

Dosage de l'activité du facteur Willebrand : comparaison de la méthode de référence manuelle à deux techniques automatisées

Thomas Martin

▶ **To cite this version:**

Thomas Martin. Dosage de l'activité du facteur Willebrand : comparaison de la méthode de référence manuelle à deux techniques automatisées. Médecine humaine et pathologie. 2016. dumas-01475098

HAL Id: dumas-01475098

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01475098

Submitted on 23 Feb 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE PICARDIE JULES VERNE

U.F.R. DE MEDECINE D'AMIENS

ANNEE 2016

Thèse 2016 - 155

MEMOIRE POUR LE

DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE

THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Dosage de l'Activité du facteur Willebrand : Comparaison de la méthode de référence manuelle à deux techniques automatisées

Présentée et soutenue publiquement

le vendredi 14 octobre 2016

par Monsieur Thomas MARTIN

né le 21 octobre 1986 à Jonzac (17)

Président du jury: Monsieur le Professeur Loïc GARCON

Membres du jury: Monsieur le Professeur Henri SEVESTRE

Monsieur le Professeur Saïd KAMEL

Directrice de thèse: Madame le Docteur Annelise VOYER

AVERTISSEMENT

La Faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses : celles-ci sont propres à leurs auteurs.

REMERCIEMENTS

A mon président de jury:

Monsieur le Professeur Loïc GARCON

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

(Hématologie – Transfusion)

Chef de service du laboratoire d'hématologie du CHU d'Amiens

Vous me faîtes l'honneur d'accepter la Présidence de cette thèse,

Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon plus profond respect.

A mon jury:

Monsieur le Professeur Henri SEVESTRE

Professeur d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques à l'UFR de Médecine d'Amiens

Chef du Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHU d'Amiens Picardie

Adjoint au chef de l'Oncopôle

Vous m'avez fait l'honneur de siéger parmi les membres du jury,

Soyez assuré de toute ma considération

A mon jury:

Monsieur le Professeur Saïd KAMEL

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Pharmacie

Vous avez accepté d'être membre de mon jury,

Veuillez accepter l'expression de ma gratitude.

A ma directrice de thèse:

Madame le Docteur Annelise VOYER

Praticien Hospitalier

Médecin responsable du Centre de Traitement des Hémophiles Adultes

Je te remercie pour ta disponibilité, ta confiance
et ta rigueur dans la supervision de ma thèse.
Je tiens à t'exprimer toute ma gratitude pour les conseils
avisés et les nombreuses heures passées à me relire.

Aux techniciennes d'hémostase spécialisées:

Merci pour votre patience et votre aide précieuse tout au long de cette thèse. Ce travail n'aurait pas pu voir le jour sans votre participation et votre grande disponibilité.

Au service d'hématologie:

Merci pour l'enseignement reçu lors de mes stages, votre rigueur et votre compétence.

A ma famille:

Avec toute mon affection

A mes parents et à mes frères:

Merci pour votre soutien tout au long de ces années.

A Philippine :

Merci pour ces jolis moments partagés, et ceux à venir.

A mes amis:

Pour tous ces bons moments passés en votre compagnie.

A mes co-internes:

Merci pour ces années passées à vos côtés.

ABREVIATIONS

ADAMTS-13	A Disintegrin And Metalloprotease with ThromboSpondin motifs - 13
ADP	Adénosine DiPhosphate
CK	Cystein Knot
DDAVP	1-deamino-8-D-arginine vasopressin
DO	Densité Optique
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EPI	Epinéphrine
FVIII:C	Mesure de l'activité coagulante du facteur VIII
GP	Glycoprotéine
GPIb	Glycoprotéine Ib
kb	kilobases
kDa	kiloDaltons
LD-RIPA	Low Dose RIPA
LIA	Latex ImmunoAssay
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PFA	Platelet Function Analyzer
PPP	Plasma Pauvre en Plaquettes
preproVWF	Peptide signal + VWFpp + VWF mature
proVWF	VWFpp + VWF mature
PRP	Plasma Riche en Plaquettes
RE	Réticulum Endoplasmique
RIPA	Ristocetin-Induced Platelet Aggregation
SIL	Système Informatique de gestion du Laboratoire
TCA	Temps de Céphaline Activée
TP	Taux de Prothrombine
TS	Temps de saignement
VWD	Maladie de Willebrand
VWF	von Willebrand Factor

VWF:Ac	Activité du facteur VWF
VWF:Ag	Antigène von Willebrand Factor
VWF:CB	Etude de la liaison du VWF au collagène
VWF:FVIII	Etude de la liaison du VWF au facteur VIII
VWF:RCo	Activité cofacteur de la ristocétine
VWFpp	VWF propeptide
WPB	Weibel-Palade Bodies

Sommaire

INTRODUCTION 14

1. Erik Adolph von Willebrand 14

2. Le facteur von Willebrand 15

2.1. Génétique 15

2.2. Synthèse et maturation 16

2.3. Stockage intracellulaire et sécrétion 18

2.4. Fonctions 19

2.5. Clearance et protéolyse 21

2.6. Facteurs influençant le taux de VWF 22

3. Diagnostic de la maladie de Willebrand 23

3.1. Clinique 23

3.2. Classification 25

3.4. Exploration biologique de la maladie de Willebrand 26

OBJECTIFS DE L'ETUDE 33

MATERIELS ET METHODES 34

1. Matériels 34

1.1. Automate STA-R Evolution 34

1.2. Plasmas 34

1.3. Coffret Siemens VWF REAGENT 35

1.4. Coffret ABP VWF Ricof Assay 36

1.5. Coffret Siemens Innovance Ac 39

2. Méthodes 41

2.1. Réalisation des analyses 41

2.2. Analyse statistique 42

RESULTATS 43

DISCUSSION 48
1. Analyse statistique 48
2. Analyse des résultats hors analyse principale 49
3. Evaluation de chaque technique de dosage 49
3.1. Technique manuelle (coffret Siemens VWF Reagent) 49
3.2. Technique automatisée VWF:RCo ABP Stago 49
3.3. Technique automatisée Siemens INNOVANCE VWF:Ac 50
4. Assurance Qualité 51
5. Transmission informatique au SIL 51
6. Limites 52
CONCLUSION 53
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 54
ANNEXES 59
RESUME 66

INTRODUCTION

La maladie de Willebrand est la plus fréquente des maladies hémorragiques héréditaires, affectant environ 1% de la population générale(1,2) et de façon égale les individus des deux sexes. Environ 100 personnes par million d'habitants sont symptomatiques(3). Elle a pour origine un déficit quantitatif (partiel ou total) ou qualitatif du facteur von Willebrand VWF. Son diagnostic repose sur le dosage antigénique et de l'activité du VWF.

Au CHU d'Amiens, le laboratoire d'hémostase spécialisée réalise chaque année entre 400 et 500 dosages de l'antigène VWF et entre 150 et 300 dosages de l'activité cofacteur de la ristocétine VWF:RCo. L'évolution du nombre de dosages VWF:Ag et VWF:RCo est détaillé dans le Tableau 1.

	2010	2011	2012	2013	2014	2015	Moyenne
VWF:Ag	721	670	503	441	373	461	528
VWF:RCo	226	149	209	243	188	257	212

Tableau 1 Evolution du nombre de dosages réalisés pour VWF:Ag et VWF:RCo

Le dosage de l'activité cofacteur de la ristocétine, méthode historique et aujourd'hui encore méthode de référence, présente des difficultés de réalisation. La mise sur le marché d'un nouveau coffret de réactifs permettant de mesurer l'activité du VWF de façon automatisée a été à l'origine de ce travail de comparaison de méthodes de dosage. Du fait de la polyvalence des techniciens en période de permanence des soins, ce travail devait s'intéresser, en plus de l'évaluation des performances globales des méthodes, à des points plus pragmatiques comme la facilité de réalisation technique et la compatibilité avec la notion d'urgence de rendu du résultat.

1. Erik Adolph von Willebrand

La maladie de Willebrand est décrite pour la première fois dans un article de 1926 du Docteur Erik Adolph von Willebrand, médecin finlandais, sous les termes de

"pseudohémophilie héréditaire"(4). Il y décrit précisément les troubles hémorragiques présentés par certains membres de plusieurs familles de l'archipel des Åland, dans le Golf de Botnie qui sépare la Suède de la Finlande. Trois familles sont détaillées sur le plan de la généalogie (voir Figure 1), de la fréquence, de la sévérité et des circonstances de survenue des manifestations hémorragiques. Sur les 66 membres étudiés, 23 présentent des signes hémorragiques : 16 femmes et 7 hommes.

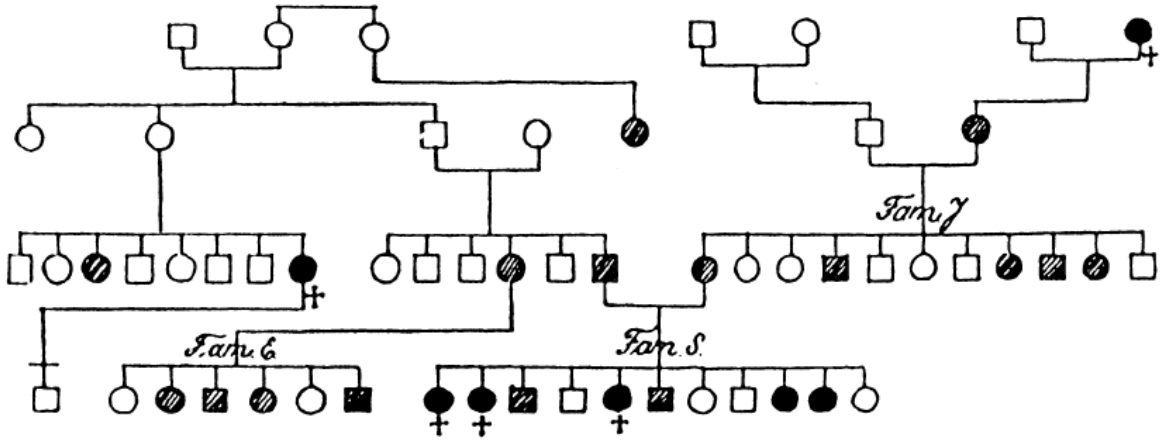


Figure 1 Arbre généalogique des trois familles des Aland étudiées par von Willebrand(4)

Les manifestations hémorragiques y sont principalement cutanées et muqueuses (épistaxis, gingivorragies, ecchymoses, ménorragies) et rarement articulaires. L'hérédité semble s'opérer selon une transmission autosomique. Selon la clinique et les tests biologiques réalisés à cette période, montrant notamment un allongement du temps de saignement et des temps de coagulation normaux, Von Willebrand distingue cette pathologie hémorragique de l'hémophilie A, de la thrombasténie de Glanzmann et du purpura thrombocytopénique.

2. Le facteur von Willebrand

2.1. Génétique

Le gène du VWF est situé sur le bras court du chromosome 12 à l'emplacement 12p13.2. Il contient 52 exons et s’étend sur 180 kb. Il code pour un polypeptide (preproVWF) de 2813 acides aminés (aa) qui se compose d’un peptide signal de 22 aa, un propeptide de 741 aa et la sous-unité mature de 2050 aa(5).

2.2. Synthèse et maturation

La synthèse du VWF a lieu spécifiquement dans les cellules endothéliales(6) et les mégacaryocytes(7). Le peptide signal permet la translocation de la protéine dans le réticulum endoplasmique (RE) puis est clivé par une signal peptidase. La structure de la protéine est alors constituée de la répétition de 5 types de domaines (A, B, C, D, CK), arrangés dans la séquence suivante : D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-B3-C1-C2-CK (cf. Figure 2).

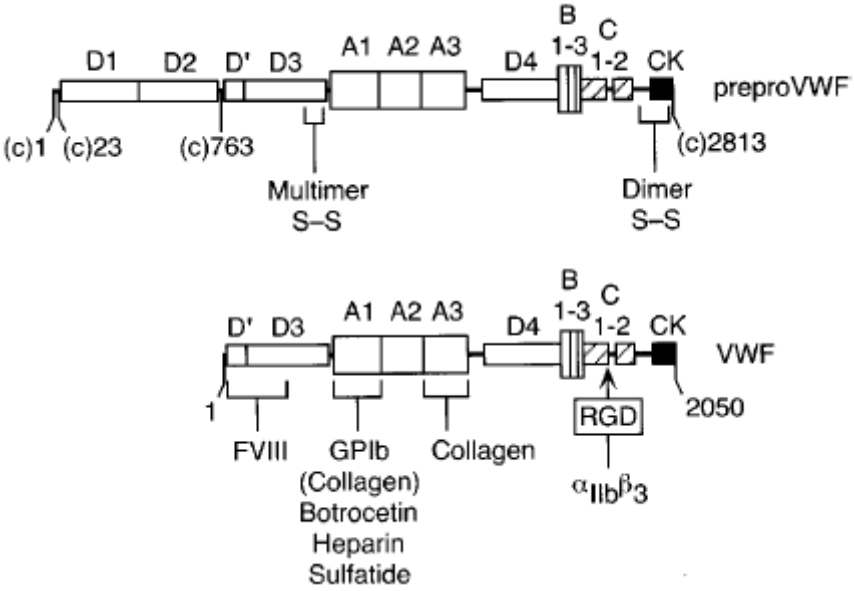


Figure 2 Représentation des domaines du preproVWF et VWF. D'après Sadler(5)

Après translocation dans le RE, les sous-unités proVWF subissent une N-glycosylation avant de se dimériser à leur extrémité C-terminale via des ponts disulfures (liaisons S-S) dans le domaine CK. Le dimère, d'une taille de 540 kDa, est également appelé protomère et est donc formé de deux monomères d'environ 250kDa. Certains oligosaccharides N-liés et O-liés au VWF appartiennent au système ABO des groupes sanguins (A, B et H)(8). Une forme intermédiaire transitoire présente des liaisons disulfures entre le propeptide VWFpp (domaines D1 et D2) et le VWF d'une même sous-unité (cf. Figure 3).

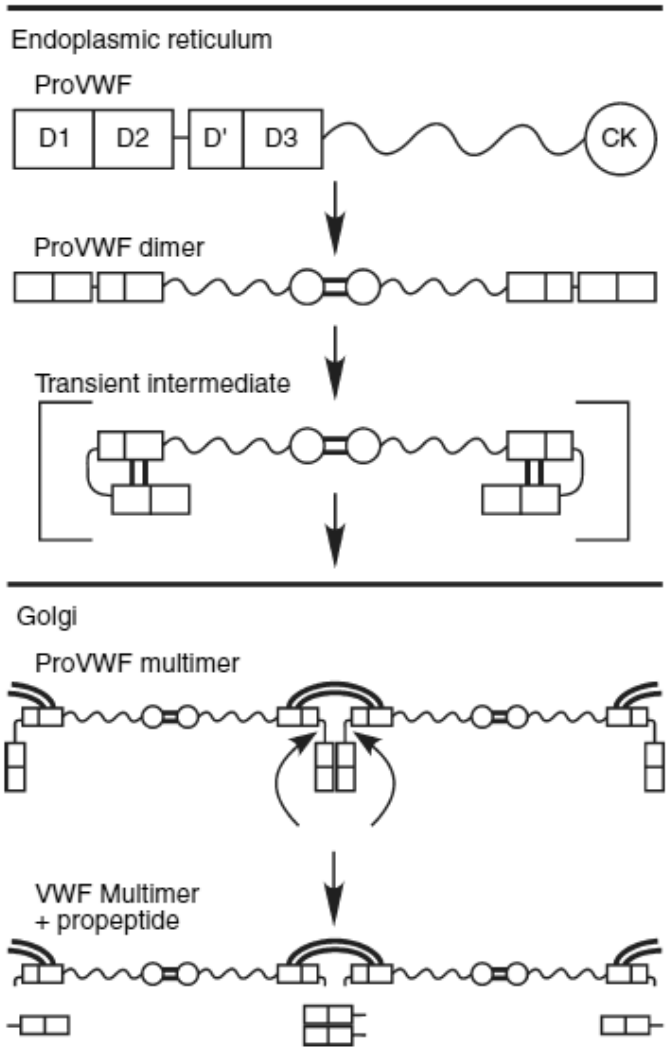


Figure 3 Modifications post-traductionnelles et multimérisation du VWF. D'après Sadler(9)

Les dimères tail-to-tail N-glycosylés sont transportés dans l'appareil de Golgi où vont à nouveau se dérouler des modifications post-traductionnelles, notamment des étapes de N-glycosylation, O-glycosylation et sulfonation (cf. Figure 4). La forme transitoire précédemment formée permet la formation des multimères head-to-head créés par des ponts disulfures au niveau de l'extrémité N-terminale entre deux dimères différents. Une fois l'assemblage head-to-head réalisé, le VWFpp est clivé mais reste lié de façon non covalente au VWF.

