différentes méthodes commerciales ou « maison » (PCR-RFLP, PCR spécifique d'allèle, flap endonucléase + FRET, analyse de courbes de fusion, PCR en temps réel, discrimination allélique à l'aide de sondes fluorescentes...). En dehors de rares situations cliniques (transplantation hépatique, transplantation de cellules souches hématopoïétiques), la recherche de résistance à la Protéine C Activée (RPCa) dans le but de détecter la présence d'un FV Leiden n'est pas recommandée. (Accord fort)

La symptomatologie peut aussi être thrombotique (20 %), avec des épisodes veineux, mais aussi artériels. L'incidence annuelle des thromboses est estimée à 18,7/1000 patients-années. Des tableaux obstétricaux sont rapportés avec en particulier la survenue d'arrêts de grossesse précoces, mais pour des génotypes rares. Enfin, des signes hémorragiques et thrombotiques peuvent être observés au sein d'une même famille et chez un même patient. Les hypodysfibrinogénémies sont souvent symptomatiques avec, d'une part, des phénotypes hémorragiques qui peuvent être sévères (principalement dépendant de la concentration de fibrinogène coagulable circulant), et d'autre part, des manifestations thrombotiques plus fréquentes que pour les dysfibrinogénémies.

La recherche d'une anomalie du fibrinogène est à envisager après un épisode thrombotique veineux ou artériel, survenu chez un sujet jeune, avec une histoire thrombotique familiale au premier degré, sans autre facteur de risque biologique identifié **83**.

Aspect pratique

Une anomalie qualitative du fibrinogène ou (hypo)dysfibrinogénémie est suspectée par l'observation d'une différence entre l'activité du fibrinogène et sa concentration (méthode immunologique), avec un ratio activité/antigène $\leq 0,7$, mais ni la sensibilité, ni la spécificité de ce seuil n'ont été validées par une étude prospective **81**. Le terme de dysfibrinogénémie est utilisé lorsque la concentration du fibrinogène (anti-

génique) est dans les valeurs de référence 1,5 à 3,5 g/l **87**, et hypodysfibrinogénémie lorsqu'elle est diminuée. Dans certains cas d'hypodysfibrinogénémie, le ratio n'est probablement pas pertinent, en particulier lorsque la concentration de fibrinogène est très basse.

La détection d'une anomalie constitutionnelle du fibrinogène repose sur la mesure de son activité coagulante et de sa concentration. Le sous-comité (SSC) fibrinogène de l'ISTH a recommandé de réaliser la mesure d'activité par la méthode chronométrique de von Clauss qui évalue la concentration du fibrinogène coagulable par la thrombine **83**. Les méthodes d'estimation indirecte du fibrinogène à partir du temps de Quick proposées avec certains appareils ne sont pas appropriées, car l'activité du fibrinogène peut être surestimée **81**. Le retentissement d'une anomalie qualitative du fibrinogène sur les tests de coagulation de première intention (temps de Quick, TCA) est variable selon les réactifs utilisés et fonction de la mutation sous-jacente **88,89**. Le temps de Quick est souvent peu voire pas allongé (fonction de la concentration de fibrinogène coagulable).

Un allongement du temps de thrombine est observé dans 88 % des cas et un allongement du temps de reptilase dans 90 % des cas d'(hypo)dysfibrinogénémie **81**. Ces deux tests peuvent être utiles au diagnostic, mais ils ne sont plus inscrits à la NABM. L'interprétation de ces temps de coagulation doit bien sûr tenir compte d'un éventuel traitement anticoagulant prescrit : anticoagulants oraux et antagonistes de la vitamine K (temps de Quick, TCA), héparine (TCA, temps de thrombine) et anticoagulant oral anti-IIa (dabigatran) (temps de thrombine).

Le diagnostic est à confirmer dans un centre spécialisé d'hémostase qui peut faire réaliser le génotypage (comme recommandé par le SSC de l'ISTH), d'éventuelles études plasmatiques complémentaires, les enquêtes familiales, le conseil thérapeutique.

ANTICORPS ANTIPHOSPHOLIPIDES (APL) : DIAGNOSTIC DE SYNDROME DES ANTIPHOSPHOLIPIDES (SAPL)

Le point sur les connaissances

La recherche au laboratoire d'anticorps antiphospholipides (aPL) s'inscrit dans la démarche diagnostique du syndrome des antiphospholipides (SAPL) dans un contexte de thrombophilie acquise ou de suivi de pathologies auto-immunes **90**.

Hétérogénéité et signification clinique des anticorps

Il existe une grande hétérogénéité des aPL, en termes de cible, de signification clinique et de persistance. Les aPL sont des auto-anticorps dirigés contre des PL anioniques (comme la cardiolipine) ou contre des protéines à forte affinité pour ces PL. Les cibles protéiques sont multiples et la β_2 GPI est l'un des principaux antigènes. Les anticorps associés au risque thrombotique sont dirigés contre un complexe PL-protéine, principalement le complexe PL- β_2 GPI et pour une moindre part le complexe phosphatidylsérine-prothrombine (PS-PT). La β_2 GPI est constituée de cinq domaines (I à V) ; le domaine V qui permet sa liaison aux surfaces anioniques ; l'épitope du domaine I reconnu par les anticorps associés à un risque thrombotique est démasqué après liaison aux PL et changement de conformation. Seuls, les aPL dirigés contre le domaine I sont associés au SAPL ; ceux dirigés contre d'autres domaines de la β_2 GPI ne le sont pas, en particulier ceux qui sont dirigés contre le domaine V. Une fois formé, le complexe anticorps- β_2 GPI est capable de se lier à différents récepteurs cellulaires (récepteurs *Toll-Like* 2 et 4, glycoprotéine $Ib\alpha$...). Les mécanismes à l'origine des complications thrombotiques sont complexes et ne sont pas bien élucidés. Ils comportent l'activation d'un certain nombre de cellules impliquées dans les processus de régulation de l'hé-

20^e QUESTION : Comment détecter une anomalie constitutionnelle du fibrinogène ?

Proposition # 70 : Dans un bilan de thrombophilie, il est recommandé de mesurer systématiquement l'activité du fibrinogène par la méthode chronométrique de von Clauss. En cas de déficit, la méthode immunologique peut être réalisée. (Accord fort)

Proposition # 71 : La réalisation d'un temps de thrombine et d'un temps de reptilase peut aussi être proposée pour le dépistage d'une anomalie constitutionnelle du fibrinogène, mais ces actes sont hors nomenclature. (Accord)

mostase et de la réponse inflammatoire **91,92**. Les anticorps de signification clinique sont des anticorps persistants. Les anticorps transitoires, tels que ceux dirigés contre la cardiolipine seule, qui sont détectés au cours d'infections, de cancers, de certains traitements (bêtabloquants, phénothiazines...), de maladies auto-immunes, de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ou même sans pathologie objectivée, n'ont pas de signification clinique. Compte tenu de l'hétérogénéité des anticorps et de l'absence de méthode de référence pour détecter spécifiquement les anticorps les plus pertinents sur le plan clinique, leur recherche nécessite d'associer plusieurs méthodes.

Recherche des anticorps, critères temporels, interprétation des résultats

D'après les recommandations internationales **90** actualisées par le sous-comité (SSC) « antiphospholipides » de l'ISTH en 2018 **93**, le diagnostic de SAPL doit obligatoirement comporter la recherche, à partir d'un même prélèvement :

- des anticorps (IgG/IgM) dirigés contre les complexes cardiolipine- β 2GPI (dits « anticardiolipine » aCL) ;
- des anticorps (IgG/IgM) anti- β 2GPI (a β 2GPI) ;
- d'un « anticoagulant circulant de type lupique » (LA) par tests de coagulation mettant en évidence un effet inhibiteur PL-dépendant des anticorps.

La recherche d'autres anticorps n'est actuellement pas recommandée même si des données de la littérature montrent que la présence d'anticorps spécifiques anti-PS-PT serait bien corrélée à la présence de LA **94,95**. Les anticorps dirigés contre le domaine I de la β 2GPI sont les plus associés au risque thrombotique, mais leur recherche n'est à ce jour pas conseillée car la valeur ajoutée de leur détermination dans la classification des SAPL n'est pas clairement démontrée **96**.

Un diagnostic biologique positif de SAPL ne peut être établi que si la persistance des anticorps a été démontrée. Ainsi, un résultat positif lors d'une première recherche doit obligatoirement entraîner un ou plusieurs contrôles ultérieurs espacés d'au moins 12 semaines avec systématiquement la réalisation des trois tests (anticardiolipine, a β 2GPI et LA). L'intervalle entre les premières manifestations cliniques et la démonstration de la présence d'anticorps ne doit pas être supérieur à 5 ans. Si la première recherche positive a été réalisée à moins de 3 mois de la première manifestation clinique, deux contrôles ultérieurs espacés d'au moins 3 mois sont indiqués.

Il existe différents profils de risque thrombotique en fonction du type d'anomalie, du nombre de tests positifs et du degré de positivité. D'après Chaouya *et al.*, le risque throm-

botique associé à la présence d'un LA apparaît similaire au risque associé à la présence d'une IgG aCL ou a β 2GPI. La triple positivité (LA positif + IgG aCL positif + IgG a β 2GPI positif) est associée à un risque thrombotique plus fort que la double ou la simple positivité. L'association aux événements thrombotiques est plus significative pour les IgG que pour les IgM. Les IgM ne sont pas des facteurs de risque indépendants de thrombose, mais leur présence augmente le risque induit par les IgG de même isotype ou le LA. Il semble donc y avoir une place pour la recherche d'IgM, en 2^e intention, chez les patients porteurs d'un LA, d'une IgG aCL ou a β 2GPI. Les IgM avec ou sans IgG peuvent être associées à la morbidité obstétricale et il est donc suggéré de les rechercher en cas de suspicion de SAPL obstétrical **97,98**. Pour l'*European League Against Rheumatism* (EULAR), les sujets à haut risque thrombotique ou de complications obstétricales sont ceux qui présentent des anomalies persistantes de type LA, ou une double positivité ou une triple positivité, ou des titres forts d'APL **99**. La place des IgM n'est pas abordée.

Recherche d'anticoagulant circulant de type lupique

Principes des recommandations

Les LA doivent être recherchés selon les recommandations du SSC LA de l'ISTH, publiées en 1995 **100** puis révisées en 2009 et 2020 **7,9,101**.

