

# La recherche des facteurs biologiques de risque établis de maladie thromboembolique veineuse : état des connaissances et conséquences pour la pratique en biologie clinique

Martine Alhenc-Gelas<sup>1</sup>, Marie-Françoise Aillaud<sup>2</sup>, Bénédicte Delahousse<sup>3</sup>, Geneviève Freyburger<sup>4</sup>,  
Agnès Le Querrec<sup>5</sup>, Guido Reber<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire d'hématologie-hémostase, AP-HP Hôpital européen Georges Pompidou, Paris, 20, rue Leblanc, 75908 Paris cedex 15, France

<sup>2</sup>Laboratoire d'hématologie-hémostase, CHU de Marseille, 147, boulevard Baille, hôpital de La Conception, 13385 Marseille, France

<sup>3</sup>Laboratoire d'hématologie-hémostase, CHU de Tours, 2, boulevard Tonnellé, 37044 Tours cedex 09, France

<sup>4</sup>Laboratoire d'hématologie-hémostase, CHU de Bordeaux, groupe hospitalier Pellegrin, place Amélie Raba-Léon, 33000 Bordeaux, France

<sup>5</sup>Laboratoire d'hématologie-hémostase, CHU de Caen, avenue de la Côte-de-Nacre, 14000 Caen, France

<sup>6</sup>Laboratoire d'hématologie-hémostase, CHU de Genève, 77, route de Florissant, Genève, Suisse

## Groupe de relecture

J.-F. Abgrall (Brest), N. Ajzenberg (Paris), A. Bauters (Lille), E. Bodé-Dotto (Nancy), C. Boinot (Poitiers), D. Borgel (inhibiteurs) (Paris), F. Braun (Thionville), L. Darnige (antiphospholipides) (Paris), E. de Maistre (Dijon), E. de Raucourt (Poissy-Saint-

Germain), F. Depasse (Ivry), J. Duchemin (Brest), G. Gerotzafias (Paris), M.-H. Horellou (Paris), I. Juhan-Vague (Marseille), V. Le Cam-Duchez (Rouen), I. Mazurier (Colmar), P. Nguyen (Reims), F. Pineau-Vincent (Le Mans), E. Racadot (Besançon), P. Sié (Toulouse), I. Thibaut Gouin (Ivry), P. Toulon (Nice), M. Trossaert (Nantes)

**S**ous l'égide du Groupe d'études sur l'hémostase et la thrombose (GEHT) de la Société française d'hématologie (SFH) et de la Société française de médecine vasculaire (SFMV), deux équipes ont travaillé en parallèle. Un groupe « aspects cliniques » a élaboré un texte de recommandations pour la pratique clinique (RPC) qui a défini les indications possibles de la recherche des facteurs biologiques de risque (FBR) de la maladie thromboembolique veineuse (MTEV) dans ses formes les plus habituelles (thromboses veineuses profondes et superficielles, et embolies pulmonaires) et les paramètres biologiques dont la détermination peut avoir un intérêt clinique. Les FBR retenus par ce premier groupe sont les déficits en inhibiteurs de la coagulation et les mutations Leiden du facteur (F) V et 20210G>A du gène du FII, d'une part (facteurs génétiquement déterminés), et les anticorps antiphospholipides (anti-PL), d'autre part. Le second groupe s'est intéressé aux modalités de la recherche de ces FBR qui sont présentées dans ce texte. Ne sont pas abordées les mesures des concentrations plasmatiques du FVIII, parce que le groupe clinique a jugé l'intérêt de sa détermination

incertain, et de l'homocystéine, dont la détermination n'est envisagée que dans le cas des formes graves de MTEV chez l'enfant et l'adulte jeune et qui est sous la responsabilité des biochimistes.

## Méthodologie

Nous avons tenté de répondre aux questions suivantes :

- quelles sont les conditions optimales de prélèvement et de traitement des tubes ? (aspects préanalytiques) ;
- comment choisir la méthode en fonction de l'étape du diagnostic ? Et quelles sont les conditions techniques optimales de la réalisation des tests ? (aspects méthodologiques analytiques) ;
- quelle stratégie diagnostique peut être privilégiée ?

La méthode d'élaboration repose sur l'analyse critique des données scientifiques disponibles et le jugement argumenté des experts au sein du groupe de travail.

La recherche d'informations pertinentes a été basée sur l'interrogation de la base de données « Medline » sur la période 1990-octobre 2008, sur la recherche de textes de consensus et de recommandations, sur la consultation de sites Internet, le recueil d'informations auprès des fournisseurs de réactifs et d'organismes de contrôle de qualité.

Une première version du texte a été soumise à un groupe d'experts indépendants. Les commentaires ont été compilés et analysés par le groupe de travail avant leur intégration dans le document final.

L'élaboration de ce travail n'a bénéficié d'aucun soutien financier.

## Nomenclatures et terminologie de biologie moléculaire

Les nomenclatures utilisées pour indiquer les positions des mutations sur les gènes des inhibiteurs de la coagulation sont celles qui ont été employées dans les bases de données [50, 74, 101].

Les termes « polymorphisme » et « mutation » sont tous deux recevables pour qualifier les mutations Leiden du FV et 210210G>A du gène du FII. En effet, le terme de *polymorphisme* est applicable aux variations de séquence ayant une fréquence supérieure à 1 % sans présumer de leurs conséquences fonctionnelles, et donc peut convenir pour qualifier ces mutations compte tenu de leur fréquence. Le terme de mutation est souvent associé à la notion de variation *délétère* (pathogène), (*— mutation causale* lorsque cette causalité est clairement établie *—*), alors que polymorphisme est le plus souvent utilisé pour qualifier des variations sans conséquence pathologique. Ainsi, on peut préférer parler de *mutation* pour ces substitutions

nucléotidiques thrombogènes des gènes du FV et du FII qui ont des conséquences fonctionnelles démontrées. Pour l'homogénéité des textes « clinique » et « biologique », les mutations Leiden des FII et FV seront cependant qualifiées « polymorphisme » dans la suite du texte.

## Facteurs biologiques de risque de maladie thromboembolique veineuse

### Facteurs de risque génétiques

#### *Déficits héréditaires en inhibiteurs de la coagulation (antithrombine [AT], protéine C [PC], protéine S [PS])*

##### *Antithrombine*

L'AT est une glycoprotéine monocaténaire de 432 acides aminés, de MM 56 kDa, synthétisée par l'hépatocyte. Sa demi-vie plasmatique est de 50 à 70 heures. Elle appartient à la famille des inhibiteurs de sérine-protéase ou serpines et présente une action inhibitrice irréversible envers les facteurs activés de la coagulation (surtout FXa et FIIa). Cette action, dans les conditions physiologiques, est progressive et va devenir puissante et immédiate (accélération d'un facteur 2 000) par liaison à certains glycosaminoglycanes dont l'héparine. L'AT comporte deux sites fonctionnels fondamentaux : le site réactif qui comporte l'arginine (Arg) 393 et la sérine (Ser) 394 et le domaine de liaison à l'héparine qui comporte la région des acides aminés 41 à 49 et 107 à 156. Sa concentration plasmatique est de 180 à 300 mg/L [58]. Le gène codant l'AT est situé sur le chromosome 1, comporte sept exons et s'étend sur 13 480 paires de bases (pb).

Le déficit héréditaire en AT est un facteur de risque de MTEV (risque relatif [RR] de l'ordre de 10 à 20, pour la majorité des déficits hétérozygotes). Il est mis en évidence chez 1 à 2 % des patients atteints de MTEV. La prévalence du déficit symptomatique dans la population générale est comprise entre 1/2 000 et 1/5 000. La transmission est autosomale dominante. *La pénétrance du déficit est variable.* Les manifestations cliniques les plus fréquentes sont des thromboses veineuses profondes et des embolies pulmonaires survenant spontanément ou dans des situations à risque de thrombose (alitement, chirurgie, prise de contraceptif œstroprogestatif, grossesse et post-partum) chez l'adulte jeune (à partir de l'âge de la puberté).

Les déficits sont de plusieurs types : quantitatifs (type I), qualitatifs (type II) (*tableau I*). Dans les déficits quantitatifs, la concentration de la protéine est diminuée, mais elle fonctionne normalement ; dans les déficits qualitatifs de type IIRS (*reactive site*) ou HBS (*heparin-binding site*), la concentration plasmatique de la protéine est normale, mais la fonction du site actif pour les premiers ou du site de liaison à l'héparine pour les seconds est anormale ; dans

**Tableau I. Les différents types de déficits en inhibiteurs de la coagulation**

<b>Déficits en antithrombine</b>	<b>Type I</b>	<b>Type IIRS</b>	<b>Type IIHBS</b>	<b>Type IIPE</b>
Activité cofacteur de l'héparine	↓	↓	↓	« limite »
Activité progressive	↓	↓	N	« limite »
Antigène	↓	N	N	« limite »
<b>Déficits en protéine C</b>	<b>Type I</b>	<b>Type IIAM</b>	<b>Type IIAC</b>	
Activité anticoagulante	↓	↓	↓	
Activité amidolytique	↓	↓	N	
Antigène	↓	N	N	
<b>Déficits en protéine S</b>	<b>Type I</b>	<b>Type III</b>	<b>Type II</b>	
Activité cofacteur de la PCa	↓	↓	↓	
Protéine S libre	↓	↓	N	
Protéine S totale	↓	N	N	

les déficits de type IIPE (pléiotropiques), la stabilité de la protéine est modifiée, et sa concentration plasmatique est légèrement diminuée. *Le risque thrombotique est fonction du type de déficit. En effet, le déficit de type IIHBS engendre un risque beaucoup plus faible que les déficits de type I ou IIRS.*

Le degré de risque associé au déficit de type PE est variable en fonction de la position de l'anomalie [72, 73]. Les bases moléculaires des déficits ont été établies, et les nombreuses mutations identifiées sont regroupées dans des bases de données. Les déficits homozygotes sont extrêmement rares (car probablement le plus souvent létaux avant la naissance) et ne sont rencontrés que pour des anomalies de type IIHBS ou quelques variants instables modérément ou peu délétères [74, 94, 95].