Le VWF est donc une glycoprotéine multimérique de poids moléculaire variable et on retrouve dans le plasma un éventail de tailles différentes correspondant à un nombre variable de dimères : la plus petite unité circulante est le dimère (assemblage de deux sous-unités matures) et les multimères les plus grands contiennent jusque 40 dimères pour un poids

moléculaire pouvant atteindre 20 000 kDa. L'état de multimérisation du VWF module son affinité pour les plaquettes(10), sa capacité à lier les plaquettes étant croissante avec le nombre de multimères qu'il comporte.

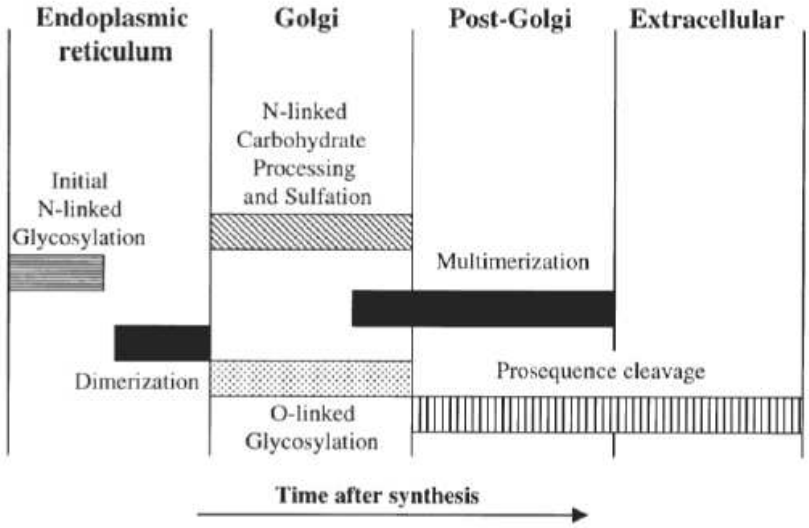


Figure 4 Modifications post-traductionnelle du VWF - D'après Wagner(11)

2.3. Stockage intracellulaire et sécrétion

2.3.1. Stockage intracellulaire

Après synthèse, le VWF est stocké en intracellulaire au niveau des cellules endothéliales et des mégacaryocytes dans des organelles spécifiques. L'organelle retrouvée dans la cellule endothéliale est appelée Corps de Weibel-Palade (Weibel-Palade Bodies, WPB) et n'existe qu'en présence de VWF. Elle présente une forme allongée, de 100 à 300nm de large(12) et jusqu'à 4 µm de longueur(13) et est formée par les multimères de VWF arrangés en structures tubulaires parallèlement alignées (voir Figure 5). L'organelle permettant le stockage intracellulaire au sein des mégacaryocytes/plaquettes est la granule α. Elle mesure entre 200 et 500nm et chaque plaquette en contient de 40 à 80(14). Contrairement aux WPB, les granules α peuvent exister même en l'absence de VWF.

2.3.2. Sécrétion

Il existe deux modes de sécrétion du VWF: une voie constitutive non régulée et une voie régulée.

A. Voie constitutive

La voie constitutive concerne la grande majorité du VWF sécrété. C'est un processus continu, ne nécessitant pas de stimulation cellulaire. et provient de la fusion isolée d'un WBP avec la membrane plasmique de la cellule(15).

B. Voie régulée

La voie régulée est médiée par des agonistes tels que la thrombine(16), l'histamine, les médiateurs de l'inflammation, le DDAVP(17). Elle entraîne la fusion d'un nombre important de WBP et donc une sortie massive de multimères de VWF hors de la cellule endothéliale.

Dans le cas des mégacaryocytes/plaquettes, aucune sécrétion constitutive n'est observée(18) et seule la voie régulée existe. Les plaquettes sécrètent leurs granules α après activation(19), i.e. après liaison du VWF au GPIb plaquettaire.

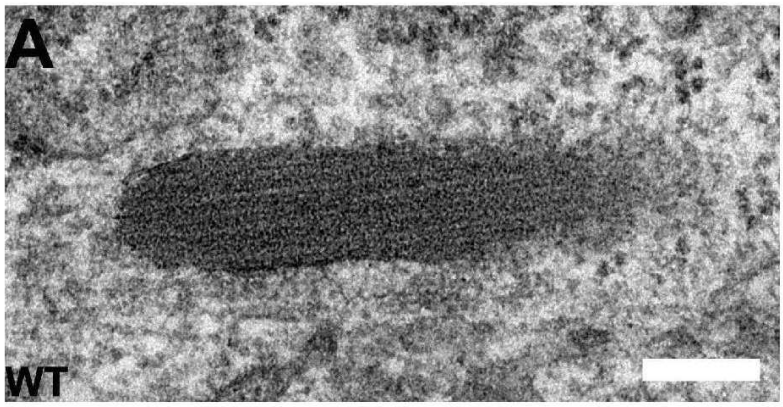


Figure 5 Corps de Weibel-Palade - D'après Jiong-Wei Wang(20)

2.4. Fonctions

Chaque sous-unité du VWF possède les domaines fonctionnels suivants (cf. Figure 6): un domaine de liaison au facteur VIII, un domaine de liaison à la GPIb plaquettaire, un domaine de clivage par l'ADAMTS13, un domaine de liaison au collagène, un domaine de liaison à la GPIIb-IIIa plaquettaire.

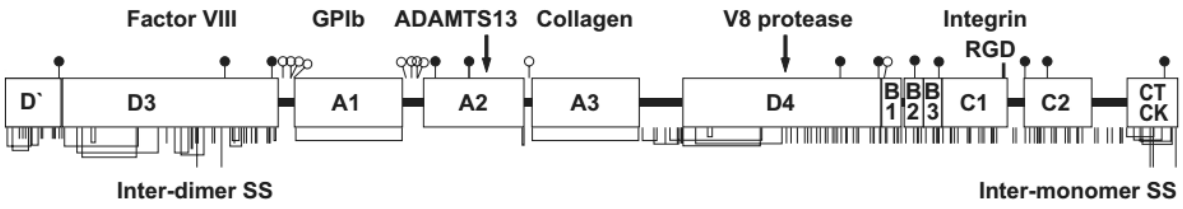


Figure 6 Sous-unité mature de VWF - D'après Zhou(21)

Ces domaines permettent au VWF de jouer deux rôles fondamentaux, à la fois dans l'hémostase primaire et dans l'hémostase secondaire.

A. Hémostase primaire

La première fonction majeure du VWF est de lier les plaquettes au collagène du sous-endothélium. A l'état quiescent, i. e. en l'absence de lésion de l'endothélium vasculaire, le VWF n'interagit pas avec les plaquettes. Une fois les fibres de collagène du sous-endothélium exposées suite à une lésion de l'endothélium vasculaire, le VWF vient lier le collagène au niveau de son domaine A3. Fixé au sous-endothélium et contraint par les conditions hémorhéologiques, le VWF voit sa conformation changer (cf. Figure 7). Il passe ainsi d'une forme globulaire à une forme longiligne en rapport avec l'intensité de la force de cisaillement(22). La liaison entre le récepteur GPIb des plaquettes circulantes et le domaine A1 du VWF devient alors possible, ce qui permet l'adhésion plaquettaire (liaison entre une plaquette et un élément autre qu'une plaquette)(23). Cette liaison entre VWF et GPIb plaquettaire initie également le processus d'activation plaquettaire(24), permettant la sécrétion des granules α et granules denses ainsi que l'activation des récepteurs GPIIb-IIIa(25) présents en surface de la plaquette.

Le récepteur GPIIb-IIIa des plaquettes activées est capable de lier le fibrinogène et le VWF avec une grande affinité(26). Il existe une compétition entre le VWF et le fibrinogène pour la liaison à ce récepteur, l'ensemble participant à la formation du clou plaquettaire via le processus d'agrégation plaquettaire (liaison de plaquette à plaquette).

B. Hémostase secondaire

Le VWF joue également un rôle dans la stabilisation du FVIII auquel il se lie de façon non covalente au niveau des domaines D'D3 (dans les 272 premiers acides aminés de la molécule mature(27), i.e. 764-1035 du preproVWF). Chaque sous-unité du VWF est capable de lier une unité de facteur VIII mais ce dernier étant inférieur en nombre, la stœchiométrie n'est pas respectée et on retrouve un ratio d'environ 1:50(28) dans le sang. Sous sa forme liée au VWF, le facteur VIII est protégé de la dégradation protéolytique réalisée par la protéine C activée(29) et le facteur Xa, lui permettant une demi-vie d'environ 12 heures(30). Cette demi-

vie est drastiquement réduite à 2,4 heures chez les patients présentant un VWD sévère. La thrombine a une action de clivage sur le facteur VIII, permettant à la fois de le libérer de son lien avec le VWF et de le changer en sa forme activée.

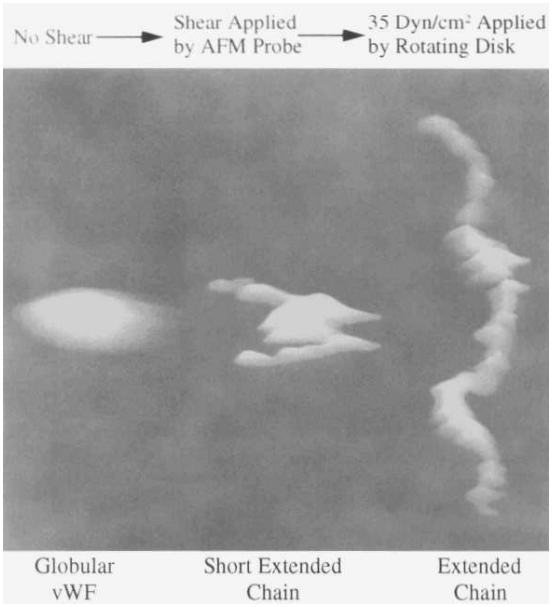


Figure 7 Modifications conformationnelles du VWF aux forces de cisaillement - D'après Siedlecki(22)

2.5. Clearance et protéolyse

Une fois libéré dans la circulation générale, le VWF va être dégradé progressivement selon deux mécanismes. Comme toutes les autres protéines plasmatiques, le VWF va subir des modifications dans la circulation sanguine (glycation, protéolyse, oxydation) qui vont altérer sa fonction(8). Une clearance est nécessaire pour éliminer ces protéines altérées. Celle-ci se déroule majoritairement dans les macrophages.

La deuxième forme de dégradation du VWF est réalisée par la protéine ADAMTS-13 (A Disintegrin And Metalloprotease with ThromboSpondin motifs - 13) qui vient cliver le VWF au niveau des résidus Y842 et M843 du domaine A2(31). En l'absence de forces de cisaillement, l'ADAMTS-13 est incapable de lier de VWF et donc de le cliver. Dans les conditions hémorhéologiques adéquates, quand le VWF change de conformation et s'étend, le domaine A2 devient accessible à l'enzyme. Cette protéolyse cible spécifiquement les multimères de très haut poids moléculaire (ultralarges) qui, en l'absence de l'ADAMTS-13, présentent des propriétés hyper-adhésives provoquant la formation spontanée de thrombi

plaquettaires. Cette physiopathologie se retrouve dans le Purpura Thrombotique Thrombocytopénique.

2.6. Facteurs influençant le taux de VWF

Le taux d'antigène VWF plasmatique présente une distribution large au sein de la population avec une moyenne de 100 UI/dL et 95% de la population comprise entre 50 et 200 UI/dL(32).

Relationship between ABO blood group phenotype and plasma vWF:Ag levels (IU dL^{-1}).

Authors	*n*	Group O	Group A	Group B	Group AB	*P*
McCallum *et al*. (1983)	136	89·7	129·2	135·0	139·0	< 0·001
Mohanty *et al*. (1984)	96	99·7 ± 9·1	113·8 ± 6·7	90·3 ± 16·4	118·3 ± 10·9	< 0·05
Orstavik *et al*. (1985)	167	65·4	96·7	102·5	119·1	< 0·01
Gill *et al*. (1987)	1117	74·8	105·9	116·9	123·3	< 0·01
Shima *et al*. (1995)	330	80·9 ± 14·1	107·3	103·8	113·8 ± 17·2	< 0·001
Souto *et al*. (2000)	328	77·3 ± 27·4	114·7	102·8 ± 30·2	136·7 ± 33·7	< 0·001

All values are given as mean ± 1 SD where possible. *P*-values are for group O vWF:Ag levels compared to vWF:Ag levels in the other blood groups.

Tableau 2 Influence du groupe sanguin sur le taux de VWF:Ag(33)

Influence of ABO Blood Group on vWF:Ag Values in Volunteer Blood Donors

ABO Type	n	vWF:AG Geometric Mean	vWF:Ag Geometric Mean ± 2 SD
O	456	74.8	35.6-157.0
A	340	105.9	48.0-233.9
B	196	116.9	56.8-241.0
AB	109	123.3	63.8-238.2

The groups were statistically significantly different from each other as follows: O *v* A, B, and AB, $P < .01$; A *v* AB, $P < .01$; B *v* A, $P < .05$.

Figure 8 Dosage VWF:Ag selon le groupe sanguin (34)

Les patients de groupe sanguin O présentent un taux d'antigène VWF significativement plus bas que ceux des autres groupes (O < A < B < AB). Si l'on se base sur le seuil de 50 UI/dL pour définir le déficit quantitatif en VWF, certains sujets sains de groupe O ayant un taux bas en VWF:Ag peuvent se voir étiquetés VWD type 1. Les mécanismes

expliquant ces différences de taux d'antigène entre groupes sanguins ne sont pas entièrement connus(35), mais l'augmentation de la clearance semble prédominante.

D'autres facteurs font varier le taux de VWF:

- L'âge(36,37), avec une augmentation d'environ 15 à 17 UI/dL par dizaine d'années vécues(38)
- L'origine ethnique: taux plus élevé chez les sujets africains que les sujets caucasiens(39)
- Facteurs hormonaux: œstrogènes(40), grossesse(41) (élévation progressive avec pic maximal au terme), thyroïde(42) (augmentation des taux avec l'hyperthyroïdie, baisse des taux avec l'hypothyroïdie)
- L'état inflammatoire
- Le tabac: taux de VWF augmenté chez les sujets fumeurs(43)
- Le sport: augmentation avec l'effort physique(44)
- Stimulation par la desmopressine DDAVP et le stress adrénergique(5)

3. Diagnostic de la maladie de Willebrand

Plusieurs situations peuvent amener à évaluer la possibilité d'une maladie de Willebrand (ou autre trouble hémorragique), parmi lesquelles(32):

- Patient présentant des signes hémorragiques, une histoire personnelle ou familiale de manifestations hémorragiques, des analyses biologiques pathologiques
- Patient étiqueté MW sans documentation

Le diagnostic de la maladie de Willebrand est complexe(45) du fait de la variabilité des signes hémorragiques, des variations du taux d'antigène VWF intra et inter-sujets et de la classification de la maladie en sous-types. Il repose sur un faisceau d'arguments cliniques et biologiques(46).

3.1. Clinique

La clinique doit rechercher des manifestations hémorragiques personnelles et en évaluer la fréquence, les circonstances de survenue et la sévérité. Dans la maladie de

Willebrand, celles-ci sont essentiellement cutanéomuqueuses : épistaxis, gingivorragies, saignements prolongés après effractions cutanées même minimes, ecchymoses, ménorragies, saignements gastro-intestinaux. Les complications de suites opératoires sont à rechercher, y compris après extraction dentaire et amygdalectomie, avec notamment la nécessité de reprise chirurgicale pour hémostase. Contrairement à l'hémophilie, les hématomes profonds et les hémarthroses sont rares mais peuvent être présents si le taux de facteur VIII est suffisamment abaissé.