Les grandes lignes de ces recommandations sont les suivantes :

a) Préanalytique : se reporter au paragraphe « prélèvement et traitement ».

b) Dépistage (screen) : compte tenu de la grande hétérogénéité des anticorps, la réalisation de deux tests de dépistage de principes différents est obligatoire pour conclure à l'absence de LA : un temps de coagulation initiée par du venin de vipère Russell dilué (dRVVT) et un TCA réalisé à l'aide d'un réactif sensible (PL en faible concentration et comme activateur, silice ou acide ellagique). Par exemple, les réactifs contenant du kaolin, trop peu sensibles, ne doivent pas être utilisés pour cette recherche. Le dépistage est positif si un résultat anormal est obtenu avec au moins l'un des deux tests, en l'absence d'interférence (anticoagulants, inflammation, CRP).

c) Confirmation (confirm) : lorsque le dépistage est positif, le caractère PL-dépendant de l'inhibiteur doit être démontré dans un test de même principe que celui utilisé en dépistage, en vérifiant l'effet neutralisant d'une forte concentration de PL. La mise à jour de 2009 évoquait l'intérêt des PL en bi-couches, ou en phase hexagonale.

d) Tests intégrés : les tests « intégrés » correspondent à deux présentations d'un même réactif qui ne diffèrent que

par la concentration de PL, l'un de faible concentration « dépistage » et l'autre en forte concentration « confirmation ». Ces tests sont à privilégier.

e) Épreuves de mélange (mixing) : lorsque le résultat du test de dépistage est positif, la réalisation du même test avec un mélange à parties égales du plasma du patient (PP) et d'un plasma normal (PN) validé pour la recherche de LA (voir ci-dessous), sans pré-incubation, vise à montrer l'existence d'un effet inhibiteur du PP, quelle qu'en soit la cause (antiphospholipides, anti-facteur, anticoagulant). La place de l'épreuve de mélange dans la recherche de LA réalisée à l'aide des tests « intégrés » fait l'objet de débats. Elle est indispensable en cas d'allongement très important des temps de coagulation (risque de faux-négatif pour un LA puissant). En cas de déficit en facteur ou de traitement par AVK, dans les tests de type dRVVT, le dépistage peut être réalisé d'emblée avec le mélange mais cela entraîne une réduction de sensibilité qui peut conduire à des faux-négatifs si un LA « faible » est présent **9,101-103**.

f) Expression des résultats : selon l'ISTH, les résultats doivent être exprimés en ratio des temps de coagulation (TC) du PP et du PN à chacune des étapes. Le ratio doit être exprimé avec deux chiffres après la virgule. Pour les TCA, l'index d'anti-coagulant circulant (IAC, connu sous le terme « d'indice de Rosner ») $[TC \text{ du mélange} - TCPN]/TCPN \times 100$ est utilisé. Pour certains tests intégrés, le résultat est exprimé en différence de TC entre les deux tests. Pour les autres tests « intégrés », 2 modes d'expression des résultats ont été proposés : ratio *screen/confirm* ou pourcentage de correction $[(screen - confirm)/screen] \times 100$. Une normalisation par rapport aux résultats obtenus pour le PN peut être réalisée en utilisant l'un des deux modes de calculs suivants qui sont équivalents : $[(screen \text{ PP}/screen \text{ PN}) / (confirm \text{ PP}/confirm \text{ PN})]$ ou $[(screen \text{ PP}/confirm \text{ PP}) / (screen \text{ PN}/confirm \text{ PN})]$. Il n'y a pas d'élément déterminant en faveur de l'un ou l'autre de ces modes d'expression. Une autre possibilité a été proposée pour réduire la variabilité inter-lots **104** ; elle consiste à utiliser en dénominateur la moyenne du TC déterminé pour chaque lot plutôt que le TC du PN mesuré à chaque série.

Aspects pratiques

Informations et examens d'hémostase devant accompagner la recherche de LA

En pratique, avant de réaliser la recherche de LA, et pour orienter les tests, il faut :

- disposer des informations concernant les traitements anticoagulants ;
- réaliser des examens d'hémostase d'orientation :

- TP, TCA (réactif utilisé en première intention en pratique quotidienne), fibrinogène avec examens complémentaires adéquats en cas de résultats anormaux ;

- test anti-Xa et temps de thrombine en cas d'absence d'information sur le traitement anticoagulant.

Lorsqu'un syndrome inflammatoire est présent, un contrôle à distance est nécessaire compte tenu du risque de diagnostics erronés (temps de coagulation raccourcis lorsque le FVIII est augmenté, ou allongés par interférence de la CRP) **104,105**.

Temps de venin de vipère Russell dilué (dRVVT)

Le dRVVT a pour principe l'activation directe du FX par un extrait de venin de vipère Russell ou le venin lui-même, en présence de PL et d'ions calcium. Le dRVVT évalue sélectivement la conversion par le FXa, en présence de son cofacteur le FVa, de la prothrombine en thrombine, alors que dans les tests de type TCA, les étapes de la coagulation en amont du FX interviennent. Ce test présente donc l'avantage d'être indépendant des concentrations des facteurs VII, VIII, IX, XI, et des facteurs de la phase contact. Dans une étude menée en 2000, la sensibilité aux LA était comprise entre 96 et 100 % et la spécificité entre 60 et 73 % **106**. Les tests de confirmation ne doivent être réalisés que lorsque les tests de dépistage sont positifs.

TCA sensible

D'après Fritsma *et al.*, parmi les réactifs considérés comme ayant une très bonne sensibilité aux LA, figurent PTT-LA® (Stago), Actin FSL® (Siemens) et HemosIL APTT-SP® (Werfen) ; Hemosil SynthasIL® (Werfen) aurait une sensibilité intermédiaire **107**. Certains centres utilisent des réactifs d'un même fabricant pour réaliser les étapes de détection et de confirmation, par exemple : Actin FSL/Actin FS®, Actin FSL/Pathromtin® (Siemens), Cephén/Cephén LS® (Hyphen) ; PTT-LA (Stago) suivi d'un Staclot LA® (Stago) en cas de positivité ; ou bien directement des tests intégrés [Hemosil SCT® (Werfen), Staclot LA® (Stago), Cryocheck® Hex LA (Cryoep)] **108**. Le TCA est un test global influencé par de nombreuses anomalies de la coagulation et est soumis à de nombreuses interférences, ce qui limite sa spécificité.

Temps de textarine/temps d'écarine, temps de venin de vipère Taïpan/temps d'écarine

L'écarine et la textarine, isolées à partir de venins de serpents, respectivement d'*Echis carinatus* et de *Pseudonaja textilis*, sont des activateurs directs de la prothrombine carboxylée ou non. Avec l'écarine, l'activation est indépendante de la présence de PL et du FVa, contrairement à celle induite par la textarine. Le venin de vipère Taïpan (*Oxyuranus*

scutellatus) contient des sous-unités FXa-like et FVa-like, capables d'activer la prothrombine carboxylée ou non en méiiothrombine en présence de PL et d'ions calcium.

Le dépistage d'un LA peut être réalisé à l'aide d'un temps de textarine ou de venin de vipère Taïpan, et la confirmation à l'aide d'un temps d'écarine. Ces tests ont l'avantage d'être insensibles à l'effet d'un traitement par AVK et la présence d'AOD anti-Xa (rivaroxaban, apixaban), mais ils sont sensibles à celle de dabigatran. Les performances du venin de vipère Taïpan/temps d'écarine ont été étudiées récemment dans une étude multicentrique de l'ISTH **109**. Les CV de reproductibilité et de répétabilité étaient $\leq 5,0$ %. L'absence de sensibilité aux AOD anti-Xa a été confirmée. La sensibilité, spécificité, valeur prédictive et négative au LA étaient de 72 %, 95 %, 88 % et 87 % (par rapport au dRVVT) pour des patients non traités ou traités par AVK ou AOD anti-Xa. Fait important, la présence d'HNF ou HBPM a conduit à des faux-positifs. Pour l'instant, ces tests ne sont pas utilisés couramment.

Plasma normal, plasma normal de référence

Pour déterminer le temps témoin ou réaliser des tests avec mélange, il faut disposer d'un *pool* de plasmas normaux de qualité optimale, c'est-à-dire pauvre en PL et contenant > 80 % de chaque facteur de la coagulation. Les recommandations de 2009 proposent l'utilisation d'un *pool* préparé localement, ou d'un plasma commercial (lyophilisé ou congelé) préparé dans des conditions adéquates pour la recherche de LA et validé pour cette utilisation **7**. Actuellement, la préparation locale d'un *pool* paraît difficile en raison de très nombreuses contraintes en termes de qualité et de réglementation.

Seuils de positivité

Pour les tests de dépistage et de mélange, les seuils de positivités retenus sont les 99^e percentiles des distributions observées chez les sujets sains. Pour les tests « intégrés », il n'y a pas de recommandation pour le ratio *screen/confirm* ; pour le mode d'expression $[(\text{screen}-\text{confirm})/\text{screen}] \times 100$, il a été proposé d'utiliser la moyenne des % de correction. L'intérêt de ce dernier mode d'expression n'a pas été formellement démontré. Les seuils de positivité doivent être vérifiés à chaque changement de lot de réactif. Selon l'ISTH 2009, les seuils de positivité devaient être déterminés localement d'après les résultats obtenus avec des plasmas de 40 adultes sains de moins de 50 ans. Le nombre de sujets sains à étudier a fait l'objet de débats ultérieurs. La plupart des laboratoires n'ayant pas accès à des populations de sujets sains de taille suffisante, il a été récemment proposé de n'étudier que 20 sujets, pour les recherches de LA comme

pour les recherches d'anticorps, et d'accepter les seuils indiqués par les fournisseurs pour un lot de réactif donné, s'il n'y a pas plus de deux valeurs hors de ces limites **104**. L'Expert Committee on Biological Standardization sous l'égide de l'OMS propose un panel de trois plasmas de référence lyophilisés (1st International Reference Plasma Panel for LA 13/172) (LA négatif, LA modérément positif et LA fortement positif), qui peuvent être utiles lors de la mise en œuvre locale de méthodes.

Performances analytiques des tests

Le choix d'un réactif doit tenir compte des performances analytiques en termes de sensibilité et spécificité. Malheureusement, sur ce sujet, les données de la littérature sont, à ce jour, insuffisantes et il n'existe pas de *gold-standard* pour la recherche de LA. Les programmes internationaux d'évaluation externe de la qualité (UK NEQAS, ECAT...) apportent des informations sur les choix des utilisateurs en termes de tests et sur leurs performances. Ainsi fin 2018, pour les tests de détection de type TCA, 60 % des adhérents à l'ECAT utilisaient Werfen HemosIL APTTSP®, Siemens Actin FSL® ou Stago PTTLA® et pour les dRVVT, 70 % utilisaient Werfen HemosIL dRVVT®, Siemens LA screen® et 20 % Stago dRVVT screen®. Les tests « intégrés » à l'aide d'HemosIL SCT étaient assez fréquemment utilisés. Les enquêtes de l'ECAT réalisées entre 2008 et 2015 montrent 99,5 % de réponses concordantes pour les échantillons avec LA fortement positifs, entre 90 et 99 % pour les LA positifs, entre 45 et 70 % pour les LA faiblement positifs, et 96 % pour les LA négatifs **110**.

Recherche de LA lorsque le patient est traité par anticoagulant **101**.

Patients traités par héparines (HNF, HBPM) ou fondaparinux

Les héparines (HNF et dans une moindre mesure les HBPMs, et aussi fondaparinux) allongent de manière variable les temps de coagulation utilisés pour la recherche d'un LA, et leur présence dans l'échantillon peut engendrer des faux-positifs. Au cours de ces traitements, seuls les réactifs contenant des agents neutralisant l'héparine (polybrène, héparinase) peuvent être utilisés. Il faut prendre connaissance des seuils d'interférence indiqués par les fabricants et/ou les vérifier/déterminer localement. Dans tous les cas, il est préférable de réaliser le prélèvement en résiduel et de mesurer systématiquement le niveau par test anti-Xa.

Patients traités par AVK

Si l'INR est compris entre 1,5 et 3,0, les tests sont réalisés directement avec le mélange « *Pool* plasmas normaux »

+ « plasma patient » mais cette condition méthode induit une réduction de sensibilité avec un risque de faux-négatif **101**, ce qui doit être mentionné dans le compte-rendu. Au-delà d'un INR à 3,0, la recherche ne doit pas être réalisée même sur mélange, du fait d'un risque de faux-positif **101**.