L'AT Cambridge II (Ala384Ser) est un variant associé à des taux d'AT peu diminués. Son rôle dans la survenue des thromboses est controversé (effet significatif dans une étude espagnole mais non confirmé dans deux études françaises) [24, 96, 108].

#### Protéine C

La PC mature est une glycoprotéine bicaténaires de 461 acides aminés, de MM 62 kDa. Elle est vitamine K dépendante, synthétisée par l'hépatocyte. Elle a une demi-vie courte de six à huit heures. L'extrémité N-terminale de la chaîne légère contient neuf résidus d'acide gamma-carboxyglutamique (GLA) indispensables à sa fixation par le calcium aux phospholipides (PLs). La chaîne lourde contient un site de clivage Arg-Leu pour la thrombine et un site catalytique.

La PC est un zymogène qui est activé en sérine-protéase par la thrombine fixée sur la thrombomoduline présente à la surface de l'endothélium vasculaire. La PC activée (PCa) est un puissant anticoagulant. Ses substrats, les facteurs procoagulants VIIIa et Va, sont rapidement inac-

tivés par protéolyse. Cette activité s'exerce à la surface de PL (plaquettaires ou endothéliaux) en présence de calcium et nécessite un cofacteur plasmatique également vitamine K dépendant, la protéine S. Le système de la PC joue un rôle majeur dans la régulation du processus thrombogène, tout particulièrement au niveau de la microcirculation où la surface endothéliale est très importante. Sa concentration plasmatique est de 3 à 5 mg/L. Le gène de la PC, situé sur le chromosome 2, s'étend sur 11,6 kb et comprend neuf exons [125, 129].

Les déficits héréditaires en PC sont mis en évidence chez environ 3% des patients atteints de MTEV. Ces déficits sont de transmission autosomale dominante. *La pénétrance est variable.* Les manifestations cliniques observées chez les hétérozygotes sont à rapprocher de celles qui sont observées en cas de déficit en AT. La prévalence du déficit en PC associé à des thromboses dans la population générale est comprise entre 1/16 000 et 1/36 000, mais une prévalence beaucoup plus forte du déficit en PC asymptomatique a été mise en évidence dans des populations saines de donneurs de sang (1/200 à 1/700). L'homozygotie est rare. Les parents d'enfants homozygotes sont généralement asymptomatiques. Lorsque l'homozygotie est associée à une absence totale de protéine circulante active, la pathologie thrombotique peut être gravissime: en effet, les patients sont alors susceptibles de présenter dès la naissance un purpura fulminans ou un syndrome thrombotique sévère. Il existe des déficits quantitatifs (type I) et qualitatifs (type II), plus rares, affectant le site actif (type IIAM (amidolytique)) ou d'autres régions de la protéine qui sont impliquées dans le fonctionnement du système de la PC (interactions PC/PL, /PS, /FVa, /FVIIIa) [type IIAC (anticoagulant)] (tableau 1), [72, 73]. *Le typage plasmatique n'a pas, à ce jour, de conséquences sur l'évaluation du risque individuel de thrombose.* Les bases moléculaires des déficits ont été établies; les mutations délétères identifiées sont

nombreuses et rarement récurrentes [3, 101]. Il existe deux polymorphismes du promoteur localisés en position -1 654 (C>T) et -1 641 (G>A) qui sont associés significativement au taux de PC circulante. Les homozygotes pour l'allèle CG peuvent avoir des taux de PC légèrement diminués. Le RR de thrombose associé à la présence de cet allèle est significatif mais modeste (RR: 1,4), et la recherche systématique de ce polymorphisme chez les sujets qui présentent une MTEV n'est pas préconisée [2].

### Protéine S

La PS est une protéine vitamine K dépendante de 635 acides aminés, de MM 69 kDa. Sa synthèse n'est pas exclusivement hépatocytaire; elle est produite par les cellules endothéliales, les cellules de Leydig et le cerveau. La partie N-terminale de la protéine mature contient 11 GLA qui lient les ions calcium et lui confèrent une haute affinité pour les PLs membranaires. Le gène codant la PS a été localisé sur le chromosome 3; il comporte 15 exons s'étendant sur plus de 80 kb. La PS est un cofacteur non enzymatique de la PCa dans son action protéolytique sur les facteurs Va et VIIIa. Elle possède également *in vitro* une activité inhibitrice directe sur les facteurs Xa et Va. Sa concentration plasmatique est d'environ 25 mg/L. Dans le plasma, la PS circule principalement sous deux formes, une forme libre (PSL) [40%] et une forme liée (60%) à une protéine régulatrice du système du complément, la *C4b-binding protein* (C4b-BP). La PS ne se lie qu'aux isoformes bêta de la C4b-BP (80% de la C4b-BP circulante). Son affinité pour la chaîne bêta est telle que toute la C4b-BP bêta circulante est liée à la PS chez l'individu sain. Il est classiquement admis que seule la fraction libre de la PS a une activité anticoagulante [26]. En fait, le mécanisme d'action de la PS est encore imparfaitement compris; son activité cofacteur de la PCa apparaît faible *in vitro*. Quelques publications récentes évoquent d'autres mécanismes qui pourraient avoir un rôle physiologique [21]. *In vivo*, l'importance des conséquences du déficit a été démontrée par les manifestations cliniques observées dans les familles déficitaires initialement décrites par Comp *et al.* en 1984 et par le tableau clinique dramatique du — très rare — déficit homozygote dans la période néonatale, similaire à celui du déficit homozygote en PC. Dans les études familiales, à l'état hétérozygote, les déficits en PS francs entraînent une MTEV chez l'adulte, avec une *pénétrance de 50%* à l'âge de 45 ans. La prévalence des déficits a été difficile à évaluer compte tenu des difficultés initiales des dosages de la PS: le déficit en PS est retrouvé chez 2 à 3% des patients « thrombophiliques »; elle pourrait être de l'ordre de 0,05 à 0,10% dans la population générale. Le RR de thrombose estimé initialement dans des familles « thrombophiliques » était de l'ordre de 10 [113]. Il est beaucoup plus faible ou même non signi-

ficatif dans les études épidémiologiques [79]. Très récemment, le rapport clinique du déficit en PS libre a été analysé chez 1 143 membres de familles de déficitaires en PS. Les résultats ne montrent un *risque de thrombose significativement augmenté que pour des taux de PS libre franchement bas* (PS libre < 40%, risque de première thrombose: 5,6, risque de récurrence de l'ordre de 3), bien inférieurs à la limite inférieure des valeurs usuelles déterminée chez les sujets sains [81].

Trois types de déficits héréditaires sont définis (*tableau I*): les types quantitatifs (I et III) affectent la quantité de protéine circulante; dans le type I, la PS totale (PST) et la PSL sont diminuées de façon équivalente; dans le type III, seule la PSL est basse. On trouve également de (— rares —) déficits qualitatifs de type II associant un taux de PSL normal et une activité diminuée. Les bases moléculaires des déficits ont été établies [50, 52]. Comme dans le cas de la PC, on a trouvé un nombre important de mutations délétères du gène *PROSI* qui sont la plupart du temps des mutations « privées ». Des sujets porteurs d'une même mutation au sein d'une même famille peuvent être porteurs d'un déficit de type I ou III. La cause de cette hétérogénéité n'est pas totalement élucidée. Les conclusions d'une étude très récente du gène *PROSI* dans 87 familles qui comportaient des déficits de type I ou III sont les suivantes: le déficit en type I serait une maladie monogénique impliquant le gène *PROSI*, alors que le déficit de type III serait une pathologie hétérogène sur le plan moléculaire faisant intervenir plusieurs facteurs, génétiques ou/et environnementaux [115]. Théoriquement, des anomalies de la C4bBP pourraient expliquer des déficits en PS de type III. Des études plasmatiques et génétiques ont été conduites. Aucun résultat positif n'a été obtenu. Le polymorphisme Herleen (Ser460Pro) est une mutation qui affecte un site de glycosylation et qui influence la durée de vie de la protéine dans la circulation [32], ce qui explique son association à des taux de PS qui peuvent être à la limite des valeurs pathologiques chez les hétérozygotes. Il est probablement sans conséquence clinique à l'état hétérozygote en l'absence de facteurs de risque associés [15]. Une influence significative indépendante de l'âge et du sexe d'un polymorphisme fréquent (Pro626Pro) des régions codantes sur les taux de PSL et de PST avait été rapportée il y a quelques années [76, 77]. En revanche, une étude récente ne retrouve pas d'influence sur la PST; un effet significatif sur le taux de PS libre est observé mais uniquement chez les femmes; Pro626Pro n'a pas d'influence sur les événements cliniques survenus dans les familles déficitaires [20].

### Polymorphisme Leiden du facteur V

Le polymorphisme Leiden du facteur V (FV), qui résulte du remplacement du nucléotide G par un A en position 1691 du gène du FV, affecte l'Arg 506 du cofacteur V de la

coagulation. Le FV possède des fonctions pro- et anticoagulantes ; en effet, il est procoagulant en tant que cofacteur de l'action du FXa sur la prothrombine et anticoagulant en tant que cofacteur de la PCa vis-à-vis de la dégradation du FVIIIa. La PCa dégrade le FVa par clivage au niveau des Arg 306, 506, 679 et 994. Le clivage en 506 intervient en premier, et il est prépondérant lorsque le FVa et la PCa sont présents en faible concentration, mais l'inactivation n'est totale qu'après clivage en 306. L'activité du FV en tant que cofacteur de la PCa pour la dégradation du FVIIIa nécessite le clivage en 506 [89, 128].

Lorsque le polymorphisme Leiden est présent, l'Arg 506 est remplacée par une glutamine, ce qui entraîne un gain de fonction du FV. Cette mutation engendre une « résistance plasmatique à l'action de la PCa » (RPCA) qui peut être mise en évidence dans des tests de coagulation. L'importance du rôle anticoagulant du FV est bien démontrée par le phénotype RPCA pseudohomozygote des patients hétérozygotes composites porteurs du polymorphisme Leiden du FV sur un allèle et d'une mutation « null » sur l'autre allèle qui abolit complètement l'activité du gène.