La première problématique vient de l'absence de spécificité des signes hémorragiques qui peuvent être présent dans la population générale saine. Le Tableau 3 compare la fréquence des signes hémorragiques chez les sujets normaux et les sujets atteint de MW(32).

Common bleeding symptoms of healthy individuals and patients with VWD.

Symptoms	Normals (n = 500 [134]; n = 341 [135]*; n = 88 [148]†; n = 60 [136]†), %	All types of VWD (n = 264 [134]; n = 1885 [394]), %	Type 1 VWD (n = 42 [395]‡; n = 671 [133]), %	Type 2 VWD (n = 497 [133]), %	Type 3 VWD (n = 66 [133]; n = 385 [87]), %
Epistaxis	4.6–22.7	38.1–62.5	53–61	63	66–77
Menorrhagia§	23–68.4	47–60	32	32	56–69
Bleeding after dental extraction	4.8–41.9	28.6–51.5	17–31	39	53–70
Ecchymoses	11.8–50	49.2–50.4	50	NR	NR
Bleeding from minor cuts or abrasions	0.2–33.3	36	36	40	50
Gingival bleeding	7.4–47.1	26.1–34.8	29–31	35	56
Postoperative bleeding	1.4–28.2	19.5–28	20–47	23	41
Haemarthrosis	0–14.9	6.3–8.3	2–3	4	37–45
Gastrointestinal bleeding	0.6–27.7	14	5	8	20

NR, not reported; VWD, von Willebrand disease.
*A total of 341 individuals were sent a questionnaire, but the precise number responding was not provided.
†Study included women only.
‡Study included males only.
§Calculated for females older than 13–15 years.

Tableau 3 Fréquences des signes hémorragiques selon sujets sains et VWD (32)

La MW étant de transmission génétique autosomique, hors mutation *de novo*, une histoire hémorragique familiale doit également être recherchée.

Un questionnaire d'évaluation des manifestations hémorragiques est mis à disposition par l'ISTH (International Society on Thrombosis and Haemostasus): l'ISTH-BAT Bleeding Assessment Tool.

3.2. Classification

L’anomalie du VWF peut être quantitative (partielle ou totale) ou qualitative. Selon l’origine de l’anomalie et donc les conséquences sur l’expression et/ou la fonction, une classification en 3 principaux types et 4 sous-types est définie(47) telle que:

- Type 1 : Déficit quantitatif partiel en VWF (70-80%) : diminution de la synthèse avec une structure normale.
- Type 2 : Déficit qualitatif du VWF (10-20%) : anomalie de structure et diminution de la synthèse.
    - Type 2A : Diminution de l'affinité du VWF pour les plaquettes et perte sélective des multimères de haut poids moléculaire
    - Type 2B : Augmentation de l'affinité de VWF pour la GPIb plaquettaire
    - Type 2M : Diminution de l'affinité du VWF pour les plaquettes sans perte sélective des multimères de haut poids moléculaire
    - Type 2N : Diminution marquée de la liaison du VWF au facteur VIII
- Type 3 : Déficit total en VWF (1-3%) et donc en facteur VIII.

Il n'existe pas de test biologique unique permettant d'une part de poser le diagnostic et, d'autre part, d'en indiquer le type/sous-type. Il est donc nécessaire de confronter les résultats de différentes analyses et d'en vérifier la cohérence avec la clinique. Le Tableau 4 résume les résultats attendus selon le type/sous-type de VWD(32).

	Normal	Type 1	Type 2A	Type 2B	Type 2M	Type 2N	Type 3	PLT-VWD*
VWF:Ag	N	L, ↓ or ↓↓	↓ or L	↓ or L	↓ or L	N or L	Absent	↓ or L
VWF:RCo	N	L, ↓ or ↓↓	↓↓ or ↓↓↓	↓↓	↓↓	N or L	Absent	↓↓
FVIII	N	N or ↓	N or ↓	N or ↓	N or ↓	↓↓	1-9 IU/dL	N or L
RIPA	N	Often N	↓	Often N	↓	N	Absent	Often N
LD-RIPA	Absent	Absent	Absent	↑↑↑	Absent	Absent	Absent	↑↑↑
PFA-100 CT	N	N or ↑	↑	↑	↑	N	↑↑↑	↑
BT	N	N or ↑	↑	↑	↑	N	↑↑↑	↑
Platelet count	N	N	N	↓ or N	N	N	N	↓
VWF multimer pattern	N	N	Abnormal	Abnormal	N	N	Absent	Abnormal

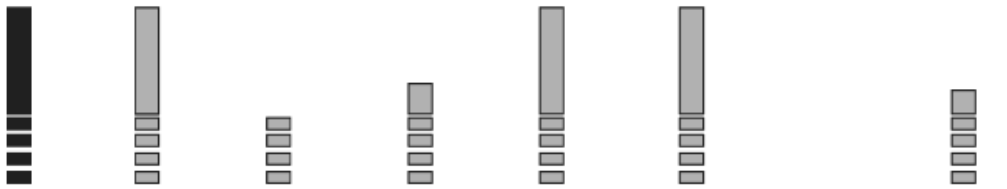


Tableau 4 Résultats des tests selon le type et sous-type de VWD. Selon Nichols(32)

3.4. Exploration biologique de la maladie de Willebrand

Le rapport de l'HAS de juillet 2011 sur la biologie des anomalies de l'hémostase a compilé les recommandations du NHLBI (National Heart, Lung, and Blood Institute), de l'UKHCDO (United Kingdom Haemophilia Centre Doctor's Organisation) et de l'AHCDC (Association of Hemophilia Clinic Directors of Canada) et définit les examens de biologie médicale à réaliser en première intention devant un désordre hémorragique. L'exploration doit initialement comprendre une numération sanguine comprenant la numération plaquettaire, le TP, le TCA et, au choix, le temps de thrombine ou le dosage du fibrinogène. Le temps de saignement (TS) permet d'explorer l'hémostase primaire mais n'est pas recommandé du fait d'un manque de sensibilité, de spécificité et reproductibilité/standardisation, en plus du risque de cicatrice inesthétique.

Une anomalie affectant un ou plusieurs tests autre que le TCA doit faire envisager une pathologie autre que la maladie de Willebrand. Au contraire, si tous les examens sont normaux ou si seul le TCA est affecté, l'exploration biologique doit se poursuivre à la

recherche d'une VWD : dosage de l'antigène VWF (VWF:Ag), dosage de l'activité cofacteur de la ristocétine (VWF:RCo) et le dosage de l'activité coagulante du facteur VIII (FVIII:C).

3.4.1 Unités des résultats

Les résultats d'analyses d'hémostase sont habituellement exprimés en UI. Une Unité Internationale représente la quantité d'un facteur présent dans 1 mL de pool de plasma normal(48). 1 UI/mL = 100 UI/dL, ce qui permet l'équivalence en pourcentage de plasma normal fréquemment utilisée par les laboratoires pour rendre les résultats. L'OMS prépare et distribue un étalon primaire utilisé par les fournisseurs de réactifs pour créer les étalons secondaires qui seront ensuite utilisés pour créer les gammes de calibration des coffrets. Le raccordement métrologique des étalons permet de conserver une comparabilité entre laboratoires.

3.4.2 VWF:Ag

Le dosage de l'antigène VWF plasmatique (VWF:Ag) est un dosage immunologique. Les méthodes habituellement utilisées sont basées sur l'enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) et le latex immunoassay (LIA) automatisé. Il ne permet que le dosage quantitatif de la protéine sans présager d'une anomalie qualitative.

La technique utilisée au CHU d'Amiens est une technique LIA réalisée sur automate STA-R Evolution avec le réactif STA-Liatest vWF. Ce réactif contient des microparticules de latex recouvertes d'anticorps polyclonaux anti-vWF. Lorsque le plasma à tester est incubé en présence du réactif, l'agglutination des microparticules de latex au VWF augmente la turbidité du mélange de façon proportionnelle à la concentration en VWF.

3.4.3. Le dosage de l'activité VWF

La mesure de l'activité du facteur VWF permet d'évaluer la capacité de liaison du VWF aux plaquettes. Le dosage est historiquement lié à la mesure de l'activité cofacteur de la ristocétine (VWF:RCo) qui est un antibiotique de la famille des glycopeptides produit par l'actinomycète Amycolatopsis *lurida* (précédemment Nocardia *lurida*). Il est maintenant retiré

du marché suite à la mise en évidence de thrombopénies iatrogènes induites par ses propriétés pro-agrégantes in vivo et in vitro.

La description du test utilisant la ristocétine pour mesurer l'activité du VWF est publiée par Howard et Firkin en 1971(49). In vitro, en l'absence de forces de cisaillement, l'interaction entre le VWF et la GPIb plaquettaire est permise par l'ajout de ristocétine au plasma. Les plaquettes utilisées sont fixées par du formol afin d'empêcher l'activation in vitro et donc de ne doser que le VWF du plasma. La technique est réalisée sur agrégomètre (mesure de la pente d'agrégation) ou sur lame (visualisation macroscopique des agglutinats plaquettaires). C'est aujourd'hui encore la technique de référence pour mesurer l'activité du VWF(50).

La technique manuelle sur lame présente cependant de nombreux points négatifs. Tout d'abord le recours à l'utilisation d'un agoniste exogène, la ristocétine, rend la liaison VWF-GPIb non physiologique. Certains polymorphismes du domaine A1 du VWF, comme le P1467S(51) ou le D1472H(52) sont notamment connus pour entraîner une baisse de l'activité cofacteur de la ristocétine sans pour autant diminuer l'activité mesurée par d'autres techniques et sans que les patients ne présentent de manifestation hémorragique.

Le second point négatif est inhérent à la réalisation technique manuelle. Le résultat du dosage est approché par dilutions successives du plasma à tester, aussi bien patient que contrôle de qualité. Aussi bien les étapes de dilutions que de lecture sont conséquentes en temps technicien.

Pour finir, la lecture est manuelle et consiste à chercher, pour chaque dilution, la présence d'agglutinats plaquettaires. Chaque dilution est comparée à un témoin négatif (sans ristocétine) et on recherche l’apparition d’agglutinats qui se présentent comme des granulations fines blanchâtres sur un fond légèrement trouble. Un fond noir et une lumière d'incidence oblique par rapport à la lame permettent de faciliter et sensibiliser la détection des agglutinats mais cette lecture, opérateur dépendante, reste délicate et particulièrement laborieuse lors de séries comportant de nombreux échantillons.

D'autres techniques de dosage de l'activité ont émergé, se concentrant sur la GPIb. Les techniques VWF:GPIbR utilisent des fragments recombinants GPIb WT dont le lien avec le VWF est permis par l’ajout de ristocétine. Au contraire, les techniques VWF:GPIbM permettent de se passer de ristocétine grâce à l’utilisation de fragments recombinants GPIb mutés où des mutations gain-de-fonction ont été insérées.

3.4.4. PFA-100 / PFA-200

Le PFA (Platelet Function Analyzer) est un test quantitatif fonctionnel plaquettaire. Il permet d'explorer l'hémostase primaire en simulant in vitro ce qui se passe in vivo. L'ensemble se compose d'un automate et d'une cartouche à usage unique. Au sein de la cartouche, l'échantillon de sang total citraté est aspiré dans un capillaire dont l'extrémité est une membrane percée d'un orifice de 147µm(53). La membrane est recouverte de collagène additionné soit d'ADP, soit d'épinéphrine. Les forces de cisaillement générées par l'aspiration au sein du capillaire et au travers de la membrane sont proches de celles retrouvées in vivo. La présence des agonistes(54) plaquettaires (ADP ou EPI) permet d'initier l'adhésion plaquettaire, l'activation et l'agrégation(55). L'automate chronomètre le temps nécessaire pour obturer la membrane du fait de la formation d'un thrombus, donnant ainsi une mesure automatisée du temps d'occlusion plaquettaire.

3.4.5. Profil multimérique

L'étude des multimères est réalisée en électrophorèse. Le principe est la migration des protéines au sein d'un gel sous l'action d'un courant électrique. Les protéines étant chargées négativement, elles sont déposées dans le gel du côté chargé négativement (cathode) et vont migrer vers le côté chargé positivement (anode) lorsque l'on exerce une différence de potentiel électrique.

Les protéines ayant le poids moléculaire le plus faible peuvent se déplacer plus facilement au sein du gel et vont donc migrer plus loin pour une même durée de migration. Au contraire, les multimères de très haut poids moléculaire vont avoir une capacité de migration réduite.

L'analyse est qualitative et quantitative, et s'intéresse à la présence et la répartition des multimères présents dans l'échantillon. Une distribution normale doit retrouver toutes les tailles de multimères: multimères de bas poids moléculaire, de poids moléculaire intermédiaire et de haut poids moléculaires.

La Figure 9 montre les différents profils obtenus selon le type de VWD. Le type 1 montre une distribution normale mais quantitativement réduite par rapport au profil témoin. Le type 3 montre une absence quasi totale de VWF. Les types 2A et 2B montrent une perte des multimères de haut poids moléculaire qui n’est pas retrouvée dans le type 2M.

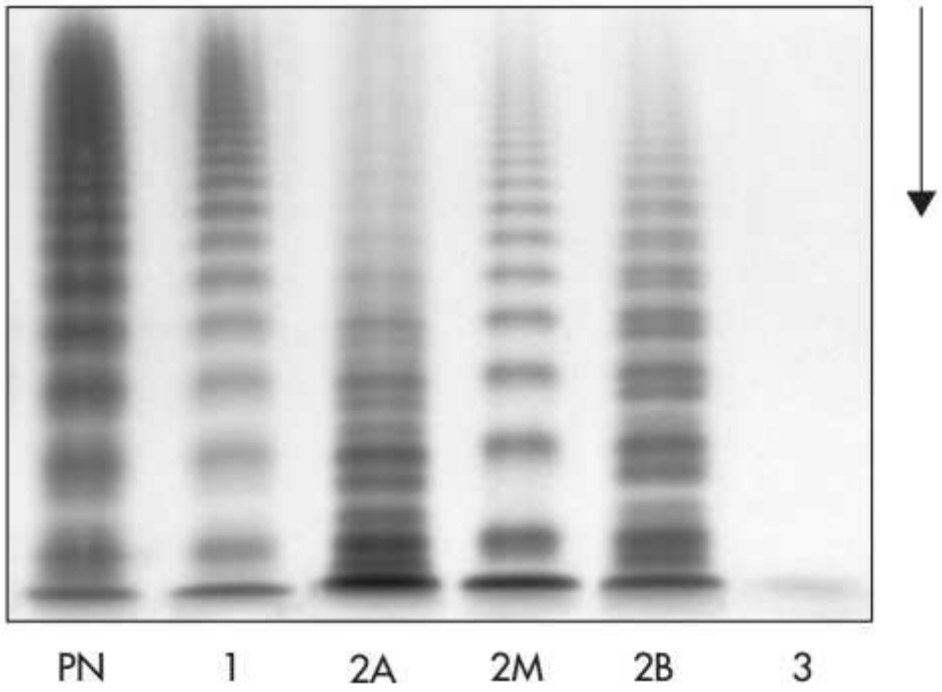


Figure 9 Exemples d'électrophorèses des multimères selon le type de VWF (56)

3.4.6. RIPA - Agrégation plaquettaire à la ristocétine / LD-RIPA

Le test RIPA, tout comme le dosage VWF:RCO, utilise les propriétés de l'antibiotique ristocétine pour entraîner une liaison entre le VWF et le récepteur GPIb des plaquettes. Un plasma riche en plaquettes (PRP) est obtenu par centrifugation lente (100-120G pendant 10-15 minutes) d'un échantillon de sang total citraté. Un plasma pauvre en plaquettes (PPP) est obtenu en centrifugeant le reste de l'échantillon à 2000G pendant 15 minutes.

Le test est réalisé en agrégométrie optique avec agitation dans des cuvettes thermostatées à 37°C. Le blanc (100%) est déterminé à l'aide du PPP. En début de test, le PRP permet de déterminer l'agrégation minimale, sans ristocétine (0%). La ristocétine est alors ajoutée, à une concentration fixée de 0,2 à 1,5 mg/ml pendant que la DO (et donc la courbe d'agrégation) est enregistrée.