Patients traités par AOD ou par argatroban

La présence d'inhibiteurs directs du FXa (rivaroxaban, apixaban...) ou de la thrombine (dabigatran, argatroban) peut engendrer des faux-positifs dans la recherche de LA, y compris lorsqu'ils sont présents à des concentrations très faibles, inférieures à la limite de quantification des méthodes de mesure utilisées dans les laboratoires d'hémostase, et/ou lorsque les tests d'hémostase courants (TP, TCA avec un réactif peu sensible aux LA) sont normaux **111,112**. Il ne faut donc pas réaliser les tests directement avec les plasmas des patients recevant ces médicaments. Le sous-comité de l'ISTH recommande de ne pas diluer le plasma lors de la recherche d'un LA chez un patient traité par AOD **101**.

Plusieurs procédés visent à éliminer l'effet des AODs préalablement à la recherche de LA. Le charbon activé, commercialisé sous différentes formes [DOAC-STOP® (Haematex Research), DOAC-Remove® (5-Diagnostics)], adsorbe les AOD. Ces procédés permettent d'exclure un LA si la recherche est négative, à condition de les avoir validés localement **101**. En revanche, en cas de positivité, ils ne permettent pas de distinguer une vraie positivité d'une interférence liée à des concentrations résiduelles même très faibles d'AOD **113**. Un contrôle réalisé après 12 semaines, et en l'absence de traitement par AOD est alors nécessaire. Si l'arrêt du traitement anticoagulant n'est pas possible, un relais par HBPM peut être envisagé. Des réactifs de TCA et dRVVT qui seraient peu ou pas sensibles aux AOD (par exemple, Cephen/Cephen LS® et Hemoclot LAS/LAC® de Hyphen Biomed Sysmex) sont en cours d'évaluation.

Interprétation

Lorsque la recherche de LA est positive, si les informations recueillies sont insuffisantes pour exclure un traitement susceptible d'engendrer de faux-positifs, le test anti-Xa permet d'exclure la présence d'AOD anti-Xa, et d'évaluer le niveau d'anti-Xa d'HNF ou d'HBPM (en cas de présence de neutralisant dans le réactif, vérifier le niveau d'interférence en fonction des réactifs). Le temps de thrombine permet d'exclure la présence d'un anticoagulant anti-IIa. Pour l'HNF, la mesure d'un temps de thrombine peut ne pas être informative car certains réactifs sont peu sensibles à l'héparine **114**.

Recherche des anticorps anticardiolipine (aCL) β_2 GPI dépendants et des anticorps anti- β_2 GPI par tests immunologiques

Des actualisations de l'ISTH complétant les recommandations initiales de 2009 ont été publiées par le SSC de l'ISTH en 2014 et 2018 **93,115**. Les tests immunologiques doivent rechercher les anticorps (IgG/IgM) dirigés contre les complexes cardiolipine- β_2 GPI (aCL) et les anticorps anti- β_2 GPI (a β_2 GPI). Les méthodes de recherche des anticorps dont la cible est la cardiolipine seule ne sont pas appropriées car elles détectent des anticorps qui ne sont pas associés à la survenue de thrombose. Les tests peuvent être réalisés, avec du plasma ou du sérum, à l'aide de méthodes de type ELISAs (tests de 1^{re} génération), ou de méthodes automatisées en phase solide. Ces plateformes automatisées emploient différents supports (particules magnétiques, microsphères) et différents systèmes de détection (chimiluminescence, cytométrie en flux, systèmes multiplexes). Elles permettent de rechercher simultanément les quatre types d'anticorps. Toutes les méthodes souffrent encore à ce jour d'un manque de standardisation. Les experts ont identifié à plusieurs reprises les origines de l'hétérogénéité des performances **96,98** :

- hétérogénéité des types de plaques ELISA, des PLs, des agents bloquants, de la nature et de la conformation de l'antigène β_2 GPI (qui doit être d'origine humaine), du *coating* de la phase solide, etc. ;
- absence de calibrants de référence et absence d'hétérogénéité dans le mode d'expression des résultats (absence d'unités internationales) ;
- absence de consensus concernant les seuils de positivité, qui doivent être déterminés de la même façon que pour la recherche de LA **104**.

Les conditions de travail plus strictes et harmonisées des plateformes sont favorables à une réduction de la variabilité inter-laboratoire. Les recommandations de 2014 précisent que la variabilité inter-essais doit être inférieure à 20 % en ELISA et à 10 % en système automatisé. De bonnes performances analytiques (répétabilité, fidélité intermédiaire intra et inter laboratoires) ont été rapportées pour le système automatisé HemosIL AcuStar **116**.

COMMUNICATION DES RÉSULTATS

Les comptes-rendus d'analyses doivent comporter les seuils de positivité, et l'interprétation intégrée des résultats par rapport à ces seuils. Il doit être indiqué que la persistance des anticorps (conditions temporelles, voir plus haut) nécessite d'avoir été démontrée pour qu'une signification clinique puisse être envisagée.

AUTRES FACTEURS BIOLOGIQUES DE RISQUE DE THROMBOSE

Les autres facteurs biologiques de risque de thrombose seront abordés par le groupe de travail « Propositions du GFHT sur la thrombophilie - aspects cliniques ».

Une élévation de la concentration plasmatique du FVIII peut être recherchée à distance de l'évènement thrombotique (> 3 mois). La recherche ne doit pas être effectuée sous AOD. En cas de thromboses de localisation atypique (splanchnique, cérébrale, etc.), la recherche de la mutation V677F de *JAK2*, et d'une mutation de *CALR* (néoplasie myéloproliférative) et la recherche d'hémoglobinurie paroxystique nocturne sont à envisager.

LA MESURE DES D-DIMÈRES A-T-ELLE UNE PLACE DANS LE BILAN DE THROMBOSE ?

Les D-dimères (DDs) sont les produits terminaux de dégradation par la plasmine de la fibrine stabilisée avec des liaisons covalentes permises par l'action du FXIIIa. À l'état physiologique, 2 à 3 % du fibrinogène plasmatique sont convertis en fibrine générant la faible quantité de DDs détectables dans le plasma de sujets sains. La demi-vie des DDs est d'environ 8 heures ; ils sont éliminés par le rein et le système des phagocytes mononucléés **117**. Une augmentation des DDs plasmatiques témoigne de l'activation systémique de coagulation et de fibrinolyse ou de la présence d'un thrombus constitué. De nombreuses méthodes de mesure de DDs ont été développées, qualitatives (ex : Clearview®...), quantitatives manuelles de type ELISA (ex : Asserachrom DD®, Stago – non adaptés aux tests unitaires), quantitatives automatisées de type ELFA (Vidas D-Dimères®, Biomérieux) ou immunoturbidimétriques utilisant des anticorps monoclonaux adsorbés sur des particules de latex [Liatest® (Stago), D-Dimer HS500® (Werfen), Innovance D-Dimer® (Siemens)...], etc. Toutes les méthodes ne sont pas équivalentes en termes de performances, compte tenu de différences méthodologiques (hétérogénéité des antigènes, cibles des anticorps), de l'hétérogénéité des calibrants et de l'absence d'harmonisation dans l'expression des résultats **118**. D'après l'ECAT (n = 670 laboratoires), les réactifs les plus utilisés en 2021 en Europe étaient : Siemens Innovance D-Dimer® (n = 363), IL HemosIL D-Dimer HS500® (n = 155) et Stago STA Liatest D-Dimer Plus® (n = 96). Les domaines de mesure de ces méthodes, qui toutes expriment le résultat en FEU, et les interférences signalées par les fabricants sont rapportées dans le **tableau 14**.

La mesure des DDs peut être utilisée pour contribuer à l'évaluation du risque de récurrence après un premier évènement thrombo-embolique veineux non provoqué dans le cadre d'un score. Trois scores d'évaluation de ce risque (HERDOO2 pour

les femmes seulement, DASH et Vienne) ont été proposés (**Tableau 15**). La concentration plasmatique des DDs est l'un des éléments pris en compte dans chacun de ces scores **119-123**. Concernant HERDOO2, dans les études initiales de proposition et de validation du score réalisées par Rodger *et al.* **119,120**, les DDs ont été mesurés avec la méthode Vidas®. Un travail ultérieur de la même équipe a démontré que l'emploi des réactifs Liatest DDI® (le réactif Liatest DDI® + n'a pas été étudié), Innovance®, D-Dimer HS®, et TinaQuant D-Dimer Gen. 2® ne sont pas appropriés puisqu'il conduit à une mauvaise classification du risque chez 14 % à 19 % des patients en fonction des réactifs. Cela est probablement dû aux limites inférieures des domaines de mesure, trop élevées **121**. Le DASH score a été établi par Tosetto *et al.* **123** à partir de données issues de sept études qui comportaient des collectifs de sujets de taille très variable sans homogénéité dans les méthodes de mesure (**Tableau 16**) **124-131**. Tosetto *et al.* ont ensuite présenté une validation externe du score **131** dont la seule précision était que les DDs étaient mesurés à l'aide de « méthodes quantitatives ». L'étude THE-VTE a apporté des précisions sur les performances des méthodes Vidas® et D-Dimer HS® **130** et montré la validité de ces deux méthodes avec des performances similaires mais des seuils différents (*cut-off* à 500 ng/mL pour Vidas®, à 230 ng/mL pour D-Dimer HS®). Aucune information complémentaire n'est disponible au sujet des performances des autres méthodes mentionnées dans l'étude initiale de Tosetto *et coll.* **123**. Concernant le score de Vienne, dans l'étude princeps, les DDs sont utilisés comme valeur continue. Ils ont été mesurés avec le coffret Asserachrom® **122**. Tritschler *et al.* ont étudié les performances de la 2^e version de ce score chez les sujets âgés **132** ; les DDs ont été mesurés avec Vidas®. Le score n'est pas applicable chez les sujets de plus de 65 ans.

Au total, dans le cadre de l'évaluation des scores de risque de récurrence de thrombose, seules les méthodes de mesure des DDs validées dans ces scores peuvent être utilisées :

- HERDOO2 : méthodes Vidas® ;
- DASH : les méthodes Vidas® et D-Dimer HS® sont appropriées. À ce jour, il n'y a pas d'information claire concernant les performances des autres méthodes ;
- score de Vienne : il n'y a pas d'information suffisante au sujet des performances des méthodes automatisées actuellement disponibles.

De plus, en 2019, les néerlandais et les norvégiens ont proposé un autre modèle de prédiction du risque de récurrence [*The Leiden Thrombosis Recurrence Risk Prediction model* (L-TRRiP)], incluant un nombre plus important de variables de laboratoire dont les DDs mesurés à l'aide du réactif D-dimer HemosIL assay® **133**.

21^e QUESTION : Comment rechercher des anticorps antiphospholipides ?