*Le polymorphisme Leiden du FV est le facteur de risque génétique de thrombose le plus fréquent dans nos contrées.* Il existe une hétérogénéité géographique de sa répartition : il est présent à l'état hétérozygote dans le Nord de l'Europe et aux États-Unis, avec une fréquence moyenne de 5 % dans la population générale ; sa fréquence diminue du nord au sud de l'Europe, avec une fréquence de l'ordre de 2 % chez les hispaniques ; elle est plus faible chez les Noirs américains et africains (1 %) et chez les Asiatiques (0,5 %). La fréquence des homozygotes a été évaluée à 0,02 % (chez les Caucasiens). Les porteurs du FV Leiden ont un risque accru de présenter des accidents thromboemboliques (RR de l'ordre de 3 à 5 chez les hétérozygotes). Le polymorphisme Leiden du FV est responsable de la quasi-totalité des RPCA FV dépendantes d'origine génétique. Deux mutations privées qui affectent, sur le FV, le site de clivage en 306 ont été rapportées : la mutation Hong Kong (Arg306Cys) qui serait sans effet sur la RPCA et la mutation Cambridge (Arg306Thr) qui pourrait être associée à une résistance accrue.

L'existence de RPCA indépendantes du FV, facteur de risque de thrombose (RR de l'ordre de 1,5), sous influence génétique, a été démontrée dans de grandes études épidémiologiques [30, 104]. Les mécanismes impliqués ne sont pas clairement identifiés.

#### ***Polymorphisme 20210G>A du gène de la prothrombine***

Le polymorphisme 20210G>A du gène de la prothrombine (FII) se situe en aval de la séquence codante, dans la région 3' non traduite (3'UTR). Elle est située dans une région fonctionnelle qui conditionne la maturation des ARN messagers (ARNm). La mutation G>A augmente

l'efficacité du clivage et de la maturation, entraîne une accumulation d'ARNm mature dans le cytoplasme et une augmentation de la synthèse protéique. Ce mécanisme explique l'association significative de la mutation à des taux élevés de FII qui a été mise en évidence. Cette augmentation de concentration pourrait, de plus, par son impact sur la génération de thrombine, expliquer son influence sur le risque thrombotique. Produite à partir du FII, la thrombine, qui transforme le fibrinogène en fibrine, est la sérine-protéase la plus efficace du système procoagulant. La concentration du FII et celle de l'AT sont deux déterminants majeurs de la génération de thrombine. En effet, cette dernière est sept fois plus forte dans un plasma qui comporte un taux de FII à 150 % associé à un taux d'AT à 50 % que dans un plasma comportant 100 % des deux protéines.

*La prévalence du polymorphisme en Europe est aux alentours de 2 %, avec un gradient croissant nord-sud.* Il est rare dans les populations d'Afrique et d'Asie. Le RR de thrombose veineuse chez les hétérozygotes est de l'ordre de 2 à 3 [5].

#### **Anticorps antiphospholipides**

Les anticorps anti-PL sont associés à la thrombose dans le contexte auto-immune du syndrome des anti-PLs (SAPL).

#### ***Hétérogénéité des anticorps***

Les anticorps « anti-PL » sont des auto-anticorps dirigés contre des PL anioniques ou contre des protéines à forte affinité pour les PL anioniques. Les protéines qui peuvent être impliquées sont nombreuses (bêta-2-glycoprotéine I ( $\beta$ 2GPI), prothrombine, annexine 5, protéine S, etc.), et il existe une grande hétérogénéité de ces anticorps au niveau de leur cible, qui se traduit au niveau de leur pathogénicité. Certains anticorps transitoires (qui peuvent être retrouvés lors d'infections, de cancers, ou en l'absence de pathologie objectivée) n'ont pas de conséquence clinique. D'autres, permanents, sont pathogènes dans le contexte du SAPL tel qu'il a été défini par le consensus international de Sapporo et la révision ultérieure de Sydney [87, 132]. Trois types de tests sont utilisés conjointement pour les mettre en évidence : un Elisa qui détecte des anticorps dirigés contre les complexes cardiolipides-anti- $\beta$ 2GPI, un Elisa qui détecte directement des anticorps anti- $\beta$ 2GPI, et des techniques de coagulation révélant l'effet inhibiteur PL-dépendant des anticorps (effet « anticoagulant de type lupique » — ou *lupus anticoagulant* [LA]). La recherche des anticorps pathogènes du SAPL doit impérativement comporter les trois types de tests compte tenu de l'absence de recouvrement total des catégories d'anticorps. D'après les données de la littérature, la présence d'un LA confère un risque thrombotique plus élevé (de l'ordre de

10) que la présence d'un anticorps détecté par technique immunologique (RR de l'ordre de 2) [46]. On peut, de plus, différencier plusieurs niveaux de risque thrombotique en fonction du nombre de tests positifs. Ainsi, dans le travail récent de Pengo *et al.* [97], la présence simultanée d'un LA, d'un taux significatif d'anticorps anticardiolipides (ACL) et anti- $\beta$ 2GPI était associée à un RR de thrombose de 33,3 (95 % IC : [7-157,6]), alors qu'une positivité simultanée pour ACL et anti- $\beta$ 2GPI engendrait un RR de 2,2 (95 % CI 1-5,2) [91]. L'établissement des relations anticorps/pathologie est compliqué par le fait qu'il n'existe pas de techniques de référence et que les méthodes ne sont pas standardisées.

### **Anticorps anticardiolipides**

Le terme utilisé pour définir ces anticorps est impropre. En effet, on regroupe sous le terme anticorps anticardiolipides (ACL) des anticorps qui se lient au cardiolipide (ou à un autre PL) et des anticorps qui ne se lient qu'à un complexe PL-protéine. Les ACL retrouvés au cours des infections, généralement transitoires et sans conséquence clinique, sont des anticorps qui se lient aux PL en l'absence de cofacteur protéique. Les anticorps — thrombogènes — du SAPL sont dirigés contre un complexe PL-protéine, principalement PL- $\beta$ 2GPI (anticorps «  $\beta$ 2GPI-dépendants ») [13]. Cependant, tous les anticorps  $\beta$ 2GPI-dépendants ne sont pas thrombogènes ; la thrombogénicité semble être fonction de l'épitope de la  $\beta$ 2GPI reconnu par l'anticorps, situé dans le domaine I pour les anticorps du SAPL, dans le domaine V pour les anticorps non thrombogènes qui ont été retrouvés dans des pathologies parasitaires. Les anticorps peuvent être de nature IgG ou IgM. Les anticorps thrombogènes du SAPL seraient des IgG, alors que les anticorps infectieux seraient de nature IgM [53].

Les caractéristiques techniques des tests employés pour rechercher les ACL sont hétérogènes. D'autre part, une évaluation spécifique des ACL  $\beta$ 2GPI-dépendants et thrombogènes n'est pas possible, ce qui explique les résultats hétérogènes des études cliniques. La grande majorité des études qui évaluent le degré de risque thrombotique veineux associé à la présence d'un ACL est de nature rétrospective. On ne dispose, à ce jour, que de trois études prospectives (PHS, LITE et HUNT) [88]. Au total, la revue de la littérature suggère l'absence d'association significative entre la présence isolée d'un ACL et la survenue d'un événement thrombotique veineux. En revanche, la présence d'ACL a été significativement associée aux événements thrombotiques artériels (infarctus du myocarde et accidents vasculaires cérébraux) [46].

### **Anticorps anti- $\beta$ 2glycoprotéine I (anti- $\beta$ 2GPI)**

Les anticorps anti- $\beta$ 2GPI ne figuraient pas dans la liste des critères biologiques du SAPL dans le consensus initial de

Sapporo. Ils ont été inclus lors de la révision de Sydney de 2004. Contrairement aux tests Elisa de mesure des ACL, la recherche des anticorps anti- $\beta$ 2GPI ne fait pas intervenir de PL. Il y a recouvrement entre les ACL et les anti- $\beta$ 2GPI, mais les ACL de type infectieux ne sont pas détectés ; la recherche d'anticorps anti- $\beta$ 2GPI devrait donc améliorer la pertinence clinique.

En pratique clinique, la recherche d'anticorps anti- $\beta$ 2GPI est moins souvent positive que la recherche d'ACL. En ce qui concerne les conséquences cliniques, la méta-analyse d'envergure réalisée par Galli *et al.* en 2003, n'apportait aucune certitude [47]. Dans plusieurs publications qui concernaient des sujets atteints de maladie auto-immune, une association significative entre la présence de ces anticorps et la thrombose a été démontrée. Récemment, de Groot *et al.* ont donné des éléments indiquant que les anticorps anti- $\beta$ 2GPI constituaient un facteur de risque de première thrombose veineuse dans la population générale [28]. Les anticorps anti- $\beta$ 2GPI dirigés contre l'épitope Gly40-Arg43 du domaine I de la  $\beta$ 2GPI possèdent une activité LA [29]. La présence simultanée d'un LA et d'anticorps anti- $\beta$ 2GPI est associée à une augmentation du risque thrombotique [91].

### **Anticoagulants de type lupique**

Les anticorps à effet « anticoagulant lupique » (LA) sont détectés dans des tests de coagulation. Il existe une compétition entre ces anticorps et les facteurs vitamine K dépendants vis-à-vis des sites de liaison mis en jeu dans la cascade de la coagulation, localisés sur les PLs anioniques. Les LA sont donc susceptibles d'engendrer des allongements des temps de coagulation dans les tests qui font intervenir ces facteurs. La sensibilité des tests vis-à-vis des LA dépend de la concentration en PL (qui doit être faible) et de la séquence réactionnelle explorée. Comme on le verra plus loin, les tests de dépistage les plus utilisés en France sont le temps de venin de vipère Russel dilué (dRVVT), le temps de céphaline plus activateur (TCA) et le temps de thromboplastine diluée (TTD). Le grand intérêt du dRVVT pour la détection des LA à risque de thrombose a été démontré [45]. Cet intérêt est expliqué par les caractéristiques techniques de la méthode : les anticorps  $\beta$ 2GPI dépendants ont *in vitro* deux types d'effet qui sont antagonistes : effet inhibiteur  $\beta$ 2GPI dépendant de la génération de thrombine, d'une part, retard à l'effet inhibiteur de la  $\beta$ 2GPI sur la génération du FX par les FIXa et VIII d'autre part. Le dRVVT évalue sélectivement la conversion par les FXa et les Va de la prothrombine en thrombine, alors que dans les tests plus globaux, les étapes de la coagulation en amont du FX interviennent. Il est donc logique que le dRVVT soit plus sensible à la présence de LA que des tests plus globaux qui prendront ces deux mécanismes antagonistes en compte.

