

Recherche d'une thrombophilie biologique : propositions du GFHT 2020

Thrombophilia testing: Proposals of the 2020 GFHT

Sous l'égide de Yves GRUEL¹ et Pierre MORANGE²

Coordonnateurs : Martine ALHENC-GELAS³, Isabelle GOUIN-THIBAUT⁴

Rédacteurs : Emmanuel DE MAISTRE⁵, Emmanuelle DE RAUCOURT⁶, Céline DESCONCLOIS⁷, Claire FLAUJAC⁸, Marie-Françoise HURTAUD⁹, Georges JOURDI¹⁰, Sylvie LABROUCHE-COLOMER¹¹, Véronique LE CAM¹², Dominique LASNE¹³, Laëtitia MAUGE³, Virginie SIGURET¹⁴

Relecteurs : Élodie BOISSIER¹⁵, Thomas BRUNGS¹⁶, Luc DARNIGE³, Valérie ESCHWEGE¹⁷, Nathalie HEZARD², Léna LE FLEM¹⁸, Frédéric LORIDON¹⁹

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

Courriel : isabelle.gouin@chu-rennes.fr

RÉSUMÉ

Ce texte propose une actualisation, par un groupe d'experts du GFHT, des recommandations pratiques relatives à la réalisation des analyses biologiques de thrombophilie. Après une mise au point sur les mesures pré-analytiques, une analyse des méthodes d'études des inhibiteurs de la coagulation chez l'adulte et l'enfant est présentée. Le choix d'un réactif de sensibilité optimale aux variants thrombogènes, les causes d'interférences et d'anomalies acquises sont détaillés. En première intention, l'activité cofacteur de l'héparine de l'antithrombine, l'activité anticoagulante de la protéine C seront mesurées, de même que l'activité de la protéine S, complétée si besoin par un dosage de la protéine S libre. Le génotypage des gènes des protéines C et S est souvent utile et son intérêt est discuté. Des propositions sont émises pour le dosage des inhibiteurs sous anticoagulant, notamment sous AOD. Les mutations Leiden des gènes *F5* et *F2* peuvent être recherchées

par différentes méthodes, commerciales ou « maison », et tout résultat positif sera confirmé sur 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 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. Le dosage des D-dimères n'est proposé que pour évaluer le risque de récurrence de thrombose. Le texte aborde, enfin, des questions pratiques essentielles, relatives au moment optimal du prélèvement du bilan de thrombophilie.

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

ABSTRACT

This article proposes an update, by a group of GFHT experts, of the practical recommendations for performing thrombophilia screening. After an update on pre-analytical measurements, an analysis of the methods for measuring coagulation inhibitors in adults and children is presented. The choice of a reagent with optimal sensitivity to thrombogenic variants, the causes of interference and acquired abnormalities are detailed. As a first step, the heparin cofactor activity of the antithrombin, the anticoagulant activity of protein C will be measured as well as the activity of protein S, complemented if necessary by an assay of free protein S. Genotyping of protein C and S genes is often useful and its interest is discussed. Proposals are made for the assay of inhibitors under anticoagulant drugs, in particular DOACs. Leiden mutations of the *F5* and *F2* genes can be investigated by different methods, commercial or "in-house", and any positive result will 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 to be used are discussed. For acquired thrombophilia, the tests necessary for the diagnosis of antiphospholipid antibody syndrome are presented. The D-dimer assay is proposed only to assess the risk of recurrence of thrombosis. Finally, the text addresses essential practical issues related to the optimal timing of thrombophilia testing.

Keywords: thrombophilia, venous thromboembolism, coagulation inhibitors, genotyping, FV Leiden, *F2* gene mutation, dysfibrinogenemia, antiphospholipid syndrome, lupus anticoagulant, D-dimers.

Rev Francoph Hémost Thromb 2020 ; 2 (3) : 93-126.

Le GFHT a décidé d'actualiser les propositions pratiques relatives à la prescription et à la réalisation des analyses biologiques s'inscrivant dans le cadre de la thrombophilie. Les aspects relatifs aux patients et situations pouvant justifier la recherche d'une thrombophilie, aux analyses qui doivent être prescrites, et à leur intérêt médical, seront traités dans un dossier spécifique, actuellement en cours de rédaction. Le dossier qui vous est proposé dans ce numéro de la Revue Francophone d'Hémostase et Thrombose est plus spécifiquement destiné aux biologistes, puisqu'il traite des aspects méthodologiques (pré-analytiques et analytiques) et des étapes à respecter pour la recherche et la mise en évidence de facteurs biologiques de risque de thrombose chez les patients avec une maladie thromboembolique veineuse.

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 GFHT (disponibles sur le site internet <https://site.geht.org>), du *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI) américain **1,2**, complétées, en ce qui concerne la recherche d'anticoagulant lupique, par celles de l'ISTH **3**.

Tubes de prélèvement, nature de l'anticoagulant

Les prélèvements d'hémostase doivent être réalisés sur citrate **0,106-0,109 M** (3,13-3,2 %) (**1 volume pour 9 volumes de sang**), **après un tube de purge neutre ; un prélèvement en 1^{re} position est acceptable si réalisé en ponction veineuse franche**. Le matériau des tubes doit être inerte et étanche à l'air afin de permettre le maintien du vide. Le PET (polyéthylène téréphtalate) répond à ce critère. Il doit être étanche à l'eau afin d'empêcher l'évaporation des liquides. Le polypropylène répond à ce critère. Ainsi, les tubes d'hémostase en matière plastique peuvent être en **PET, ou en polypropylène**. Pour les tubes avec vide préexistant, une double paroi (PET et couche interne en polypropylène) est recommandée. Pour les tubes sans vide préexistant, les tubes en polypropylène sont seuls conformes. **Un remplissage ≥ 90 % est recommandé ; il est acceptable jusqu'à 80 %**.

Conditions temporelles (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. Le délai de traitement acceptable est fonction des paramètres que l'on veut étudier (Tableau 1).

Préparation du plasma

Les tests d'hémostase doivent être réalisés sur du plasma contenant **< 10 G/L** de plaquettes, ce qui implique la réalisation d'une double-centrifugation avec les centrifugeuses utilisées actuellement dans la plupart des laboratoires. Les conditions de centrifugation sont les suivantes : **au moins 15 min à 1 500-2 000 g, ou au moins 10 minutes à 2 000-2 500 g, frein désactivé ou à puissance minimale**. La double centrifugation comporte une étape intermédiaire de décantation du plasma dans un tube plastique « non-activateur de l'hémostase » (type polypropylène) ; lors de la deuxième décantation, il faut veiller à ne pas prélever les plaquettes résiduelles présentes au fond du tube. Les performances de la centrifugeuse quant à la vitesse doivent être contrôlées au moins annuellement. La centrifugeuse doit avoir une **température contrôlée qui doit être comprise entre 15 et 25°C**. L'élimination des plaquettes par filtration, bien qu'efficace, n'est pas conseillée compte tenu du risque de fixation de certaines protéines de la coagulation au filtre **4**.

Congélation des plasmas

Lorsque les examens ne peuvent pas être effectués dans un délai acceptable, les plasmas déplaquetés doivent être congelés en aliquotes de **petit volume** 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 congélation recommandée est **≥ -70°C**. Une congélation rapide à température **≥ -20°C** est acceptable. La stabilité des paramètres après congélation est variable selon la température et la durée de conservation (Tableau 2).

Tableau 1 : Stabilité des paramètres (sang total et plasma), d'après la littérature et le texte GFHT en préparation.

Table 1: Stability of parameters (in whole blood and plasma) according to the literature and GFHT guidelines.

Paramètre	Sang total à TA	Plasma frais à TA	Plasma frais à température 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 /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	Au moins 24 h	Au moins 4 h	DA
Résistance à la protéine C activée	≤ 48 h	≤ 48 h	DA
Recherche anticoagulant circulant de type lupique	Au moins 4 h	≤ 4 h et double centrifugation ≤ 4 h et simple centrifugation si plaquettes < 10 G/L	DA

Abréviations : DI : données insuffisantes ; DA : données absentes ; TA : Température Ambiante.

Température Ambiante : 15-25°C (selon la pharmacopée européenne). Température réfrigérée : 2-8°C (selon la pharmacopée européenne).

Tableau 2 : Stabilité des paramètres congelés, d'après la littérature et le texte GFHT en préparation.

Table 2: Stability of frozen parameters according to the literature and GFHT guidelines.

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 une congélation à au moins -60°C 1 à 2 semaines
Antithrombine (activité /antigène)	Au moins 24 mois	Au moins 24 mois	DA
Protéine C (activité/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	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 anticoagulant circulant de type lupique	Au moins 2 semaines	Au moins 1 semaine	Pas de recongélation après décongélation

Abréviation : DA : données absentes.

Transport de plasmas congelés

Si un transport de plasmas congelés est nécessaire, il doit se faire **dans de la carboglace** en quantité suffisante pour que la congélation soit maintenue, et dans un emballage approprié, en suivant les recommandations de transport des échantillons de sang humain. Le **transport dans de la glace ou avec un accumulateur de froid (plaque eutectique) est acceptable**. Le transport en carboglace comporte des risques d'acidification des échantillons susceptibles de modifier certains paramètres d'hémostase **5**. D'après le GFHT, il est recommandé de conserver les échantillons transportés à ≥ -70°C. Une conservation à -20°C (moins de 15 jours) est acceptable.

Décongélation

Selon les recommandations, la **décongélation doit être effectuée rapidement** (quelques minutes) à une température de **37°C, dans un bain-marie, en immersion**. 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 un aliquot de 500 µL, 2 à 4 minutes maximum). Le GFHT et le CLSI insistent sur l'importance de l'**homogénéisation** qui ne doit pas être réalisée à l'aide d'un vortex, mais par **retournements (6 allers-retours) 6**.

DÉFICITS EN INHIBITEURS DE LA COAGULATION AT PC PS : COMMENT LES DIAGNOSTIQUER ?

Antithrombine

L'antithrombine (AT) est une glycoprotéine monocaténaire de 464 acides aminés synthétisée par l'hépatocyte. L'AT circulante comporte 432 acides aminés (AA) ; sa concentration

plasmatique moyenne est de l'ordre de 200 mg/L ; sa demi-vie plasmatique moyenne est de 60 heures. Elle a une masse moléculaire (MM) de 58 kDa. Le gène codant l'AT, *SERPINC1*, situé sur le chromosome 1, comporte 7 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 progressive dans les conditions physiologiques, et elle devient immédiate lorsque l'AT se lie à certains glycosaminoglycanes dont l'héparine (accélération d'un facteur 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 **7**. La prévalence du déficit en AT dans la population générale serait de l'ordre de 1/5 000 **8**. 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 réalisées 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 **9**. Ces données sont probablement relativement inexactes car elles 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 manifestations cliniques les plus fréquentes sont des thromboses veineuses profondes et des embolies pulmonaires survenant spontanément ou 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), qualitatifs (type II). Dans les déficits quantitatifs, la concentration de la protéine est diminuée, mais elle fonctionne normalement. Dans les déficits qualitatifs de type IIRS ou HBS, la fonction du site RS pour les premiers ou du site HBS pour les seconds est anormale ; la concentration de la protéine est normale (ou moins diminuée que l'activité). Dans les déficits de type IIPE (pléiotropiques), la stabilité de la protéine est modifiée, ce qui explique l'activité et la concentration d'AT peu diminuées ou à la limite inférieure des valeurs de référence. Les bases moléculaires ont été établies et de nombreuses mutations de *SERPINC1* ont été identifiées (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>). Le phénotype clinique associé au déficit est hétérogène. Il est habituellement sévère dans le déficit de type I, lorsqu'il y a une réduction importante de la concentration plasmatique de l'inhibiteur. Dans les types II, l'hétérogénéité est importante. En effet, il existe, d'une part, des variants de *SERPINC1* qui entraînent des phénotypes cliniques plus sévères 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 mutations qui ont un effet modéré sur le plan fonctionnel et qui sont des facteurs de risque moins sévères de thrombose comme le variant Cambridge II (p.Ala416Ser). Au sein du groupe HBS, certaines mutations apparaissent peu thrombogènes, mais la présence du variant Budapest III (p.Leu131Phe) entraîne une augmentation significative du risque thrombotique, y compris en cas d'hétérozygotie **7,10**.

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)...) **11-13**.

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 expliqués par des anomalies de glycosylation dans le cadre du « *Congenital Disorder of Glycosylation* » (CDG) syndrome **7**.

Protéine C

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 une vitamine K dépendante, synthétisée par l'hépatocyte. Sa concentration plasmatique moyenne 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 sérine 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 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 **14**. La prévalence du déficit en PC dans la population générale serait de l'ordre de 0,2 % **8**. 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/phospholipide, /PS, /FVa, /FVIIIa) [type IIb ou IIAC (anticoagulant)]. Les techniques 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 rapportées :

- 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 associé au déficit en PC serait de l'ordre de 7, et le risque de récurrence de l'ordre de 3 **9**. Ces données sont probablement relativement inexactes car elles ne sont pas obtenues à partir d'études tenant compte des génotypes ;

- une forme récessive, dont la prévalence estimée par Tait *et al.* sur une population de donneurs de sang sains écossais était de l'ordre de 1/200 à 1/700 **15**. 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 sévère dès la naissance. Ils sont issus de familles asymptomatiques. Les mutations du gène *PROC* présentes chez ces enfants ne sont pas différentes de celles mises 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 anomalies génétiques. Cette hypothèse ne tient pas compte d'une possible hétérogénéité dans la thrombogénicité des différentes mutations.