Proposition # 72 : *Étant donné l'hétérogénéité des anticorps antiphospholipides, il est recommandé de rechercher systématiquement, à partir d'un même prélèvement, des anticorps IgG/IgM anti-cardiolipine et IgG/IgM anti-β2GPI par des méthodes immunologiques, ainsi qu'un anticoagulant circulant de type lupique (LA) par méthodes de coagulation. (Accord fort)*

Proposition # 73 : *La recherche d'anticorps (IgG et IgM) anticardiolipine et anti-β2GPI peut être effectuée dans le plasma ou le sérum, avec des méthodes immunologiques de type ELISA ou sur des systèmes automatisés. Les seuils de positivité sont les ≥ 99^e percentiles des distributions observées chez les sujets sains. (Accord fort)*

Proposition # 74 : *Pour le dépistage d'un anticoagulant de type lupique, il est recommandé de réaliser systématiquement un temps de venin de vipère Russell dilué (dRVVT) et un TCA mesuré à l'aide d'un réactif sensible (faible concentration en phospholipides et activateur de type silice ou acide ellagique). Les seuils de positivité recommandés sont les 99^e percentiles des distributions observées chez les sujets sains. (Accord fort)*

Proposition # 75 : *Si le dépistage d'un anticoagulant circulant de type lupique est positif (au moins un test positif en l'absence d'interférence), il est recommandé de réaliser un test de confirmation de l'effet neutralisant d'une concentration élevée en phospholipides sur l'action de l'inhibiteur pour montrer la phospholipo-dépendance de l'anticorps. Si le dépistage est négatif (dRVVT et TCA avec un réactif sensible négatifs), il est recommandé de ne pas faire de test de confirmation (risque de faux-positifs). (Accord fort)*

Comment rechercher un anticoagulant de type lupique lorsque le patient est traité par anticoagulant ?

Proposition # 76 : (Accord fort)

- **HNF/HBPM :** *Au cours de ces traitements, seuls les réactifs contenant des agents neutralisant l'héparine (polybrène, héparinase) peuvent être utilisés. Il faut prendre connaissance des seuils d'interférence indiqués par les fabricants et/ou les vérifier/déterminer localement. Dans tous les cas, il est préférable de réaliser le prélèvement en résiduel et de mesurer systématiquement le niveau d'activité anti-Xa. Pour l'HNF, la mesure d'un temps de thrombine peut ne pas être informative car certains réactifs sont peu sensibles à l'héparine.*

- **AVK :** *Si l'INR est compris entre 1,5 et 3,0, les tests sont à réaliser directement avec un mélange à parties égales du plasma du patient et d'un plasma normal validé pour la recherche de LA ; cette condition induit une réduction de sensibilité. Au-delà d'un INR à 3,0, la recherche ne doit pas être réalisée, même sur mélange, du fait d'un risque de faux-positif.*

- **AOD :** *La présence d'AOD peut engendrer des faux-positifs, y compris lorsqu'ils sont présents à des concentrations très faibles, inférieures à la limite de quantification des méthodes de mesure utilisées dans les laboratoires d'hémostase. Le charbon activé peut être utilisé pour éliminer l'effet des AODs préalablement à la recherche de LA. Ce procédé permet d'exclure un LA si la recherche est négative. En revanche, en cas de positivité, ils ne permettent pas de distinguer une vraie positivité d'une interférence liée à des concentrations résiduelles même très faibles d'AOD.*

- *Pour toute recherche d'anticoagulant de type lupique positive, l'absence d'interférence avec un médicament anticoagulant doit être systématiquement recherchée (par exemple, en effectuant un test anti-Xa générique ou un temps de thrombine pour dépister les héparines et AOD).*

Proposition # 77 : *Il est recommandé que tout résultat positif soit contrôlé après un intervalle de temps d'au moins 12 semaines avec un nouveau prélèvement. La première recherche ne doit pas avoir lieu plus de 5 ans après les manifestations cliniques. (Accord fort)*

Tableau 14 : Caractéristiques des méthodes de la mesure des D-dimères.

Table 14: Characteristics of the methods for the measurement of D-dimer.

	Domaine de mesure (cf. fabricant)	Hb (g/L)	Triglycérides (g/L)	Bilirubine (µM)	Facteur Rhumatoïde (UI/mL)	Anticorps anti-souris	Albumine	Réaction croisée PDF
Vidas DD exclusion II®	45-10 000 ng/mL FEU	> 4,8	> 30	> 537	> 400		> 60 g/L	oui si PDF+++
Liatest DDI+®	0,27-4 µg/mL FEU	> 2		> 3 420	> 1 000	oui		> 15 µg/mL
Innovance Ddimer®	0,17-4,4 mg/L FEU	> 2	> 6	> 1 026	> 1 330	oui		> 20 µg/mL
D-Dimer HS et HS500®	HS : 215-7 050 HS500 : 150-3 680 ng/mL FEU	> 5	> 13,3	> 3 078	> 1 400	oui		> 20 µg/mL

Abréviations : FEU : fibrinogen equivalent units ; PDF : produits de dégradation du fibrinogène.

Tableau 15 : Scores d'évaluation du risque de récurrence d'évènement thromboembolique veineux.

Table 15: Risk assessment scores for recurrent venous thromboembolic events.

SCORE	HERDOO2	DASH	VIENNE
Sexe	Femmes uniquement	H/F	H/F
Âge	>/< 65 ans	>/< 50 ans	
Localisation thrombose			TVP proximale/distale/EP
HER*	Oui/Non		
IMC	>/< 30 kg/m²		
Mesure des DDs par rapport au traitement anticoagulant	Sous AVK, 5-12 mois après TVP/EP	Après arrêt	Arrêt
Méthode de dosage DD Seuil	Vidas® >/< 250 ng/mL	Variées +/-	Stago Asserachrom®
1 ^{re} TV sous estrogène		Oui/Non	

*HER : Hyperpigmentation, Œdème, Rougeur d'un membre inférieur

Abréviations : TVP : thrombose veineuse profonde ; EP : embolie pulmonaire ; IMC : indice de masse corporelle.

Tableau 16 : Etudes ayant servi à établir et valider le DASH score.

Table 16: Studies used to establish and validate the DASH score.

Référence	Nb sujets	Nb de sujets avec 1 ^{re} TV non provoquée	Intervalle de temps entre arrêt anticoagulant et mesure DD	Méthode DD	Seuils (ng/mL)
124	610	610	21 j	Stago Asserachrom®	250
125	599	282	21-37 j	Vidas®	500
126	608	505	20-40 j	Clearview simplify**	Quali+/-
127	501	45	Médian 28 j	Stago Liatest®	500
128	272	142	30-60 j	Trinity MDA DD®	500
129	295	175	30-37 j	IL Test®	250
130	626	238	2-3 mois	Vidas HemosIL D-Dimer HS®	500 230
131	827	827	20-40 j	Quantitative	500

*: n'est plus commercialisé.

22^e QUESTION : Place de la mesure des D-dimères dans le bilan de thrombophilie

Proposition # 78 : Dans le cadre du bilan initial de thrombophilie, la mesure des D-dimères n'est pas recommandée. (Accord fort)

Proposition # 79 : Lors du suivi d'une maladie thromboembolique veineuse, les D-dimères peuvent être mesurés pour évaluer le risque de récurrence. Il est recommandé d'utiliser une méthode de mesure utilisée dans la conception et la validation dans ces scores (HERDOO2 et DASH). (Accord fort)

BILAN DE THROMBOSE DE L'ENFANT

Aspects pré-analytiques

L'obtention d'un prélèvement conforme est difficile chez le nouveau-né et l'enfant. Le volume sanguin prélevé doit être le plus faible possible et il convient d'éviter tout geste invasif douloureux, en particulier les ponctions veineuses répétées. Les analyseurs d'hémostase permettent la prise en charge des prélèvements pédiatriques grâce à la miniaturisation des méthodes. Toutefois, le volume de plasma disponible étant obligatoirement faible, seuls les examens ayant le plus de pertinence clinique à cet âge de la vie doivent être réalisés.

En période néonatale, les non-conformités pré-analytiques les plus fréquentes sont le remplissage insuffisant du tube et le prélèvement coagulé. Elles s'expliquent par les difficultés des méthodes de prélèvement veineux, aggravées par l'hypercoagulabilité physiologique du nouveau-né et son hémocrite élevé, souvent supérieur à 55 %. Les tubes d'hémostase doivent faire l'objet d'une observation macroscopique soignée par le personnel du laboratoire (vérification du niveau de remplissage, vérification de l'absence de caillot).

Au niveau analytique, les difficultés de prélèvement peuvent entraîner des perturbations biologiques (diminution du fibrinogène, élévation du FV, raccourcissement du TCA). Ces anomalies peuvent faire évoquer un prélèvement non conforme même en l'absence de caillots visibles **134**. En accord avec les recommandations pré-analytiques du GFHT, il faut privilégier le recueil du sang à partir d'un prélèvement veineux, parfois artériel, jamais capillaire ; utiliser des aiguilles de prélèvement dont le diamètre ne doit pas excéder 25 gauge et des microtubes de 1 mL minimum ; éviter l'utilisation de tubes « sous vide » chez le nouveau-né (risque de remplissage insuffisant) ; et enfin acheminer rapidement le prélèvement au laboratoire (Tableau 17).

Hémostase pédiatrique

L'hémostase néonatale est quantitativement et qualitativement différente de celle de l'enfant plus âgé ou de l'adulte. C'est un système encore en développement, qui va évoluer durant le dernier mois de vie intra-utérine, dans les jours qui suivent l'accouchement, et pendant la première année de vie et même après. Chez le nouveau-né, les concentrations de la plupart des protéines pro et anticoagulantes sont beaucoup plus basses que chez l'adulte, avec un système hémostatique qui est en équilibre mais plus précaire. Compte tenu de la maturation progressive du système hémostatique dans le temps, seuls des déficits sévères peuvent être diagnostiqués en période néonatale. La concentration moyenne des inhibiteurs AT, PC, PS chez le nouveau-né est beaucoup plus basse que chez l'adulte, et plus basse chez le prématuré que chez le nouveau-né à terme. Les valeurs de référence de l'adulte sont atteintes avant l'âge de 1 an pour l'AT, vers 6 mois pour la PS, mais seulement à l'adolescence pour la PC (16 ans) **135**.

Thrombose et bilan de thrombose pédiatrique

La thrombose de l'enfant est une pathologie multifactorielle. Un facteur biologique de risque thrombotique ne doit pas être systématiquement recherché devant une thrombose veineuse néonatale. La présence d'un cathéter central est le facteur de risque majeur de thrombose chez le nouveau-né. Ainsi, seules les thromboses sur cathéter très étendues, les thromboses multiples, les thromboses de localisation inhabituelle doivent faire discuter la réalisation d'une recherche de facteur de risque biologique, tout particulièrement s'il existe un antécédent thrombotique familial. L'intérêt de la recherche de thrombophilie biologique est donc à discuter au cas par cas, en fonction de l'âge du patient, de la nature de l'événement thrombotique et de son caractère spontané ou provoqué et d'une éventuelle histoire familiale **135-137**. En période néonatale, le prélèvement et l'interprétation des résultats des tests plasmatiques sont délicats. En consé-

Tableau 17 : Prélèvement d'hémostase chez le nouveau-né, d'après les recommandations pré-analytiques en hémostase du GFHT 2015.

Table 17: Hemostasis sampling in neonates, based on the GFHT 2015 preanalytical recommendations in hemostasis.