En présence de ristocétine en quantité suffisante, le VWF se lie aux plaquettes et entraîne une activation puis une agrégation plaquettaire. Ces processus aboutissent à une diminution de la turbidité du plasma et donc une diminution de la DO enregistrée par l'agrégomètre. Le seuil de positivité de l'agrégation, i.e. agrégation positive à une concentration donnée de ristocétine, est de 30 à 50%. Il n'existe pas de contrôle interne de qualité, les résultats des plasmas testés sont donc confrontés aux résultats obtenus pour un plasma de sujet sain.

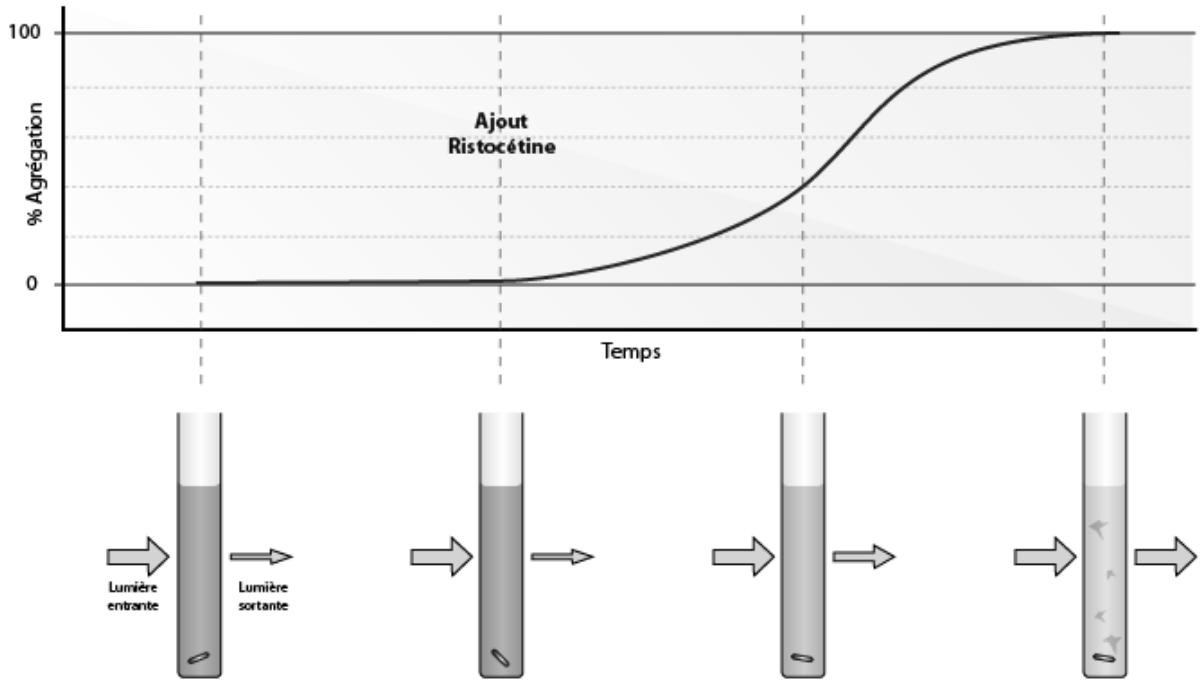


Figure 10 Principe analytique RIPA

Les résultats obtenus sont les suivants:

Sujet	0,2 ≤ [ristocétine] ≤ 0,6 mg/ml	1 ≤ [ristocétine] ≤ 1,5 mg/ml
Sujet sain et VWD 2N	Absence d'agrégation	Agrégation normale
VWD 1, 2A, 2M	Absence d'agrégation	Agrégation ou diminuée
VWD 2B	Agrégation	Agrégation
VWD 3	Absence d'agrégation	Absence d'agrégation

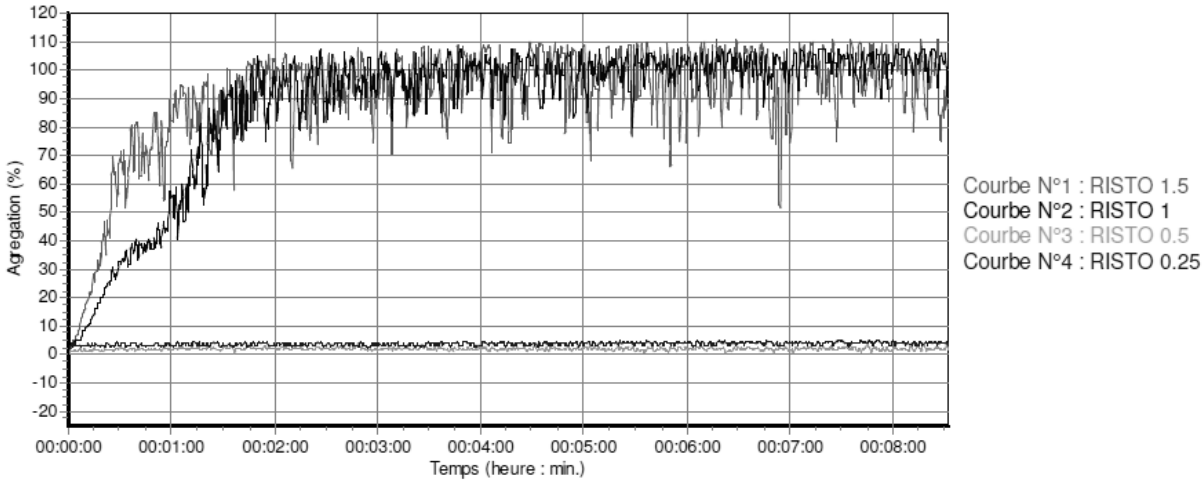


Figure 11 Exemple RIPA normale

3.4.7. L'étude de la liaison au collagène

Etude spécialisée en ELISA permettant de mesurer l'affinité de la liaison du VWF au collagène : VWF:CB.

3.4.8. L'étude de la liaison au facteur VIII

Etude spécialisée en ELISA permettant de mesurer l'affinité de la liaison du VWF au facteur VIII : VWF:FVIIIB.

OBJECTIFS DE L'ETUDE

Le laboratoire d'hémostase spécialisée réalise le dosage de l'activité du VWF avec la méthode de référence manuelle d'agglutination sur lame, que ce soit pour le diagnostic ou pour le suivi thérapeutique. Cette technique présente cependant de nombreux points négatifs, à savoir une réalisation entièrement manuelle, un temps technicien conséquent du fait de nombreuses dilutions successives et une lecture manuelle des agglutinats, délicate, pour chacune de ces dilutions. Ces différents points imposent d'une part un technicien formé et habitué à réaliser cette méthode, et d'autre part rendent cette méthode peu adaptée aux urgences.

L'objectif de l'étude était de comparer la méthode de référence manuelle à deux méthodes automatisées, l'une encore en cours d'essais et utilisant la ristocétine, et l'autre déjà en usage dans d'autres laboratoires et n'utilisant pas la ristocétine.

La comparaison devait porter sur les performances globales des différentes méthodes afin de s'assurer de conserver une qualité de rendu des résultats. Elle devait également s'intéresser à l'aspect pratique, avec une évaluation de la facilité de réalisation (notamment la possibilité d'être réalisée par un technicien non référent en hémostase) et la notion de rendu de résultat en urgence (délai de rendu et possibilité d'une série réduite à un seul patient).

MATERIELS ET METHODES

1. Matériels

1.1. Automate STA-R Evolution

Le STA-R Evolution (Diagnostica Stago, Asnières, France) est un automate d'hémostase permettant la réalisation automatisée de tests de coagulation de routine et spécialisée. Il permet des mesures en chronométrie, colorimétrie et immunoturbidimétrie.



Figure 12 Automate Stago STA-R Evolution

1.2. Plasmas

Les échantillons de patients étaient recueillis sur tube BD Vacutainer Citrate de sodium 9NC 0,109M (3,2%). Afin de satisfaire les exigences du GEHT (Groupe Français d'Etude sur l'Hémostase et la Thrombose), les échantillons subissaient une double centrifugation dans le but d'obtenir un plasma pauvre en plaquettes (< 10G/L) indispensable avant congélation.

La préparation était la suivante : l'échantillon était centrifugé à 2250G pendant 13 minutes à température ambiante. Le plasma était ensuite aspiré à l'aide d'une pipette pasteur en plastique sans aspirer la couche leuco-plaquettaire puis placé dans un second tube. La deuxième centrifugation était identique à la première au niveau des paramètres. Le plasma

surnageant était ensuite aspiré à l'aide d'une pipette pasteur plastique, sans aspirer le culot contenant les plaquettes résiduelles, et placé dans un troisième tube étiqueté.

L'échantillon était inspecté à la recherche d'un aspect hémolysé, ictérique ou lactescent.

Les plasmas citratés ainsi obtenus étaient analysés le jour même ou congelés à -80°C si l'analyse n'était pas réalisée le jour même.

Dans le cas de l'utilisation de plasmas citratés congelés, ces derniers étaient décongelés au bain-marie thermostaté à 37°C puis homogénéisés avant analyse.

Dans le cas des échantillons de contrôle qualité, lyophilisés, la reconstitution était réalisée selon les indications des fournisseurs respectifs.

1.3. Coffret Siemens VWF REAGENT

Le coffret Siemens VWF REAGENT permet de mesurer l'activité cofacteur de la ristocétine VWF:RCo. Le principe de la méthode est basé sur la capacité VWF à agglutiner des plaquettes stabilisées en présence de l'antibiotique ristocétine A.

Le coffret comprend:

- Le Réactif von Willebrand, lyophilisé, qui contient des plaquettes humaines stabilisées, de la ristocétine et de l'EDTA.
- Plaque en verre

Sont nécessaires mais non inclus dans le coffret:

- Solution saline isotonique
- Eau distillée
- Plasma de contrôle Normal
- Plasma de contrôle Pathologique

Le réactif von Willebrand était reconstitué avec 2 mL d'eau distillée puis homogénéisé par agitation vigoureuse.

L'échantillon de plasma était successivement dilué en solution saline isotonique pour obtenir des dilutions décroissantes de 1/20 à 1/160, selon le schéma suivant:

			500 µl	500 µl	500 µl	250 µl
Échantillon	–	50 µl	500 µl	500 µl	500 µl	250 µl
Solution saline isotonique	250 µl	950 µl	500 µl	500 µl	250 µl	250 µl
Dilution	blanc	1 : 20	1 : 40	1 : 80	1 : 120	1 : 160
Titre	–	20	40	80	120	160

Figure 13 Dilutions du coffret von Willebrand Reagent

Sur chaque case de la plaque en verre étaient déposés:

- 50 µl de dilution plasmatique ou de blanc
- 50 µl de réactif von Willebrand.

Les dépôts étaient mélangés pendant 1 minute puis la plaque était mise à reposer pendant 1 minute. La lecture de l'agglutination était ensuite réalisée sur fond noir avec une source de lumière venant de côté, en comparant avec le blanc. Le titre correspondait alors à la dernière dilution où l'on observait une agglutination nette par rapport au blanc. Des dilutions plus étroites étaient réalisées si nécessaire afin d'affiner le titre, notamment entre la dilution 1/40 et 1/80.

Le contenu en cofacteur de la ristocétine en % était obtenu en multipliant le titre du spécimen par la limite de détection indiquée dans le coffret.

Les contrôles qualité étaient passés de la même façon que les échantillons issus de patients.

1.4. Coffret ABP VWF Ricof Assay

Le dosage proposé par Stago est une adaptation du coffret ABP Ristocetin Co-Factor Assay Kit, initialement prévu pour une utilisation sur agrégomètre, pour l'automate Sta-R. Il mesure la capacité du plasma testé à agglutiner des plaquettes fixées au formol en présence de ristocétine. La méthode sera appelée « VWF:RCo ABP Stago » pour la suite de ce travail.

Le coffret se compose de cinq réactifs et permet de réaliser deux séries de dosages.

- Le réactif I contient des plaquettes humaines fixées au formol et lyophilisées
- Le réactif II contient de la ristocétine lyophilisée
- Le réactif III est un tampon TBS
- Le réactif IV est un plasma de référence lyophilisé
- Le réactif V est un contrôle de qualité pathologique

Ne sont pas inclus dans le coffret mais nécessaires:

- Réactif auxiliaire: STA-OWREN-KOLLER
- Matériel auxiliaire: Barreau aimanté
- Eau distillée

Les réactifs ont été reconstitués selon l'"'Application Suggérée", Ref. 1501-V5, fournie par Stago et disponible en Annexe. L'ensemble des réactifs nécessaires à la réalisation d'une série étaient laissés à température ambiante 30 minutes avant reconstitution: 2 flacons de réactif I, 2 flacons de réactif II, 1 flacon de réactif III, 1 flacon de réactif IV et 1 flacon de réactif V.

Réactif	Reconstitution
Réactif I	Chacun des deux flacons de plaquettes stabilisées et lyophilisées était reconstitué avec 3 mL de tampon TBS. Après 15 minutes à température ambiante, les flacons étaient agités doucement par retournement puis poolés. Un barreau aimanté était placé dans le flacon puis le réactif était positionné en zone R1 du tiroir de l'automate, dans un emplacement permettant l'agitation magnétique du réactif.
Réactif II	Chacun des deux flacons de ristocétine lyophilisée était reconstitué avec 1,2 mL d'eau distillée. Après 15 minutes à température ambiante, les deux flacons étaient homogénéisés doucement puis poolés. Le réactif était ensuite positionné en zone R2 du tiroir.
Réactif IV	Le flacon de plasma de référence était reconstitué avec 1 mL d'eau distillée. Après 30 minutes à température ambiante, le flacon était homogénéisé puis placé en zone R0 du tiroir.
Réactif V	Le plasma de contrôle pathologique "tait reconstitué avec 0,5 mL d'eau distillée. Après 30 minutes à température ambiante, le flacon était homogénéisé puis placé en zone R0 du tiroir.

Tableau 5 Reconstitution de la méthode VWF:RCo ABP Stago

La gamme de calibration était réalisée à l'aide d'un plasma standard fourni dans le kit. La valeur de l'étalon était celle indiquée dans le coffret. Elle se constituait de 6 points en double mesure au 1/4, 1/6, 1/8, 1/10, 1/12 et 1/20ème. La régression était polynomiale d'ordre 3. La limite d'acceptabilité de la courbe de calibration était indiquée dans l'"Application Suggérée" et fixée à ≥ 0,985.

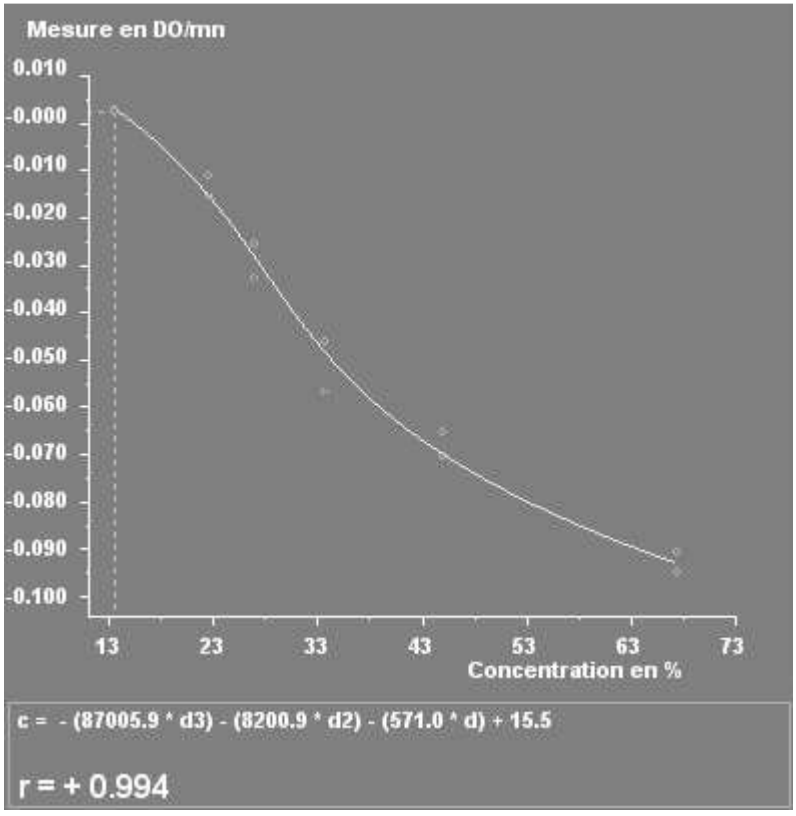


Figure 14 Courbe de calibration de la méthode VWF:RCo ABP Stago

Le déroulement du test était le suivant:

- Etaient mélangés puis incubés pendant 240 secondes
    - 70 µl d'échantillon dilué selon la zone de mesure souhaitée
    - 150 µl de réactif I (plaquettes reconstituées et agitées)
- La ristocétine (réactif II) était ensuite ajoutée à un volume de 44 µl et servait de réactif déclenchant.
- Deux mesures de DO étaient réalisées à 50 secondes puis 350 secondes afin d'en déduire une cinétique de DO en DO/minute.