Les bases moléculaires du déficit en PC ont été établies, et de nombreuses mutations de *PROC* ont été identifiées (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>). Il existe deux polymorphismes fréquents du promoteur, -228C>T et -215G>A (nomenclature HGVS) qui sont associés significativement au taux de PC circulante. Les homozygotes pour l'allèle CG ont des taux de PC légèrement plus bas 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) **16**, et la recherche systématique de ce polymorphisme chez les sujets qui présentent une MTEV n'est pas recommandée.

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 **17**.

Peu de données sont disponibles concernant l'influence du taux 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 **18**.

Le génotypage réalisé dans des familles déficitaires de type I a démontré les limites des tests plasmatiques. En effet, d'une part, des taux subnormaux, voire normaux, ne permettent pas d'exclure la présence de mutations délétères avec 100 % de certitude **19**, et, d'autre part, 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 certaines mutations de type II. Tel 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 **20**.

Protéine S

La PS est une glycoprotéine vitamine K dépendante de 676 AAs. 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 sur le chromosome 3 ; il comporte 15 exons s'étendant sur plus de 80 kb. Il existe un pseudo-gène (*PROS2P*), non codant, qui a 97 % d'homologie par rapport au gène codant. La synthèse de la PS n'est pas exclusivement hépatocytaire ; elle est 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 membranaires. 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 **14**. 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 **21,22**.

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 % **8**. Des déficits en PS hétérozygotes seraient retrouvés 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 associée au déficit en PS serait de l'ordre de 5, et le risque relatif de récurrence de l'ordre de 2,5 (non significatif) **9**. 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 **23,24**.

Plusieurs études ont montré que les déficits constitutionnels thrombogènes sont ceux pour lesquels la PSL plasmatique est fortement diminuée, avec un seuil de risque (30-40 %) plus bas que la limite inférieure des valeurs de référence **25,26**.

Les déficits héréditaires sont de types quantitatifs (I et III) ou qualitatifs (plus rares). Les déficits qualitatifs de type II associent un taux de PSL normal et une activité cofacteur de la PCa diminuée. Dans le type I, la PST et la PSL sont diminuées de façon équivalente ; dans le type III, seule la PSL est basse. Les déficits de type I et III peuvent être des variants phénotypiques d'une même mutation. Le dosage

de PS libre apparaît plus pertinent que le dosage de PS totale pour le diagnostic de déficit en PS et l'évaluation de la thrombogénicité **27,28**.

Les bases moléculaires du déficit en PS ont été établies et de nombreuses mutations de *PROS1* ont été identifiées (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>). Le génotypage de *PROS1* (séquençage des régions codantes et recherche de grand remaniement génique) 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 **17**.

Quelques données concernant les relations génotype-phénotype clinique sont disponibles **26,29**. Toutes les mutations ne semblent pas équivalentes en matière de thrombogénicité. Ainsi, les variants de type II pourraient être moins thrombogènes que les variants de type quantitatif. La présence d'une mutation délétère de type quantitatif et le taux de PS circulante ont une influence conjointe sur le risque d'événements thrombotiques.

La mutation Heerlen (p.Ser501Pro, nomenclature HGVS) modifie un site de glycosylation, ce qui entraîne une réduction de sa durée de vie dans la circulation et une diminution modeste de la concentration plasmatique de PS. Les données de la littérature concernant ses conséquences cliniques sont à ce jour contradictoires **26,30,31**.

Comment explorer l'AT ?

Le phénotypage plasmatique des déficits comporte la mesure de l'activité « cofacteur de l'héparine » qui évalue les capacités des sites fonctionnels RS et HBS, et le dosage immunologique qui estime la concentration plasmatique de l'AT. La mesure de l'activité antiprotéasique en l'absence d'héparine (« activité progressive ») évalue la fonctionnalité du seul site RS. Dans les déficits de types I et IIPE, les résultats sont anormaux avec les trois méthodes. Dans les déficits de type IIPE, la concentration plasmatique de l'AT et son activité sont à la limite inférieure des valeurs de référence ou peu diminuées. Dans les déficits de type IIHBS, l'activité cofacteur de l'héparine est plus basse que l'activité progressive ou la concentration. Dans les déficits de type IIRS, l'activité cofacteur de l'héparine et l'activité progressive sont toutes deux plus basses que la concentration.

Mesure de l'activité cofacteur de l'héparine

La méthode évalue la capacité de l'AT à inhiber la thrombine ou le FXa ajoutés en quantité fixe 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, la thrombine doit être d'origine bovine, pour éviter l'interférence du cofacteur II de l'héparine. 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 et de l'enzyme. D'après les données des programmes de contrôle de qualité, les réactifs les plus utilisés fin 2018 étaient en Europe selon l'*External Quality Control of diagnostic Assays and Tests* (ECAT) : Stago Stachrom ATIII[®], Werfen HemosIL liquid Antithrombin[®], Siemens Innovance anti-thrombin[®] et Berichrom Antithrombine III[®] ; et en France selon Probioqual : Stachrom AT[®] et Hemosil Liquid AT[®].

Le choix d'un coffret a une importance fondamentale car leurs performances ne sont pas équivalentes vis-à-vis de la détection de certains variants thrombogènes. Les déficits de type I et IIRS sont généralement détectés quel que soit le coffret. Cependant, certains variants (non HBS) thrombogènes peuvent ne pas être détectés parce qu'ils ont des effets mineurs sur le phénotype plasmatique ou des effets transitoires. 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 comparatives réalisées pour 7 coffrets commerciaux sont rapportées dans le **tableau 3** : les variants HBS, y compris le variant thrombogène Budapest III (p.Leu 131 Phe), sont mal détectés par les coffrets HemosIL[®], Berichrom[®], Coamatic[®] et Biophen[®]AT. **Ces coffrets ne doivent donc pas être utilisés dans le cadre du bilan de thrombose.** Les performances d'Innovance[®] sont satisfaisantes. En ce qui concerne Stachrom[®], Javela *et al.* ont montré d'excellentes performances sur un nombre important de plasmas de déficits de type II (non génotypés) **12,32-37**.

Interférences :

- patient traité par une héparine : pas d'interférence de l'héparine dans la mesure, en l'absence de surdosage majeur ;
- anticoagulant oral direct (AOD) (cf. « Comment rechercher un déficit en AT, PC, PS, lorsque le patient est traité par anticoagulant, quelle méthode utiliser ? ») ;
- hémolyse, hyperlipémie, hyperbilirubinémie : se référer aux indications des fabricants.

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 dans la méthode précédente. Évaluant la capacité fonctionnelle

Tableau 3 : Coffrets de mesure de l'activité cofacteur de l'héparine de l'antithrombine. Capacité de détection des variants de type II (nombre d'hétérozygotes avec résultat normal/nombre d'hétérozygotes étudiés).

Table 3: Kits for antithrombin activity measurement. Performances for detection of type II variants.

	HemosIL [®] Werfen	HemosIL liquid AT [®] Werfen	Stachrom AT [®] Stago	Innovance AT [®] Siemens	Berichrom AT [®] Siemens	Coamatic AT LR [®] Werfen	Biophen AT (thrombine bovine) Sysmex Hyphen [®]	Références
p.Arg56Cy (HBS)			0/1	0/1	1/1	1/1		43
p.Pro73Leu (HBS)	3/3	7/7	0/2	0/14	2/2	8/9	7/7	41,43,44
p.Arg79Cys (HBS)		0/4		0/14		0/14	1/12	41
p.Asn77His (HBS)		1/1		0/1		0/1	1/1	41
p.Arg79His (HBS)		4/4		0/18		2/4	3/3	41
p.Leu131Phe (HBS)	14/25	2/6		0/91		1/6	6/6	41,44
p.Ser148Pro (HBS)			0/1	0/1	0/1	0/1		43
Type II (non génotypés)	93/104		0/104	1/104	95/104			45
p.Arg 425Cys (RS)	3/3		0/3	0/3	3/3			42
p.Arg425His (RS)			0/1	0/1	0/1	0/1		43

du site d'inhibition des protéases et n'étant pas sensible aux anomalies du site de liaison à l'héparine, elle permet théoriquement de classer les déficits de type II en type I/HBS (activité progressive normale) ou RS (activité progressive basse), mais il n'existe pas, à notre connaissance, de coffret commercial ayant des performances satisfaisantes. De plus, l'intérêt de la méthode est limité, d'une part parce que sa spécificité est imparfaite (interférence de l'alpha 2 macroglobuline...), et d'autre part parce qu'au sein du groupe HBS, l'estimation du degré de risque thrombotique nécessite l'identification de la mutation sous-jacente **10**.

Interférences :

- la méthode ne peut pas être réalisée si le patient est traité par une héparine ;
- anticoagulant oral direct (AOD) (cf. « Comment rechercher un déficit en AT, PC, PS, lorsque le patient est traité par anticoagulant, quelle méthode utiliser ? »).

Dosages immunologiques

La plupart des laboratoires qui réalisent des typages utilisent des techniques immunoturbidimétriques automatisées. Fin 2018, d'après les données de l'ECAT, les coffrets les plus utilisés étaient Liatest AT (Stago)[®] et Liaphen ATIII (Hyphen Biomed)[®]. Les anticorps de capture sont polyclonaux.

Interférences : facteur rhumatoïde, hémolyse, hyperlipémie, hyperbilirubinémie, anticorps dirigés contre des composants des réactifs... : se référer aux indications des fabricants.

Valeurs usuelles ; variations physiologiques

L'antithrombine est basse à la naissance (cf. paragraphe pédiatrie). Les valeurs de référence de l'adulte sont comprises entre 80 et 120 %. Le vieillissement n'entraîne pas d'évolution significative **38**.

Principales causes d'anomalies acquises

- Certains auteurs ont observé une diminution très modérée du taux d'AT (de l'ordre de 10 à 20 %) au cours de la grossesse, alors que d'autres n'observent pas d'évolution significative **39,40**.
- Des déficits acquis sont observés dans les situations suivantes : insuffisance hépatocellulaire (par diminution de la synthèse), syndrome néphrotique (par fuite urinaire imparfaitement compensée), thromboses étendues et CIVD (par consommation), assistances circulatoires mécaniques (CEC, ECMO...) **41,42**, alcoolisme sévère (anomalies de glycosylation).
- Traitements engendrant des déficits acquis : héparine non fractionnée et héparines de bas poids moléculaire comportant un fort pourcentage de chaînes longues, lorsqu'elles sont administrées à posologies « curatives » (diminution moyenne de 20 % de l'AT circulante), contraceptifs oraux contenant plus de 30 µg d'éthinylestradiol, L-asparaginase.

Au total, quelle place pour chaque méthode ?

Place du génotypage ?

Dans la mesure où le phénotypage ne permet pas de détecter 100 % des anomalies thrombogènes, certains auteurs ont proposé un génotypage d'emblée chez les sujets qui présentent des thromboses veineuses spontanées, même si l'AT plasmatique est normale **43**.

Nous proposons la stratégie suivante :

- En 1^{re} intention, mesure de l'activité cofacteur de l'héparine à l'aide d'un réactif de sensibilité optimale (voir supra).
- Les résultats des dosages doivent être interprétés en tenant compte des valeurs de référence, des causes d'interférences, des causes d'anomalies acquises (pathologies, contexte hormonal chez la femme - grossesse, COC, THS-, autres traitements).
- Si l'activité cofacteur de l'héparine est diminuée, la réalisation d'un dosage immunologique est indispensable ensuite pour établir le diagnostic de déficit de type I ou II 44.
- Dans le cas des déficits de type II, le complément de phénotypage plasmatique par la mesure de l'activité progressive peut conduire à des erreurs d'estimation de la thrombogénicité. Il est donc préférable de remplacer cette mesure par un génotypage de *SERPINC1*.
- Afin de ne pas méconnaître des variants thrombogènes à effet faible sur le phénotype plasmatique, le génotypage est également nécessaire devant des taux 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 après concertation multidisciplinaire.
- Devant une forte suspicion de déficit de type I constitutionnel, avec génotypage de *SERPINC1* négatif, l'intérêt d'une recherche d'anomalie de glycosylation est à discuter.

Comment explorer la PC ?

Il existe des coffrets commerciaux qui permettent :

- la mesure de l'activité anticoagulante de la PC (test chromométrique) ;
- la mesure de l'activité amidolytique évaluant la capacité fonctionnelle du site catalytique ;
- le dosage immunologique de la protéine.

Dans les déficits de type I, la PC est diminuée quelle que soit la technique de dosage utilisée. Dans les déficits de type

II, la quantité de protéine circulante est normale ou moins diminuée que l'activité. Dans les déficits de type IIAM, l'activité est anormale quelle que soit la méthode de mesure ; dans les déficits de type IIAC, l'activité amidolytique est similaire à la concentration de l'inhibiteur.

Mesure de l'activité anticoagulante

De nombreux coffrets commerciaux permettent de réaliser cette mesure. Le tableau 4 reprend quelques caractéristiques de coffrets utilisés en France et en Europe fin 2018, d'après les données des organismes d'EEQ ECAT et Probioqual. Toutes les techniques 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, contenue dans le 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. Compte tenu du mode d'activation de la PC, aucun coffret disponible n'évalue ses capacités à interagir avec le complexe thrombine-thrombomoduline ou avec son récepteur endothélial. **Les réactifs de mesure de l'activité anticoagulante ne sont pas tous équivalents en termes de sensibilité aux variants thrombogènes.** Ainsi, il a été montré que le réactif Hemosil ProClot® n'est pas sensible aux conséquences plasmatiques du variant thrombogène de type IIAC p.Asn421Ile, qui est en revanche correctement détecté à l'aide de Staclot PC® ou Cryocheck Clot C® 45.