Aiguille	23 gauge (> 25 gauge : risque élevé d'hémolyse)
Tube	Microtube (1 mL, système ouvert)
Site de prélèvement	• Veineux ou artériel • Direct : goutte à goutte, tube ouvert (recommandé) ; seringue (acceptable) • Cathéter central
Remplissage	• Recommandé : ≥ 90 % • Acceptable : ≥ 80 %
Transport	Rapide (prévenir l'activation et la coagulation du prélèvement)
Hématocrite > 55 %	• Saisie d'un commentaire qui décrit les conséquences sur les résultats • Ajustement de la concentration en citrate : à éviter (perte de l'intégrité du tube)

quence, seuls les tests qui peuvent influencer la prise en charge thérapeutique immédiate seront réalisés. La détection d'un déficit homozygote en PC, PS ou AT Budapest III est indispensable car la découverte de l'une de ces anomalies entraîne une substitution spécifique. Des mesures chez les parents peuvent être nécessaires. Une situation particulière est l'accident vasculaire ischémique artériel néonatal (AVCian) qui a fait l'objet de recommandations françaises en 2017. Même si certains facteurs de risque (facteur V Leiden, élévation de la concentration de la lipoprotéine (a) [Lp(a)]) semblent plus fréquents dans les AVCian, le lien direct avec la survenue de l'accident ischémique n'est pas démontré. Selon ces recommandations, il ne doit pas y avoir de recherche systématique de facteur biologique de risque de thrombose. Le FV Leiden ne doit être recherché qu'en cas d'antécédent thrombotique veineux familial. Il en est de même des déficits hétérozygotes en AT, PC, PS. Il n'est pas recommandé de mesurer systématiquement la Lp(a) ou l'homocystéine, en dehors d'une histoire familiale évocatrice (accord d'experts). La recherche d'APL peut être envisagée chez le nouveau-né et sa mère, en cas d'anamnèse maternelle évocatrice d'un SAPL – hypothèse d'un transfert materno-fœtal des auto-anticorps IgG de la mère ; elle doit être réalisée le plus précocement possible après l'accouchement **138**. Dans le cadre du *purpura fulminans* post-infectieux et en particulier post-varicelle, la mesure d'activité de la PS est nécessaire pour ne pas méconnaître un déficit acquis profond lié au développement d'un auto-anticorps dirigé contre cette protéine **139,140**.

Valeurs de référence

Selon l'ISTH, pour la pédiatrie, les laboratoires doivent utiliser des valeurs de références tenant compte d'une part de l'âge des enfants (post-natal et aussi gestationnel) et d'autre part des analyseurs et des réactifs **141**. Le sous-comité ne le précise pas, mais il est probable que l'emploi de valeurs de référence en fonction des analyseurs et des réactifs n'est pas nécessaire. Pour les inhibiteurs de la coagulation, on n'observe pas d'influence nette du couple analyseur/réactif, comme le montrent les données rapportées dans le **tableau 4**, issues de travaux réalisés avec des réactifs différents et sur des appareils différents **29-33**.

BILAN DE THROMBOSE : QUELLES ÉTAPES ?

Le bilan de thrombose comporte des tests plasmatiques souvent difficiles à standardiser et le recours à la biologie moléculaire est indispensable pour la recherche du variant *F2 c.*97G > A* (anciennement G20210A). Le rôle du biologiste dans l'interprétation des résultats est fondamental et nécessite une collaboration étroite avec le clinicien pour une prise en charge optimale des patients thrombophiliques. Ainsi, la réalisation des bilans de thrombose doit se faire dans des centres experts qui maîtrisent à la fois les aspects méthodes de laboratoire et cliniques de ces situations.

Investigations de première intention

Les tests

Pour les thromboses de localisations « habituelles », le bilan doit comporter la recherche de déficit en inhibiteurs physiologiques de la coagulation (AT, PC, PS), des variants thrombogènes du *F5* et *F2*, des anticorps antiphospholipides, et des hypodysfibrinogénémies. La recherche d'hyperhomocystéinémie majeure est à discuter dans des cas particuliers. La mesure des D-dimères peut être envisagée dans l'évaluation du risque de récurrence à l'aide de scores validés en utilisant une mesure qui a été utilisée pour la construction du score choisi. Compte tenu de l'existence de causes d'anomalies acquises, le biologiste aura besoin d'une évaluation concomitante des paramètres suivants : temps de Quick pour estimer l'état de la fonction hépatique (voire mesure des facteurs du TP), et mesure de la concentration du fibrinogène dont l'élévation témoigne d'un syndrome inflammatoire. La connaissance de la concentration de FVII (ou des facteurs VII+X) peut être une aide à l'interprétation des concentrations diminuées de PC car les demi-vies de la PC et du FVII sont similaires. Si le bilan est réalisé alors que le patient est traité par héparine ou AVK, la mesure du niveau d'anticoagulation est nécessaire pour adapter les modalités pratiques de réalisation des tests (*vide supra*). La

23^e QUESTION : Particularités du bilan de thrombophilie chez l'enfant

Proposition # 80 : *En cas de quantité de plasma limitée (compte tenu des difficultés de prélèvement), en urgence, il est recommandé de rechercher uniquement les déficits sévères en AT, PC, PS dont la présence peut influencer la prise en charge thérapeutique, notamment en cas de purpura fulminans ou de thrombose néo-natale. (Accord fort)*

Proposition # 81 : *Il est indispensable d'interpréter les résultats en tenant compte des variations physiologiques liées à l'âge affectant les concentrations plasmatiques des inhibiteurs AT, PC et PS. (Accord fort)*

connaissance de la présence d'un AOD est primordiale car elle conditionne aussi la possibilité de réalisation et le choix de certains tests (*vide supra*).

Dans le cadre d'une enquête familiale

Il est recommandé de ne rechercher en première intention chez les apparentés que le facteur de risque biologique diagnostiqué chez le cas index, de stopper l'étude en cas de négativité ou au contraire de la compléter par la recherche des autres facteurs de risque génétiques de thrombose en cas de positivité.

Aspect temporel

Jusqu'à présent, il était recommandé de réaliser ces investigations à distance d'un épisode aigu et de traitement anticoagulant compte tenu des risques erronés, de faux-positifs ou faux-négatifs, ou de l'interprétation impossible de certains tests dans de telles situations. Dans la mesure où la mise en évidence de la présence d'un anticorps APL ou d'un déficit constitutionnel thrombogène en AT peut modifier la prise en charge thérapeutique, il apparaît pertinent de proposer une recherche précoce de ces anomalies dès le diagnostic de thrombose et avant la mise sous traitement anticoagulant. Pour des aspects pratiques, il est plus simple alors d'envisager de réaliser l'ensemble du bilan au moment du diagnostic, avant instauration du traitement anticoagulant et ce d'autant plus que des traitements au long cours sont maintenant envisagés en cas d'embolie pulmonaire idiopathique. L'interprétation devra alors prendre en compte la possibilité d'anomalies acquises en inhibiteur physiologique de la coagulation à la phase aiguë de thrombose, sous traitement par héparine ou AVK mais aussi le fait que la présence d'un anticorps APL uniquement mis en évidence moins de 12 semaines après un épisode thrombotique n'est pas un critère biologique de SAPL. La recherche des variants thrombogènes du F2 et F5 par méthode de biologie moléculaire n'est pas influencée par l'état clinique ou les traitements anticoagulants. Enfin, le bilan de thrombose

pendant la grossesse n'est pas recommandé compte tenu des anomalies acquises pendant cette période qui touchent de façon constante la PS et parfois l'AT, voire la PC ; de plus, la sensibilité de la recherche d'anticoagulant lupique peut être modifiée suite à l'augmentation physiologique du FVIII et à l'hémodilution.

Contrôles

Si un premier bilan complet a été effectué au moment du diagnostic de thrombose, il sera proposé systématiquement à distance de l'événement et des traitements anticoagulants, si cela est possible, un contrôle de la PS et de la PC (déficits pouvant être masqués en phase aiguë, difficultés d'interprétation notamment si certaines méthodes ne pouvaient pas être utilisées lors des traitements anticoagulants).

Les anomalies permanentes sont seules susceptibles d'influencer la prise en charge thérapeutique. La confirmation des anomalies décelées avec une première exploration est donc fondamentale. En cas de déficit en AT, PC ou PS, le contrôle est à effectuer en dehors de tout contexte susceptible d'engendrer un déficit acquis.

En ce qui concerne les recherches des variants thrombogènes du F2 et F5 par biologie moléculaire, le diagnostic étant établi pour la vie entière, il apparaît particulièrement important de prendre toutes les précautions pour éviter les diagnostics erronés. Lorsque le résultat d'une première recherche de variant est positif, un contrôle avec un deuxième prélèvement devra être réalisé (HAS).

Le diagnostic biologique des anticorps APL du SAPL repose sur la mise en évidence d'anticorps persistants. Les conditions de réalisation dans le temps des tests biologiques ont été précisées par les sociétés savantes. Les points essentiels sont les suivants :

- la présence d'anticorps, mise en évidence une seule fois à moins de 3 mois ou à plus de 5 ans après les manifestations thrombotiques ou obstétricales qui ont entraîné leur recherche, ne permet pas le diagnostic de SAPL ;

- il faut s'assurer de la persistance d'une positivité lors d'au moins deux contrôles successifs réalisés à au moins 3 mois d'intervalle dans la période allant de 3 mois à 5 ans après les manifestations cliniques.

Inhibiteurs de la coagulation : place de l'enquête familiale et place des analyses de gènes

La présence d'un déficit isolé confirmé en inhibiteur de la coagulation ne permet pas d'affirmer son caractère héréditaire. L'analyse des gènes ne peut pas être une analyse systématique.

Le recours à la biologie moléculaire est une aide dans les contextes suivants :

- chez les parents à l'origine de la naissance d'un enfant homozygote gravement atteint car l'identification du variant permet l'accès au diagnostic anténatal pour des grossesses ultérieures ;
- chez les *propositi*, lorsque les résultats des mesures sont d'interprétation difficile, ou lorsque l'enquête familiale est impossible ou non-informative ;
- dans la famille, lorsque les résultats des mesures plasmatiques sont d'interprétation difficile. ■

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

24^e QUESTION : Bilan de thrombophilie, quelles étapes ?

Proposition # 82 : *Il est recommandé qu'un bilan de thrombophilie soit réalisé dans un centre expert qui maîtrise à la fois les aspects cliniques et biologiques relatifs aux analyses prescrites. (Accord fort)*

Proposition # 83 : *Le biologiste en charge de la réalisation des bilans de thrombophilie doit avoir une bonne maîtrise des méthodes, des pièges pré-analytiques et analytiques, et des limites et performances des réactifs utilisés. (Accord fort)*

Proposition # 84 : *Il est proposé quand cela est possible de prélever le bilan de thrombophilie à la recherche d'un facteur biologique de risque avant le début d'un traitement anticoagulant et sans que celui-ci soit retardé. (Accord fort)*

Proposition # 85 : *En cas d'anomalie identifiée génétique ou plasmatique lors d'un premier bilan, il est recommandé de réaliser un contrôle. Pour les anomalies plasmatiques, le contrôle doit être réalisé à distance (après au moins 3 mois) et organisé en tenant compte du contexte clinique (causes d'anomalies acquises) et des traitements anticoagulants. (Accord fort)*

Proposition # 86 : *La détermination du caractère constitutionnel d'une anomalie d'un inhibiteur de la coagulation repose sur l'enquête familiale ou sur l'analyse du gène concerné. (Accord fort).*

Remerciements

Nous remercions Thomas Lecompte pour la mise en forme du texte final.

INFORMATIONS NÉCESSAIRES À L'INTERPRÉTATION D'UN BILAN BIOLOGIQUE DE THROMBOPHILIE

PRESCRIPTEUR

Nom :
 Téléphone :
 Service :

PATIENT

Nom-prénom : Poids :
 Sexe : Taille :
 Date de naissance : Groupe sanguin :

Traitements *au moment du bilan de thrombose* (y compris hormonaux) :

.....

ÉVÈNEMENTS THROMBOEMBOLIQUES PERSONNELS

1^{er} évènement

- Type (TVP / EP / TVS / Thrombose artérielle) :
- Date :
- Localisation :
- Moyens diagnostiques :

.....