Le test principal utilisait une dilution de l'échantillon au 1/3 dans du tampon STA-OWREN-KOLLER permettant une mesure du VWF:RCo de 16 à 43%. Des tests dépendant étaient utilisés pour étendre la gamme de mesure, avec les dilutions de l'échantillon suivantes:

Zone de mesure	9 - 16 %	16 - 43 %	43 - 81 %	81 - 160 %
Dilution échantillon	1/2	1/3	1/6	1/12

Tableau 6 Gamme de mesure selon la dilution - coffret VWF:RCo ABP Stago

Les mesures inférieures à 9% et supérieures à 160%, limites de la zone de mesure toutes dilutions confondues, étaient rendues <9% et >160% respectivement.

Le contrôle de qualité pathologique inclus était passé en début et fin de série, avec comme limites d'acceptabilité celles fixées par l'"Application Suggérée": 13,3 - 30%" et non pas celles indiquées dans le coffret.

Deux autres contrôles étaient passés aux mêmes moments:

- Stago STA-Liatest Control N
- Stago STA-Liatest Control P

Aucune borne n'était donnée par Stago pour ces contrôles.

1.5. Coffret Siemens Innovance Ac

Le coffret Innovance de Siemens offre la possibilité de mesurer l'activité du VWF sans utilisation de plaquette ni de ristocétine. Le test se base sur un fragment GPIbα recombinant où deux mutations gain-de-fonction ont été insérées(57). Ces deux mutations, G233V et M239V, sont connues de la pseudo-VWD(58,59) et modifient la conformation du site de liaison GPIbα au domaine A1 du VWF de telle sorte que le VWF se lie spontanément au GPIb muté avec pour conséquence une agrégation des plaquettes in vivo et également in vitro en l'absence de ristocétine(60).

Un épitope est également ajouté au fragment recombinant, permettant une liaison avec une haute affinité du complexe VWF:GPIbα aux anticorps du réactif I.

La liaison des microparticules au complexe VWF/GP1bα est mesurée par un accroissement de la turbidité causée par l'agglutination des particules.

Le coffret se compose de trois réactifs prêts à l'emploi:

- Le réactif I contient des microparticules de polystyrène recouvertes d'un anticorps monoclonal dirigé vers le fragment GPIbα
- Le réactif II contient un réactif de blocage hétérophile permettant de supprimer les liaisons non spécifiques
- Le réactif III contient le fragment GPIbα recombinant proprement dit.

Ne sont pas inclus dans le coffret mais nécessaires:

- Siemens Plasma Standard Humain (REF ORKL 13)
- Siemens Plasma de Contrôle Normal (REF ORKE 41)
- Siemens Plasma de Contrôle Pathologique (REF OUPZ 17)

Les plasmas de calibration et de contrôle étaient reconstitués selon la notice technique incluse dans leurs coffrets respectifs.

La gamme de calibration était réalisée avec le Plasma Standard Humain et était constituée de 6 points en double mesure au 1/3 1/4 1/5 1/6 1/10 et 1/30ème. La régression était polynomiale d'ordre 3.

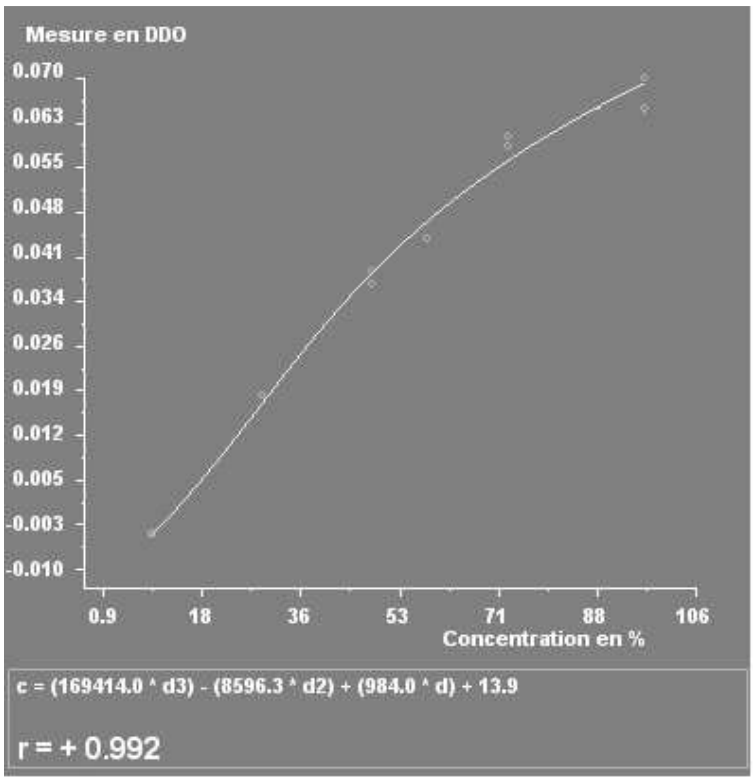


Figure 15 Courbe de calibration du coffret Siemens INNOVANCE

Le déroulement du test était le suivant :

- Etaient mélangés et incubés pendant 120 secondes:
  - 65 µl d'échantillon (pur ou dilué selon la zone de mesure souhaitée)
  - 100 µl de tampon HBR (réactif I)
  - 25 µl de GP1b (réactif III)
- 145 µl de réactif I étaient ensuite ajoutés et servaient de réactif déclenchant
- Deux mesures de DO étaient réalisées à 20 secondes puis 150 secondes.

Le test principal utilisait une dilution de l'échantillon au 1/3 dans du tampon STA-OWREN-KOLLER permettant une mesure du VWF:RCo de 10 à 80%. Des tests dépendant étaient utilisés pour étendre la gamme de mesure, avec les dilutions de l'échantillon suivantes:

Zone de mesure	**3,33 - 10 %**	**10 - 80 %**	**80 - 160 %**
Dilution échantillon	1/1	1/3	1/6

Tableau 7 Gamme de mesure selon la dilution - coffret VWF:Ac Siemens Innovance

Les mesures inférieures à 3.3% et supérieures à 160%, limites de la zone de mesure toutes dilutions confondues, étaient rendues <3.3% et >160% respectivement.

Les contrôles qualité étaient passés en début et fin de série, les limites d'acceptabilité étaient celles indiquées dans les coffrets respectifs.

2. Méthodes

2.1. Réalisation des analyses

La réalisation des analyses s'est déroulée dans le secteur d'hémostase spécialisée du laboratoire d'hématologie. Chaque série était encadrée par les contrôles qualité propres à chaque méthode, tels que décrits dans leur section respective.

Dans le cas où le dosage de l'activité du facteur Willebrand avait été réalisé auparavant, celui-ci était à nouveau réalisé en parallèle dans les 3 méthodes pour respecter les conditions de comparaison (notamment la possibilité de dégradation du VWF durant la conservation de l'échantillon).

Les tests automatisés étaient réalisés sur l'automate STA-R Evolution dédié à l'hémostase spécialisée. Les réactifs auxiliaires (tampon STA-Owren-Koller, calcium STA-CaCl2) étaient changés à chaque série.

La technique manuelle était réalisée par une technicienne référente en hémostase, habituée à réaliser cette technique de dosage.

Dans le cas des technique automatisées, et lorsque le dosage du VWF:Ag était connu, la dilution de départ était choisie selon le principe de l'égalité du VWF:Ag et du VWF:RCo ou VWF:Ac.

2.2. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel libre R version 3.3.1 x64 pour Windows. Les diagrammes de Bland-Altman(61,62) ont été réalisés à l'aide de la librairie *BlandAltmanLeh* version 0.3.1. Les régressions de Passing Pablok(63,64) ont été réalisées à l'aide de la librairie *mcr* version 1.2.1. Les intervalles de confiance ont été calculés pour un degré de confiance de 95%.

RESULTATS

Au total, 105 plasmas issus de patients et 5 plasmas de contrôle qualité (3 contrôles nationaux et 2 contrôles internes) ont été dosés parallèlement avec les 3 méthodes. Les essais se sont déroulés sur 8 journées, de février 2015 à aout 2015.

La majorité des analyses a été réalisée sur plasma conservé par congélation à -80°C, les autres analyses ont été réalisées sur plasma frais ou plasma lyophilisé reconstitué. La répartition précise est détaillée dans le Tableau 8.

Plasma congelé	Plasma frais	Plasma lyophilisé	Cumul
99	6	5	110

Tableau 8 Répartition des plasmas utilisés

Les plasmas issus de la plasmathèque ont été sélectionnés parmi les doublons de plasmas citratés de patients suivis en consultation au Centre Régional du Traitement de l'Hémophilie du CHU d'Amiens. L'objectif principal de cette sélection était de disposer d'un éventail large de concentrations et d'activité du VWF afin de tester les méthodes sur l'ensemble de la gamme de mesure et les différents types de VWD.

Certains patients ont été dosés plusieurs fois, soit sur un prélèvement de même circonstance (doublon tube congelé), soit dans des circonstances différentes (différents stades de grossesse, différents temps de test au Minirin).

Quatre-vingt deux patients uniques ont été dosés, avec une répartition homogène des deux sexes. La répartition et les caractéristiques des plasmas issus de patients sont précisées dans le Tableau 9.

Femmes		Hommes		Cumul	
Nombre	Âge moyen	Nombre	Âge moyen	Nombre	Âge moyen
51	37,4	31	34	82	36,1

Tableau 9 Répartition en âge et sexe des patients

La majorité (93.9%) des plasmas issus de patients avaient une durée de conservation inférieure à 12 mois, avec une moyenne de 3,5 mois. Seuls 6 plasmas congelés dépassaient cette durée de conservation, avec un maximum de 17 mois (13 mois, 13 mois, 16 mois, 16 mois, 17 mois et 17 mois).

Tous les coffrets Siemens Innovance VWFAc utilisés étaient issus du même lot et nous n'avons pas été amenés à refaire la calibration. Pour le coffret VWF:RCo ABP Stago, la calibration a été refaite à l'occasion d'un changement de lot.

La distribution des dosages de l'activité du VWF ainsi que de l'antigène (lorsque réalisé) des plasmas testés est présentée dans la Figure 16. Les statistiques de distribution sont précisées dans le Tableau 10.

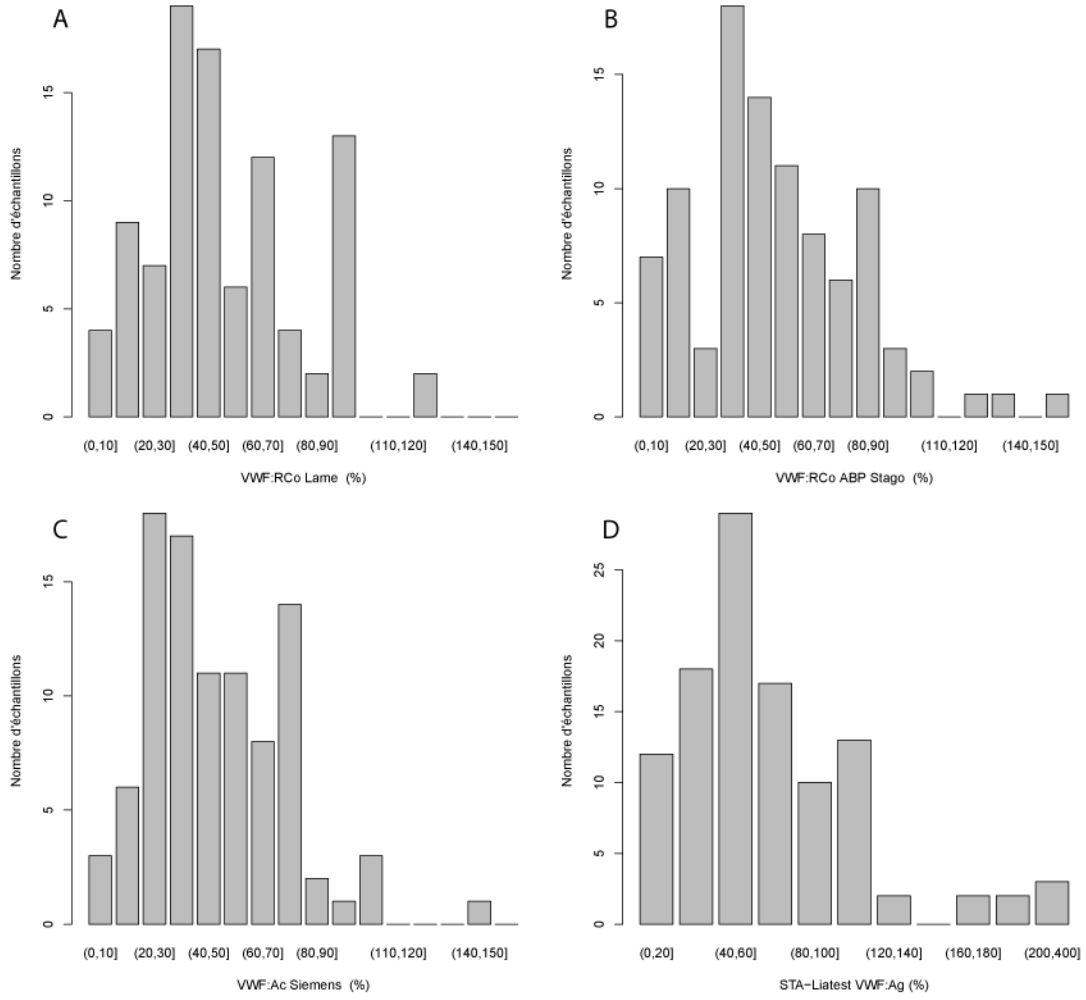


Figure 16 Distribution des dosages des plasmas testés. A) VWF:RCo Lame. B) VWF:RCo ABP Stago. C) VWF:Siemens. D) STA-Liatest VWF:Ag lorsque disponible

Dosage	Nombre	Min.	1er Q	Médiane	Moyenne	3ème Q	Max.
VWF:RCo Lame	95	7.7	31	46	51.2	66	123
VWF:RCo ABP Stago	95	9	32.5	48	51.86	70.5	160
VWF:Ac Siemens	95	8.0	29.5	43.0	48.37	67.5	144
STA-Liatest VWF:Ag	93	7.0	39	58	70.41	90.5	385

Tableau 10 Paramètres de distribution des dosages (en %)

L'analyse statistique a été réalisée sur les échantillons où le résultat obtenu dans les différentes méthodes était dans le domaine de mesure des méthodes respectives. Les échantillons où un ou plusieurs résultat était inférieur ou supérieur au domaine de mesure ont été étudiés séparément. Enfin, un échantillon a été exclu de l'analyse car analysé en fin de période de stabilité à bord pour le coffret VWF:RCo ABP Stago. Cette répartition est résumée dans le Tableau 11.

Résultats dans le domaine de mesure	≥ 1 résultat hors du domaine de mesure	Echantillon exclu de l'analyse	Total
95	14	1	110

Tableau 11 Répartition des échantillons pour l'analyse statistique

Pour les 95 échantillons inclus dans l'analyse statistique, les données issues de la régression de Passing Bablok (pente, interception et leurs IC95% respectifs) ainsi que de le coefficient de corrélation de Pearson (et son IC95%) sont résumés dans le Tableau 12.

Régression	Passing Bablok	Estimation	IC 95%	r	IC 95% r
VWF:RCo Lame / VWF:RCo ABP Stago	Pente	1.049	0.961-1.148	0.878	0.822-0.917
	Intercept.	-0.723	-6.158-2.631		
VWF:RCo Lame / VWF:Ac Siemens	Pente	0.869	0.756-1.000	0.850	0.783-0.898
	Intercept.	3.086	-2.000-8.855		
VWF:RCo ABP Stago / VWF:Ac Siemens	Pente	0.836	0.777-0.894	0.961	0.942-0.974
	Intercept.	4.371	1.276-7.049		

Tableau 12 Résultats de la régression Passing Bablok et corrélation de Pearson

Les résultats issus du diagramme de Bland-Altman, à savoir le biais et les limites d'acceptabilité à ±1,96 écarts-types sont résumés dans le Tableau 13.