Tableau 4 : Caractéristiques des principaux réactifs de mesure de l'activité anticoagulante de la protéine C.

Table 4: Characteristics of the main reagents for protein C anticoagulant activity measurement.

Réactif	Type d'activation	Dilution plasma*	Interférences signalées par le fabricant				ECAT nb utilisateurs Fin 2018	Probioqual nb utilisateurs Fin 2018
			FVIII (%)	HNF (UI/mL)	Anticoagulant lupique	FV Leiden Hz		
Cryocheck Clot C®	RVV (RVV-X)	1/10	> 600	> 1,2	-	-	2	0
Werfen Hemosil IL Proclot®	TCA (silice + PL synthétiques)	Pur	> 250	> 1,5	+	+	13	3
Hyphen Hemoclot Protein C®	TCA	1/10	+	> 1	+	?	8	5
Siemens Protein C reagent®	TCA (acide ellagique + PL soja)	1/10	+	> 2	+	+	21	1
Stago Staclot PC®	TCA	1/10	> 250	> 1	?	-	34	34

Abréviations : Hz : hétérozygote ; PL : phospholipide ; RVV : venin de vipère Russell ; TCA : temps de céphaline avec activateur ; HNF : héparine non fractionnée. * selon la notice du produit.

Interférences :

- taux élevés de FVIII et présence du FV Leiden qui, en raccourcissant les temps de coagulation, peuvent simuler des déficits ;
- certains anticoagulants lupiques, héparinémies très élevées, AOD anti-IIa ou anti-Xa (cf. paragraphe « Comment rechercher un déficit en AT, PC, PS lorsque le patient est traité par anticoagulant, quelle méthode utiliser ? »).

Mesure de l'activité amidolytique

Il existe de nombreux coffrets commerciaux aux performances équivalentes. Ils utilisent tous le Protac pour transformer la PC en PCa et étudient la capacité de la PCa à cliver un substrat chromogène.

Il y a peu de causes d'interférences. Cependant, certains substrats peuvent être clivés par d'autres enzymes que la PCa avec risque de faux-diagnostic 46. Il n'y a pas d'interférence des AODs 47.

Dosages immunologiques

L'antigène de la PC peut être évalué à l'aide de techniques ELISA, ou ELFA (sur Vidas, bioMérieux).

Fin 2018, d'après les données de l'ECAT, les coffrets les plus utilisés étaient Asserachrom Protein C® (Stago) (technique manuelle) et Vidas Protein C® (Biomerieux). La capture de la PC peut s'effectuer à l'aide de fragments F(ab')₂ d'un anticorps polyclonal anti-PC et le 2^e anticorps est polyclonal (Stago). La capture se fait à l'aide d'un anticorps monoclonal (Vidas).

Interférences signalées par les fournisseurs : résultats erronés possibles en cas de présence d'anticorps dirigés contre des composants des réactifs.

Valeurs usuelles et variations physiologiques

La PC est basse à la naissance (cf. paragraphe pédiatrie). À partir de 16 ans, et quelle que soit la méthode utilisée, les valeurs de référence sont comprises entre 70 et 140 % 48. Le taux de PC est indépendant de l'âge et du sexe.

Principales causes d'anomalies acquises

- Pendant la grossesse, la PC pourrait être inchangée ou modérément augmentée (au plus de 20 % entre la 6^e et la 20^e semaine) et reste augmentée quelques jours en *post-partum* 49.
- Des déficits acquis sont observés dans les contextes suivants : insuffisance hépatocellulaire (par diminution de la synthèse), hypovitaminose K (par diminution de la synthèse de la protéine active), alcoolisme sévère (anomalies de glycosylation), thromboses étendues, CIVD (par consommation), présence d'auto-anticorps anti-PC (très rare).

- Traitements engendrant des déficits acquis : antivitamines K, traitement par L-asparaginase.

Au total, quelle place pour chaque méthode ?

Place du génotypage ?

Les recommandations de l'ISTH préconisent d'utiliser la technique amidolytique en première intention car elle est moins soumise à interférences que la technique de coagulation, et de compléter le bilan par une mesure d'activité chronométrique en cas de résultat normal si une thrombophilie génétique est fortement suspectée 46. Cette attitude est compliquée à mettre en œuvre et elle peut conduire à un défaut de diagnostic des déficits de type IIb. Nous préférons donc continuer à proposer **la mesure de l'activité anticoagulante en 1^{re} intention** avec prise en compte des causes d'interférences dans l'interprétation des résultats, en l'absence de traitement susceptible de rendre les résultats ininterprétables. **Dans le choix du réactif, il faut tenir compte des données publiées concernant la sensibilité aux variants thrombogènes.**

Le typage des déficits n'a pas à ce jour, de conséquences sur l'évaluation du degré de risque thrombotique individuel. Le génotypage de PROC est absolument nécessaire dans la forme récessive du déficit, pour permettre le conseil génétique et des diagnostics anténataux précoces. Il peut être utile pour affirmer l'origine constitutionnelle d'un déficit franc, devant des phénotypes plasmatiques d'interprétation difficile, ou même en l'absence d'anomalie plasmatique chez des sujets présentant une histoire thrombotique majeure, après concertation multidisciplinaire, ou 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.

Propositions :

- Pour le dépistage d'un déficit en PC, il est recommandé de mesurer en 1^{re} intention son activité anticoagulante, à l'aide d'un réactif de sensibilité optimale.
- Les résultats des dosages doivent être interprétés en tenant compte des valeurs de référence, des causes d'interférences, des causes d'anomalies acquises (pathologies, contexte hormonal chez la femme - grossesse, COC, THS - autres traitements).
- Il est recommandé de discuter la réalisation d'une étude du gène de la protéine C (PROC) avec un centre expert.

Comment explorer la PS ?

Les coffrets commerciaux utiles au diagnostic et au conseil thérapeutique sont ceux qui évaluent l'activité (cofacteur de la PCa) de la PS et ceux qui permettent le dosage immunologique de la PSL. Il n'existe pas à ce jour de coffret

commercial permettant d'évaluer d'autres aspects fonctionnels de la PS. Dans les déficits quantitatifs, les PS libre et activité sont toutes deux diminuées ; dans le type II, l'activité de la PS est seule anormale.

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

Le **tableau 5** reprend quelques caractéristiques des coffrets utilisés en France et en Europe fin 2018, d'après les données des organismes d'EEQ, ECAT et Probioqual. Les tests mesurent l'allongement du temps de coagulation d'un mélange de plasma à tester et d'un plasma commercial déplété en PS, en présence de PCa. La coagulation est déclenchée par du facteur tissulaire du FIXa ajouté, ou par activation endogène du FX par du RVV en présence de calcium et de phospholipides.

Interférences :

- taux élevés de FVIII et présence du FV Leiden qui, en raccourcissant les temps de coagulation, peuvent simuler des déficits ; les degrés d'interférences sont variables en fonction des réactifs. Staclot PS® (Stago) est supplémenté en FVa bovin pour éviter l'interférence du FV Leiden. Malheureusement, cette interférence n'a pas pu être totalement éliminée ;
- PC diminuée : interférence signalée dans les techniques Werfen et Siemens ;
- certains anticoagulants lupiques, héparinémies très élevées, AOD anti-IIa ou anti-Xa (cf. paragraphe « Au total, quelle place pour chaque méthode ? Place du génotypage ? »).

Dosages immunologiques de la PS

Deux types de méthodologies sont disponibles pour le dosage de la PSL, techniques immunoturbidimétriques automatisées et ELISA classiques de type *sandwich*. Fin 2018, d'après les données de l'ECAT, les coffrets les plus utilisés étaient Coamatic free PS®, Chromogenix, HemosIL free Protein S®,

Siemens Innovance free PS antigen®, Stago Liatest free protein S® (techniques turbidimétriques) et Stago Asserachrom free PS® (ELISA). Tous emploient des anticorps monoclonaux pour la capture de la protéine et sa révélation, exceptées les techniques 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. Le nombre de centres réalisant des dosages de PS totale était beaucoup plus faible que le nombre de centres dosant la PS libre (20 %), le réactif le plus utilisé étant Stago Asserachrom Total PS® (ELISA).

Interférences : sensibilité possible au facteur rhumatoïde pour certains coffrets, plasmas particulièrement turbides, hémolysés, lipémiques ou ictériques, résultats erronés possibles en cas de présence d'anticorps dirigés contre des composants des réactifs... : se référer aux indications des fabricants.

Valeurs usuelles et variations physiologiques

La PS est basse à la naissance (cf. paragraphe pédiatrie). Chez l'adulte, les valeurs de référence diffèrent en fonction du sexe, et de l'âge chez les femmes. Les données de la littérature conduisent à utiliser des limites inférieures de valeurs de référence de l'ordre de 60 % pour les hommes, 50 % pour les femmes non ménopausées et 55 % pour les femmes ménopausées **50-52**.

Principales causes d'anomalies acquises

- La PS plasmatique diminue précocement au cours de la grossesse : 50 % des femmes enceintes ont une PS déjà diminuée à 13-20 semaines de grossesse. La recherche d'un déficit constitutionnel pendant cette période ou moins de 3 mois *post-partum* n'est pas recommandée car l'interprétation des résultats des dosages est très délicate **53**.

Tableau 5 : Caractéristiques des principaux réactifs de mesure de l'activité anticoagulante de la protéine S.

Table 5: Characteristics of the main reagents for protein S anticoagulant activity measurement.

Réactif	Type d'activateur	Dilution du plasma*	Interférences signalées par le fabricant				ECAT nb utilisateurs Fin 2018	Probioqual nb utilisateurs Fin 2018
			FVIII (%)	HNF (UI/mL)	Anticoagulant lupique	FV Leiden Hz		
Cryocheck ClotS® Cryopep	PCa/RVV/PL/Ca	1/10	> 600	> 1	+	+	1	0
Hyphen Hemoclot PS® Sysmex	PCa/FIXa/PL/Ca	1/10	> 200	> 1	+	+	7	2
HemosIL PS activity® Werfen	PCa/rhTF/PL/Ca	Pur	?	> 1,6	?	?	41	19
Staclot PS® Stago	PCa/FVa/PL/Ca	1/10	> 150	> 1	+	?	72	51
Protein S AC® Siemens	PCa/RVV/PL/Ca	1/10	> 400	> 3	+	+	30	0

Abréviations : Ca : calcium ; Hz : hétérozygote ; PCa : protéine C activée ; PL : phospholipide ; RVV : venin de vipère Russell ; rhTF : facteur tissulaire recombinant humain ; HNF : héparine non fractionnée.

* notice du produit.

- Des déficits acquis sont également observés dans les contextes suivants : insuffisance hépatocellulaire, hypovitaminose K, alcoolisme sévère (anomalies de glycosylation), CIVD et thromboses étendues, auto-anticorps anti-PS (très rares), syndrome néphrotique. Au cours du syndrome inflammatoire, il y aurait des risques de faux diagnostic (positif ou négatif, en fonction des médiateurs de l'inflammation mis en jeu) **54,55**.
- Traitements engendrant des déficits acquis : antivitamines K, contraceptifs oraux œstroprogestatifs (diminution moyenne de l'ordre de 20 %, fonction de la classe), traitement hormonal substitutif de la ménopause avec estrogène oral, L-asparaginase.

Au total, quelle place pour chaque méthode ?

Place du génotypage ?

En l'absence de traitement susceptible de rendre les résultats ininterprétables, la mesure de l'activité est à réaliser en 1^{re} intention car elle est sensible aux anomalies quel que soit leur type. En cas de diminution de l'activité, le dosage de la PSL est à réaliser en complément pour établir le diagnostic d'anomalie quantitative ou qualitative.

Il n'y a pas lieu de doser systématiquement la C4bBP ou la PS totale. En effet, ces dosages n'apportent pas à ce jour, d'information susceptible d'avoir une influence sur l'évaluation de la thrombogénicité.

Le génotypage de *PROS1* est absolument nécessaire dans la forme récessive du déficit, pour permettre le conseil génétique et des diagnostics anténataux précoces. Il peut être utile pour affirmer l'origine constitutionnelle d'un déficit franc ou lorsque les résultats des dosages 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.

Propositions :

- Pour le **dépistage** d'un déficit en PS, il est recommandé de mesurer en 1^{re} intention son **activité anticoagulante**, à l'aide d'un réactif de sensibilité optimale.
- En cas de diminution de l'activité, **le dosage de la PSL est à réaliser en complément pour caractériser le déficit** (anomalie quantitative ou qualitative).
- Les résultats des dosages doivent être interprétés en tenant compte des valeurs de référence, des causes d'interférences, des causes d'anomalies acquises (pathologies), contexte hormonal chez la femme (grossesse, COC, THS, autres traitements).
- Il est recommandé de discuter la réalisation d'une étude du gène de la protéine S (*PROS1*) avec un centre expert.