- Survenu en situation(s) clinique(s) favorisante(s) :

	OUI	NON	Non renseigné
IMC > 30 kg/m ²	☐	☐	☐
Chirurgie majeure (> 30 min + anesthésie générale) < 3 mois	☐	☐	☐
Fracture des membres avec immobilisation ou polytraumatisme < 3 mois	☐	☐	☐
Affection médicale aiguë avec immobilisation > 3 j, < 3 mois	☐	☐	☐
Cancer actif (diagnostic < 6 mois ou ttt en cours ou métastases)	☐	☐	☐
Grossesse/Post-partum	☐	☐	☐
Traitement œstro-progestatif	☐	☐	☐
Traitement hormonal substitutif avec œstrogène par voie orale	☐	☐	☐
Voyage > 4 h avion, car, voiture, train (<i>Cannegieter et al., PLOS Medicine 2006</i>)	☐	☐	☐

- Anticoagulation préventive lors des situations cliniques favorisantes (*molécule, posologie et durée*) :

.....

- Prise en charge thérapeutique (*molécule, posologie et durée*) :

.....

.....

.....

.....

Autres évènements thrombotiques :

Pour chaque épisode : date, localisation, éventuelles circonstances favorisantes, prise en charge (*molécule, posologie et durée*) :

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Evènements obstétricaux (*fausse couche spontanée précoce (< 10 semaines de gestation) ; tardive (≥ 10 semaines de gestation) ; éclampsie ; pré-éclampsie ; RCIU*).

Pour chaque épisode, préciser la date :

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

ANTÉCÉDENTS THROMBOEMBOLIQUES FAMILIAUX

JOINDRE UN ARBRE GÉNÉALOGIQUE.

POUR CHAQUE MEMBRE, PRÉCISER LE DEGRÉ DE PARENTÉ ET DÉCRIRE L'ÉPISODE (*VEINEUX OU ARTÉRIEL, DATE, LOCALISATION, ÉVENTUELLES CIRCONSTANCES FAVORISANTES, BILAN ÉTIOLOGIQUE RÉALISÉ, PRISE EN CHARGE*) :

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

BILAN BIOLOGIQUE DE THROMBOSE

Dates et résultats des bilans déjà réalisés :

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

RÉFÉRENCES

1. Groupe Français d'Étude sur l'Hémostase et la Thrombose. Recommandations préanalytiques en hémostase : Stabilité des paramètres d'hémostase générale et délais de réalisation des examens Mai 2017. 2017 [cité 26 Jan 2022]; Disponible sur : <https://site.geht.org/>
2. Groupe Français d'Étude sur l'Hémostase et la Thrombose. Recommandations pré-analytiques en hémostase (octobre 2015 mise à jour 2017 et 2018). 2015 [cité 26 Jan 2022]; Disponible sur : <https://site.geht.org/>
3. Groupe Français d'Étude sur l'Hémostase et la Thrombose. Recommandations pré-analytiques en hémostase : Stabilité des paramètres d'hémostase spécialisée et délais de réalisation des examens (partie 2) 2018 [Internet]. 2018 [cité 26 Jan 2022]. Disponible sur : <https://site.geht.org/>
4. Groupe Français d'Étude sur l'Hémostase et la Thrombose. Propositions pré-analytiques en hémostase : Stabilité des paramètres d'hémostase spécialisée et délais de réalisation des examens (partie 3) Juin 2020 [Internet]. 2020 [cité 26 Jan 2022]. Disponible sur : <https://site.geht.org/>
5. Adcock DM, Hoefner DM, Kottke-Marchand K, Marlar RA, Szamosi DI, Warunek DJ. CLSI Document H21-A5. Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays. *Approv Guidel-Fifth Ed Clin Lab Stand Inst* 2008 ; 28 (5).
6. Ledford-Kraemer M, Moore GW, Bottenus R, Brandt JT, Castellone DD, Daniele C, et al. CLSI Document H60-A: Laboratory Testing for the Lupus Anticoagulant. *Clin Lab Stand Inst* [Internet]. 2014 Apr 4 [cited 2019 Nov 20]; Available from: <https://clsi.org/standards/products/hematology/documents/h60/>
7. Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M, et al. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *J Thromb Haemost* 2009 ; 7 : 1737-40.
8. Boissier E, Lakhal K, Talon L, Senage T, Rozec B, Roussel JC, et al. The centrifuge brake impacts neither routine coagulation assays nor platelet count in platelet-poor plasma. *Clin Chem Lab Med* 2020 ; 58 : e185-8.
9. 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 : 2828-39.
10. Lima-Oliveira G, Adcock DM, Salvagno GL, Favaloro EJ, Lippi G. Mixing of thawed coagulation samples prior to testing: Is any technique better than another? *Clin Biochem* 2016 ; 49 : 1399-401.
11. Corral J, de la Morena-Barrio ME, Vicente V. The genetics of antithrombin. *Thromb Res* 2018 ; 169 : 23-9.
12. Middeldorp S. Is thrombophilia testing useful? *Hematol Am Soc Hematol Educ Program* 2011 ; 2011 : 150-5.
13. Di Minno MND, Ambrosino P, Ageno W, Rosendaal F, Di Minno G, Dentali F. Natural anticoagulants deficiency and the risk of venous thromboembolism: a meta-analysis of observational studies. *Thromb Res* 2015 ; 135 : 923-32.
14. Alhenc-Gelas M, Plu-Bureau G, Hugon-Rodin J, Picard V, Horellou MH, GFHT study group on Genetic Thrombophilia. Thrombotic risk according to SERPINC1 genotype in a large cohort of subjects with antithrombin inherited deficiency. *Thromb Haemost* 2017 ; 117 : 1040-51.
15. Corral J, Hernandez-Espinosa D, Soria JM, Gonzalez-Conejero R, Ordonez A, Gonzalez-Porras JR, et al. Antithrombin Cambridge II (A384S): an underestimated genetic risk factor for venous thrombosis. *Blood* 2007 ; 109 : 4258-63.
16. Gindele R, Oláh Z, Ilonczai P, Speker M, Udvari Á, Selmecezi A, et al. Founder effect is responsible for the p.Leu131Phe heparin-binding-site antithrombin mutation common in Hungary: phenotype analysis in a large cohort. *J Thromb Haemost* 2016 ; 14 : 704-15.
17. Navarro-Fernández J, de la Morena-Barrio ME, Padilla J, Miñano A, Bohdan N, Águila S, et al. Antithrombin Dublin (p.Val30Glu): a relatively common variant with moderate thrombosis risk of causing transient antithrombin deficiency. *Thromb Haemost* 2016 ; 116 : 146-54.
18. de la Morena-Barrio ME, Martínez-Martínez I, de Cos C, Wypasek E, Roldán V, Undas A, et al. Hypoglycosylation is a common finding in antithrombin deficiency in the absence of a SERPINC1 gene defect. *J Thromb Haemost* 2016 ; 14 : 1549-60.
19. Merz M, Böhm-Weigert M, Braun S, Cooper PC, Fischer R, Hickey K, et al. Clinical multicenter evaluation of a new FXa-based Antithrombin assay. *Int J Lab Hematol* 2011 ; 33 : 498-506.
20. Javela K, Engelbarth S, Hiltunen L, Mustonen P, Puurunen M. Great discrepancy in antithrombin activity measured using five commercially available functional assays. *Thromb Res* 2013 ; 132 : 132-7.
21. Kovács B, Bereczky Z, Oláh Z, Gindele R, Kerényi A, Selmecezi A, et al. The superiority of anti-FXa assay over anti-FIIa assay in detecting heparin-binding site antithrombin deficiency. *Am J Clin Pathol* 2013 ; 140 : 675-9.
22. Puurunen M, Salo P, Engelbarth S, Javela K, Perola M. Type II antithrombin deficiency caused by a founder mutation Pro73Leu in the Finnish population: clinical picture. *J Thromb Haemost* 2013 ; 11 : 1844-9.
23. Corral J, Vicente V. Puzzling questions on antithrombin: Diagnostic limitations and real incidence in venous and arterial thrombosis. *Thromb Res* 2015 ; 135 : 1047-8.
24. Orlando C, Heylen O, Lissens W, Jochmans K. Antithrombin heparin binding site deficiency: A challenging diagnosis of a not so benign thrombophilia. *Thromb Res* 2015 ; 135 : 1179-85.
25. Gindele R, Selmecezi A, Oláh Z, Ilonczai P, Pfliegler G, Marján E, et al. Clinical and laboratory characteristics of antithrombin deficiencies: A large cohort study from a single diagnostic center. *Thromb Res* 2017 ; 160 : 119-28.
26. Van Cott EM, Orlando C, Moore GW, Cooper PC, Meijer P, Marlar R, et al. Recommendations for clinical laboratory testing for antithrombin deficiency; Communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2020 ; 18 : 17-22.
27. Zeng W, Tang L, Jian XR, Li YQ, Guo T, Wang QY, et al. Genetic analysis should be included in clinical practice when screening for antithrombin deficiency. *Thromb Haemost* 2015 ; 113 : 262-71.
28. Lowe GD, Rumley A, Woodward M, Morrison CE, Philippou H, Lane DA, et al. Epidemiology of coagulation factors, inhibitors and activation markers: the Third Glasgow MONICA Survey. I. Illustrative reference ranges by age, sex and hormone use. *Br J Haematol* 1997 ; 97 : 775-84.
29. Andrew M, Paes B, Milner R, Johnston M, Mitchell L, Tollefsen DM, et al. Development of the human coagulation system in the full-term infant. *Blood* 1987 ; 70 : 165-72.
30. Andrew M, Vegh P, Johnston M, Bowker J, Ofosu F, Mitchell L. Maturation of the hemostatic system during childhood. *Blood* 1992 ; 80 : 1998-2005.
31. 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 : 362-72.