### Critères biologiques de définition du SAPL

Les critères biologiques qui définissent le SAPL établis au cours des conférences de Sapporo puis de Sydney sont les suivants [87, 132]:

- mise en évidence d'un LA détecté d'après les recommandations du sous-comité LA de l'ISTH (détaillées dans la partie diagnostic biologique de ce texte), deux fois ou plus à plus de 12 semaines d'intervalle;
- présence d'un ACL d'isotype IgG et/ou IgM dans le plasma ou le sérum, de titre moyen ou fort (c'est-à-dire > 40 UGPL ou MPL, ou > 99<sup>e</sup> percentile), détecté deux fois ou plus, à plus de 12 semaines d'intervalle, à l'aide d'un Elisa « standardisé »;
- présence d'un anti-β2GPI d'isotype IgG et/ou IgM dans le plasma ou le sérum, de titre supérieur au 99<sup>e</sup> percentile, détecté deux fois ou plus, à plus de 12 semaines d'intervalle, à l'aide d'un Elisa « standardisé » et d'après les procédures recommandées par Reber *et al.* [98].

Il a été souligné que le diagnostic biologique de SAPL ne peut être posé que si plus de 12 semaines et moins de cinq ans séparent les tests positifs des manifestations cliniques. La recherche d'autres anticorps (anticorps antiphosphatidyléthanolamine, antiprothrombine, etc.) pourrait être d'intérêt, mais elle n'est pas à ce jour recommandée faute de certitude concernant leur pathogénicité.

Ces recommandations ont contribué à améliorer les pratiques. Cependant, de nombreux problèmes perdurent, par exemple comme on le verra plus loin en ce qui concerne la standardisation des Elisa. En 2007, Galli *et al.* ont de plus insisté sur la nécessité de recommandations plus précises en ce qui concerne le traitement préanalytique des prélèvements et les recherches de LA (tests et mode d'expression des résultats) [49]. Ces experts ont, d'autre part, suggéré que compte tenu de l'évolution des connaissances, les recherches d'ACL et d'IgM anti-β2GPI ne fassent plus partie des critères diagnostiques du SAPL [47, 48]. Les discussions qui ont eu lieu lors de la réunion des sous-comités de l'ISTH de juin 2008 apportent de nouvelles directives pour le diagnostic de LA. Ces directives sont exposées dans la partie « Diagnostic biologique pratique ».

Au total, compte tenu de difficultés et incertitudes persistantes:

- il importe que ces tests soient réalisés dans des laboratoires expérimentés, à jour des connaissances dans le domaine et pleinement conscients des difficultés et limites;
- le GEHT doit continuer à apporter sa contribution d'amélioration des tests de laboratoire et de recherche clinique dans ce domaine;
- une synthèse complémentaire sera élaborée à la lumière des avancées prévues courant 2009, avec les possibles décisions du SSC de l'ISTH.

## Diagnostic biologique

### Prélèvement et son traitement

Les tubes de sang nécessaires à la réalisation des analyses discutées dans ce texte sont les suivants:

- pour les tests de coagulation: tubes citratés;
- pour les recherches d'anticorps anti-PL par techniques immunologiques: tubes citratés ou tubes secs [87];
- pour les analyses de biologie moléculaire: tubes citratés ou EDTA.

### Plasmas: préparation, traitement, conservation

La préparation d'un plasma de qualité optimale pour la réalisation du bilan de thrombose doit prendre en compte les points suivants:

- certaines protéines de la coagulation sont labiles;
- les recherches d'anticoagulant lupique sont extrêmement influencées par les plaquettes présentes dans les échantillons, et particulièrement lorsqu'elles sont réalisées sur des échantillons plasmatiques qui ont été congelés. En effet, la congélation induit une extériorisation des PL plaquettaires procoagulants qui réduisent la sensibilité des tests.

Le prélèvement et son traitement doivent donc être effectués en respectant scrupuleusement les recommandations nationales et internationales. Les informations essentielles que nous résumons ci-dessous émanent du GEHT (disponibles sur le site Internet [www.geht.org](http://www.geht.org)) et/ou du *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI) américain [1], et, en ce qui concerne les recherches d'anticoagulant lupique, de l'ISTH [17, compte rendu SSC-LA 2008].

### Tubes de prélèvement, nature de l'anticoagulant

Les prélèvements d'hémostase doivent être anticoagulés avec du citrate 0,106 M préférentiellement, sinon 0,109 M (3,13-3,2%) [1 vol pour 9 vol de sang]. Le sang doit être collecté dans des tubes qui présentent une surface non activatrice de la coagulation. Le polystyrène ne doit donc pas être utilisé.

### Conditions temporelles (transport, traitement du prélèvement)

Le transport de l'échantillon du site de prélèvement au laboratoire doit se faire à température ambiante. Les conditions réfrigérées ne sont pas recommandées, car il y a un risque d'activation du FVII, de perte du facteur Willebrand et d'activation plaquettaire. Idéalement, il doit être traité dans les deux heures qui suivent la prise de sang (GEHT). En fait, le délai de traitement acceptable est fonction des paramètres que l'on veut étudier; il a été montré qu'un délai de quatre heures était acceptable pour le dosage du FVIII, et ce délai a été retenu par le CLSI pour la plupart des autres paramètres de la coagulation, mais en l'absence d'études établissant sa validité [1].

Zürcher *et al.* ont très récemment étudié l'impact des conditions de transport du sang total sur le bilan de thrombose. Les échantillons de sang avaient été obtenus dans des conditions habituelles de prélèvement chez 59 patients. Le sang total citraté (0,106 M) a été conservé puis transporté à température ambiante. Des dosages des différents paramètres du bilan ont été réalisés sans délai puis en moyenne 5, 10, 24 et 48 h après la prise de sang. De façon intéressante, dans cette étude, les activités de l'AT, de la PC (chromogénique et anticoagulante) et le taux de PS libre sont *stables pendant 48 heures*; les résultats des mesures de résistance à la PCa et de PS totale sont stables sur une période de 24 heures [135]. Pour la RPCA, ces données sont en accord avec les résultats d'un travail de Freyburger *et al.* qui concernait six sujets sains et huit malades [43]. Si ces résultats devaient être confirmés dans d'autres travaux, ils pourraient étayer une mise à jour des recommandations.

#### *Préparation du plasma*

L'obtention du plasma pauvre en plaquettes (< 10 G/L) nécessite une *double centrifugation* à 2 000-2 500 g avec des temps de centrifugation qui ne seront pas inférieurs à 15 minutes. Le CLSI précise qu'une double centrifugation comporte une étape intermédiaire de décantation du plasma dans un tube plastique « non-activateur de l'hémostase » (type polypropylène) et que lors de la deuxième décantation, il faut veiller à ne pas prélever les plaquettes résiduelles au fond du tube. Les performances de la centrifugeuse quant à la vitesse doivent être contrôlées tous les six mois. D'après Lippi *et al.*, la température de centrifugation doit être comprise entre 18 et 22 °C [82]. L'élimination des plaquettes par filtration bien qu'efficace n'est pas conseillée compte tenu de son influence sur certaines protéines de la coagulation [39].

#### *Congélation des plasmas*

Lorsque les examens ne sont pas effectués dans un délai de deux à quatre heures, les plasmas déplaquetés doivent être congelés selon la procédure suivante: aliquotes de *petit volume* (pas plus de 1 mL), dans des tubes en matériau *non mouillable* et dont la capacité est adaptée à l'échantillon (*pas de volume mort*). La congélation sera la plus rapide possible, si possible en azote liquide, sinon à -70 °C plutôt qu'à -20 °C. La littérature qui concerne l'influence de la température et du temps de conservation des aliquotes, sous forme congelée sur les résultats des tests, est pauvre. Les résultats d'une étude sur plasma de sujets sains ont montré la stabilité de 15 paramètres (TP, TCA, temps de thrombine, FII, FV, FVII, FX, FVIII, FIX, FXII, activité anticoagulante de la PC et de la PS, activité chromogénique de l'AT, FW antigène, D-dimères) pendant au moins 18 mois à -74 °C [133]; le CLSI a estimé que les données disponibles démontraient la stabilité des

facteurs étudiés pour des durées de conservation allant jusqu'à trois mois à température inférieure ou égale à -24 °C et au moins 18 mois à température inférieure ou égale -74 °C. Il a cependant souligné que dans cette étude les conditions de prélèvement (plasmaphérèse et citrate 0,129 M) n'étaient pas identiques à celles qui sont utilisées en routine et que l'influence de l'état clinique n'était pas prise en compte.

À -20 °C, la durée de conservation ne devra pas dépasser deux semaines. Le CLSI a estimé que l'emploi de congélateurs avec cycles de décongélation automatique n'était pas acceptable compte tenu de l'activation possible de certains facteurs dans de telles conditions de stockage.

#### *Transport de plasmas congelés*

Lorsque le laboratoire n'effectue pas lui-même les dosages, l'envoi de plasmas congelés devra être effectué dans de la carboglace en quantité suffisante pour que la congélation soit maintenue et dans un emballage approprié, en suivant les recommandations de transport des échantillons de sang humain (GBEA et arrêté du 24 avril 2002 JO du 25 mai 2002, voir site Internet [www.Légifrance.fr](http://www.Légifrance.fr)).

#### *Décongélation*

La décongélation devra être effectuée *rapidement* (deux à trois minutes) à une température de 37 °C; les plasmas doivent ensuite être *homogénéisés* et les tests effectués *sans délai*. Le CLSI insiste sur l'importance de l'homogénéisation compte tenu du risque de précipitation de certaines protéines induit par la congélation.

#### **ADN**

Nous ne détaillerons pas dans ce document les différentes techniques de préparation de l'ADN et les modes de conservation. On en trouvera un exposé très complet et détaillé dans le texte de recommandations américaines du CLSI [1].