Performances analytiques comparées des techniques d'étude des inhibiteurs

Quelques évaluations de performances réalisées à partir des analyses de données d'EEQ sont disponibles dans la littérature. En 2003, le calcul de CVs inter-laboratoires prenant en compte des valeurs sur une période de 6 ans, a permis de classer les techniques dans l'ordre suivant (CV les plus faibles au CV les plus élevés) : AT < PC < PS **56**. En 2011, Cunningham *et coll.* ont comparé les performances de quelques techniques en termes de biais (par rapport à la valeur d'un étalon) et de CVs inter-laboratoires **57**. Des biais de 2,6 à 8,8 % ont été observés. Les biais les plus faibles (< 5 %) concernaient les méthodes de dosage de l'AT (activité et antigène) et la plupart des techniques de dosage de PC (chromogéniques et immunologiques). Les biais les plus importants concernaient les techniques d'évaluation de PS (activité et antigène). En termes de CVs inter-laboratoires (6,1-20 %), les méthodes pouvaient être classées dans l'ordre suivant (CV les plus faibles au CV les plus élevés) : PC activité (chromogénique ou chromométrique) < AT activité < AT antigène, PS activité, PS libre, PC antigène. Globalement, les performances des techniques de dosage de l'AT étaient meilleures que celles des techniques de dosage de PC ou PS, en accord avec les résultats de Meijers *et coll.* **56**.

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

Traitement par héparine

Une diminution de l'AT plasmatique mise en évidence lors d'un traitement curatif par HNF ou par une HBPM riche en chaînes longues doit entraîner un contrôle après 5 à 10 j d'arrêt du traitement.

Traitement par antivitamines K

La recherche de déficit en PC ou PS sous AVK n'est pas recommandée. En cas de traitement par AVK, l'activité chromométrique de PC et PS n'est pas interprétable. L'activité amidolytique de PC et la PS libre sont moins diminuées mais l'interprétation des résultats est délicate (réservée à des centres experts). 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 **58**. Le traitement par AVK n'interfère pas dans le dosage de l'AT.

Traitement par AOD 47,59

Les AOD anti-Xa ou anti-IIa interfèrent avec tous les tests de coagulation et avec les tests chromogéniques basés sur

une inhibition de l'activité anti-Xa ou anti-IIa, respectivement. L'effet varie en fonction des réactifs, du médicament et de sa concentration plasmatique. La conséquence est la surestimation de l'activité avec le risque de masquer un déficit en inhibiteur. L'activité de l'AT, mesurée par méthode chromogénique, est surestimée lorsque le test est basé sur une inhibition de l'activité anti-Xa en présence d'un AOD anti-Xa ou lorsque le test est basé sur une inhibition de l'activité anti-IIa, en présence de dabigatran.

Propositions en cas de traitement par 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. L'activité de PC doit être évaluée par la technique amidolytique et pour celle de la PS, par technique immunologique de la PS libre. À noter que dans ces conditions, les (très rares) déficits qualitatifs en PC de type IIAC et les déficits qualitatifs en PS ne pourront pas être diagnostiqués.

Après arrêt d'un AOD, compte tenu des caractéristiques pharmacocinétiques variables en fonction des individus, pour une élimination totale du médicament, il convient d'attendre au moins 1 semaine avant la réalisation de mesures d'activité de PC ou PS par les méthodes chronométriques habituelles de dépistage.

AT, PS et traitement estrogénique par voie orale

Certains traitements estrogéniques par voie orale sont susceptibles d'engendrer des déficits acquis en AT ou PS ; au moins 2 cycles après arrêt du traitement sont nécessaires avant contrôle.

FV LEIDEN ET MUTATION G20210A (C.*97G>A) DU GÈNE F2 60

Les connaissances

La mutation 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 cofacteur V de la coagulation. Le FV possède des fonctions pro- et anti-coagulantes. En effet, il est procoagulant en tant que cofacteur de l'action du FXa sur la prothrombine et anticoagulant en tant que cofacteur de la PCa vis-à-vis de la dégradation du FVIIIa. La PCa dégrade 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 la dégradation du FVIIIa nécessite le clivage en 534. Lorsque la mutation Leiden est présente, l'Arg 534 est remplacée par une glutamine, ce qui entraîne un gain de fonction du FV. Cette mutation engendre une « résistance plasmatique 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 pseudo-homozygote des patients hétérozygotes composites porteurs de la mutation 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 de la mutation Leiden du FV est hétérogène. La mutation est présente à l'état hétérozygote dans le nord de l'Europe et aux États-Unis, avec une fréquence moyenne de 5 % dans la population générale ; sa 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 accidents thromboemboliques (risque relatif (RR) de 1^{re} thrombose de l'ordre de 3 à 5 chez les hétérozygotes) ; l'influence de la mutation sur le risque de récurrence est faible (RR 1,5). La mutation Leiden du FV est responsable d'au moins 95 % des RPCA FV dépendantes d'origine génétique.

La mutation 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). La mutation 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 de la mutation à des taux de FII 30 % plus élevés chez les hétérozygotes que chez les non-mutés. Cette augmentation de concentration pourrait, par son impact sur la génération de thrombine, expliquer l'influence de la mutation sur le risque thrombotique. La prévalence de la mutation 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 de la mutation sur le risque de récurrence est faible (RR 1,5).

Comment rechercher ces anomalies ?

La recherche de ces 2 mutations ponctuelles est simple et de nombreuses méthodes 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 techniques « maison ». D'autres travaillent à l'aide de réactifs commerciaux. En Europe, les techniques de PCR en temps réel sont maintenant plus utilisées que les techniques RFLP (EEQ DGKL RFP 2017-18). Une enquête, auprès des laboratoires français hospitaliers et privés réalisant ces analyses, nous 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 6**. LACAR et Vienna Lab commercialisent de plus, des trousse permettant la recherche simultanée des deux mutations ainsi que pour Vienna Lab, un tampon (D2PCR™ Buffer) qui permet d'éviter l'extraction préalable d'ADN **61-68**. D'après les données de la littérature, les performances analytiques (sensibilité, spécificité) des techniques sont globalement bonnes, supérieures à 98 % **69**. Avec les techniques commerciales, pour éviter les faux-diagnostics, il convient de lire attentivement les informations données par le fabricant et d'examiner systématiquement les données 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 mutations recherchées peuvent en effet induire des profils anormaux. Ils sont généralement interprétés comme invalides par les systèmes de mesure. Cependant, dans certains cas, de faux-diagnostics sont possibles (**Tableau 6**). 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 **70**.

En tant qu'examen touchant les caractéristiques génétiques d'une personne à des fins médicales, la recherche des mutations thrombogènes de F2 et F5 est réglementée par le code de la santé publique (titre III, partie législative articles L1131-1 à 3 et réglementaire articles R1131-1 à 21) que ce soit pour les conditions de prescription, de réalisation de l'analyse, de communication et de conservation 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 mutations, « tout au moins lorsque le résultat d'une recherche est positif, un contrôle sur un deuxième prélèvement paraît devoir être conseillé ».

Propositions :

- Pour la recherche de la mutation Leiden de F5 et de F2 c.*97G>A, il est indispensable d'obtenir, comme pour toute autre analyse des caractéristiques génétiques d'un individu, un consentement signé par le patient et le prescripteur après information préalable, conformément aux articles R.1131-4 et R.1131-5 du code de la santé publique.
- Il est recommandé de ne pas rechercher une RPCA (résistance à la protéine C activée) dans le but d'identifier la présence d'un FV Leiden.
- La recherche de ces mutations peut être effectuée à l'aide de différentes méthodes commerciales ou « maison » (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...).
- Il est recommandé, lorsque le résultat de la recherche d'un variant génétique est positif, qu'un contrôle soit réalisé sur un deuxième prélèvement (rapport d'évaluation technologique HAS 2011).

RÉSISTANCE À LA PROTÉINE C ACTIVÉE (RPCA), QUAND UTILISER CE TEST ?

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 de la mutation et de déterminer le statut génétique (hétérozygotie/homozygotie). De plus, il n'est pas totalement sensible et spécifique vis-à-vis de cette mutation. Compte tenu de ces éléments, l'HAS a recommandé en 2006 de rechercher directement le FV Leiden par technique de biologie moléculaire et l'analyse RPCA n'est plus inscrite à la NABM **71**.

Dans un nombre restreint de situations cliniques (transplantation hépatique, greffe de moelle osseuse), la recherche du FV Leiden réalisée sur l'ADN extrait des leucocytes n'est pas pertinente ; la recherche d'une RPCA reste alors indiquée **72,73.**

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) **74**. Pour améliorer la spécificité, il a ensuite évolué vers une version dans laquelle le plasma du patient à tester est dilué dans du plasma déficient en FV (Coatest APCR-V). D'autres tests de principes un peu différents ont ensuite été développés (**Tableau 7**). 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 techniques sont réalisées en présence ou en l'absence de PCa d'origine

Recherche d'une thrombophilie biologique : propositions du GFHT 2020

Thrombophilia testing: Proposals of the 2020 GFHT

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).

Tableau 6 : Mutations thrombogènes de F5 et F2 : coffrets commerciaux CE-IVD, utilisés en France en 2019.

Table 6: Systems for detection of thrombophilia-associated mutations used in France in 2019.

Nom du coffret	FV Leiden kit # FII (prothrombin) G20210 kit# (FDA 2003)	Lightmix In vitro Diagnostics kit FII G20210 FV (Leiden)	LC-FII-LP_24 ou LC-FII-LP_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 (revendu 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 ») 74	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	Hybridation SimpleProbe® canal 519 reconnaissant allèle « sauvage » 72	Hybridation simple : sonde reconnaissant : allèle muté (FII), allèle sauvage (FV) 72	Sondes Scorpion 70-72	Sonde Hydrolyse TaqMan® 70-72
Appareillages et compatibilité	LC® 2.0	LC® 1.x LC® 2.0 LC® 480 I et II LC® Nano LC® 96 Cobas z480	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 FII et V contenu dans une matrice équivalente au sang (hétérozygote)	Synthétique : - sauvage - homozygote muté
Analyse simultanée des mutations FII et FV ?	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 : 0,22 x 10 ³ /mm ³ - ADN : 5 ng/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 - Triglycerides < 500 mg/dl	Pas d'interférence si : - Héparine < 14,3 USP/ml - Bilirubine < 16 mg/d - Cholestérol < 250 mg/dl - Triglycerides < 1.932 mg/dl 75	
Risques de faux diagnostics	Faux positifs FV Leiden : A1692C G1689A A1696G		Faux positifs FV Leiden : G1689A	Erreurs de statut : si sang total congelé/décongelé ou leucocytes très augmentés 76,77	

Tableau 7 : Résistance à la protéine C activée. Caractéristiques des techniques les plus utilisées fin 2018 en Europe d'après les analyses de l'EEQ ECAT.

Table 7: Characteristics of the main reagents for activated protein C resistance detection used in Europe according to ECAT.

Techniques	Milieu réactionnel	Interférences signalées par le fabricant
Chromogenix/Hemosil APC™ Resistance –V (Instrumentation Laboratory, 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	
Staclot APC-R (Stago)	- plasma déficient en FV + PL - venin de crotale - PCa - calcium++	FV < 50 % Inhibiteurs directs de la thrombine

Abréviations : PL : phospholipides ; RVV : venin de vipère Russell ; TCA : temps de céphaline activée ; PCa : protéine C activée.

Une technique permet la quantification du FV Leiden (Hemoclott Quanti V-L, Hyphen Biomed).

Le résultat d'une méthode en 2 temps (± PCa) peut être exprimé soit à l'aide du ratio des 2 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 les zones de résistance. Certaines de ces méthodes restent sensibles à des variations de taux de facteurs. La sensibilité à la présence des anticoagulants lupiques est diminuée lorsque l'activation de la coagulation est réalisée en aval de la tenase (activation des facteurs V, X ou II), et par optimisation de la concentration en phospholipides. Des limites des méthodes sont indiquées par les fabricants, et il convient d'en tenir compte. Les mesures de RPCA sont pour la majorité des tests possibles chez les patients traités par héparine à concentration thérapeutique en l'absence de surdosage, compte tenu de la présence d'inhibiteur d'héparine dans les réactifs. La plupart des tests sont insensibles aux AVK, en particulier lorsqu'ils sont réalisés sur 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 mesures de RPCA réalisées à l'aide des réactifs Coatest APCR V® et Pefakit®. Le dabigatran est susceptible d'engendrer de faux résultats avec ces 2 tests (faux-négatifs) ; Pefakit® est moins influencé par le rivaroxaban que Coatest® **75**. Cependant, il n'est pas conseillé de rechercher une RPCA sous AOD.

ANOMALIES DU FIBRINOGENE : DYSFIBRINOGENEMIE ET HYPODYSFIBRINOGENEMIE : COMMENT LES DIAGNOSTIQUER ? 76-78

Une anomalie qualitative du fibrinogène est suspectée sur l'observation d'une discordance entre l'activité du fibrinogène et sa concentration (dosage immunologique), avec un ratio activité/antigène $\geq 0,7$. Le terme de dysfibrinogénémie est utilisé lorsque la concentration du fibrinogène (antigénique) se situe dans les valeurs de référence [1,5-3,5 g/L] **79** 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.

Ces anomalies sont rares. Un certain nombre de cas ont 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 fausses de l'un des gènes qui codent pour les chaînes du fibrinogène. Dans les hypodysfibrinogénémies, différents mécanismes moléculaires ont été rapportés. Il existe des mutations qui affectent la formation et/ou la sécrétion d'une chaîne, d'autres qui induisent une augmentation de clairance de la protéine mutée mais aussi des hétérozygoties composites pour des mutations responsables d'une part d'un déficit et d'autre part d'une anomalie de fonction ont été décrites.

Toutes les mutations publiées et les phénotypes cliniques associés sont recensés dans une base de données française, en accès libre sur le site du GFHT : <http://site.geht.org/base-de-donnees-fibrinogene/>, tenue à jour régulièrement **80**.