32. Appel IM, Grimminck B, Geerts J, Stigter R, Cnossen MH, Beishuizen A. Age dependency of coagulation parameters during childhood and puberty. *J Thromb Haemost* 2012 ; 10 : 2254-63.
33. Toulon P, Berruyer M, Brionne-François M, Grand F, Lasne D, Telion C, et al. 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 : 9-16.
34. Faioni EM, Valsecchi C, Palla A, Taioli E, Razzari C, Mannucci PM. Free protein S deficiency is a risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1997 ; 78 : 1343-6.
35. Liberti G, Bertina RM, Rosendaal FR. Hormonal state rather than age influences cut-off values of protein S: reevaluation of the thrombotic risk associated with protein S deficiency. *Thromb Haemost* 1999 ; 82 : 1093-6.
36. Dykes AC, Walker ID, McMahon AD, Islam SI, Tait RC. A study of Protein S antigen levels in 3788 healthy volunteers: influence of age, sex and hormone use, and estimate for prevalence of deficiency state. *Br J Haematol* 2001 ; 113 : 636-41.
37. Szecei PB, Jørgensen M, Klajnbard A, Andersen MR, Colov NP, Stender S. Haemostatic reference intervals in pregnancy. *Thromb Haemost* 2010 ; 103 : 718-27.
38. James AH, Rhee E, Thames B, Philipp CS. Characterization of antithrombin levels in pregnancy. *Thromb Res* 2014 ; 134 : 648-51.
39. Finley A, Greenberg C. Review article: heparin sensitivity and resistance: management during cardiopulmonary bypass. *Anesth Analg* 2013 ; 116 : 1210-22.
40. Esper SA, Levy JH, Waters JH, Welsby IJ. Extracorporeal membrane oxygenation in the adult: a review of anticoagulation monitoring and transfusion. *Anesth Analg* 2014 ; 118 : 731-43.
41. Tripodi A. Issues concerning the laboratory investigation of inherited thrombophilia. *Mol Diagn* 2005 ; 9 : 181-6.
42. Dahlbäck B. Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders. *Blood* 2008 ; 112 : 19-27.
43. Tait RC, Walker ID, Reitsma PH, Islam SI, McCall F, Poort SR, et al. Prevalence of protein C deficiency in the healthy population. *Thromb Haemost* 1995 ; 73 : 87-93.
44. Pomp ER, Doggen CJM, Vos HL, Reitsma PH, Rosendaal FR. Polymorphisms in the protein C gene as risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost* 2009 ; 101 : 62-7.
45. Alhenc-Gelas M, Plu-Bureau G, Mauge L, Gandrille S, Prèsot I, GFHT Study Group on Genetic Thrombophilia. Genotype-Phenotype Relationships in a Large French Cohort of Subjects with Inherited Protein C Deficiency. *Thromb Haemost* 2020 ; 120 : 1270-81.
46. Linssen M, Mohamed M, Wevers RA, Lefeber DJ, Morava E. Thrombotic complications in patients with PMM2-CDG. *Mol Genet Metab* 2013 ; 109 : 107-11.
47. Cooper PC, Siddiq S, Morse C, Nightingale J, Mumford AD. Marked discrepancy between coagulometric protein C activity assays with the pro-thrombotic protein C Asn21le substitution. *Int J Lab Hematol* 2011 ; 33 : 451-6.
48. Allaart CF, Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM, Briët E. Increased risk of venous thrombosis in carriers of hereditary protein C deficiency defect. *Lancet* 1993 ; 341 : 134-8.
49. Ding Q, Yang L, Dinarvand P, Wang X, Rezaie AR. Protein C Thr315Ala variant results in gain of function but manifests as type II deficiency in diagnostic assays. *Blood* 2015 ; 125 : 2428-34.
50. Cooper PC, Pavlova A, Moore GW, Hickey KP, Marlar RA. Recommendations for clinical laboratory testing for protein C deficiency, for the subcommittee on plasma coagulation inhibitors of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2020 ; 18 : 271-7.
51. Said JM, Ignjatovic V, Monagle PT, Walker SP, Higgins JR, Brennecke SP. Altered reference ranges for protein C and protein S during early pregnancy: Implications for the diagnosis of protein C and protein S deficiency during pregnancy. *Thromb Haemost* 2010 ; 103 : 984-8.
52. Awoda S, Daak AA, Husain NE, Ghebremeskel K, Elbashir MI. Coagulation profile of Sudanese children with homozygous sickle cell disease and the effect of treatment with omega-3 fatty acid on the coagulation parameters. *BMC Hematol* 2017 ; 17 : 18.
53. Hackeng TM, Seré KM, Tans G, Rosing J. Protein S stimulates inhibition of the tissue factor pathway by tissue factor pathway inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 ; 103 : 3106-11.
54. Chattopadhyay R, Sengupta T, Majumder R. Inhibition of intrinsic Xase by protein S: a novel regulatory role of protein S independent of activated protein C. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012 ; 32 : 2387-93.
55. Schwarz HP, Fischer M, Hopmeier P, Batard MA, Griffin JH. Plasma protein S deficiency in familial thrombotic disease. *Blood* 1984 ; 64 : 1297-300.
56. ten Kate MK, van der Meer J. Protein S deficiency: a clinical perspective. *Haemophilia* 2008 ; 14 : 1222-8.
57. Lijfering WM, Mulder R, ten Kate MK, Veeger NJGM, Mulder AB, van der Meer J. Clinical relevance of decreased free protein S levels: results from a retrospective family cohort study involving 1143 relatives. *Blood* 2009 ; 113 : 1225-30.
58. Alhenc-Gelas M, Plu-Bureau G, Horellou MH, Rauch A, Suchon P, GEHT genetic thrombophilia group. PROS1 genotype phenotype relationships in a large cohort of adults with suspicion of inherited quantitative protein S deficiency. *Thromb Haemost* 2016 ; 115 : 570-9.
59. Zöller B, García de Frutos P, Dahlbäck B. Evaluation of the relationship between protein S and C4b-binding protein isoforms in hereditary protein S deficiency demonstrating type I and type III deficiencies to be phenotypic variants of the same genetic disease. *Blood* 1995 ; 85 : 3524-31.
60. Simmonds RE, Ireland H, Lane DA, Zöller B, García de Frutos P, Dahlbäck B. Clarification of the risk for venous thrombosis associated with hereditary protein S deficiency by investigation of a large kindred with a characterized gene defect. *Ann Intern Med* 1998 ; 128 : 8-14.
61. Alhenc-Gelas M, Canonico M, Morange PE, Emmerich J, GEHT Genetic Thrombophilia Group. Protein S inherited qualitative deficiency: novel mutations and phenotypic influence. *J Thromb Haemost* 2010 ; 8 : 2718-26.
62. Marlar RA, Gausman JN, Tsuda H, Rollins-Raval MA, Brinkman HJM. Recommendations for clinical laboratory testing for protein S deficiency: Communication from the SSC committee plasma coagulation inhibitors of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2021 ; 19 : 68-74.
63. Bertina RM, Ploos van Amstel HK, van Wijngaarden A, Coenen J, Leemhuis MP, Deutz-Terlouw PP, et al. Heerlen polymorphism of protein S, an immunologic polymorphism due to dimorphism of residue 460. *Blood* 1990 ; 76 : 538-48.
64. Suchon P, Germain M, Delluc A, Smadja D, Jouven X, Gyorgy B, et al. Protein S Heerlen mutation heterozygosity is associated with venous thrombosis risk. *Sci Rep* 2017 ; 7 : 45507.
65. García de Frutos P, Alim RI, Härdig Y, Zöller B, Dahlbäck B. Differential regulation of alpha and beta chains of C4b-binding protein during acute-phase response resulting in stable plasma levels of free anticoagulant protein S. *Blood* 1994 ; 84 : 815-22.

66. Criado García O, Sánchez-Corral P, Rodríguez de Córdoba S. Isoforms of human C4b-binding protein. II. Differential modulation of the C4BPA and C4BPB genes by acute phase cytokines. *J Immunol* 1995 ; 155 : 4037-43.
67. Middeldorp S, van Hylckama Vlieg A. Does thrombophilia testing help in the clinical management of patients? *Br J Haematol* 2008 ; 143 : 321-35.
68. Nauck M, März W, Wieland H. Evaluation of the Roche diagnostics LightCycler-Factor V Leiden Mutation Detection Kit and the LightCycler-Prothrombin Mutation Detection Kit. *Clin Biochem* 2000 ; 33 : 213-6.
69. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 2000 ; 28 : E63.
70. Didenko VV. DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. *BioTechniques* 2001 ; 31 : 1106-16, 1118, 1120-1.
71. Mamotte CDS. Genotyping of single nucleotide substitutions. *Clin Biochem Rev* 2006 ; 27 : 63-75.
72. Gessoni G, Sara SV, Canistro R, Manoni F. GeneXpert in the diagnosis of risk factors for thrombophilia: evaluation of its use in a small laboratory. *Blood Transfus Trasfus Sangue* 2012 ; 10 : 228-9.
73. Marturano A, Bury L, Greslele P. Possible incorrect genotyping of heterozygous factor V Leiden and Prothrombin 20210 gene mutations by the GeneXpert assay. *Clin Chim Acta* 2014 ; 435 : 36-9.
74. Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J. Real-time PCR detection chemistry. *Clin Chim Acta* 2015 ; 439 : 231-50.
75. Zhang S, Taylor AK, Huang X, Luo B, Spector EB, Fang P, et al. Venous thromboembolism laboratory testing (factor V Leiden and factor II c.*97G>A), 2018 update: a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med* 2018 ; 20 : 1489-98.
76. Segal JB, Brotman DJ, Emadi A, Necochea AJ, Samal L, Wilson LM, et al. Outcomes of genetic testing in adults with a history of venous thromboembolism. *Evid Rep Technol Assess* 2009 ; 180 : 1-162.
77. Dahlbäck B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 ; 90 : 1004-8.
78. Dunn TB, Linden MA, Vercellotti GM, Gruessner RWG. Factor V Leiden and hepatic artery thrombosis after liver transplantation. *Clin Transplant* 2006 ; 20 : 132-5.
79. Leroy-Matheron C, Duvoux C, Van Nhieu JT, Leroy K, Cherqui D, Gouault-Heilmann M. Activated protein C resistance acquired through liver transplantation and associated with recurrent venous thrombosis. *J Hepatol* 2003 ; 38 : 866-9.
80. Kadauke S, Khor B, Van Cott EM. Activated protein C resistance testing for factor V Leiden. *Am J Hematol* 2014 ; 89 : 1147-50.
81. Casini A, Neerman-Arbez M, Ariëns RA, de Moerloose P. Dysfibrinogenemia: from molecular anomalies to clinical manifestations and management. *J Thromb Haemost* 2015 ; 13 : 909-19.
82. Casini A, Brungs T, Lavenu-Bombled C, Vilar R, Neerman-Arbez M, de Moerloose P. Genetics, diagnosis and clinical features of congenital hypodysfibrinogenemia: a systematic literature review and report of a novel mutation. *J Thromb Haemost* 2017 ; 15 : 876-88.
83. Casini A, Undas A, Palla R, Thachil J, de Moerloose P, Subcommittee on Factor XIII and Fibrinogen. Diagnosis and classification of congenital fibrinogen disorders: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2018 ; 16 : 1887-90.
84. Soria J, Soria C, Caen P. A new type of congenital dysfibrinogenemia with defective fibrin lysis--Dusard syndrome: possible relation to thrombosis. *Br J Haematol* 1983 ; 53 : 575-86.
85. Collet JP, Soria J, Mirshahi M, Hirsch M, Dagonnet FB, Caen J, et al. Dusart syndrome: a new concept of the relationship between fibrin clot architecture and fibrin clot degradability: hypofibrinolysis related to an abnormal clot structure. *Blood* 1993 ; 82 : 2462-9.
86. Hanss M, Biot F. A database for human fibrinogen variants. *Ann N Y Acad Sci* 2001 ; 936 : 89-90.
87. Fish RJ, Neerman-Arbez M. Fibrinogen gene regulation. *Thromb Haemost* 2012 ; 108 : 419-26.
88. Cunningham MT, Brandt JT, Laposata M, Olson JD. Laboratory diagnosis of dysfibrinogenemia. *Arch Pathol Lab Med* 2002 ; 126 : 499-505.
89. Lebreton A, Casini A. Diagnosis of congenital fibrinogen disorders. *Ann Biol Clin (Paris)* 2016 ; 74 : 405-12.
90. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006 ; 4 : 295-306.
91. de Groot PG, de Laat B. Mechanisms of thrombosis in systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2017 ; 31 : 334-41.
92. Garcia D, Erkan D. Diagnosis and Management of the Antiphospholipid Syndrome. *N Engl J Med* 2018 ; 378 : 2010-21.
93. Devreese KMJ, Ortel TL, Pengo V, de Laat B, Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibodies. Laboratory criteria for antiphospholipid syndrome: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2018 ; 16 : 809-13.
94. Litvinova E, Darnige L, Kirilovsky A, Burnel Y, de Luna G, Dragon-Durey MA. Prevalence and Significance of Non-conventional Antiphospholipid Antibodies in Patients With Clinical APS Criteria. *Front Immunol* 2018 ; 9 : 2971.
95. Tonello M, Mattia E, Favaro M, Del Ross T, Calligaro A, Salvan E, et al. IgG phosphatidylserine/prothrombin antibodies as a risk factor of thrombosis in antiphospholipid antibody carriers. *Thromb Res* 2019 ; 177 : 157-60.
96. Yin D, de Laat B, Devreese KMJ, Kelchtermans H. The clinical value of assays detecting antibodies against domain I of β 2-glycoprotein I in the antiphospholipid syndrome. *Autoimmun Rev* 2018 ; 17 : 1210-8.
97. Chayoua W, Kelchtermans H, Moore GW, Musiał J, Wahl D, de Laat B, et al. Identification of high thrombotic risk triple-positive antiphospholipid syndrome patients is dependent on anti-cardiolipin and anti- β 2glycoprotein I antibody detection assays. *J Thromb Haemost* 2018 ; 16 : 2016-23.
98. Chayoua W, Kelchtermans H, Gris JC, Moore GW, Musiał J, Wahl D, et al. The (non-)sense of detecting anti-cardiolipin and anti- β 2glycoprotein I IgM antibodies in the antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 2020 ; 18 : 169-79.
99. Tektonidou MG, Andreoli L, Limper M, Amoura Z, Cervera R, Costedoat-Chalumeau N, et al. EULAR recommendations for the management of antiphospholipid syndrome in adults. *Ann Rheum Dis* 2019 ; 78 : 1296-304.
100. Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharer I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. *Thromb Haemost* 1995 ; 74 : 1185-90.