Certaines techniques de recherche de mutations sont réalisables sur sang total; dans d'autres cas, on travaillera sur l'ADN extrait des globules blancs. L'échantillon d'ADN peut être conservé à 2 à 8 °C ou congelé.

Les analyses d'ADN ne sont possibles que si le patient a donné son consentement par écrit.

#### **Tests et interprétation des résultats**

Cette partie analyse les aspects techniques des recherches d'anomalies responsables de thrombose.

Les tests réalisés sont des actes de biologie médicale, qui doivent être bien évidemment mis au point et exécutés dans le respect des règles générales qui régissent ces analyses (GBEA).

Comme on le verra, dans la plupart des cas, ces recherches sont réalisées à l'aide de trousse commerciales; il est

cependant parfois nécessaire de développer des techniques au laboratoire (« tests maison »).

Nous désirons insister sur deux points essentiels :

– si des « tests maison » doivent être mis en route, ils devront être validés en suivant les recommandations officielles. Par exemple, on pourra se référer au guide de validation des méthodes en biologie médicale édité par le COFRAC qui est disponible sur Internet (document LAB GTA 04) ;

– le contrôle de qualité (interne et externe) est de première importance. Il doit lui aussi être organisé en fonction des recommandations existantes. Deux documents sont à disposition sur le site du COFRAC (*Les contrôles de la qualité analytique en biologie médicale*, document LAB GTA 06, et *Guide d'évaluation des incertitudes de mesure*, document LAB GTA 14).

L'importance du contrôle de qualité est telle dans notre domaine qu'il nous a paru important d'insister sur cet aspect tout au long du chapitre.

### **Mesure des inhibiteurs de la coagulation**

#### *Antithrombine*

Les différents types de déficits (quantitatifs et qualitatifs) (*tableau I*) et leurs caractéristiques sont décrits dans la première partie de ce document [68, 69].

Trois types de mesures sont effectués :

- la mesure de l'activité « cofacteur de l'héparine » évalue les capacités des deux sites fonctionnels de l'AT, le site d'inhibition des protéases et le site de liaison à l'héparine ;
- le dosage immunologique évalue la concentration plasmatique de l'inhibiteur ;
- la mesure de l'activité antiprotéasique effectuée en l'absence d'héparine (« activité progressive ») évalue la fonctionnalité du site réactif.

#### Mesure de l'activité cofacteur de l'héparine

La méthode est une mesure en retour évaluant la capacité inhibitrice de l'AT sur la thrombine bovine ou le FXa ajoutés en quantité fixe et en excès en présence d'une forte concentration d'héparine. La quantité résiduelle de thrombine ou de FXa est mesurée par son activité amidolytique sur un substrat synthétique chromogène spécifique. La libération de paranitroaniline (pNA) à partir du substrat est mesurée à 405 nm. Les différences dans la composition des coffrets peuvent concerner l'enzyme (FXa ou thrombine), le substrat, le tampon, l'héparine, le temps d'incubation du mélange de plasma dilué et de l'enzyme (*tableau II*).

Les caractéristiques analytiques de ces méthodes sont dans l'ensemble satisfaisantes. La spécificité est bonne. La sensibilité vis-à-vis de la détection des variants diffère en fonction des réactifs et des conditions techniques retenues [70]. On sait depuis longtemps que, pour éviter l'interférence du

cofacteur II de l'héparine, il faut utiliser de la thrombine bovine et un temps d'incubation court [127] ou évaluer l'activité anti-Xa. Les temps d'incubation courts (30 s) favorisent également le diagnostic des déficits de type IIHBS (quelle que soit l'enzyme) et du variant Sheffield/Glasgow. De plus, pour que ce variant et les AT Stockholm et Denver puissent être détectés, la protéase utilisée doit être de la thrombine (bovine) [90]. *L'emploi d'un temps d'incubation de 30 s est une recommandation 2008 du sous-comité « Inhibiteurs de la coagulation » de l'ISTH.* [Compte rendu de la réunion 2008 du sous-comité *Inhibiteurs de la coagulation* de l'ISTH, 126]. La présence d'héparine dans un prélèvement n'interfère pas dans les mesures.

#### Dosages immunologiques

Il est possible d'utiliser des techniques immunologiques classiques (immunoélectrophorèse, immunodiffusion radiale). Plus récemment, ont été commercialisés des coffrets Elisa, puis des réactifs qui permettent une évaluation par immunoturbidimétrie, qui sont bien adaptés aux dosages au coup par coup ou en petites séries, en manuel ou sur automate. À noter : dans certaines méthodologies, la présence de facteur rhumatoïde peut induire une surestimation du taux d'AT.

#### Mesure de l'activité progressive de l'AT

Les méthodes étudient la capacité de l'AT à neutraliser, pendant une *incubation longue* (20 à 30 minutes) et *en l'absence d'héparine*, une protéase cible (thrombine ou FXa) ajoutée en excès. Évaluant la capacité fonctionnelle du site d'inhibition des protéases et n'étant pas sensibles aux anomalies du site de liaison à l'héparine, elles permettent la différenciation des types IIHBS (activité progressive normale) et RS (activité progressive basse). À noter qu'elles ne sont pas complètement spécifiques compte tenu du temps d'incubation (interférence de l'alpha-2 macroglobuline) Les techniques employées sont le plus souvent des techniques « maison » [106].

#### Valeurs usuelles, variations physiologiques

À la naissance, le taux d'AT moyen est de 63 % (écart-type : 12) [7].

À partir d'un an, les valeurs usuelles sont comprises entre 80 et 120 % [59].

L'évolution de la concentration d'AT en fonction de l'âge et du sexe a été largement étudiée [34, 84, 86, 103]. Dans l'étude de Dolan *et al.* (637 femmes, 744 hommes de 20 à 59 ans), les résultats moyens par tranche d'âge ne sont pas significativement différents. Dans les travaux de Rodeghiero *et al.* (4 000 sujets de 18 à 65 ans), on observe une tendance à la diminution des concentrations au cours du vieillissement, mais la ménopause s'accompagne d'une augmentation de l'ordre de 5%. Les résultats obtenus par Lowe *et al.* sont rapportés dans le *tableau III*. Les auteurs observent également des concentrations un peu plus basses

**Tableau II. Antithrombine. Mesure de l'activité cofacteur de l'héparine : caractéristiques de quelques trouses**

Fournisseur actuel	Fournisseur antérieur	Nom	Temps d'incubation plasma/enzyme
<b>Enzyme: FIIa</b>			
American Diagnostica		Actichrom Antithrombin	1 min
Biogenic	Hyphen Biomed	Biophen AT (anti-IIa)	1 min
Siemens	Siemens	Berichrom Antithrombine III	3 min
Stago		Stachrom ATIII	1 min
Trinity Biotech	Sigma (Accucolor)	TriniCHROM Antithrombin (anti-IIa)	2 min
<b>Enzyme: FXa</b>			
Biogenic	Hyphen Biomed	Biophen Antithrombin	240 s sur STA-R Diagnostica Stago
Biogenic	Hyphen Biomed	Biophen AT LRT <sup>a</sup>	90 s sur STA-R Diagnostica Stago
Instrumentation Laboratory	Chromogenix	Coamatic Antithrombin LR <sup>a</sup>	90 s
Instrumentation Laboratory	Chromogenix	Coamatic Antithrombin	90 s
Instrumentation Laboratory		HemosL Antithrombin	100 s
Instrumentation Laboratory		HemosL liquid Antithrombin <sup>a</sup>	100 s
Siemens		Innovance Antithrombin <sup>b</sup>	185-210 s selon l'analyseur
Trinity Biotech	Biopool (Spectrolyse)	TriniChrom Antithrombin (anti-Xa)	1 min

<sup>a</sup>Réactifs liquides prêts à l'emploi.

<sup>b</sup>Commercialisation prochaine.

chez les plus âgés. L'amplitude faible de ces modifications n'a pas de conséquences en pratique courante. L'antigène est parfois exprimé en g/L avec des valeurs usuelles entre 0,24 et 0,36 g/L. Ce mode d'expression n'est pas conseillé, car il complique l'interprétation des typages.

Résultats dans les différents types de déficits constitutionnels

Dans les déficits de types I et II pléiotropiques, les résultats sont anormaux avec les trois méthodes. Dans les déficits de type IIPE, les concentrations sont très modérément diminuées (70-80%). Dans les déficits de type IIHBS, l'activité cofacteur de l'héparine est seule anormale. Dans les déficits de type IIRS, l'activité cofacteur de l'héparine et l'activité progressive sont toutes deux anormales (tableau I). La mesure de l'activité cofacteur de l'héparine est la méthode de dépistage, puisqu'elle est sensible à tous les types de déficits. Les deux autres méthodes sont utilisées en complément pour le typage. Ce typage est indispensable, puisque le risque de thrombose diffère en fonction du type d'anomalie (risque de thrombose faible, voire nul pour les déficits de type IIHBS hétérozygote).

Principales causes d'anomalies acquises

– Certains auteurs ont observé une diminution très modérée de la concentration d'AT (de l'ordre de 10 à 20 %)

au cours de la grossesse. Cette observation est inconstante [105, 131];

– des déficits acquis sont observés dans les situations suivantes: insuffisance hépatocellulaire (par diminution de la synthèse), syndrome néphrotique (par fuite urinaire imparfaitement compensée), thromboses étendues et CIVD (par consommation);

– traitements engendrant des déficits acquis: héparine non fractionnée et héparines de bas poids moléculaire comportant un fort pourcentage de chaînes longues lorsqu'elles sont administrées à posologies « curatives » (diminution moyenne de 20 % de l'AT circulante), contraceptifs oraux contenant plus de 30 µg d'éthinylestradiol, L-asparaginase.

Un déficit mis en évidence au cours de ces traitements doit conduire à un contrôle, après cinq à dix jours d'arrêt pour les traitements par héparines, après au moins deux cycles d'arrêt pour les contraceptifs oraux.