Le phénotype clinique associé aux anomalies du fibrinogène est très hétérogène. Il peut n'y avoir aucun signe clinique au moment du diagnostic (55 %), en particulier lors d'une découverte fortuite (bilan systématique, bilan 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 2,5/1 000 patients-années. La symptomatologie peut aussi être thrombotique (20 %), avec des épisodes veineux, mais aussi artériels. L'incidence annuelle des thromboses est estimée à 18,7/1 000 patients-années. Des tableaux obstétricaux sont rapportés avec en particulier, la survenue d'arrêts précoces de grossesse. 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 du taux de fibrinogène coagulable circulant), et d'autre part des manifestations thrombotiques plus nombreuses que dans les dysfibrinogénémies.

Une association claire entre génotype et phénotype n'a été démontrée que dans quelques cas d'anomalies du fibrinogène à risque thrombotique, par exemple pour le fibrinogène Paris V Dusart **81**, responsable d'une symptomatologie thrombotique artérielle et veineuse grave, débutant à un âge jeune. La mutation p.Cys554Arg de la chaîne du fibrinogène, induit un trouble de la polymérisation de la fibrine responsable d'une anomalie structurale du caillot de fibrine, qui est anormalement dense et résistant à la fibrinolyse **82**. 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 **78**.

La mesure du fibrinogène coagulable et celle de sa concentration sont indispensables au diagnostic. 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 **76**. Ces tests sont utiles pour le dépistage lorsque le fibrinogène coagulable n'est pas diminué, mais ils ne sont plus inscrits à la NABM.

Le sous-comité (SSC) fibrinogène de l'ISTH a recommandé de réaliser la mesure d'activité par la technique chronométrique

de Von Clauss qui évalue la concentration du fibrinogène coagulable par la thrombine. Les méthodes d'estimation indirecte du fibrinogène à partir du temps de Quick proposées sur certains automates ne sont pas appropriées, car l'activité du fibrinogène peut être surestimée. 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 **83,84**. Le temps de Quick n'est souvent peu voire pas allongé (fonction du taux de fibrinogène).

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.

Propositions :

- L'activité du fibrinogène doit être évaluée par la technique chronométrique de Von Clauss pour pouvoir dépister les anomalies qualitatives de la protéine.
- La réalisation d'un temps de thrombine et d'un temps de reptilase peut aussi être proposée bien que ces tests ne soient plus inscrits à la nomenclature des analyses de biologie médicale.

ANTICORPS ANTIPHOSPHOLIPIDES. DIAGNOSTIC DE SAPL

Le point sur les connaissances

La recherche 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 **85**.

Hétérogénéité et « thrombogénicité » des anticorps

Il existe une grande hétérogénéité des aPL, en termes de cible, de pathogénicité 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 antigènes déterminants. Les anticorps pathogènes 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) dont le domaine V qui permet sa liaison aux surfaces anioniques ; l'épitope du domaine I reconnu par les anticorps pathogènes est démasqué après changement de forme et liaison aux PL. Seuls, les aPL dirigés contre le domaine I sont

associés au SAPL ; ceux dirigés contre d'autres domaines de la β_2 GPI sont non thrombogènes, 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 tous élucidés. Ils comportent l'activation d'un certain nombre de cellules impliquées dans les processus de régulation de l'hémostase et de la réponse inflammatoire **86,87**. Les anticorps « thrombogènes » sont des anticorps persistants. Les anticorps transitoires, tels que ceux dirigés contre la cardiolipine seule, qui sont retrouvés au cours des 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 conséquence clinique. Compte tenu de l'hétérogénéité des anticorps et de l'absence de méthode de référence pour détecter spécifiquement les anticorps « thrombogènes », leur recherche nécessite d'associer plusieurs techniques.

Recherche des anticorps, critères temporels, interprétation des résultats

D'après les recommandations internationales **85** actualisées par le sous-comité « antiphospholipides » de l'ISTH en 2018 **88**, 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_2 GPI** (dits « anticardiolipine » aCL) ;
- des anticorps (IgG/IgM) **anti- β_2 GPI** ($a\beta_2$ GPI) ;
- d'un « **anticoagulant 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 quelques données de la littérature montrent que la présence d'anticorps spécifiques anti-PS-PT serait bien corrélée à la présence de LA **89,90**. Les anticorps dirigés contre le domaine I de la β_2 GPI sont thrombogènes, 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 **91**.

Un diagnostic biologique positif de SAPL ne peut être posé 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 (anti-cardiolipine, $a\beta_2$ GPI et LA). Le délai 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, au moins deux contrôles ultérieurs espacés d'au moins 3 mois sont indispensables.

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 coll.*, le risque thrombotique associé à la présence d'un LA apparaît similaire au risque associé à la présence d'une IgG aCL ou $a\beta_2$ GPI. La triple positivité (LA positif + IgG aCL positif + IgG $a\beta_2$ GPI 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 $a\beta_2$ GPI. 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 **92,93**. Pour l'*European League Against Rheumatism* (EULAR), les sujets à haut risque thrombotique ou de complications obstétricales sont ceux qui présentent des anomalies permanentes de type LA, ou une double positivité ou une triple positivité, ou des titres forts d'APL. La place des IgM n'est pas évoquée **94**.

Recherche d'anticoagulant circulant de type lupique

Les LA doivent être recherchés selon les recommandations du SSC LA de l'ISTH.

Principes des recommandations

Les premières recommandations internationales de l'ISTH pour la recherche des LA ont été publiées en 1995 **95** puis révisées en 2009 **3**.

Les grandes lignes de ces recommandations sont les suivantes :

a. **Préanalytique** : cf. paragraphe « prélèvement et traitement ».

b. **Dépistage « screen »** : compte tenu de la grande hétérogénéité des anticorps, la réalisation de 2 tests de dépistage est obligatoire pour conclure à l'absence de LA : un temps de venin de vipère Russell dilué (**drVVT**) et un **TCA réalisé à l'aide d'un réactif sensible** (PL en faible concentration, activateur silice ou acide ellagique). Par exemple, les réactifs contenant du kaolin, trop peu sensibles, ne doivent pas être utilisés. Le dépistage est **positif si un résultat anormal est obtenu avec au moins l'un des deux tests**.

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 bicouches, ou en phase hexagonale. Des tests dits « intégrés » sont réalisés à l'aide de 2 présentations d'un même réactif qui ne diffèrent que par la concentration de PL.

d. **Épreuves de mélange « mixing »** : lorsque le résultat du test de dépistage est anormal, la réalisation du même test sur 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 préincubation, vise à montrer l'existence d'un effet inhibiteur du PP. La place de l'épreuve de mélange dans la recherche de LA réalisée à l'aide des tests « intégrés » a fait l'objet de débats. Elle est nécessaire pour ne pas rendre un diagnostic négatif lorsqu'un LA particulièrement fort est présent (avec un temps de coagulation (TC) qui reste allongé en test de confirmation). En cas de déficit en facteur ou de traitement par AVK, dans les tests de type DRVVT, le dépistage peut être réalisé d'emblée sur mélange mais cela entraîne une réduction de sensibilité qui peut conduire à des faux-négatifs si un LA « faible » est présent **96,97**.

e. **Expression des résultats** : selon l'ISTH, les résultats doivent être exprimés en ratio des TC du PP et du PN dans chacune des étapes. Le ratio doit être exprimé avec 2 chiffres après la virgule. Pour les TCA, l'index d'anticoagulant circulant (IAC, index de Rosner) [TC du mélange - TCPN/TCPPx100] est utilisé. Pour les 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 : $[(screen\ PP/screen\ PN) / (confirm\ PP/confirm\ PN)]$ ou $[(screen\ PP/confirm\ PP) / (screen\ PN/confirm\ PN)]$. Il n'y a **pas d'élément déterminant** en faveur de l'un ou l'autre de ces modes d'expression. Une alternative qui consiste à utiliser en dénominateur la moyenne du TC déterminé pour chaque lot plutôt que le TC du PN mesuré à chaque série, a été proposée pour réduire la variabilité inter-lots **98**.

Aspects techniques

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 anti-coagulants ;
- réaliser des examens d'hémostase de base : TP, TCA (réactif utilisé en routine), fibrinogène, avec examens complémentaires en cas de résultats anormaux.

Lorsqu'un syndrome inflammatoire est présent, un contrôle à distance est nécessaire compte tenu du risque de faux diagnostic (temps de coagulation raccourcis lorsque le FVIII est augmenté, ou allongés par interférence de la CRP) **98,99**.

Tableau 8 : Temps de venin de vipère Russell dilué : caractéristiques de quelques trousse commerciales.

Table 8: Characteristics of the main reagents for Diluted Russel viper venom time measurement.

Fournisseur	Nom du coffret	Caractéristiques	Interférences signalées par le fournisseur*
American Diagnostica	DVV test DVV Confirm	Réactifs lyophilisés Présence d'un agent neutralisant l'héparine	Inhibiteurs anti-IIa, anti-Va ou anti-Xa (faux-positifs) FVIII > 200 % (faux positifs) HNF > 1 UI/mL Lovenox > 0,25 UI/mL
Siemens/Dade Behring	LA1 (dépistage) LA2 (confirmation)	Réactifs lyophilisés Présence d'un agent neutralisant l'héparine	HNF > 1 UI/mL
Werfen (IL)	LA Screen LA Confirm	Réactifs lyophilisés Présence de polybrène	non précisées sauf interférences liées à la détection optique
Stago	Staclot DRVV Screen Staclot DRVV Confirm	Réactifs lyophilisés Présence de polybrène	HNF > 0,8 UI/mL
T-Coag	TriniCLOT Lupus screen TriniCLOT Lupus confirm	Réactifs lyophilisés Présence d'un agent neutralisant l'héparine	Non précisées

Abréviation : HNF : héparine non fractionnée.

* auxquelles s'ajoutent les AOD pour chaque test.

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 l'avantage d'être insensible aux taux 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 % **100. Les tests de confirmation ne doivent être réalisés que lorsque les tests de dépistage sont positifs.**

TCA sensible

D'après Fritsma *et coll.*, 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 **101**. 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), PTT-LA/StacLOT LA® (Stago), Cephén/CEPHEN LS® (Hyphen), ou des tests intégrés [Hemosil SCT® (Werfen), StacLOT LA® (Stago)] **102**. Le TCA est un test global influencé par de nombreuses anomalies de la coagulation 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 méioprothrombine 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 la présence d'AVK et d'AOD anti-Xa (rivaroxaban, apixaban). Cependant d'une part, ils ne sont pas couramment disponibles à ce jour et d'autre part, l'ISTH ne les recommande pas pour l'instant, en l'absence d'évaluation suffisante de leurs performances.

Plasma normal, plasma normal de référence

Pour déterminer le temps témoin ou réaliser des tests sur mélange, il faut disposer d'un *pool* de PN 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 **3**. Actuellement, la préparation locale d'un *pool* ne paraît plus possible 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^{es} 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 $[(\text{screen-confirm})/\text{screen}] \times 100$, 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 1999, les seuils de positivité devaient être déterminés localement d'après les résultats obtenus sur 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 ne tester 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 2 valeurs hors de ces limites **98**. 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 au point de méthodes.

Performances 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. 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®. Un nombre relativement important d'adhérents réalisait des tests « intégrés » à l'aide d'HemosIL SCT. 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 **103**.

Recherche de LA au cours des traitements anticoagulants **104**

Patients traités par AVK

Selon l'ISTH, si l'INR est compris entre 1,5 et 3,0, les tests « intégrés » doivent être réalisés directement sur le mélange PN + PP ; cette condition technique induit une réduction de sensibilité et au-delà d'un INR à 3,0, la recherche ne doit pas être réalisée. D'autres sociétés savantes n'indiquent pas de limite supérieure d'INR **105**.

Patients traités par héparines (HNF, HBPM) ou fondaparinux

Les héparines (HNF et dans une moindre mesure les HBPMs, y compris fondaparinux) allongent de manière variable les TC et peuvent 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 d'activité anti-Xa.

Patients traités par AOD, argatroban

La présence d'inhibiteurs directs du FXa (rivaroxaban, apixaban, edoxaban...) 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 réalisés en routine (TP, TCA avec un réactif peu sensible aux LA) sont normaux **106,107**. Il ne faut donc pas réaliser les tests directement sur les plasmas des patients recevant ces médicaments. Plusieurs procédés visent à éliminer l'effet des AOD préalablement à la recherche de LA. Le charbon actif, 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. 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 **108**. 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 cliniquement possible, un relai par HBPM doit être réalisé. Le compte-rendu doit comporter ce commentaire. Des réactifs de TCA et dRVVT qui pourraient être peu ou pas sensibles aux AOD (par exemple, Cepen/Cepen 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, la mesure de l'activité anti-Xa permet d'exclure une souillure du prélèvement par de l'héparine. Pour l'HNF, la mesure d'un temps de thrombine peut ne pas être informative car certains réactifs sont peu sensibles à l'héparine **109**. Ces examens ne pourront être facturés car ils sont inclus dans le forfait pré-analytique du patient. Compte tenu de l'interférence majeure des AOD sur la recherche de LA, devant un résultat positif, il convient de réaliser une mesure d'activité anti-Xa HNF ou HBPM et un temps de thrombine pour vérifier l'absence d'AOD anti-Xa ou anti-IIa.

Recherche des anticorps anticardioline (aCL) β_2 GPI dépendants et des anti- β_2 GPI

Des recommandations de l'ISTH complétant les recommandations initiales de 2009 ont été publiées en 2014 et 2018 **88,110**. Les tests immunologiques doivent rechercher les anticorps (IgG/IgM) dirigés contre les complexes cardioline- 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 cardioline 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, dans le plasma ou le sérum, à l'aide de techniques de type ELISAs (tests de 1^{ère} génération), ou de techniques 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 **91,93** :

- hétérogénéité des types de plaques ELISA, les 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'homogénéité dans le mode d'expression des résultats (absence d'unités internationales) ;
- absence de consensus concernant les seuils de positivité. Les seuils de positivité doivent être déterminés de la même façon que pour la recherche de LA **98**.