101. Tripodi A, Cohen H, Devreese KMJ. Lupus anticoagulant detection in anticoagulated patients. Guidance from the Scientific and Standardization Committee for lupus anticoagulant/antiphospholipid antibodies of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *J Thromb Haemost* 2020 ; 18 : 1569-75.
102. Devreese KMJ. No more mixing tests required for integrated assay systems in the laboratory diagnosis of lupus anticoagulants? *J Thromb Haemost* 2010 ; 8 : 1120-2.
103. Favaloro EJ, Bonar R, Zebeljan D, Kershaw G, Marsden K. Laboratory investigation of lupus anticoagulants: mixing studies are sometimes required. *J Thromb Haemost* 2010 ; 8 : 2828-31.
104. Devreese KMJ. Antiphospholipid antibody testing and standardization. *Int J Lab Hematol* 2014 ; 36 : 352-63.
105. Schouwers SME, Delanghe JR, Devreese KMJ. Lupus Anticoagulant (LAC) testing in patients with inflammatory status: does C-reactive protein interfere with LAC test results? *Thromb Res* 2010 ; 125 : 102-4.
106. Triplett DA. Use of the dilute Russell viper venom time (dRVVT): its importance and pitfalls. *J Autoimmun* 2000 ; 15 : 173-8.
107. Fritsma GA, Dembitzer FR, Randhawa A, Marques MB, Van Cott EM, Adcock-Funk D, et al. Recommendations for appropriate activated partial thromboplastin time reagent selection and utilization. *Am J Clin Pathol* 2012 ; 137 : 904-8.
108. Tripodi A, Chantarangkul V, Cini M, Devreese K, Dlott JS, Giacomello R, et al. Variability of cut-off values for the detection of lupus anticoagulants: results of an international multicenter multiplatform study. *J Thromb Haemost* 2017 ; 15 : 1180-90.
109. Moore GW, Jones PO, Platton S, Hussain N, White D, Thomas W, et al. International multicenter, multiplatform study to validate Taipan snake venom time as a lupus anticoagulant screening test with ecarin time as the confirmatory test: Communication from the ISTH SSC Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibodies. *J Thromb Haemost* 2021 ; 19 : 3177-92.
110. Cohen H, Mackie IJ, Devreese KMJ, International Society for Thrombosis and Haemostasis Scientific and Standardization Committee for Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibodies. Clinical and laboratory practice for lupus anticoagulant testing: An International Society of Thrombosis and Haemostasis Scientific and Standardization Committee survey. *J Thromb Haemost* 2019 ; 17 : 1715-32.
111. Favaloro EJ, Lippi G. Interference of direct oral anticoagulants in haemostasis assays: high potential for diagnostic false positives and false negatives. *Blood Transfus* 2017 ; 15 : 491-4.
112. Jabet A, Stepanian A, Golmard JL, Flaujac C, Joly BS, Gouin-Thibault I, et al. Are Screening Tests Reliable to Rule Out Direct Oral Anticoagulant Plasma Levels at Various Thresholds (30, 50, or 100 ng/mL) in Emergency Situations? *Chest* 2018 ; 153 : 288-90.
113. Slavik L, Jacova J, Friedecky D, Ulehlova J, Tauber Z, Prochazkova J, et al. Evaluation of the DOAC-Stop Procedure by LC-MS/MS Assays for Determining the Residual Activity of Dabigatran, Rivaroxaban, and Apixaban. *Clin Appl Thromb Hemost* 2019 ; 25 : 1076029619872556.
114. Flanders MM, Crist R, Rodgers GM. Comparison of five thrombin time reagents. *Clin Chem* 2003 ; 49 : 169-72.
115. Devreese KMJ, Pierangeli SS, de Laat B, Tripodi A, Atsumi T, Ortel TL, et al. Testing for antiphospholipid antibodies with solid phase assays: guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2014 ; 12 : 792-5.
116. Devreese KM, Poncet A, Lindhoff-Last E, Musial J, de Moerloose P, Fontana P. A multicenter study to assess the reproducibility of antiphospholipid antibody results produced by an automated system. *J Thromb Haemost* 2017 ; 15 : 91-5.
117. Thachil J, Lippi G, Favaloro EJ. D-Dimer Testing: Laboratory Aspects and Current Issues. *Methods Mol Biol* 2017 ; 1646 : 91-104.
118. Adam SS, Key NS, Greenberg CS. D-dimer antigen: current concepts and future prospects. *Blood* 2009 ; 113 : 2878-87.
119. Rodger MA, Kahn SR, Wells PS, Anderson DA, Chagnon I, Le Gal G, et al. Identifying unprovoked thromboembolism patients at low risk for recurrence who can discontinue anticoagulant therapy. *CMAJ* 2008 ; 179 : 417-26.
120. Rodger MA, Le Gal G, Anderson DR, Schmidt J, Pernod G, Kahn SR, et al. Validating the HERDOO2 rule to guide treatment duration for women with unprovoked venous thrombosis: multinational prospective cohort management study. *BMJ* 2017 ; 356 : j1065.
121. Rodger MA, Le Gal G, Langlois NJ, Gin B, Mallick R, Giulivi A, et al. 'HERDOO2' clinical decision rule to guide duration of anticoagulation in women with unprovoked venous thromboembolism. Can I use any d-Dimer? *Thromb Res* 2018 ; 169 : 82-6.
122. Eichinger S, Heinze G, Jandeck LM, Kyrle PA. Risk assessment of recurrence in patients with unprovoked deep vein thrombosis or pulmonary embolism: the Vienna prediction model. *Circulation* 2010 ; 121 : 1630-6.
123. Tosi A, Iorio A, Marcucci M, Baglin T, Cushman M, Eichinger S, et al. Predicting disease recurrence in patients with previous unprovoked venous thromboembolism: a proposed prediction score (DASH). *J Thromb Haemost* 2012 ; 10 : 1019-25.
124. Eichinger S, Minar E, Bialonczyk C, Hirschl M, Quehenberger P, Schneider B, et al. D-dimer levels and risk of recurrent venous thromboembolism. *JAMA* 2003 ; 290 : 1071-4.
125. Palareti G, Legnani C, Cosmi B, Valdré L, Lunghi B, Bernardi F, et al. Predictive value of D-dimer test for recurrent venous thromboembolism after anticoagulation withdrawal in subjects with a previous idiopathic event and in carriers of congenital thrombophilia. *Circulation* 2003 ; 108 : 313-8.
126. Palareti G, Cosmi B, Legnani C, Tosi A, Brusi C, Iorio A, et al. D-dimer testing to determine the duration of anticoagulation therapy. *N Engl J Med* 2006 ; 355 : 1780-9.
127. Shrivastava S, Ridker PM, Glynn RJ, Goldhaber SZ, Moll S, Bounameaux H, et al. D-dimer, factor VIII coagulant activity, low-intensity warfarin and the risk of recurrent venous thromboembolism. *J Thromb Haemost* 2006 ; 4 : 1208-14.
128. Baglin T, Palmer CR, Luddington R, Baglin C. Unprovoked recurrent venous thrombosis: prediction by D-dimer and clinical risk factors. *J Thromb Haemost* 2008 ; 6 : 577-82.
129. Poli D, Antonucci E, Ciuti G, Abbate R, Prisco D. Combination of D-dimer, F1+2 and residual vein obstruction as predictors of VTE recurrence in patients with first VTE episode after OAT withdrawal. *J Thromb Haemost* 2008 ; 6 : 708-10.
130. van Hylckama Vlieg A, Baglin CA, Luddington R, MacDonald S, Rosendaal FR, Baglin TP. The risk of a first and a recurrent venous thrombosis associated with an elevated D-dimer level and an elevated thrombin potential: results of the THE-VTE study. *J Thromb Haemost* 2015 ; 13 : 1642-52.
131. Tosi A, Testa S, Martinelli I, Poli D, Cosmi B, Lodigiani C, et al. External validation of the DASH prediction rule: a retrospective cohort study. *J Thromb Haemost* 2017 ; 15 : 1963-70.
132. Tritschler T, Méan M, Limacher A, Rodondi N, Aujesky D. Predicting recurrence after unprovoked venous thromboembolism: prospective validation of the updated Vienna Prediction Model. *Blood* 2015 ; 126 : 1949-51.

133. Timp JF, Braekkan SK, Lijfering WM, van Hylckama Vlieg A, Hansen JB, Rosendaal FR, *et al.* Prediction of recurrent venous thrombosis in all patients with a first venous thrombotic event: The Leiden Thrombosis Recurrence Risk Prediction model (L-TRRiP). *PLoS Med* 2019 ; 16 : e1002883.
134. Williams MD, Chalmers EA, Gibson BES, 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 : 295-309.
135. Kenet G, Limperger V, Shneyder M, Nowak-Göttl U. Risk factors for symptomatic venous and arterial thromboembolism in newborns, children and adolescents - What did we learn within the last 20 years? *Blood Cells Mol Dis* 2017 ; 67 : 18-22.
136. Haley KM. Neonatal Venous Thromboembolism. *Front Pediatr* 2017 ; 5 : 136.
137. van Ommen CH, Nowak-Göttl U. Inherited Thrombophilia in Pediatric Venous Thromboembolic Disease: Why and Who to Test. *Front Pediatr* 2017 ; 5 : 50.
138. Saliba E, Debillon T, Recommandations accident vasculaire cérébral (AVC) néonatal, Auvin S, Baud O, Biran V, *et al.* Neonatal arterial ischemic stroke: Review of the current guidelines. *Arch Pediatr* 2017 ; 24 : 180-8.
139. Levin M, Eley BS, Louis J, Cohen H, Young L, Heyderman RS. Postinfectious purpura fulminans caused by an autoantibody directed against protein S. *J Pediatr* 1995 ; 127 : 355-63.
140. Theron A, Dautremay O, Boissier E, Zerroukhi A, Baleine J, Moulis L, *et al.* Idiopathic purpura fulminans associated with anti-protein S antibodies in children: a multicenter case series and systematic review. *Blood Adv* 2022 ; 6 : 495-502.
141. 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 : 298-300.