*Protéine C*

Les différents types de déficits (quantitatifs et qualitatifs) (tableau I) et leurs caractéristiques sont décrits dans la première partie de ce document. Comme pour l'AT, il existe des déficits quantitatifs (type I) et des déficits qualitatifs (type II). Dans les déficits de type IIAM (activité

**Tableau III. Évolution de l'activité des inhibiteurs de la coagulation en fonction de l'âge et du sexe (techniques II) [d'après Lowe et al. 1997 [84]]**

	n	Tranches d'âge										
		25-34 ans		35-44 ans		45-54 ans		55-64 ans		65-74 ans		
		Médiane	5 <sup>e</sup> -99 <sup>e</sup> percentile	Médiane	5 <sup>e</sup> -99 <sup>e</sup> percentile	Médiane	5 <sup>e</sup> -99 <sup>e</sup> percentile	Médiane	5 <sup>e</sup> -99 <sup>e</sup> percentile	Médiane	5 <sup>e</sup> -99 <sup>e</sup> percentile	
<b>Antithrombine (%)</b>												
Hommes	692	99	83-121	102	80-124	101	73-122	101	76-117	96	72-120	
Femmes	770	100	82-117	100	81-118	105	84-119	104	76-124	101	81-119	
<b>Protéine C (%)</b>												
Hommes	716	99	68-148	108	66-175	102	55-147	105	67-154	99	59-153	
Femmes	787	98	64-155	98	60-161	114	57-169	114	65-164	117	59-172	
<b>Protéine S (%)</b>												
Hommes	576	113	83-149	116	78-150	117	72-150	117	81-152	115	73-163	
Femmes	633	92	47-128	96	58-134	106	71-141	109	58-156	112	69-149	

amidolytique), le site actif de la protéine est anormal ; dans les déficits de type IIAC (activité anticoagulante), le site catalytique est intact.

Trois types de mesures sont classiquement réalisés :

- la mesure de l'activité de la PC dans un test de coagulation ;
- le dosage immunologique qui évalue la concentration plasmatique de la protéine ;
- la mesure de l'activité amidolytique qui évalue les capacités fonctionnelles du site catalytique.

Les réactifs utilisés sont tous disponibles sous forme de coffrets commerciaux.

Parmi ces méthodes, la mesure de l'activité anticoagulante est la seule qui soit sensible aux déficits de type IIAC mais elle peut être (avec certains coffrets de réactifs) plus difficile à standardiser que la méthode chromogénique, et elle est plus soumise à interférences. À l'heure actuelle et compte tenu de ces difficultés, certains laboratoires ne mesurent pas systématiquement l'activité anticoagulante en première intention, le diagnostic de déficit de type IIAC nécessitant le recours à un laboratoire expérimenté dans le domaine de la recherche des FBR de thrombose.

Mesure de l'activité anticoagulante

De nombreux coffrets commerciaux permettent cette mesure (*tableau IV*). Toutes les techniques comportent une première étape de transformation de la PC en PCa à l'aide du Protac qui est une enzyme spécifique extraite du venin d'Agkistrodon contortrix. Toutes mesurent ensuite l'activité anticoagulante de la PCa contenue dans le mélange du plasma du patient et d'un plasma commercial spécifiquement dépleté en PC, mais elles diffèrent par le niveau de déclenchement de la coagulation. La coagulation peut, en effet, être étudiée dans un test global de type TCA ou déclenchée par le venin de vipère Russel (VVR) qui active le FX : dans les tests de type TCA, l'activité catalytique du site protéasique, et les interactions avec les cofacteurs Va, VIIIa, la PS, les PL et le calcium sont prises en compte. Ce test étudie donc la plupart des facettes fonctionnelles de la protéine, mais étant très global, il est aussi le plus sensible aux *interférences* : présence de certains anticoagulants lupiques (qui, en allongeant les temps de coagulation, peuvent masquer des déficits), de concentrations élevées de FVIII et du FV Leiden (qui, en raccourcissant les temps de coagulation, peuvent simuler des déficits), héparinémies très élevées. Les degrés d'interférence sont, cependant, plus ou moins importants en fonction des coffrets (*tableau IV*). Dans notre expérience, certaines techniques de type TCA, délicates, ne donnent satisfaction que lorsque le nombre de plasmas étudiés dans une série de tests est très limité.

**Tableau IV. Protéine C — Mesure de l'activité anticoagulante : caractéristiques de quelques trousses**

Fournisseur actuel	Fournisseur antérieur	Nom du coffret	Activateur	Type de temps de coagulation	Dilution du plasma	Interférences signalées par le fournisseur			
						FVIII (%)	HNF (UI/mL)	Anticoagulant lupique	FV Leiden hétérozygote
American Diagnostics		Acticlot PC	Protac	TCA	1/5	+	> 1	+	-
Cryoep	Bioep	Cryocheck Clot C	Protac	RVVT	1/10	> 600	> 1,2	-	+
Instrumentation Laboratory		HemosIL ProClot Protein C	Protac	TCA	pur	> 250	> 2	+	+
Biogenic	Hyphen Biomed	Hemoclott Protein C	Protac	TCA	1/10	+	> 1	+	?
Siemens	Siemens	Réactif Protéine C	Protac	TCA	1/10	+	> 2	+	+
Stago		Stacloct Protein C	Protac	TCA	pur	> 250	> 1	-	-
Trinity Biotech	Sigma (Accuclot)	TriniCLOT Protein C	Protac	TCA	1/10	+	> 1	+	+

#### Techniques colorimétriques

Elles évaluent exclusivement la fonctionnalité enzymatique du site actif de la PC. Il existe de nombreux coffrets commerciaux aux performances équivalentes ; tous utilisent le Protac pour transformer la PC en PCa et étudient la capacité de la PCa à cliver un substrat chromogène spécifique. Ces techniques sont bien standardisées et posent peu de problèmes d'interférence.

#### Dosages immunologiques

Compte tenu des faibles concentrations circulantes de PC, les techniques de type Elisa ou ELFA sont seules utilisables ; elles ne posent aucun problème technique spécifique.

#### Valeurs usuelles et variations physiologiques

À la naissance, la concentration plasmatique moyenne de PC est de 35 % (écart-type 9 %) [9]. Elle peut rester basse jusqu'à l'adolescence. Après 15 ans, et quelle que soit la méthode utilisée, les valeurs usuelles généralement adoptées sont comprises entre 70 et 140 % [10]. Cependant, il faut signaler que chez l'adulte, une augmentation de l'activité (chromogénique) de la PC en fonction de l'âge et quel que soit le sexe a été démontrée par Dolan *et al.* [34] et Rodeghiero *et al.* [103]. Dans l'étude de Lowe *et al.*, l'augmentation n'est observée que chez les femmes (tableau III) [84]. Rodeghiero *et al.* ont montré que l'effet de l'âge, mis en évidence en analyse univariée disparaissait complètement en analyse multivariée après prise en compte des taux de cholestérol total et de triglycérides et de l'indice de masse corporelle (IMC) [103].

#### Résultats dans les différents types de déficits constitutionnels

*La mesure de l'activité anticoagulante doit être réalisée en première intention, car les autres méthodes ne sont pas sensibles aux déficits de type IIAC. Le typage n'a pas, à ce jour, de conséquences sur l'évaluation du risque thrombotique individuel (tableau I).*

L'analyse du gène de la PC dans des familles déficitaires de type I a démontré les limites des tests plasmatiques : en effet, des concentrations subnormales, voire normales, ne permettent pas d'exclure la présence d'une mutation délétère avec 100 % de certitude [7].

#### Principales causes d'anomalies acquises

- Au cours de la grossesse normale, la concentration plasmatique de PC n'est pas modifiée [18, 23, 66, 105] ;
- des déficits acquis sont observés dans les contextes suivants : insuffisance hépatocellulaire (par diminution de la synthèse), hypovitaminose K (par diminution de la synthèse du facteur actif), thromboses étendues et CIVD (par consommation), présence d'auto-anticorps anti-PC ;

**Tableau V. Protéine S — Mesure de l'activité anticoagulante: caractéristiques de quelques trousses**

Fournisseur actuel	Fournisseur antérieur	Nom du coffret	Réactif	Interférences signalées par le fournisseur			
				FVIII (%)	HNF (UI/mL)	Anticoagulant lupique	FV Leiden hétérozygote
American Diagnostic		Acticlot PS	PCa/FXa/PL/Ca	?	> 1,2	+	+
Cryoep	Biopep	Cryocheck Clot S	PCa/VVR/PL/Ca	> 600	> 1	+	+
Instrumentation Laboratory		HemosIL ProS	Thromboplastine Ca/Protac	?	> 2	+	+
Siemens	Siemens	Protéine S AC	PCa/VVR/PL/Ca	> 400	> 3	+	+
Stago		Staclot PS	TCA/PCa+FVa bovin	> 250	> 1	+	±
Trinity Biotech	Sigma (Accuclot)	TriniCLOT <sup>®</sup> protein S	Pca/FXa/PL/Ca	?	> 1,2	+	?

<sup>o</sup>Commercialisation en 2009.

– traitements engendrant des déficits acquis: antagonistes de la vitamine K (AVK); *après arrêt des AVK, un délai de deux semaines au moins avant contrôle est recommandé* [123].

#### Protéine S

Il existe des déficits qualitatifs (type II) et des déficits quantitatifs avec PS libre (PSL) abaissée et PS totale (PST) normale (type III) ou PS libre et totale conjointement diminuées (type I) (*tableau I*). Les méthodes de mesure utiles au diagnostic sont de trois types: celles qui évaluent l'activité (cofacteur de la PCa) de la PS et celles qui mesurent la concentration plasmatique de la forme libre et de la forme totale. Comme dans le cas des autres inhibiteurs, la méthode théoriquement la plus pertinente, à utiliser en première intention parce qu'elle est susceptible de dépister tous les types de déficits, est celle qui évalue l'activité de la protéine. Il a cependant pendant longtemps été recommandé d'utiliser la mesure de la PSL en première intention à cause du manque de spécificité des mesures d'activité. Actuellement, ces problèmes sont largement atténués et cette mesure peut être plus largement proposée

*Il n'y a pas lieu de doser systématiquement la C4bBP*. En effet, ce dosage n'apporte, à ce jour, aucune information susceptible d'avoir une influence sur le diagnostic.