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 **111**.

Rendu des résultats

Les comptes-rendus d'analyses doivent comporter les seuils de positivité et l'interprétation 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.

Tableau 9 : Recommandations aux biologistes pour le diagnostic du syndrome des antiphospholipides **3,85,88,109**.

Table 9: Recommended laboratory testing for the antiphospholipid syndrome.

L'ensemble des tests LA, aCL et anti- β_2 GPI doit être mis en œuvre pour pouvoir identifier les patients triple-positifs qui sont à haut risque thrombotique
La recherche d'autres anticorps anti-phospholipides n'est actuellement pas recommandée
LA : à rechercher dans le plasma, selon les recommandations du SSC*
aCL dépendants de la β_2 GPI, IgG/IgM : à rechercher dans le plasma ou le sérum [techniques immunologiques en phase solide (ELISA ou systèmes automatisés)] selon les recommandations du SSC*
Anticorps anti- β_2 GPI, IgG/IgM, à rechercher dans le plasma ou le sérum [techniques immunologiques en phase solide (ELISA ou systèmes automatisés)] selon les recommandations du SSC*
LA, aCL et/ou anti- β_2 GPI doivent être retrouvés positifs à deux reprises au minimum, à au moins 12 semaines d'intervalle La 1 ^{re} recherche ne doit pas avoir lieu plus de 5 ans après les manifestations cliniques
Les biologistes doivent interpréter les résultats en collaboration avec des cliniciens

* SSC : Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibodies of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, sous-comité sur les anticorps anticoagulants/antiphospholipides du lupus du comité scientifique et de normalisation de la société internationale de la thrombose et de l'hémostase.

Propositions :

- Étant donné l'hétérogénéité des anticorps antiphospholipides, il est recommandé de rechercher systématiquement, à partir d'un même prélèvement, des anticorps IgG/IgM anticardiopiline (β_2 GPI dépendants, aCL) et IgG/IgM anti- β_2 GPI par des méthodes immunologiques en phase solide, ainsi qu'un anticoagulant lupique (LA) par des techniques chromatométriques.
- LA, aCL et/ou anti- β_2 GPI doivent être retrouvés positifs à deux reprises au minimum, à au moins 12 semaines d'intervalle ; la première recherche ne doit pas avoir lieu plus de 5 ans après les manifestations cliniques.
- Il est recommandé de réaliser systématiquement deux types de tests pour la recherche de LA : 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).
- Pour les tests de dépistage et de mélange, les seuils de positivité recommandés sont les **99^{es} percentiles** des distributions observées chez les sujets sains.
- Si le dépistage de LA est négatif, il ne faut pas réaliser de test de confirmation (risque de faux-positifs).
- Si le dépistage de LA est positif (au moins un test positif en l'absence de cause d'interférence), il est recommandé de réaliser un test confirmant l'effet neutralisant d'une concentration élevée en phospholipides sur l'action de l'inhibiteur pour montrer la phospholipo-dépendance de l'anticorps.
- L'expression des résultats de recherche de LA doit se faire en ratios. Une normalisation par rapport aux résultats obtenus pour le plasma normal peut être réalisée.
- Pour toute recherche d'anticoagulant lupique positive, l'absence d'interférence avec un médicament anticoagulant doit être systématiquement recherchée.
- Selon les recommandations du SSC de l'ISTH, la recherche d'anticorps anticardiopiline- β_2 GPI dépendants et d'anticorps anti- β_2 GPI (IgG et IgM) peut être effectuée dans le plasma ou le sérum avec des techniques immunologiques en phase solide de type ELISA ou sur des systèmes automatisés.

LE DOSAGE DES D-DIMÈRES A-T-IL UNE PLACE DANS LE BILAN DE THROMBOSE ?

Les D-Dimères (DDs) sont les produits terminaux de dégradation de la fibrine par la plasmine. Ils sont constitués de dimères de domaines D liés de façon covalente à un domaine E. À l'état physiologique, 2 à 3 % du fibrinogène plasmatique sont convertis en fibrine générant la faible quantité de DDs dosable chez les sujets sains. La demi-vie des DDs est d'environ 8 heures, ils sont éliminés par le rein et le système réticuloendothélial **112**. Une augmentation des DDs plasmatiques témoigne de l'activation des systèmes de coagulation et de fibrinolyse ou de la présence d'un thrombus constitué. De nombreuses techniques de dosage 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 techniques 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 113. D'après des données de l'EEQ Probioqual, les réactifs les plus utilisés fin 2018 sur notre territoire étaient : Stago STA Liatest®, Werfen D-Dimer HS500®, BioMérieux Vidas DDimères Exclusion II® et Siemens Innovance D-Dimer®. Les domaines de mesure de ces différentes techniques et les interférences signalées par les fournisseurs sont rapportés dans le **tableau 10**. Le dosage des DDs est utilisé dans l'évaluation du

risque de récurrence après un premier événement thrombotique veineux non provoqué. Trois scores clinico-biologiques d'évaluation de ce risque (HERDOO2 pour les femmes, DASH, de Vienne) ont été proposés (**Tableau 11**). La concentration plasmatique des DDs est l'un des éléments pris en compte dans chacun de ces scores 114-118. Concernant HERDOO2, dans les études initiales de proposition et de validation du score réalisées par Rodger *et coll.* 114,115, les DDs ont été dosés à l'aide de la technique 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® n'est pas approprié puisqu'il conduit à une mauvaise classification du risque chez 14 % à 19 % des patients en fonctions des réactifs. Ceci est probablement dû aux limites inférieures des domaines de mesure, trop élevées 116. Le DASH score a été établi par Toso *et coll.* 117 à partir de données issues de sept études qui comportaient des collectifs de sujets de taille très variable sans homogénéité

Tableau 10 : Caractéristiques des méthodes de dosages des D-Dimères et interférences signalées par le fabricant.

Table 10: Characteristics of D-dimers tests.

	Domaine de mesure (notice du produit, sans redilution)	Hb (g/L)	Triglycérides (g/L)	Bilirubine (µM)	Facteur rhumatoïde (UI/mL)	Anticorps anti-souris	Autre	Réaction croisée avec les PDF
Vidas DD exclusion II*	45-10 000 ng/mL FEU	> 4,8	> 30	> 537	> 400		Albumine > 60 g/L	Oui si PDF+++
Liatest DDI+	0,27-4 µg/mL FEU	> 2		> 3 420	> 1 000	Oui		> 15 µg/mL
Innovance D-Dimer*	0,17-4,4 mg/L FEU	> 2	> 6	> 1 026	> 1 330	Oui		> 20 µg/mL
D-Dimer HS et HS500†	HS : 215-7050 HS500 : 150-3 680 ng/mL FEU	> 5	> 13,3	> 3 078	> 1 400	Oui		> 20 µg/mL

Abréviations : PDF : produits de dégradation de la fibrine ; FEU : unité d'équivalent fibrinogène.

Tableau 11 : Évaluation du risque de récurrence de thrombose : scores.

Table 11: Prediction scores for recurrent venous thromboembolism.

	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/m ²		
Mesure des DDi par rapport au traitement anticoagulant	Sous AVK, 5-12 mois après TVP/EP	Après arrêt	Arrêt
Méthode de dosage DD	Vidas*	Variées	Stago Asserachrom® Seuil >/< 250 ng/mL +/-
1 ^{re} TV sous estrogène		Oui/Non	

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

* HER : hyperpigmentation, œdème, rougeur d'un membre inférieur.

dans les techniques de dosage (Tableau 12) 119-127. Toretto *et coll.* ont ensuite présenté une validation externe du score 126 dont la seule précision était que les DDs étaient dosés à l'aide de « techniques quantitatives ». L'étude THE-VTE a apporté des précisions sur les performances des techniques Vidas® et D-Dimer HS® 127 et montré la validité de ces deux méthodes avec des performances similaires (*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 techniques mentionnées dans l'étude initiale de Toretto *et coll.* 117. Concernant le score de Vienne, dans l'étude princeps, les DDs sont utilisés comme valeur continue ; ils ont été dosés à l'aide du coffret Asserachrom® 118. Tritschler *et coll.* 128 ont étudié les performances de la 2^e version de ce score chez les sujets âgés. Les DDs ont été dosés sur 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 dosage des DDs validées dans ces scores peuvent être utilisées :

- HERDOO2 : les DDs doivent obligatoirement être dosés sur Vidas® ;
- DASH : les techniques 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 techniques automatisées actuellement disponibles.

De plus, en 2019, les hollandais 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 biologiques dont les DDs mesurés à l'aide du réactif D-Dimer HemosIL assay® (Instrumentation Laboratory) 129.

Il est recommandé lors du suivi d'une maladie thromboembolique veineuse de ne doser le taux de D-Dimères que dans le cadre d'une évaluation du risque de récurrence à l'aide des scores HERDOO2 ou DASH. Seules les méthodes de dosage validées dans ces scores doivent être utilisées.

BILAN DE THROMBOSE DE L'ENFANT : PARTICULARITÉS ?

Pré-analytique

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 techniques. 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 techniques de prélèvement et d'abord veineux, aggravées par l'hypercoagulabilité physiologique du nouveau-né et son hématoците élevé, souvent supérieur

Tableau 12 : Études ayant servi à établir et valider le DASH score.

Table 12: Studies used for DASH score validation.

Référence	Sujets (n)	Sujets avec 1 ^{re} TV non provoquée (n)	Délai entre arrêt anticoagulant-dosage DD	Technique DD	Cut-offs (ng/mL)
123	610	610	21 j	Stago Asserachrom®	250
121	599	282	21-37 j	Vidas®	500
119	608	505	20-40 j	Clearview simplify**	quali+/-
124	501	45	Médian 28 j	Stago Liatest®	500
122	340	129	24-28 j	Vidas®	500
120	272	142	30-60 j	Trinity MDA DD®	500
125	295	175	30-37 j	IL Test®	250
127	626	238	2-3 mois	Vidas HemosIL D-Dimer HS®	500 230
126		827	20-40 j	Quantitative	500

Abréviations : TV : thrombose veineuse ; DD : D-Dimère.
* n'est plus commercialisé.

à 55 %. Les tubes d'hémostase doivent faire l'objet d'une observation macroscopique soignée par le personnel technique du laboratoire (vérification du niveau de remplissage, vérification de l'absence de caillot). Au niveau analytique, les difficultés techniques 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 **130**. 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), acheminer rapidement le prélèvement au laboratoire (**Tableau 13**).

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) **131**.

Thrombose et bilan de thrombose

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 **132,133**. En période néonatale, le prélèvement et l'interprétation des résultats des tests plasmatiques sont délicats (voir plus loin). En conséquence, les tests qui peuvent influencer la prise en charge thérapeutique immédiate seront seuls réalisés. Le dépistage d'un déficit homozygote en PC, PS ou AT Budapest III est indispensable car la découverte de l'une de ces anomalies entraîne une attitude substitutive spécifique. Des dosages 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 du taux de la lipoprotéine a (Lp(a)) semblent plus fréquents dans les AVCian, le lien direct avec la survenue de l'accident

Tableau 13 : Prélèvement d'hémostase chez le nouveau-né, d'après les recommandations pré-analytiques en hémostase (GFHT, révision 2015).

Table 13: Blood collection in neonates, according to the GFHT guidelines.

Aiguille	23 gauge (> 25 gauge : risque élevé d'hémolyse)
Tube	Microtube (1 mL, système ouvert)
Site de prélèvement	<ul style="list-style-type: none"> • Veineux ou artériel • Direct : goutte à goutte, tube ouvert (recommandé) seringue (acceptable) • Cathéter central
Remplissage	<ul style="list-style-type: none"> • Recommandé : $\geq 90\%$ • Acceptable : $\geq 80\%$
Transport	Rapide (prévenir l'activation et la coagulation du prélèvement)
Hématocrite > 55 %	<ul style="list-style-type: none"> • 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)

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 en AT, PC, PS. Il n'est pas recommandé de doser systématiquement la Lp(a) ou l'homocystéine, en dehors d'une histoire familiale évocatrice (accord d'experts). La recherche d'APL peut être recommandée chez le nouveau-né et sa mère, en cas d'anamnèse maternelle évocatrice d'un SAPL. Elle doit être réalisée le plus précocement possible après l'accouchement **134**. Dans le cadre du *purpura fulminans* post-infectieux et en particulier post-varicelle, la mesure d'activité de la PS peut être nécessaire pour ne pas passer à côté d'un déficit acquis profond lié au développement d'un anticorps dirigé contre cette protéine **135**.

Valeurs de référence

Selon l'ISTH, pour la pédiatrie, les laboratoires doivent utiliser des valeurs de référence tenant compte d'une part de l'âge des enfants (postnatal et aussi gestationnel) et d'autre part des analyseurs et des réactifs **136**. 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 nécessaire que pour des tests de base. 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 14** issues de travaux réalisés avec des réactifs différents et sur des automates différents **137-141**.

Propositions :

- Tenant compte des difficultés de prélèvement veineux chez l'enfant, en particulier chez le nouveau-né, seuls seront recherchés en urgence les déficits sévères en AT, PC, PS dont la présence peut influencer la prise en charge thérapeutique, notamment en cas de *purpura fulminans*.
- Il est indispensable chez l'enfant et jusqu'à la puberté d'interpréter les résultats obtenus en tenant compte des variations physiologiques liés à l'âge affectant les taux plasmatiques des inhibiteurs AT, PC et PS.