Comparaison	Biais	IC 95% biais	Limtes d'acceptabilité IC 95%
VWF:RCo Lame / VWF:RCo ABP Stago	-0.664	-3.599 - 2.271	-28.9 - 27,6
VWF:RCo Lame / VWF:Ac Siemens	2.830	-0.195 - 5.856	-26.3 - 31.9
VWF:RCo ABP Stago / VWF:Ac Siemens	3.494	1.673 - 5.316	-14 - 21

Tableau 13 Résultat diagramme Bland-Altman

Les graphiques montrant les régressions de Passing Bablok et les diagrammes de Bland-Altman sont présentés dans la Figure 17.

Les résultats des 14 échantillons analysés séparément sont détaillés dans le Tableau 14. Ceux de l'échantillon exclu de l'étude sont présentés dans le Tableau 15.

VWF:RCo Lame	VWF:RCo Stago	VWF:Ac Siemens
107	151	> 160
7,7	< 9	12
> 123	>160	>160
> 123	155	121
8	< 9	11
> 123	160	160
> 123	160	> 160
1	<9	10
< 7,7	<9	12
>133	160	>160
> 123	> 160	> 160
>133	160	160
8	<9	4
92	>160	>160

Tableau 14 Détails des 14 échantillons présentant ≥1 résultat hors du domaine de mesure (en %)

VWF:RCo Lame	VWF:RCo Stago	VWF:Ac Siemens
46	67	45

Tableau 15 Résultats obtenus pour l'échantillon exclu de l'analyse statistique

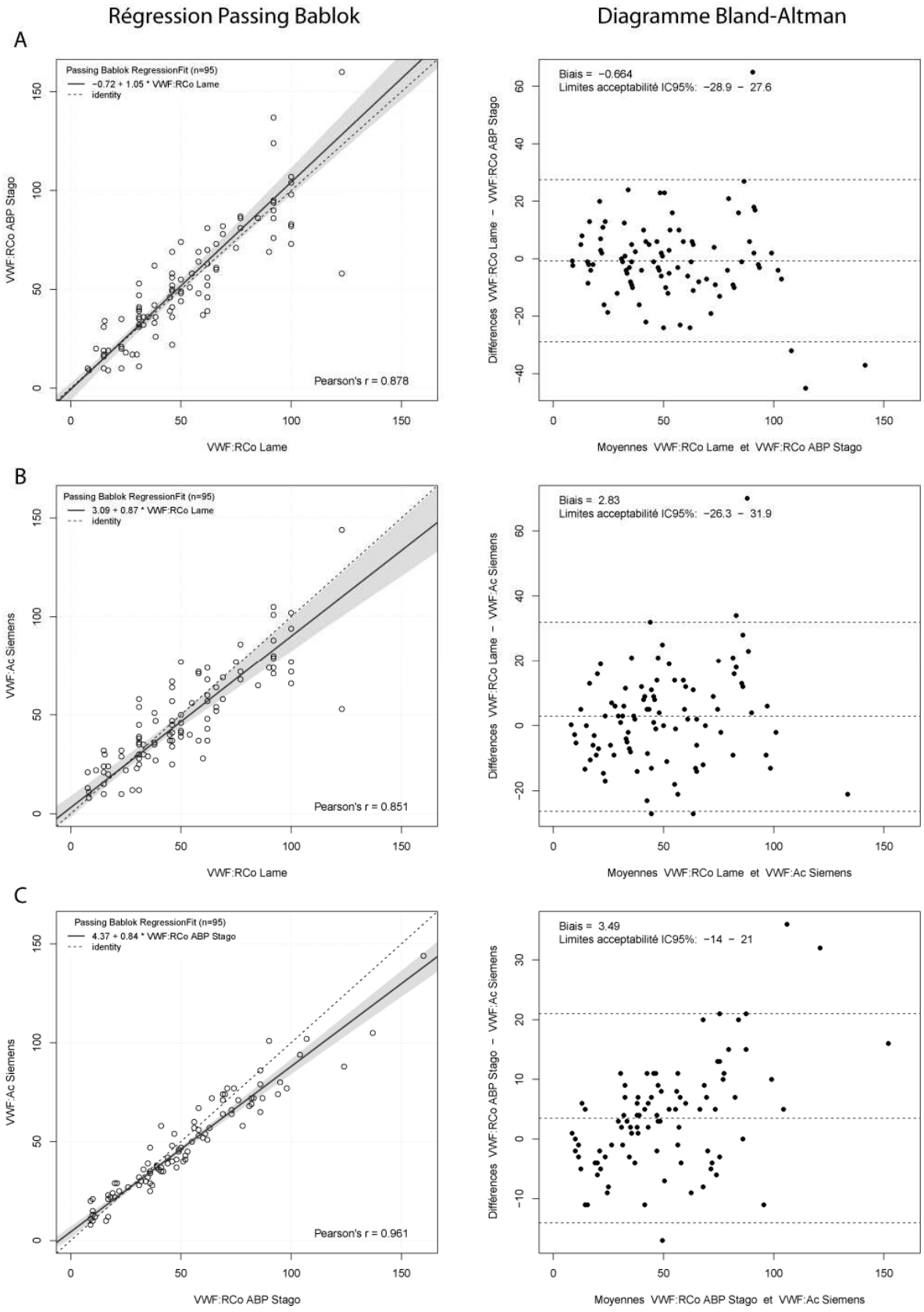


Figure 17 Régression Passing Bablok et diagramme de Bland-Altman. A) Comparaison VWF:RCo Lame et VWF:RCo ABP Stago. B) Comparaison VWF:RCo Lame et VWF:Ac Siemens. C) Comparaison VWF:RCo ABP Stago et VWF:Ac Siemens

DISCUSSION

1. Analyse statistique

La sélection de plasmas testés a permis de couvrir l'ensemble de la gamme de mesure des méthodes comparées, notamment dans les valeurs basses d'activité VWF.

Le coefficient de corrélation de Pearson était supérieur à 0.70 dans les 3 comparaisons, montrant une relation linéaire forte entre les différentes méthodes. Ce résultat était attendu(65) puisqu'il s'agit du dosage d'un même mesurande par différentes méthodes. Le coefficient de corrélation était significativement supérieur entre les deux méthodes automatisées, avec r = 0.961 (IC 95%: 0.942-0.974).

La régression de Passing Bablok n'a pas mis en évidence de biais systématique entre le dosage en technique manuelle et les techniques automatisées respectivement. En revanche, un biais systématique était présent entre les deux techniques automatisées (IC95% de l'interception excluant 0). Un biais proportionnel n'a pas été mis en évidence entre la technique manuelle et les techniques automatisées respectivement. Un biais proportionnel était présent entre les deux techniques automatisées (IC95% de la pente excluant 1).

Visuellement, les diagrammes de Bland-Altman n'ont pas montré de motif particulier dans la répartition des points. La qualité de l'accord entre la méthode manuelle sur lame et la technique automatisée VWF:RCo ABP Stago était très élevée, avec un seul point en dehors des limites d'acceptabilité pour la gamme 0-100%. La qualité de l'accord entre la méthode manuelle et la technique automatisée VWF:Ac Siemens était en deçà mais acceptable, avec 5 points en dehors des limites d'acceptabilité sur la gamme 0-100%. La qualité de l'accord entre les deux méthodes automatisées était également acceptable.

Concernant le seul point hors limites d'acceptabilité dans la comparaison de la technique manuelle et la technique automatisée VWF:RCo ABP Stago, il est intéressant de noter que ce point était également hors limites d'acceptabilité pour la méthode VWF:Ac Siemens. Le prélèvement présentait, au final, les résultats suivants:

VWF:RCo lame (initial)	VWF:RCo lame	VWF:Ag (initial)	STA-Liatest VWF:Ag	VWF:RCo ABP Stago	VWF:Ac Siemens
NR	123	126	64	58	53

Tableau 16 Résultats obtenus pour l'échantillon hors limites d'acceptabilité (en %). NR: Non réalisé

Le prélèvement avait été conservé de façon similaire aux autres prélèvements, avec une durée de conservation de 2.5 mois. Les résultats obtenus par les trois techniques ont été vérifiés. Le VWF:Ag a été redosé, montrant une nette diminution sans qu'il ne soit trouvé d'explication. Les dosages automatisés concordaient avec le dernier dosage du VWF:Ag.

2. Analyse des résultats hors analyse principale

Dans les 14 échantillons séparés de l'analyse statistique, 9 présentaient au moins un dosage supérieur au domaine de mesure d'une des méthodes et 5 échantillons présentaient au moins un dosage inférieur au domaine de mesure d'une des méthodes. Dans les deux cas, les résultats donnés par les autres méthodes étaient concordant.

La technique limitante dans les valeurs hautes était majoritairement la technique manuelle. Cependant, l'intérêt de prolonger les dilutions plus loin que 1/160 en agglutination sur lame ne présente que peu d'intérêt, le dosage étant de fait supérieur à 100% (la valeur exacte dépend du titre du lot utilisé) et donc normal.

La technique limitante dans les valeurs basses était majoritairement la technique automatisée VWF:RCo ABP Stago. Contrairement aux valeurs hautes, il est intéressant de disposer d'un domaine de mesure descendant le plus bas possible afin de pouvoir doser l'activité des VWD sévères.

3. Evaluation de chaque technique de dosage

3.1. Technique manuelle (coffret Siemens VWF Reagent)

La méthode de dosage manuelle sur lame a montré une pénibilité certaine lors de ces grandes séries, avec notamment 21 échantillons lors de la dernière journée d'essais. Le temps technicien conséquent imposait de détacher une technicienne référente de l'activité spécialisée afin de réaliser les essais de comparaison.

3.2. Technique automatisée VWF:RCo ABP Stago

Lorsque les tests ont été réalisés, la méthode de dosage proposée par Stago était encore en phase d'essais et le coffret fourni était identique au coffret commercialisé directement par ABP. L'application suggérée fournie par Stago donnant des instructions de reconstitution et

d'usage différents, notamment sur les volumes de reconstitution différents de ceux indiqués sur les flacons, le risque d'erreur lors de la préparation des réactifs n'était pas négligeable. La nécessité de pooler les flacons (plaquettes et ristocétine) augmentait également le nombre de manipulations lors de la préparation des réactifs.

Le coffret n'appartenant pas à la gamme STA de Stago, l'introduction des réactifs à bord de l'automate était relativement fastidieuse du fait de l'absence de codes-à-barres sur les flacons et des volumes de réactifs à modifier manuellement à l'introduction.

Concernant la rapidité de mise en œuvre et la notion d'urgence, la méthode de dosage ABP Stago s'est révélée inadaptée. En effet, en prenant en compte le temps de remise à température ambiante, le temps de stabilisation des réactifs après reconstitution et celui de préparation de l'automate, il fallait compter au minimum 80 minutes avant de pouvoir analyser un plasma de patient, soit un rendu de résultat au mieux en 90 minutes. Même si la situation ne s'est pas présentée lors des essais, il aurait été délicat de décider de la conduite à tenir en cas de contrôle qualité hors limites d’acceptabilité du fait des temps de reconau vu du temps de mise en œuvre et du nombre limité de tests réalisable par coffret, il est délicat de choisir entre la réalisation d'une nouvelle calibration et la reconstitution d'un nouveau coffret.

La solution proposée par Stago concernant les contrôles internes de qualité était peu satisfaisante. Pour rappel, il s'agissait d'utiliser un plasma pathologique de niveau bas intégré au coffret et un plasma de niveau normal appartenant à la gamme de contrôles LIA (Stago STA-Liatest Control N). Les bornes d'acceptabilité étaient fixées, larges et indépendantes du lot du coffret dans le cas du contrôle pathologiques, et non fournies dans le cas du niveau normal.

La conservation des réactifs à bord de l'automate était très réduite, avec une durée maximale de 4 heures tant pour les plaquettes stabilisées que pour la ristocétine.

La limite inférieure de quantification était élevée, à 9%, empêchant un résultat précis du dosage de l’activité dans les VWD sévères.

3.3. Technique automatisée Siemens INNOVANCE VWF:Ac

Contrairement au coffret VWF:RCo ABP Stago, le coffret Siemens Innovance VWF:AC s'est montré plus simple à mettre en œuvre du fait de réactifs prêts à l'emploi. Cependant, l'absence

de codes-à-barres sur les flacons imposait une saisie manuelle des codes réactifs ainsi que des numéros de lots.

La solution proposée par Siemens concernant les contrôles internes de qualité était satisfaisante. Pour rappel, il s'agissait d'utiliser des contrôles qualité externes au coffret, avec des bornes d'acceptabilité fournies. Par ailleurs, ces CIQ étaient déjà en usage comme CIQ de la méthode manuelle.

Le délai de rendu des résultats était inférieur à la technique VWF:RCo ABP Stago, avec un premier résultat obtenable en moins de 40 minutes.

La limite inférieure de quantification de l'activité était plus basse, avec une quantification réalisable jusque 3,3%.

4. Assurance Qualité

La norme NF EN ISO 15189 impose au Laboratoire de Biologie Médicale impose de parvenir à l'accréditation de 100% des analyses réalisées d'ici à 2020. Le marquage CE-IVD des réactifs d'une analyse permet l'accréditation de cette analyse en portée A où une simple vérification des performances sur site est demandée. L'absence de ce marquage impose au contraire une demande d'accréditation en portée B où une validation de la méthode est nécessaire. La validation de méthode est plus contraignante et fastidieuse du fait de nombreux points à valider : linéarité, interférences, limites de détection, stabilité, en plus des points en commun avec la vérification de méthode.

Aucun des coffrets utilisé dans cette comparaison ne dispose d'un tel marquage CE-IVD.

5. Transmission informatique au SIL

La réalisation de l'analyse sur automate offre la possibilité de transmettre de façon informatique le résultat au SIL (Système Informatique de gestion du Laboratoire). Cependant, en l'état actuel de paramétrage et du fait de la nécessité de dilutions indépendantes pour couvrir la gamme de mesure, il n'était pas possible d'utiliser cette transmission informatique pour les méthodes automatisées testées.

6. Limites

La vérification de l'aspect de l'échantillon était simplement visuelle, sans mesure automatisée de l'indice d'hémolyse, d'ictère ou de lactescence (H.I.L.). Dans la mesure où les principes analytiques des méthodes automatisées sont basés sur la D.O., il serait utile de s'intéresser à l'influence de l'aspect de l'échantillon sur le dosage.

La stabilité de la calibration n'a pas été étudiée du fait d'une période d'essai insuffisamment longue et de l'absence de lot unique pour les méthodes automatisées.

La variabilité inter-opérateur n'a pas été étudiée pour aucune des techniques.

La Nomenclature des Actes de Biologie Médical (version 43 du 11/04/2016) donne une cotation de B50 pour le dosage fonctionnel du VWF (code 192). La valeur du B actuelle est de 0,27€, donnant un remboursement de 13,50€ HT par la Sécurité Sociale. Il n'a pas été possible d'obtenir de tarif des différents coffrets de réactifs auprès du service achat du CHU d'Amiens, rendant une analyse du seuil de rentabilité impossible.

CONCLUSION

Les différentes méthodes automatisées ont montré une corrélation et une concordance satisfaisante avec la méthode de référence manuelle, avec une supériorité pour la méthode VWF:RCo ABP Stago. La technique automatisée Siemens INNOVANCE VWF:Ac s'est montrée supérieure à la méthode ABP Stago au niveau de la limite inférieure de quantification ainsi que pour la praticité d'usage du fait de l'utilisation de réactifs prêts à l'emploi. Le délai de rendu des résultats était significativement allongé pour le coffret VWF:RCo ABP Stago en rapport avec un temps de préparation du coffret conséquent. Dans les deux techniques automatisées, la faible durée de stabilité des réactifs à bord de l'automate imposait de travailler en série. Aucun des coffrets ne disposait d'un marquage CE-IVD, imposant de ce fait une portée B pour l'accréditation de l'analyse par le COFRAC. Aucune des techniques automatisées n'a véritablement montré d'intérêt pour la réalisation d'un dosage isolé ou urgent de l'activité du facteur Willebrand mais ces deux techniques ont montré une praticité évidente lors de la réalisation de grandes séries.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Rodeghiero F, Castaman G, Dini E. Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease. Blood. 1987 Feb 1;69(2):454–9.