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

**Principes des méthodes actuelles.** Ces tests mesurent l'allongement du temps de coagulation d'un mélange du plasma à tester et d'un plasma réactif déplété en PS, en présence de PCa (exogène ou produite dans le mélange à l'aide du Protac). La coagulation est étudiée dans un test de type temps de Quick ou TCA, ou après activation par du FXa ajouté ou produit par activation endogène du FX par le VVR.

**Causes d'interférence.** Comme dans la mesure de l'activité anticoagulante de la PC, les taux très élevés de FVIII, la présence d'héparines, de certains anticoagulants lupiques et du FV Leiden sont des causes potentielles d'interférence et de faux diagnostics. Ces paramètres ont une influence plus ou moins grande en fonction du coffret (*tableau V*). Le réactif Staclot PS (Diagnostica Stago) est supplémenté en FVa bovin pour éviter l'interférence du FV Leiden. Malheureusement, cette interférence n'a pas pu être totalement éliminée [11]. La possibilité d'une interférence des HBPM dans les tests dont le réactif déclenchant est du FXa a été soulignée [112].

**Sensibilité.** Une dizaine de mutations (huit rapportées dans la base de données [101] et deux décrites plus récemment [61, 102] qui expliquent un phénotype biologique de type II ont été rapportées, ce qui démontre la sensibilité de la mesure d'activité vis-à-vis des déficits constitutionnels qualitatifs.

## Dosages immunologiques de la PSL et de la PST

La première technique de dosage de la PSL décrite par Comp *et al.* comportait une étape difficile à standardiser de précipitation de la PS complexée à la C4b-BP par le PEG, suivie d'une mesure de la PSL dans le surnageant. Les techniques commerciales actuelles se sont affranchies de cette étape, car elles utilisent des anticorps monoclonaux spécifiques de la PSL. Deux types de techniques sont disponibles, Elisa classiques de type sandwich et immunoturbidimétrique. Dans ces dernières, la PSL plasmatique est captée sur des particules de latex recouvertes de C4b-BP [54] ou d'un anticorps monoclonal anti-PSL [8]; dans un deuxième temps, l'addition de particules recouvertes d'un autre anticorps reconnaissant la PS captée entraîne une agglutination proportionnelle à la concentration de PS libre dans le plasma.

Pour la PS totale, les techniques commercialisées sont également de type Elisa ou immunoturbidimétriques. Elles emploient des anticorps polyclonaux ou monoclonaux. L'avantage de l'emploi d'anticorps monoclonaux qui permettent une mesure plasmatique directe de la PSL est évident. Néanmoins, il faut avoir à l'esprit la possibilité d'une non-reconnaissance de la protéine si une anomalie moléculaire affecte l'épitope de la PS reconnu par l'anticorps [6].

## Valeurs usuelles et variations physiologiques

À la naissance, la concentration plasmatique de PS est comprise entre 12 et 60 %. Elle atteint des valeurs proches de celle de l'adulte à six mois [9].

Chez l'adulte, les valeurs usuelles diffèrent en fonction de l'âge et du sexe (tableau III). L'analyse de la littérature et des résultats récents de plusieurs programmes de contrôle de qualité externe (ECAT, NEQAS) montre qu'il n'est malheureusement pas possible, à ce jour, d'adopter des limites de valeurs usuelles indépendantes des réactifs utilisés que ce soit pour les mesures d'activité ou de PS libre, et l'importance de la détermination de ces limites par chaque laboratoire [35, 38, 64, 65, 79, 84].

## Résultats dans les différents types de déficits constitutionnels

Tous les types de déficit ont été retrouvés chez des sujets atteints de MTEV, et les déficits de type II ne peuvent être détectés que si l'on mesure en première intention l'activité de la protéine. Or, actuellement, de nombreux laboratoires évaluent la PS libre. Cette attitude résulte d'une recommandation ancienne de la *World Health Organization* et de l'ISTH [72,73] qui tenait compte de la mauvaise spécificité des méthodes de mesure d'activité utilisées à l'époque. Les réactifs ont été améliorés et plusieurs sociétés savantes (*British Society of Haematology, College of American Pathologists*) sont revenues partiellement sur cette attitude tout en insistant sur l'importance de la connaissance des

causes d'interférence [55,130]. *Il y a lieu de tenir compte de ce changement d'attitude, et ce, d'autant plus qu'il existe des publications qui démontrent la sensibilité des méthodes de mesure d'activité vis-à-vis des mutations responsables de déficits qualitatifs (tableau I).*

## Principales causes d'anomalie acquises

- Les taux de PS diminuent précocement au cours de la grossesse (dès la dixième semaine) [23, 66, 18, 105]. *La recherche d'un déficit constitutionnel pendant cette période n'est pas recommandée, car l'interprétation des résultats de dosages est très délicate;*
- autres causes de déficit acquis : hépatopathie, hypovitaminose K, CIVD et thromboses étendues, auto-anticorps anti-PS;
- *au cours du syndrome inflammatoire*, plusieurs situations sont possibles en fonction des médiateurs de l'inflammation impliqués : augmentation des taux de PST, PSL et activité, ou diminution de la PS libre et de l'activité, d'où *le risque de faux diagnostic (positif ou négatif)* [25, 51];
- traitements : antagonistes de la vitamine K, L-asparaginase, certains traitements contraceptifs oraux (de type 3G, en particulier) et hormonaux substitutifs de la ménopause administrés par voie orale entraînent une diminution de la PS active circulante [4, 67]. Les contrôles programmés après arrêt des AVK ne seront pas réalisés à moins de deux, voire même trois semaines après l'arrêt; en effet, la normalisation de la concentration de PS peut être très lente [123].

Pour les CO et les THS, on attendra, comme pour l'AT, au moins deux cycles après l'arrêt du traitement.

## Calibration et contrôle

*Un certain nombre de mutations délétères des gènes des inhibiteurs de la coagulation, et tout particulièrement de l'AT et de la PC, peuvent ne pas être associées à des déficits plasmatiques francs.*

Il est donc extrêmement important d'éviter les dérives et de maîtriser au mieux la pratique des tests. Des courbes d'étalonnage et des plasmas de contrôle de qualité pour les zones « normale » et « pathologique » devront être systématiquement intégrés dans chaque série de dosages [71].

Il existe des standards internationaux pour les trois paramètres, et les calibrants commerciaux sont étalonnés par rapport à ces standards. Il existe également des plasmas commerciaux « zone normale » et « zone pathologique » pour le contrôle de qualité interne. Dans l'ensemble, les calibrants et les contrôles disponibles sur le marché sont correctement titrés; il convient, cependant, de vérifier leur titre lorsque des problèmes surviennent. On ne peut que recommander l'adhésion à des programmes de contrôle de qualité externe indépendants des fournisseurs de réactifs tels que celui qui est proposé par la fondation ECAT au niveau européen ([www.ecat.nl](http://www.ecat.nl)).

### Analyse des gènes

L'analyse des gènes des inhibiteurs de la coagulation est techniquement possible. Elle a permis d'établir les bases moléculaires des déficits [50, 74, 101]. Dans une approche classique, l'analyse des exons, des jonctions intron-exon et des régions promotrices proximales fait classiquement appel au séquençage direct. Elle est délicate et onéreuse et n'a pas une sensibilité de 100% ; en particulier cette approche n'est pas sensible aux grands remaniements géniques. Par ailleurs, certains déficits pourraient être la conséquence de mutations qui ne sont pas localisées dans les régions explorées ; le développement rapide de la biologie moléculaire et de la génétique a ouvert la porte à de nouvelles technologies qui améliorent les stratégies et la sensibilité de la détection des délétions/insertions (techniques MLPA, de DHPLC, etc.) [75]. La place de ces analyses dans le diagnostic biologique des déficits en inhibiteurs est développée dans le chapitre « Stratégie diagnostique ».

### Étude de la sensibilité à la PCa : mesure de la « RPCA »

Le FV Leiden est la principale cause reconnue de RPCA, facteur de risque de thrombose. La mesure plasmatique peut être réalisée dans la plupart des laboratoires ; le test génétique est réservé à un certain nombre de laboratoires qui disposent d'un agrément délivré par la DRASS. Le test RPCA est donc souvent utilisé en test de dépistage, mais il ne permet pas d'affirmer la présence d'une anomalie génétique ni le statut d'hétérozygotie ou d'homozygotie. De plus, il ne faut pas oublier que les tests plasmatiques peuvent, de par leur principe même, être soumis à des interférences.

### Test historique

Le test historique (de première génération) décrit par Dahlbäck *et al.*, en 1993, repose sur la mesure d'un TCA réalisé en présence et en l'absence de PCa (Coatest-APCR, IL) [27]. Sensible mais non spécifique, il a ensuite évolué vers une version dans laquelle le plasma du patient à tester est dilué dans du plasma déficient en FV (Coatest APCR-V). Dans ces conditions, seule l'influence du temps de dégradation du FV du patient intervient sur le ratio, et la discrimination entre patients porteurs ou non du polymorphisme Leiden du FV est grandement améliorée. D'autres tests de « deuxième génération » de principe un peu différent ont été développés. La sensibilité de ces méthodes vis-à-vis du FV Leiden est le plus souvent excellente. En revanche, la spécificité des tests reste imparfaite.

### Tests de deuxième génération

Tous les tests de deuxième génération cherchent à améliorer la spécificité de la méthode vis-à-vis de la recherche du FV Leiden (tableau VI).

**Tableau VI. Mesure de la RPCA : caractéristiques de quelques trousses commerciales**

Fournisseur	Nom du coffret	Mode d'activation de la coagulation	Mode d'obtention de la PCA	Plasma testé	Interférences signalées par le fournisseur
Biogenic/Hyphen Biomed	Hemoclot FVL	FIXa	X-PCA (±)	PM + protéines purifiées (FII, fibrinogène, PS, FVIII)	[FV]
Byolis/Technoclone	APCR kit	RVV-FV + noscarine	PCA (±)	PM + P de dilution	[FV]
Instrumentation Laboratory	Coatest APCR	TCA	PCA (±)	PM	[FVIII, FV, PS], AVK, HNF + toute cause de TCA allongé
Instrumentation Laboratory	Coatest APCRV	TCA	PCA (±)	PM + P déficient en FV	[FV], FVR306T
Pentapharm	Pefakit APC-R factor V Leiden	RVV-FV + noscarine	PCA (±)	PM + P déficient en FV	-
Siemens/Siemens	ProC Ac R	RVV	Protac (±)	PM	FV R306T, R306C, [PC]

PM : plasma du malade ; P : plasma ; [...] : influence possible, fonction de la concentration.