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 de la mutation F2 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 techniques et cliniques de ces situations.

Bilan de dépistage

Les tests

Pour les thromboses de localisations « habituelles », le bilan doit comporter la recherche de déficit en inhibiteur de la coagulation (AT, PC, PS), des mutations thrombogènes du FV et du FII, des anticorps antiphospholipides, et des hypodysfibrinogénémies. La recherche d'hyperhomocystéinémie majeure est à discuter dans des cas particuliers. Le dosage des D-Dimères peut être envisagé dans l'évaluation des scores de risque de récurrence. Compte tenu des 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 (ou dosage des facteurs du TP), dosage du **fibrinogène** dont l'élévation du taux témoigne d'un syndrome inflammatoire. La connaissance du taux de **FVII (ou VII+X)** peut être une aide à l'interprétation des taux diminués de PC car la pharmacodynamie 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 (voir supra). La connaissance de la présence d'un AOD est primordiale car elle conditionne aussi le choix et la possibilité de réalisation de certains tests (voir supra).

Thromboses de localisation « inhabituelle »

En cas de thrombose splanchnique, la recherche de la mutation V677F de *JAK2* (complétée en cas de résultat négatif par la recherche de mutation de *CALR*) et d'HPN est nécessaire. En cas de thrombose cérébrale, la recherche d'HPN est à discuter.

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 ce bilan à distance de l'épisode aigu et de traitement anticoagulant compte tenu des risques de faux diagnostics positifs ou négatifs ou de l'interprétation impossible de certains tests dans de telles situations. Dans la mesure où la mise en

Tableau 14 : Inhibiteurs de la coagulation : valeurs de référence chez les nouveau-nés à terme et chez les enfants.

Table 14: Coagulation inhibitors reference values for neonates and children.

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
AT antigène %											
136,137	63 (+/-12)		67 (+/-13)		78 (+/-15)	97 (+/-12)	104 (+/-10)		111 (82-139)	111 (90-131)	105 (77-132)
AT activité %											
138	76 (58-90)	74 (60-89)				109 (72-134)			116 (101-131)	114 (95-134)	111 (96-126)
140						105 (81-126)		110 (90-132)	110 (93-128)	108 (92-122)	104 (90-119)
139				41 (33-63)		80 (29-129)		96 (63-128)	97 (61-128)	97 (64-136)	97 (69-136)
PC antigène %											
136,137	35 (+/-9)		42 (+/-11)		43 (+/-11)	54 (+/-13)	59 (+/-11)		66 (40-92)	69 (45-93)	83 (55-111)
PC amidolytique %											
138	36 (24-40)	44 (28-54)				71 (31-112)			96 (65-127)	100 (71-129)	94 (66-118)
140						66 (43-102)		76 (59-103)	88 (71-125)	90 (75-120)	93 (70-131)
139				39 (27-48)		51 (23-95)		80 (47-151)	93 (59-148)	101 (46-154)	99 (72-155)
PC coag %											
138	32 (24-40)	33 (24-51)				77 (28-124)			94 (50-134)	94 (64-125)	88 (59-112)
140						70 (41-115)		83 (60-117)	97 (63-133)	98 (62-134)	100 (71-144)
139				36 (30-115)		82 (28-128)		85 (44-151)	86 (61-143)	91 (39-170)	95 (66-127)
PS totale %											
136,137	36 (+/-12)		50 (+/-14)		63 (+/-15)	86 (+/-16)	87 (+/-16)		86 (54-118)	78 (41-114)	72 (52-92)
PS libre %											
139				84 (61-108)		95 (48-127)		86 (63-139)	86 (53-135)	95 (62-142)	94 (61-131)
PS coag %											
138	36 (28-47)	49 (33-67)				102 (29-162)			101 (67-136)	109 (64-154)	103 (65-140)
140						84 (59-99)		85 (59-110)	85 (60-115)	87 (63-116)	90 (62-126)
139				90 (29-115)		82 (33-154)		88 (52-138)	98 (60-149)	105 (67-162)	99 (53-147)

Abréviations : AT : antithrombine ; PS : protéine S ; PC : protéine C.

Légende : Références 136,137 : moyenne +/-1SD ou IC 95 % ; Référence 138 : moyenne (limites : 95 % population) ; Référence 139 : médiane (IC 95 %) ; Référence 140 : médiane [5^e-95^e pctlle].

évidence de la présence d'un anticorps anti-PL ou d'un déficit héréditaire en AT thrombogène peut modifier la prise en charge thérapeutique, il apparaît pertinent de proposer une recherche précoce de ces anomalies au moment du diagnostic de thrombose, avant la mise sous traitement. Pour des aspects pratiques, **il est plus simple 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 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 anti-PL uniquement mis en évidence moins de 12 semaines après un épisode

thrombotique n'est pas un critère biologique de SAPL **85**. La recherche des mutations thrombogènes du FII et du FV par technique 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 de l'hémodilution.

Contrôles

1. 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).

2. Les anomalies permanentes sont seules susceptibles d'influencer la prise en charge thérapeutique. La confirmation des anomalies décelées sur un premier bilan est donc fondamentale. En cas de déficit inexpliqué en **AT, PC ou PS**, le contrôle est à effectuer en dehors de tout contexte susceptible d'engendrer un déficit acquis. Si l'anomalie est retrouvée, le **phénotypage du déficit** sera effectué sur ce deuxième prélèvement.

En ce qui concerne les recherches de mutations thrombogènes du FII et du FV par technique de biologie moléculaire, le diagnostic étant établi pour la vie entière, il apparaît particulièrement important de prendre toutes les précautions pour éviter les faux diagnostics. Tout au moins lorsque le résultat d'une première recherche de mutation est positif, **un contrôle sur un deuxième prélèvement** devra être réalisé si cela est possible (HAS).

Le diagnostic biologique des anticorps anti-PL du SAPL repose sur la mise en évidence d'anticorps permanents. Les conditions de réalisation dans le temps des tests biologiques ont été précisées par les sociétés savantes **85**. 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 de poser un diagnostic de SAPL ;
- il faut s'assurer **de la persistance d'une positivité lors d'au moins 2 contrôles successifs réalisés à au moins 3 mois d'intervalle** dans la période de 3 mois à 5 ans après les manifestations cliniques.

Compte tenu de l'hétérogénéité des méthodologies et de leurs performances, il est important de réaliser le dépistage

et les contrôles **dans un même laboratoire, avec les mêmes méthodologies.**

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

La présence d'un déficit isolé confirmé en inhibiteur de la coagulation ne permet pas d'affirmer son caractère héréditaire. **L'enquête familiale est indispensable.** L'analyse de gène ne doit pas être une analyse de routine, d'autant plus qu'une sensibilité complète ne peut pas être atteinte.

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 de la mutation permet l'accès au diagnostic anténatal pour des grossesses ultérieures ;
- chez les propositi, lorsque les résultats des dosages sont d'interprétation difficile, ou lorsque l'enquête familiale est impossible ou non-informative ;
- dans la famille, lorsque les résultats des dosages plasmatiques sont d'interprétation difficile. ■

Propositions :

- Les bilans de thrombophilie sont à réaliser dans des centres experts qui maîtrisent à la fois les aspects médicaux et biologiques relatifs aux analyses prescrites.
- Il est proposé d'effectuer le plus tôt possible le bilan de thrombophilie à la recherche d'un facteur de risque biologique c'est-à-dire au moment du diagnostic de thrombose et avant le début d'un traitement anticoagulant.
- Il est recommandé en cas d'anomalie identifiée sur un premier bilan, de réaliser un contrôle à distance (après au moins 3 mois). Pour les anomalies plasmatiques, le contrôle doit être organisé en tenant compte du contexte clinique (causes d'anomalies acquises) et des traitements anticoagulants.
- 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.

Bilan de thrombophilie

NOM – PRÉNOM du patient :

Date de naissance :

Poids :

Taille :

Groupe sanguin :

NOM du médecin prescripteur :

SERVICE :

- **Traitement au moment du bilan de thrombose (y compris hormones) :**

.....

ÉVÉNEMENTS THROMBOEMBOLIQUES

1^{er} épisode TVP / EP / TVS / T Artérielle (date) :

.....

- **Localisation, moyens diagnostiques :**

.....

- **Situations cliniques favorisantes :**

OUI

NON

NR*

IMC > 30 kg/m²

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 œstroprogestatif

Traitement hormonal substitutif avec œstrogène par voie orale

Voyage > 4 h avion, car, voiture, train**

* NR : non renseigné

** d'après Cannegieter *et al.*, *PLOS Medicine* 2006

Anticoagulation préventive durant ces situations : molécule, dose et durée

.....

Autres situations cliniques

.....

- **Prise en charge thérapeutique :**

.....

- **Autres événements** (nombre et date) : fausse couche spontanée précoce (< 10 semaines de gestation) ; tardive (≥ 10 semaines de gestation) ; éclampsie ; pré-éclampsie ; RCIU

.....

Autres épisodes

Pour chaque épisode de TVP/EP : indiquer la date, la localisation, les éventuels facteurs de risque, la prise en charge (avec la durée du traitement)

.....

Antécédents familiaux de MTEV : joindre un arbre généalogique

- **Description** pour chaque membre : thromboses veineuses ou artérielles, dates des événements, degré de parenté, localisation, situations à risque au moment de l'événement, bilan étiologique réalisé et résultats, prise en charge

.....

Bilan biologique de thrombose

- **Dates et résultats des bilans déjà réalisés :**

.....

.....

RÉFÉRENCES

- Adcock DM, Hoefner DM, Kottke-Marchant K, Marlara RA, Szemosi DI, Warunek DJ. Collection, transport and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guidelines. CLSI document H21-A5, PA Wayne and CLS institute Editors, 2008.
- Ledford-Kraemer MR, Moore GW, Boltenus R, Castellone DD, Daniele C, De Groot PG, et al. Laboratory testing for the lupus anticoagulant, approved guidelines. CLSI document H60-A, PA Wayne and CLS institute Editors, 2014.
- Pengo V, Tripodi A, Reber A, Rand JH, Ortel TJ, Galli M, et al. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. *J Thromb Haemost* 2009 ; 7 : 1737-40.
- Favaro EJ. Preanalytical variables in coagulation testing. *Blood Coag Fibrinol* 2007 ; 18 : 86-9.
- Trondsetas L, Mikkelsen G, Alsos Lain I. The effects of dry ice exposure on plasma pH and coagulation analysis. *Clin Chem Lab Med* 2017 ; 27 : 59-64.
- Lima-Oliveira G, Adcock DM, Salvagno GL, Favaro EJ, Lippi G. Mixing of thawed coagulation samples prior to testing: Is any technique better than another? *Clin Biochem* 2016 ; 49 : 1399-401.
- Corral J, de la Morena-Barrio ME, Vicente V. The genetics of antithrombin. *Thromb Res* 2018 ; 169 : 23-9.
- Middledorp S. Is thrombophilia testing useful? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011 ; 2011 : 150-5.
- Di MinnoMN, Ambrosino P, Ageno W, Rosendaal F, Di Minno G, Dentali F. Natural anticoagulants deficiency and the risk of venous thrombosis: a meta-analysis of observational studies. *Thromb Res* 2015 ; 135 : 923-32.
- Alhenc-Gelas M, Plu-Bureau G, Hugon-Rodin J, Picard V, Horellou MH. GFHT study group. Thrombotic risk according to *SERPINC1* genotype in a large cohort of subjects with antithrombin inherited deficiency. *Thromb Haemost* 2017 ; 117 : 1040-51.
- 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.
- Navarro-Fernandez J, de la Morena-Barrio ME, Padilla J, Bohdan N, Aguila S, Martinez-Martinez I, 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.
- Gindele R, Olah Z, Ilonczai P, Speker M, Udvari A, Selemeczi 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.
- Dahlback B. Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders. *Blood* 2008 ; 112 : 199-207.
- Tait RC, Walker ID, Retisma PH, Islam SIAM, McCall F, Poort SR, et al. Prevalence of Protein C deficiency in the healthy population. *Thromb Haemost* 1995 ; 73 : 87-93.
- Pomp ER, Doggen CJ, Vos HL, Reitsma PH, Rosendaal FR. Polymorphisms in the protein C gene as risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost* 2009 ; 101 : 62-7.
- Linssen M, Mohamed M, Wevers RA, Lefeber DJ, Morava E. Thrombotic complications in patients with PMM2-CDG. *Mol Genet Metab* 2013 ; 109 : 107-11.
- Alhenc-Gelas M, Plu-Bureau G, Mauge L, Gandrille S, Presot 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.
- Allaart C, Allaart CF, Poort SR, Reitsma PH, Bertina RM, Briët E. Increased risk of venous thrombosis in carriers of hereditary protein C deficiency. *Lancet* 1993 ; 341 : 134-8.