2. Werner EJ, Broxson EH, Tucker EL, Giroux DS, Shults J, Abshire TC. Prevalence of von Willebrand disease in children: A multiethnic study. J Pediatr. 1993 Dec 1;123(6):893–8.

3. Sadler JE. New concepts in von Willebrand disease. Annu Rev Med. 2005;56:173–91.

4. Willebrand EAV. Hereditary pseudohaemophilia. Haemophilia. 1999 May 1;5(3):223–31.

5. Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. Annu Rev Biochem. 1998;67:395–424.

6. Wagner DD, Olmsted JB, Marder VJ. Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. J Cell Biol. 1982 Oct;95(1):355–60.

7. Sporn LA, Chavin SI, Marder VJ, Wagner DD. Biosynthesis of von Willebrand protein by human megakaryocytes. J Clin Invest. 1985 Sep;76(3):1102–6.

8. Lenting PJ, Christophe OD, Denis CV. von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends. Blood. 2015 Mar 26;125(13):2019–28.

9. Sadler JE. von Willebrand factor: two sides of a coin. J Thromb Haemost JTH. 2005 Aug;3(8):1702–9.

10. Furlan M. Von Willebrand factor: molecular size and functional activity. Ann Hematol. 1996 Jun;72(6):341–8.

11. Wagner DD. Cell biology of von Willebrand factor. Annu Rev Cell Biol. 1990;6:217–46.

12. Hannah MJ, Williams R, Kaur J, Hewlett LJ, Cutler DF. Biogenesis of Weibel-Palade bodies. Semin Cell Dev Biol. 2002 Aug;13(4):313–24.

13. Erent M, Meli A, Moisoi N, Babich V, Hannah MJ, Skehel P, et al. Rate, extent and concentration dependence of histamine-evoked Weibel–Palade body exocytosis determined from individual fusion events in human endothelial cells. J Physiol. 2007 Aug 15;583(Pt 1):195–212.

14. Italiano JE, Battinelli EM. Selective sorting of alpha-granule proteins. J Thromb Haemost JTH. 2009 Jul;7 Suppl 1:173–6.

15. Nightingale T, Cutler D. The secretion of von Willebrand factor from endothelial cells; an increasingly complicated story. J Thromb Haemost JTH. 2013 Jun;11 Suppl 1:192–201.

16. Vischer UM, Barth H, Wollheim CB. Regulated von Willebrand factor secretion is associated with agonist-specific patterns of cytoskeletal remodeling in cultured endothelial cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000 Mar;20(3):883–91.

17. Kaufmann JE, Oksche A, Wollheim CB, Günther G, Rosenthal W, Vischer UM. Vasopressin-induced von Willebrand factor secretion from endothelial cells involves V2 receptors and cAMP. J Clin Invest. 2000 Jul 1;106(1):107–16.

18. Bryckaert M, Rosa J-P, Denis CV, Lenting PJ. Of von Willebrand factor and platelets. Cell Mol Life Sci. 2015;72:307–26.

19. Blair P, Flaumenhaft R. Platelet α–granules: Basic biology and clinical correlates. Blood Rev. 2009 Jul;23(4):177–89.

20. Wang J-W, Groeneveld DJ, Cosemans G, Dirven RJ, Valentijn KM, Voorberg J, et al. Biogenesis of Weibel-Palade bodies in von Willebrand's disease variants with impaired von Willebrand factor intrachain or interchain disulfide bond formation. Haematologica. 2012 Jun;97(6):859–66.

21. Zhou Y-F, Eng ET, Zhu J, Lu C, Walz T, Springer TA. Sequence and structure relationships within von Willebrand factor. Blood. 2012 Jul 12;120(2):449–58.

22. Siedlecki CA, Lestini BJ, Kottke-Marchant KK, Eppell SJ, Wilson DL, Marchant RE. Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. Blood. 1996 Oct 15;88(8):2939–50.

23. Roth GJ. Developing relationships: arterial platelet adhesion, glycoprotein Ib, and leucine-rich glycoproteins. Blood. 1991 Jan 1;77(1):5–19.

24. Kroll MH, Harris TS, Moake JL, Handin RI, Schafer AI. von Willebrand factor binding to platelet GpIb initiates signals for platelet activation. J Clin Invest. 1991 Nov;88(5):1568–73.

25. Yin H, Liu J, Li Z, Berndt MC, Lowell CA, Du X. Src family tyrosine kinase Lyn mediates VWF/GPIb-IX-induced platelet activation via the cGMP signaling pathway. Blood. 2008 Aug 15;112(4):1139–46.

26. De Marco L, Girolami A, Zimmerman TS, Ruggeri ZM. von Willebrand factor interaction with the glycoprotein IIb/IIa complex. Its role in platelet function as demonstrated in patients with congenital afibrinogenemia. J Clin Invest. 1986 Apr;77(4):1272–7.

27. Hilbert L, Jorieux S, Fontenay-Roupie M, Guicheteau M, Fressinaud E, Meyer D, et al. Expression of two type 2N von Willebrand disease mutations identified in exon 18 of von Willebrand factor gene. Br J Haematol. 2004 Oct;127(2):184–9.

28. Lenting PJ, van Mourik JA, Mertens K. The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. Blood. 1998 Dec 1;92(11):3983–96.

29. Koedam JA, Meijers JC, Sixma JJ, Bouma BN. Inactivation of human factor VIII by activated protein C. Cofactor activity of protein S and protective effect of von Willebrand factor. J Clin Invest. 1988 Oct;82(4):1236–43.

30. Tuddenham EG, Lane RS, Rotblat F, Johnson AJ, Snape TJ, Middleton S, et al. Response to infusions of polyelectrolyte fractionated human factor VIII concentrate in human haemophilia A and von Willebrand's disease. Br J Haematol. 1982 Oct;52(2):259–67.

31. Dong J, Moake JL, Nolasco L, Bernardo A, Arceneaux W, Shrimpton CN, et al. ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. Blood. 2002 Dec 1;100(12):4033–9.

32. Nichols WL, Hultin MB, James AH, Manco-Johnson MJ, Montgomery RR, Ortel TL, et al. von Willebrand disease (VWD): evidence-based diagnosis and management guidelines, the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Expert Panel report (USA). Haemoph Off J World Fed Hemoph. 2008 Mar;14(2):171–232.

33. O'Donnell J, Laffan MA. The relationship between ABO histo-blood group, factor VIII and von Willebrand factor. Transfus Med Oxf Engl. 2001 Aug;11(4):343–51.

34. Gill JC, Endres-Brooks J, Bauer PJ, Marks WJ, Montgomery RR. The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease. Blood. 1987 Jun;69(6):1691–5.

35. Jenkins PV, O'Donnell JS. ABO blood group determines plasma von Willebrand factor levels: a biologic function after all? Transfusion (Paris). 2006 Oct;46(10):1836–44.

36. Albánez S, Ogiwara K, Michels A, Hopman W, Grabell J, James P, et al. Aging and ABO blood type influence von Willebrand factor and factor VIII levels through interrelated mechanisms. J Thromb Haemost JTH. 2016 May;14(5):953–63.

37. Rydz N, Grabell J, Lillicrap D, James PD. Changes in von Willebrand factor level and von Willebrand activity with age in type 1 von Willebrand disease. Haemoph Off J World Fed Hemoph. 2015 Sep;21(5):636–41.

38. Kadir RA, Economides DL, Sabin CA, Owens D, Lee CA. Variations in coagulation factors in women: effects of age, ethnicity, menstrual cycle and combined oral contraceptive. Thromb Haemost. 1999 Nov;82(5):1456–61.

39. Miller CH, Haff E, Platt SJ, Rawlins P, Drews CD, Dilley AB, et al. Measurement of von Willebrand factor activity: relative effects of ABO blood type and race. J Thromb Haemost JTH. 2003 Oct;1(10):2191–7.

40. Kluft C, Leuven JAG, Helmerhorst FM, Krans HMJ. Pro-inflammatory effects of oestrogens during use of oral contraceptives and hormone replacement treatment. Vascul Pharmacol. 2002 Aug;39(3):149–54.

41. Sié P, Caron C, Azam J, Goudemand J, Grandjean H, Boneu B, et al. Reassessment of von Willebrand factor (VWF), VWF propeptide, factor VIII:C and plasminogen activator inhibitors 1 and 2 during normal pregnancy. Br J Haematol. 2003 Jun;121(6):897–903.

42. Baumgartner-Parzer SM, Wagner L, Reining G, Sexl V, Nowotny P, Müller M, et al. Increase by tri-iodothyronine of endothelin-1, fibronectin and von Willebrand factor in cultured endothelial cells. J Endocrinol. 1997 Aug;154(2):231–9.

43. Liu J, Liang Q, Frost-Pineda K, Muhammad-Kah R, Rimmer L, Roethig H, et al. Relationship between biomarkers of cigarette smoke exposure and biomarkers of inflammation, oxidative stress, and platelet activation in adult cigarette smokers. Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol. 2011 Aug;20(8):1760–9.

44. van Loon JE, Sonneveld MAH, Praet SFE, de Maat MPM, Leebeek FWG. Performance related factors are the main determinants of the von Willebrand factor response to exhaustive physical exercise. PloS One. 2014;9(3):e91687.

45. Favaloro EJ, Bonar RA, Meiring M, Duncan E, Mohammed S, Sioufi J, et al. Evaluating errors in the laboratory identification of von Willebrand disease in the real world. Thromb Res. 2014 Aug;134(2):393–403.

46. James AH, Eikenboom J, Federici AB. State of the art: von Willebrand disease. Haemoph Off J World Fed Hemoph. 2016 Jul;22 Suppl 5:54–9.

47. Sadler JE, Budde U, Eikenboom JCJ, Favaloro EJ, Hill FGH, Holmberg L, et al. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. J Thromb Haemost JTH. 2006 Oct;4(10):2103–14.

48. Raut S, Hubbard AR. International reference standards in coagulation. Biol J Int Assoc Biol Stand. 2010 Jul;38(4):423–9.

49. Howard MA, Firkin BG. Ristocetin--a new tool in the investigation of platelet aggregation. Thromb Diath Haemorrh. 1971 Oct 31;26(2):362–9.

50. Hillarp A, Stadler M, Haderer C, Weinberger J, Kessler CM, Römisch J. Improved performance characteristics of the von Willebrand factor ristocetin cofactor activity assay using a novel automated assay protocol. J Thromb Haemost JTH. 2010 Oct;8(10):2216–23.

51. Flood VH, Friedman KD, Morateck PA, Wren JS, Scott JP, Montgomery RR. Limitations of the Ristocetin Cofactor Assay in Measurement of VWF Function. J Thromb Haemost JTH [Internet]. 2009 Nov [cited 2016 Jul 3];7(11). Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3825106/

52. Flood VH, Wren JS, Haberichter SL, Friedman KD, Bellissimo DB, Gill JC, et al. Low VWF:RCo In Subjects with VWF Polymorphisms D1472H and P1467S Due to Decreased Binding of Ristocetin to the VWF A1 Domain. Blood. 2010 Nov 19;116(21):2208–2208.

53. Paniccia R, Priora R, Liotta AA, Abbate R. Platelet function tests: a comparative review. Vasc Health Risk Manag. 2015;11:133–48.

54. Huang EM, Detwiler TC. Characteristics of the synergistic actions of platelet agonists. Blood. 1981 Apr 1;57(4):685–91.

55. Kundu SK, Heilmann EJ, Sio R, Garcia C, Davidson RM, Ostgaard RA. Description of an in vitro platelet function analyzer--PFA-100. Semin Thromb Hemost. 1995;21 Suppl 2:106–12.

56. Veyradier A, Fressinaud Ã, Goudemand J, Meyer D. La maladie de Willebrand. HÃ©matologie. 2011 Oct 1;17(4):278–88.

57. Schneppenheim R., Obser T., Budde U., Patzke J. Development of a new functional assay for von Willebrand factor binding to platelet GPIba that does not require ristocetin. Abstract FC4-05 of the 54th Annual Meeting of the GTH.

58. Othman M. Platelet-type Von Willebrand disease: three decades in the life of a rare bleeding disorder. Blood Rev. 2011 Jul;25(4):147–53.

59. Russell SD, Roth GJ. Pseudo-von Willebrand disease: a mutation in the platelet glycoprotein Ib alpha gene associated with a hyperactive surface receptor. Blood. 1993 Apr 1;81(7):1787–91.

60. Weiss HJ, Meyer D, Rabinowitz R, Pietu G, Girma JP, Vicic WJ, et al. Pseudo-von Willebrand's disease. An intrinsic platelet defect with aggregation by unmodified human factor VIII/von Willebrand factor and enhanced adsorption of its high-molecular-weight multimers. N Engl J Med. 1982 Feb 11;306(6):326–33.

61. Giavarina D. Understanding Bland Altman analysis. Biochem Medica. 2015 Jun 5;25(2):141–51.

62. Bland JM, Altman DG. Measuring agreement in method comparison studies. Stat Methods Med Res. 1999 Jun;8(2):135–60.

63. Bablok W, Passing H. Application of statistical procedures in analytical instrument testing. J Autom Chem. 1985;7(2):74–9.

64. Bilić-Zulle L. Comparison of methods: Passing and Bablok regression. Biochem Medica. 2011;21(1):49–52.

65. Mukaka M. A guide to appropriate use of Correlation coefficient in medical research. Malawi Med J J Med Assoc Malawi. 2012 Sep;24(3):69–71.

ANNEXES

0192	**Dosage fonctionnel du facteur Willebrand par mesure de l'activité cofacteur de la ristocétine (ou autre méthode évaluant la liaison à la glycoprotéine Ib plaquettaire)**	B 50

En cas de prescription : « diagnostic (ou recherche) de maladie de Willebrand », le biologiste peut effectuer et coter le dosage du facteur Willebrand, de préférence le dosage fonctionnel (0192) en première intention (pour dépister les déficits quantitatifs et qualitatifs), ainsi que le dosage du facteur VIII (0178). Les résultats doivent être interprétés en fonction du groupe sanguin ABO du patient.

En cas de dosage fonctionnel du facteur Willebrand diminué ou proche de la borne inférieure des valeurs de référence, le biologiste peut effectuer et coter en deuxième intention le dosage immunologique du facteur Willebrand (1013).

Une conclusion interprétant les résultats doit figurer sur le compte rendu.

1013	**Dosage immunologique du facteur Willebrand**	B 40

Technique complémentaire du dosage fonctionnel, le dosage immunologique ne peut être réalisé qu'en deuxième intention, lorsque l'activité du facteur Willebrand (0192) est diminuée ou proche de la borne inférieure des valeurs de référence.

Les résultats doivent être interprétés en fonction du groupe sanguin ABO du patient.
Une conclusion interprétant les résultats doit figurer sur le compte rendu.

Annexe 1 Nomenclature des Actes de Biologie Médicale - Avril 2016

TEST FONCTIONNEL PLAQUETTAIRE

Informations du patient

Nom :
Né(e) le :
Opérateur :

Prénom :
Sexe :
Date : 12:05-04/06/2016

Informations :

Courbe N°1 : RISTO 1.5
Courbe N°2 : RISTO 1
Courbe N°3 : RISTO 0.5
Courbe N°4 : RISTO 0.25

Courbe N°5 :
Courbe N°6 :
Courbe N°7 :
Courbe N°8 :

Numeration Plaquettaire : G/L

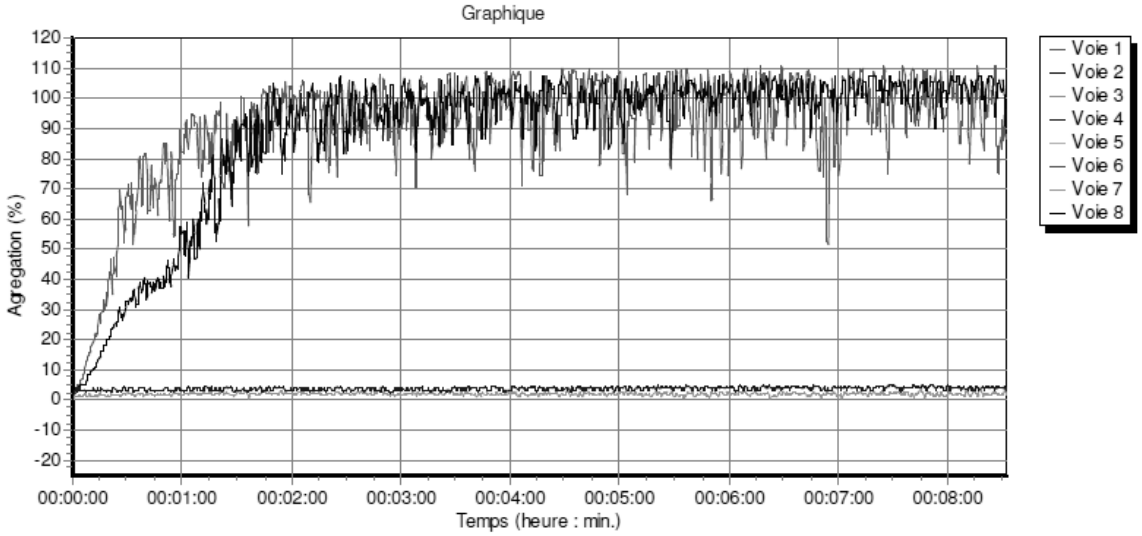


TABLEAU DES RESULTATS

Voie	Latence	Vél. manu	Vél. S. auto	Vél. auto	Agrég 3 min	Agrég 6 min.	Agrég max	Surf. 4 min
1	5.00	nc.	nc.	168.60	91.69	94.59	104.30	321.81
2	5.00	nc.	nc.	85.87	97.92	104.90	107.28	288.30
3	5.00	nc.	nc.	8.62	2.50	2.08	61.25	21.90
4	5.00	nc.	nc.	6.47	3.45	3.98	49.32	25.04
5	nc.	nc.	nc.	nc.	nc.	nc.	nc.	nc.
6	nc.	nc.	nc.	nc.	nc.	nc.	nc.	nc.
7	nc.	nc.	nc.	nc.	nc.	nc.	nc.	nc.
8	nc.	nc.	nc.	nc.	nc.	nc.	nc.	nc.

Annexe 2 Exemple rendu de résultat de test RIPA

Stago

Application Suggérée

INNOVANCE® VWF Ac

(SIEMENS)

Détermination de l'activité du facteur von Willebrand

STA-R® / STA-R Evolution®

REF OPHL

☐ REACTIF

- Coffret INNOVANCE® VWF Ac (REF OPHL) *(SIEMENS)*
  3 x 2 ml INNOVANCE® VWF Ac, REAGENT I
  3 x 3.5 ml INNOVANCE® VWF Ac, REAGENT II
  1 x 2.5 ml INNOVANCE® VWF Ac, REAGENT III

☐ REACTIF AUXILLIAIRE

- STA®-OWREN-KOLLER (REF 00360) *(STAGO)*

☐ MATERIEL AUXILLIAIRE

- STA®-MICROCUPS (REF 00802) *(STAGO)*

☐ ECHANTILLON

- Plasma citraté pur

☐ CALIBRATION

- Plasma standard humain (REF ORKL 13) *(SIEMENS)*

☐ CONTROLE DE QUALITE

- Plasma de contrôle N (REF ORKE 41)
- Plasma de contrôle P (REF OUPZ 17) *(SIEMENS)*

☐ PREPARATION ET CONSERVATION

REACTIF I (Latex)

Se référer à la notice technique incluse dans le coffret.
Pour utilisation sur STA-R® / STA-R Evolution®, diluer le réactif au 1/6 en eau distillée : soit, par exemple, 1 ml de Latex et 5 ml d'eau distillée.
Positionner ensuite le flacon en Zone R2 - Tiroir produits.

REACTIF II (Buffer)

Réactif prêt à l'emploi.
Se référer à la notice technique incluse dans le coffret.
Positionner le flacon en Zone R1 - Tiroir produits.

REACTIF III (GP1b)

Réactif prêt à l'emploi.
Se référer à la notice technique incluse dans le coffret.
Positionner le flacon en Zone R1 - Tiroir produits.

STA®-Owren Koller

Flacon de 15 ml prêt à l'emploi.
Se référer à la notice technique incluse dans le coffret.
Positionner le flacon en Zone R0 - Tiroir produits.

Plasma Standard Humain (PSH)

Se référer à la notice technique incluse dans le coffret.
Transvaser dans un STA®-Microcups puis positionner le flacon en Zone R0 - Tiroir produits.

Plasma de Contrôle N

Se référer à la notice technique incluse dans le coffret.
Le plasma de Contrôle **N** sera traité comme échantillon et **dosé avec la configuration de test dépendant au 1/6 (VWFAC1/6).**

Plasma de Contrôle P (PCP)

Se référer à la notice technique incluse dans le coffret.
Transvaser le flacon dans un STA®-Microcups puis positionner le flacon en Zone R0 - Tiroir produits.
Le plasma de Contrôle P sera traité comme un Contrôle de Qualité dans la configuration du test principal.

Ce protocole est suggéré par Diagnostica Stago comme une aide au laboratoire désirant utiliser le réactif concerné sur l'analyseur indiqué ci-dessus. Les utilisateurs assument la responsabilité totale de la validation des résultats obtenus avec ce protocole, en suivant les règles en vigueur relatives aux réactifs in vitro. Diagnostica Stago ne pourra être tenu responsable des conséquences dommageables qui pourraient survenir à l'occasion de l'application de ce protocole.

Annexe 3 Application Suggérée par Stago pour le coffret Siemens INNOVANCE VWF Ac

Stago

Application Suggérée

ABP VWF RICOF ASSAY *(ABP INC)*

Determination de l'activité du facteur von Willebrand

STA-R® / STA-R Evolution®

REF 01085 (Stago)
REF ABP-RCof+2 (ABP)

☐ REACTIFS

- ABP VWF RICOF ASSAY
  REF 01085 (Stago)
  REF ABP-RCof+2 (ABP)
  4 x 3 mL Plaquettes lyophilisées, Réactif I
  4 x 10 mg Ristocétine lyophilisée, Réactif II
  2 x 25 mL Tampon TBS, Réactif III

☐ REACTIF AUXILLIAIRE

- STA®-OWREN-KOLLER (REF 00360) *(STAGO)*

☐ MATERIEL AUXILLAIRE

- STA®-MICROCUPS (REF 00802) *(STAGO)*
- Barreau aimanté (REF 27425) *(STAGO)*

☐ ECHANTILLON

- Plasma citraté

☐ CALIBRATION

- Reference plasma : plasma de calibration *(ABP)*, Réactif IV

☐ CONTROLE DE QUALITE

- Abnormal control plasma : plasma de contrôle pathologique *(ABP)*, Réactif V

☐ PREPARATION ET CONSERVATION

Laisser les réactifs I à V revenir à température ambiante (15-25°C) pendant 30 min.

REACTIF I (PLATELET)
Reconstituer le réactif avec **3 mL** de tampon TBS, (Réactif III).
Laisser la solution se stabiliser 15 min. minimum sur la paillasse (15-25°C). Agiter doucement par retournement (3 à 4 fois), **pooler deux flacons, puis mettre un barreau aimanté blanc (Réf. 27425).**
Positionner immédiatement le flacon en Zone R1 avec agitation magnétique -Tiroir produits.

REACTIF II (RISTOCETIN)
Reconstituer le réactif avec **1.2 mL** d'eau distillée.
Laisser la solution se stabiliser 15 min. minimum sur la paillasse (15-25°C). Homogénéiser doucement, **pooler deux flacons.**
Positionner immédiatement en Zone R2 – Tiroir produits.

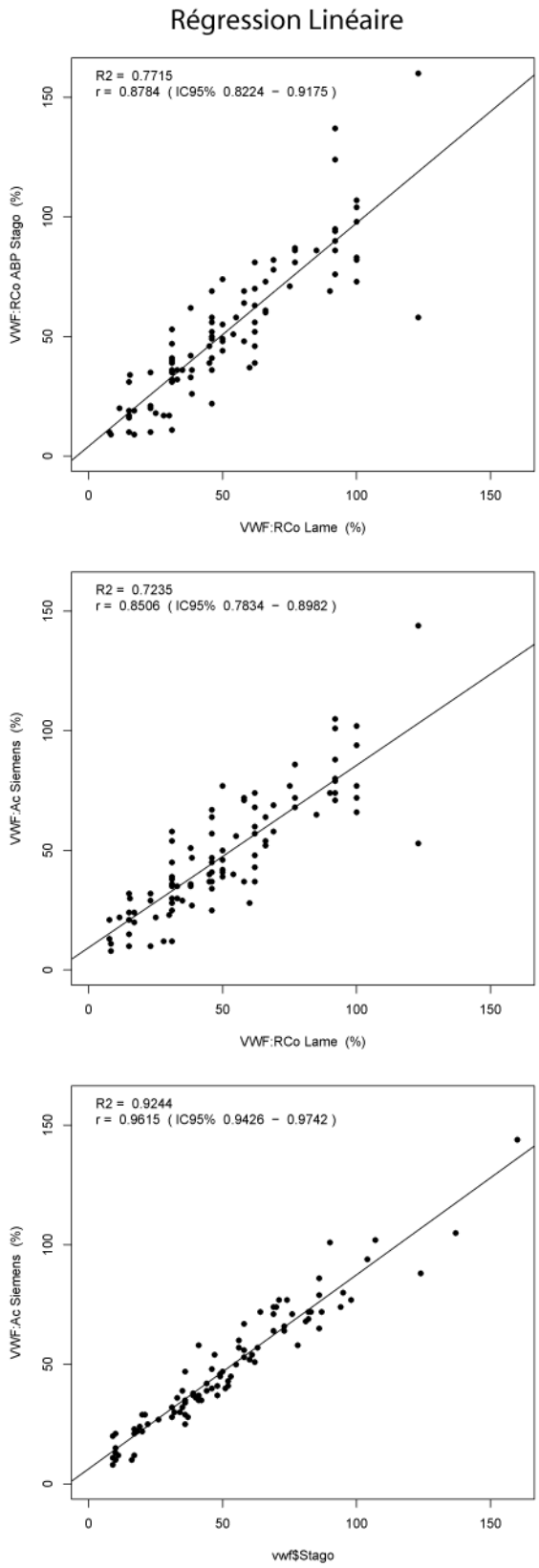
STA®-Owren Koller
Flacon prêt à l'emploi.
Positionner le flacon en Zone R0 – Tiroir produits.

REACTIF IV (Reference plasma)
Reconstituer le réactif avec **1 mL** d'eau distillée.
Laisser la solution se stabiliser 30 min. sur la paillasse (15-25°C). Homogénéiser avant emploi, vérifier l'absence de bulles.
Positionner en Zone R0 – Tiroir produits.

REACTIF V (Abnormal control plasma)
Reconstituer le réactif avec **0.5 mL** d'eau distillée.
Laisser la solution se stabiliser 30 min. sur la paillasse (15-25°C). Homogénéiser avant emploi, **transvaser le contenu du flacon dans un STA®-Microcups**, vérifier l'absence de bulles puis positionner en Zone R0 – Tiroir produits.
Modifier le volume indiqué au moment du chargement de 1 mL en 0.5 mL.

Ce protocole est suggéré par Diagnostica Stago comme une aide au laboratoire désirant utiliser le réactif concerné sur l'analyseur indiqué ci-dessus. Les utilisateurs assument la responsabilité totale de la validation des résultats obtenus avec ce protocole, en suivant les règles en vigueur relatives aux réactifs in vitro. Diagnostica Stago ne pourra être tenu responsable des conséquences dommageables qui pourraient survenir à l'occasion de l'application de ce protocole.

Annexe 4 Application Suggérée par Stago pour la technique VWF:RCo ABP Stago



Annexe 5 Régression linéaire et coefficient de corrélation de Pearson

VWF:RCo Lame	VWF:RCo ABP Stago	VWF:Ac Siemens
25	18	22
92	90	101
92	86	79
28	17	12
31	39	38
15	31	32
58	69	71
31	41	58
15	10	15
11,5	20	22
46	58	67
38,5	36	47
7,7	10	21
46	69	64
77	87	72
15	16	10
7,7	10	13
31	40	36
31	47	54
31	11	12
46	52	41
31	36	25
46	50	47
31	53	45
77	86	86
46	41	37
62	46	48
62	52	43
62	70	74
31	35	39
69	78	58
31	41	35
38,5	26	27
15	17	21
38	42	35
38	62	51
23	20	29
92	124	88
62	63	57
46	49	45
60	37	28
92	94	74
46	36	34
85	86	65
69	82	69
15	19	24
92	76	71
31	31	28
54	51	40

123	160	144
46	22	25
23	21	29
123	58	53
92	95	80
46	56	57
38	33	36
30	17	23
62	81	68
92	137	105
77	81	68
15,4	34	30
23	35	32
62	39	37
31	32	30
8,3	9	11
33	32	30
35	36	29
17	19	24
45	46	40
66	73	64
100	98	77
100	83	72
8,3	9	8
100	73	66
50	44	39
45	39	37
100	107	102
17	9	20
66	60	52
100	82	72
62	56	60
66	61	54
75	71	77
50	44	42
50	48	41
58	64	72
33	36	35
55	58	56
50	55	50
23	10	10
50	49	46
50	74	77
58	48	37
100	104	94
90	69	74

Annexe 6 Résultats de l'analyse statistique principale

RESUME

Mots clés: facteur von Willebrand, comparaison de méthodes, activité cofacteur de la ristocétine, maladies hémorragiques

La maladie de Willebrand est la plus fréquente des maladies hémorragiques héréditaires, affectant environ 1% de la population générale. Elle a pour origine une anomalie quantitative (partielle ou totale) ou qualitative du facteur von Willebrand, entrainant des manifestations hémorragiques principalement cutanéomuqueuses. Le diagnostic demeure complexe et basé sur un faisceau d'arguments clinico-biologiques. Le dosage de l'activité du VWF tient une place importante dans le diagnostic positif et la classification en sous-types. Il est historiquement réalisé en technique manuelle ou en agrégométrie, mesurant la capacité de liaison de VWF à des plaquettes stabilisées en présence de ristocétine. Le laboratoire d'hémostase du CHU d'Amiens utilise la méthode de référence manuelle dont la réalisation est délicate et nécessite un technicien habitué à la réaliser, et donc non compatible avec un dosage en urgence. L'objectif de ce travail était de comparer 3 méthodes de dosage de l'activité du facteur Willebrand: la méthode manuelle de référence utilisant la ristocétine, et deux méthodes automatisées, l'une utilisant la ristocétine et l'autre un récepteur GP1bα recombinant présentant deux mutations gain-de-fonction. Les patients analysés étaient majoritairement des patients suivis au Centre Régional du Traitement de l'Hémophilie (CRTH) du CHU d'Amiens. Les deux techniques automatisées ont montré une corrélation et une concordance satisfaisante par rapport à la méthode de référence manuelle ainsi qu'un intérêt lors de la réalisation de séries comportant de nombreux échantillons. Cependant, aucune des deux ne s'est révélée adaptée pour la réalisation d'un dosage en urgence.

keywords: von Willebrand factor, methods comparison, ristocetin cofactor activity, bleeding disorders

The von Willebrand disease (VWD) is the most common inherited bleeding disorder, affecting about 1% of the population. It is due to quantitative (partial or total) or qualitative defects of the von Willebrand factor (VWF) and causes excessive bleeding mainly from mucous and cutaneous sites. The diagnosis remains complex and based on a cluster of clinical and biological arguments. VWF activity's assay is important for the diagnosis and the classification in subtypes. It has historically been realized with a manual method or with aggregometry, measuring VWF's capacity to bind stablized platelets in the presence of ristocetin. The haemostasis laboratory of Amiens's University Hospital is using the manual reference method, the realization of which is delicate, therefore requiring a technician used to perform it and thus inadequate for emergency testing. The objective of the study was to compare 3 VWF activity's assays: the manual reference method using ristocetin, and two automated methods, one using ristocetin and the other using a recombinant GPIba receptor with two gain-of-function mutations. Patients analyzed were mainly patients followed in the Haemophilia Regional Treatment Center of Amiens's Hospital. Both automated methods have shown satisfactory correlation and agreement with the manual reference method. They have also presented interest for batch testing with numerous samples. However, none of these methods turned out to be adequate for emergency testing.