20. 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 ; 25 : 2428-34.
21. 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 USA* 2006 ; 103 : 3106-11.
22. 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.
23. Ten Kate MK, Van der Meer J. Protein S deficiency: a clinical perspective. *Haemophilia* 2008 ; 14 : 1222-8.
24. Schwarz HP, Fischer M, Hopmeier P, Batard MA, Griffin JH. Plasma protein S deficiency in familial thrombotic disease. *Blood* 1984 ; 64 : 1297-300.
25. Lijfering WM, Mulder R, ten Kate MK, Veeger NJ, 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.
26. 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.
27. Simmonds RE, Ireland H, Lane DA, Zöller B, Garcia de Frutos P, Dahlbäck B. Clarification of the risk of 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.
28. Zöller B, Garcia 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. Merz M, Bohm-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.
35. Gindele R, Selmezi A, Olah Z, Ilonczai P, Pflieger G, Marjan E, et al. Clinical and laboratory characteristics of antithrombin deficiencies: a large cohort study from a single center. *Thromb Res* 2017 ; 160 : 119-28.
36. Javela K, Engelbart S, Hitunen L, Muestonen P, Puurunen M. Great discrepancy in antithrombin activity measured using five commercially available functional assays. *Thromb Res* 2013 ; 11 : 1844-9.
37. Corral J, Vicente V. Puzzling questions on antithrombin. Diagnostic limitations and real incidence in venous and arterial thrombosis. *Thromb Res* 2015 ; 135 : 1047-8.
38. Lowe GDO, 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 : 785-97.
39. James AH, Rhee E, Thames B, Philipp CS. Characterization of antithrombin levels in pregnancy. *Thromb Res* 2014 ; 134 : 648-51.
40. Szecsi PB, Jorgensen M, Klajnbard A, Andersen MR, Colov NP, Stender S. Haemostatic reference intervals in pregnancy. *Thromb Haemost* 2010 ; 103 : 718-27.
41. Finley A, Greenberg C. Heparin Sensitivity and Resistance: Management during cardiopulmonary bypass. *Anesth Analg* 2013 ; 116 : 1210-22.
42. Esper SA J, 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.
43. Wei Z, Liang T, Xiao-Rong J, Yi-Qing L, Tao G, Qing-Yun W, et al. Genetic analysis should be included in clinical practice when screening for antithrombin deficiency. *Thromb Haemost* 2015 ; 113 : 262-71.
44. Van Cott EM, Orlando C, Moore GW, Cooper PC, Meijer P, Marlar R for the Subcommittee on Plasma Coagulation Inhibitors. Recommendations for clinical laboratory testing for antithrombin deficiency; communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2020 ; 18 : 17-22.
45. Cooper PC, Siddiq S, Morse C, Nightingale J, Mumford AD. Marked discrepancy between coagulometric protein C activity assays with the prothrombotic protein C Asn21Ile substitution. *Int Jnl Lab Hem* 2011 ; 33 : 451-6.
46. Cooper PC, Pavlova A, Moore GW, Hickey K, 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.
47. Douxfils J, Ageno W, Samama CM, Lessire S, Ten Cate H, Verhamme P, et al. Laboratory testing in patients treated with oral anticoagulants: a practical guide for clinicians. *J Thromb Haemost* 2017 ; 15 : 1-11.
48. Andrew M, Vegh P, Johnston M, Bowker J, Ofosu F, Mitchell L. Maturation of the hemostatic system during childhood. *Blood* 1992 ; 80 : 1998-2005.
49. Said JM, Ignjatovic V, Monagle PT, Walker SP, Higgins JR, Brennecke SP. Altered reference ranges for protein C and protein S deficiency during pregnancy. *Thromb Haemost* 2010 ; 103 : 984-8.
50. Faioni E, 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.
51. 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.
52. Dykes AC, Walker ID, McMahon AD, Islam SI, Tait RC. A study of PS antigen levels in 3788 healthy volunteers: influence of age, sex and hormone use, and estimate for prevalence of deficiency state. *Brit J Haematol* 2001 ; 113 : 636-41.
53. Szecsi PB, Jorgensen M, Klajnbard A, Andersen MR, Colov NP, Srtender S. Haemostatic reference intervals in pregnancy. *Thromb Haemost* 2010 ; 103 : 718-27.
54. Garcia de Frutos P, Alim RI, Härdig Y, Zöller B, Dahlbäck B. Differential regulation of alpha and beta chains of c4bBP during acute phase response resulting in stable plasma levels of free anticoagulant protein S. *Blood* 1994 ; 84 : 815-22.

55. Criado Garcia 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.
56. Meijer P, Kluft C, Haverjate D, De Maat MP. The long-term within and between-laboratory variability for assay of antithrombin, and proteins C and S: results derived from the external quality assessment program for thrombophilia screening of the ECAT Foundation. *J Thromb Haemost* 2003 ; 1 : 748-53.
57. Cunningham MT, Olson JD, Wayne LC, Van Cott EM, Elby CS, Teruya J, et al. External quality assurance of antithrombin, protein C and protein S assays. *Arch Pathol Lab Med* 2011 ; 135 : 227-32.
58. Tripodi A. Issues concerning the laboratory investigation of inherited thrombophilia. *Mol Diagn* 2005, 9 : 181-6.
59. Smock KJ, Plumhoff EA, Meijer P, Hsu P, Zantek ND, Heikal NM, et al. Protein S testing in patients with protein S deficiency, factor V Leiden, and rivaroxaban by North American Specialized Coagulation Laboratories. *Thromb Haemost* 2016 ; 116 : 50-7.
60. Middeldorp S, van Hylckama Vlieg A. Does thrombophilia testing help in the clinical management of patients? *Brit J Haematol* 2008 ; 143 : 321-35.
61. Mamotte CD. Genotyping of single nucleotide substitutions. *Clin Biochem Rev* 2006 ; 27 : 63-75.
62. Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J. Real-time PCR detection chemistry. *Clin Chim Acta* 2015 ; 439 : 231-50.
63. Didenko VV. DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. *Biotechniques* 2001 ; 31 : 1106-16.
64. Nauck M, März W, Wieland H. Evaluation of the Roche diagnostics Light-Cycler-Factor V Leiden Mutation Detection Kit and the LightCycler-Prothrombin Mutation Detection Kit. *Clin Biochem* 2000 ; 33 : 213-6.
65. 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.
66. Gessoni G, Valverde S, Canistro R, Marangon F, Manoni F. Field evaluation of the GeneXpert system for detection of thrombophilia associated mutations: a six-month experience in a small laboratory. *Biochimica Clin* 2012 ; 36 : 20-4.
67. Marturano A, Bury L, Gresele 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.
68. 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* 2012 ; 10 : 228-9.
69. 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.
70. 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.
71. Évaluation HAS : intérêt de la recherche des mutations FV Leiden et FII 20210G>A - Septembre 2006. *Sang Thrombose Vaisseaux* 2007 ; 19 : 191-4.
72. Dunn TB, Linden MA, Vercellotti GM, Gruessner RWG. Factor V Leiden and hepatic artery thrombosis after liver transplantation. *Clin Transplant* 2006 ; 20 : 132-5.
73. Leroy-Matheron C, Duvoux C, Van Nhieu JT, Lery 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.
74. Dahlback 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 USA* 1993 ; 90 : 1004-8.
75. Kadauke S, Khor B, Van Cott EM. Activated protein C resistance testing for factor V Leiden. *Am J Hematol* 2014 ; 89 : 1147-50.
76. Casini A, Neerman-Arbez M, Ariens RA, De Moerlose P. Dysfibrinogenemia: from molecular anomalies to clinical manifestations and management. *J Thromb Haemost* 2015 ; 13 : 909-19.
77. Casini A, Bruns T, Lavenu-Bombled C, Vilar R, Neerman-Arbez M, De Moerlose 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.
78. Casini A, Undas A, Palla R, Thachil J, de Moerlose P for the 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.
79. Fish R, Neerman-Arbez M. Fibrinogen gene regulation. *Thromb Haemost* 2012 ; 108 : 419-26.
80. Hanss M, Biot F. A database for human fibrinogen variants. *Ann N Y Acad Sci* 2001 ; 936 : 89-90.
81. Soria J, Soria C, Caen J. A new type of congenital dysfibrinogenemia with defective fibrin lysis-Dusard syndrome: possible relation to thrombosis. *Br J Haematol* 1983 ; 53 : 575-86.
82. Collet JP, Soria J, Mirshahi M, Hirsch M, Dagonnet F, Caen J, et al. Dusard 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.
83. Cunningham MT, Brandt JT, Laposata M, Olson JD. Laboratory diagnosis of dysfibrinogenemia. *Arch Pathol Lab Med* 2002 ; 126 : 499-505.
84. Lebreton A, Casini A. Diagnostic des anomalies congénitales du fibrinogène. *Ann Biol Clin* 2016 ; 74 : 405-12.
85. Myiakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006 ; 4 : 295-306.
86. Garcia D, Erkan D. Diagnostic and management of the antiphospholipid syndrome. *New Engl J Med* 2018 ; 378 : 2010-21.
87. De Groot P, de Laat B. Mechanisms of thrombosis in systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2017 ; 31 : 334-41.
88. Devreese KMJ, Ortel TL, Pengo V, de Laat B. Laboratory criteria for antiphospholipid syndrome: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2018 ; 16 : 809-13.
89. 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 : 1-10.
90. Tonello M, Mattia E, Favaro M, Del Ross T, Calligaro A, Salvan E, et al. Ig G phosphatidyl serine/ prothrombin antibodies as a risk factor of thrombosis in antiphospholipid antibody carriers. *Thromb Res* 2019 ; 177 : 157-60.
91. Yin D, De Laat B, Devreese KMJ, Kelchtermans H. The clinical value of assays detecting antibodies against domain I of β 2GPI in the antiphospholipid syndrome. *Autoimmun Rev* 2018 ; 17 : 1210-8.
92. Chayoua W, Kelchtermans H, Moore GW, Musial J, Wahl D, De Laat B, et al. Identification of high thrombotic risk triple-positif antiphospholipid syndrome patients is dependent on anti-cardiolipin and anti β 2glycoprotein I antibody detection assays. *J Thromb Haemost* 2018 ; 16 : 2016-23.

93. Chaouya W, Keltchermans H, Gris JC, Moore GW, Musia J, Wahl D, et al. The (non-sense) of detecting anti-cardiolipin and anti β 2GPI IgM antibodies in the antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 2020 ; 18 : 169-79.
94. Tektonidou MG, Andreoli L, Limer 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.
95. Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer 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.
96. Devreese KM. No more mixing tests required for integrated assay systems in the laboratory diagnosis of lupus anticoagulants? *J Thromb Haemost* 2010 ; 8 : 1120-2.
97. Favarolo 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.
98. Devreese KMJ. Antiphospholipid antibody testing and standardization. *Int Jnl Lab Hem* 2014 ; 36 : 352-63.
99. Schouwers SM, Delaghe JR, Devreese KM. Lupus anticoagulant (LAC) testing in patients with inflammatory status : does C-reactive protein interfere with LAC results? *Thromb Res* 2010 ; 125 : 102-4.
100. Triplett DA. Use of the diluted Russel viper venom time (dRVVT); its importance and pitfalls. *J Autoimmun* 2000 ; 15 : 173-8.
101. 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.
102. Tripodi A, Chantarangkul, Cin 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.
103. Cohen H, Mackie IJ, Devreese KMJ, International Society for Thrombosis and Haemostasis Scientific Standardization Committee for Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibodies. Clinical and laboratory practice for lupus anticoagulant testing: an International Society of Thrombosis and Haemostasis Scientific Standardization Committee survey. *J Thromb Haemost* 2019 ; 10 : 1715-32.
104. 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.
105. Moore GW. Commonalities and contrasts in recent guidelines for lupus anticoagulant detection. *Int Jnl Lab Hem* 2014 ; 36 : 364-73.
106. Favarolo 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.
107. 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 in emergency situations? *Chest* 2018 ; 153 : 288-90.
108. 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 Haemost* 2019 ; 25 : 1-6.
109. Flanders M, Crist R, Rodgers GM. Comparison of five thrombin time reagents. *Clin Chem* 2003 ; 49 : 169-72.
110. 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 ISH. *J Thromb Haemost* 2014 ; 12 : 792-5.
111. Devreese KM, Poncet J, 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.
112. Thachil J, Lippi G, Favaloro EJ. D-Dimer testing: laboratory aspects and current issues. *Methods Mol Biol* 2017 ; 1646 : 91-104.
113. Adam SS, Key NS, Greenberg CS. D-dimer antigen: current concepts and future prospects. *Blood* 2009 ; 113 : 2878-87.
114. 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.
115. 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.
116. 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.
117. Tosetto 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.
118. Eichinger S, Heinze G, Jandek 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.
119. Palareti G, Cosmi B, Legnani C, Tosetto 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.
120. 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.
121. 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.
122. Tait RC, Lowe G, McColl M. Predicting risk of recurrent venous thrombosis using a 5-point scoring system including fibrin D-dimer. *J Thromb Haemost* 2005 (Suppl 2) : OM 260.
123. 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.
124. 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.
125. 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.

126. Tosetto 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.
127. 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.
128. 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.
129. 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.
130. 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.
131. 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.
132. Van Ommen CH, Nowak-Göttl U. Inherited thrombophilia in pediatric venous thromboembolic disease: why and who to test. *Front Pediatr* 2017 ; 5 : 50.
133. Haley KM. Neonatal venous thromboembolism. *Front Pediatr* 2017 ; 5 : 136.
134. Saliba E, Debillon T, Recommandations accident vasculaire cérébral (AVC) néonatal, Auvin S, Baud O, Biran V, et al. Accidents vasculaires cérébraux ischémiques artériels néonataux : synthèse des recommandations. *Arch Pédiatrie* 2017 ; 24 : 180-8.
135. Levine M. Postinfectious purpura fulminans caused by an autoantibody directed against protein S. *J Pediatr* 1995 ; 127 : 355-63.
136. 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.
137. 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.
138. Andrew M, Vegh P, Johnston M, Bowker J, Ofosu F, Mitchell L. Maturation of the hemostatic system during childhood. *Blood* 1992 ; 80 : 1998-2005.
139. 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.
140. 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.
141. 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.