Ils diffèrent par :

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

Dans l'objectif d'une recherche de RPCA FV Leiden-dépendante, les tests de deuxième génération sont les plus appropriés. Les tests de première génération ne sont généralement utilisés que pour la détection des RPCA FV indépendantes, dans le contexte d'études cliniques.

#### *Optimisation de la qualité, interférences, causes de non-spécificité*

La méthode de première génération est la plus globale et la moins spécifique. Parmi les causes d'anomalie acquise, on peut citer les anticoagulants circulants de type lupiques [100] et la grossesse [18].

Certaines méthodes de deuxième génération restent sensibles aux variations de concentrations de certains facteurs : diminution de la PC (lorsque la génération de PCa est endogène), de la PS, du FV ou augmentation du FVIII, ou du fibrinogène. La sensibilité à la présence des anticoagulants lupiques est réduite lorsque l'activation de la coagulation est réalisée en aval de la ténase (activation des facteurs V, X ou II), et par optimisation de la concentration en PL.

Lorsque le test est réalisé en l'absence et en présence de PCa, le test effectué dans la première condition peut être anormal indépendamment de la présence du FV Leiden. Dans ce cas, selon les fabricants, le rapport ( $\pm$  PCa) resterait interprétable, mais en pratique une recherche du FV Leiden par biologie moléculaire doit être recommandée.

De Ronde et Bertina [31] ont conseillé l'expression des résultats sous forme de rapport du résultat du patient sur le résultat d'un pool normal ou d'un plasma lyophilisé normal (ratios normalisés). Cependant, dans une étude de Tripodi *et al.* [121], à laquelle ont participé sept laboratoires experts, *la normalisation n'améliorait pas la reproductibilité*. On peut donc exprimer le résultat d'une méthode en deux temps ( $\pm$  PCA) soit à l'aide du rapport des deux temps, soit à l'aide du rapport normalisé.

Chaque laboratoire doit *déterminer localement et pour chaque lot de réactif la zone de normalité et les zones de résistance* qui permettent de suspecter la présence du FV Leiden à l'état hétérozygote ou homozygote. Il peut exister une « zone de doute » dont les limites doivent être également précisées.

Un résultat dans cette zone de doute devra systématiquement entraîner une recherche du FV Leiden par test de biologie moléculaire.

Les mesures de RPCA sont possibles chez les patients traités par héparine dans la plupart des cas car les réactifs contiennent des inhibiteurs du médicament. L'insensibilité aux AVK est assurée dans la plupart des tests, en particulier lorsqu'ils sont réalisés sur mélange du plasma du patient et d'un plasma commercial déficient en FV.

#### ***Test de coagulation permettant l'exploration globale de la voie de la PC***

Plusieurs coffrets commerciaux de dépistage des anomalies de la voie de la PC ont été développés, il y a quelques années déjà, (PROC Global, Siemens, Gradi Throm PCP test, Gradipore, etc.). Ils étudient le degré d'allongement du temps de coagulation (type TCA ou dRVVT) du plasma du patient en l'absence et en présence de PCa par le Protac au sein du mélange. La sensibilité de ces techniques vis-à-vis des anomalies des protéines intervenant dans le test n'a été étudiée que sur des effectifs très faibles. Très bonne vis-à-vis du FV Leiden, elle est imparfaite vis-à-vis des déficits en PC et surtout des déficits en PS. Puisque ces techniques ne permettent pas de s'affranchir du dosage spécifique des inhibiteurs et de la recherche de RPCA et sont fréquemment altérées en dehors de la présence de ces anomalies spécifiques, elles présentent *un intérêt limité dans la stratégie de screening des anomalies de la voie de la PC* [119].

Elles pourraient, en revanche, se révéler utiles pour quantifier le degré de risque thrombotique individuel [36, 110]. Il en est de même d'autres méthodes d'évaluation globale du potentiel coagulant tel que le CAT (*calibrated automated thrombogram*) [60] ou l'OHP (*overall hemostatic potential*) [16, 62].

#### ***Recherche du FV Leiden et du polymorphisme 20210G>A du gène de la prothrombine, analyses de biologie moléculaire***

##### *Méthodes*

La recherche du polymorphisme 1691G>A de l'exon 10 du gène du FV et du 20210G>A de la région 3' non traduite du gène du FII est simple. Toutes les méthodes de recherche des mutations ponctuelles peuvent être employées. Elles apportent une *quasi-certitude quant au statut d'un individu vis-à-vis du polymorphisme recherché* [44, 114].

L'éventail des techniques est très large. On travaille le plus souvent sur l'ADN (purifié ou non). Il existe des techniques classiques qui comportent deux étapes : une étape d'amplification de l'ADN par PCR et une étape de détection de la mutation sur le produit amplifié. La détection peut être effectuée :

- par électrophorèse sur gel pour les techniques d'amplification-digestion ou d'amplification spécifique d'allèle ;

– sur support solide (microplaques : techniques type Elisa, billes, etc.) pour des techniques d'hybridation, de ligation d'oligonucléotide (OLA), etc. qui incluent une capture des produits amplifiés marqués à la biotine sur support solide par l'intermédiaire de la streptavidine puis une révélation colorimétrique ou fluorimétrique.

Des coffrets commerciaux utilisent ces principes. Historiquement, les techniques d'amplification-digestion ont été les premières employées. Elles sont peu onéreuses (en équipement et en réactifs) mais consommatrices de temps. Certaines techniques « multiplexes » permettent la recherche conjointe de ces deux polymorphismes.

Les techniques plus récentes de PCR en temps réel permettent une réalisation simultanée des deux étapes ; elles utilisent une sonde fluorescente qui permet la quantification et la caractérisation de l'amplicon formé en temps réel.

Pour des stratégies de recherche simultanées de nombreux polymorphismes et pour augmenter les cadences, deux voies sont actuellement développées : sont mises au point des techniques utilisant, d'une part, des microsphères de polystyrène fluorescentes porteuses de sondes de capture spécifiques d'allèles qui peuvent être détectées par la cytométrie en flux ou, d'autre part, dans une stratégie de détection de type puces à ADN, des nanoparticules d'or également porteuses de sondes spécifiques. Dans cette dernière technique qui est extrêmement sensible, aucune amplification de l'ADN n'est nécessaire. À noter que ces méthodes ne sont pas, à ce jour, employées en routine.

### Qualité

Le contrôle national de qualité « caractéristiques génétiques à des fins médicales » 05CGM1 organisé en 2005 sous l'égide de l'Afssaps comportait la recherche des polymorphismes Leiden du FV et 20210G>A de la prothrombine. Quarante-neuf laboratoires ont participé. Quarante-huit ont rendu des résultats exacts. La moitié des laboratoires employait des techniques classiques en deux étapes, et l'autre moitié la PCR en temps réel.

Lorsque des techniques « maison » sont utilisées, la responsabilité de la validité du résultat revient totalement au laboratoire, qui doit tout mettre en place pour assurer les performances de sa technique et garantir la qualité en s'entourant des contrôles qui permettent d'évaluer l'efficacité des différentes étapes analytiques (amplification, digestion, etc.). Les changements de lot de réactifs nécessitent une attention particulière.

Quelle que soit la technique employée, dans chaque série de tests seront incorporés un blanc réactif et trois contrôles (normal, muté hétérozygote et homozygote). Un panel de trois ADN de référence a récemment été préparé par le NIBSC et adopté en tant que premier panel génétique de référence pour la recherche des deux polymorphismes [57]. Des contrôles commerciaux commencent à être disponibles. Un programme de contrôle de qualité

externe européen est proposé par la fondation ECAT qui fournit deux fois par an des échantillons testés pour un panel de polymorphismes potentiellement modulateurs du risque thrombotique.

## Recherche des anticorps antiphospholipides

### Anticoagulant lupique

#### Grandes lignes

Comme on l'a vu dans la première partie, les anticoagulants de type lupique (LA) sont un groupe hétérogène d'anticorps dont les cibles sont diverses [13]. De cette hétérogénéité, de la diversité des techniques actuellement mises en œuvre pour les mettre en évidence et de l'absence d'harmonisation dans les modes d'expression des résultats découlent d'importantes difficultés diagnostiques.

Un sous-comité de l'ISTH travaille sur cette problématique. Les premières recommandations internationales ont été publiées en 1995 [17] et cinq grands principes de travail ont été définis à l'époque :

- travailler sur des échantillons plasmatiques de qualité, soigneusement « déplaquetés » ;
- mettre en œuvre au moins deux tests de dépistage de principe différent, sensibles (importance du choix du réactif, de la concentration en PL). Les caractéristiques essentielles des techniques les plus employées sont rapportées et discutées ci dessous ;
- démontrer l'existence d'un effet inhibiteur (mise en évidence de la persistance d'un résultat anormal lors de la répétition du test de dépistage sur un mélange à parties égales de plasma du patient et de plasma normal) ;
- démontrer le caractère PL-dépendant de cet inhibiteur dans un test de même principe que celui utilisé dans l'étape de dépistage (effet « normalisant » d'une forte concentration de PL) ;
- devant un TCA allongé, éliminer la présence d'un inhibiteur spécifique dirigé contre un facteur de la coagulation.

Plusieurs études récentes ont montré que, malgré ces premières recommandations, les performances des laboratoires restaient très variables. Par exemple, dans une étude italienne publiée en 2007, 29 laboratoires ont fourni 302 plasmas qu'ils considéraient positifs pour la recherche de LA. Ces plasmas ont été analysés une deuxième fois dans un centre de référence. Le résultat positif n'a été confirmé que dans 76 % des cas [92]. Dans une enquête européenne de l'ECAT (2006) pour un même échantillon de contrôle de qualité externe probablement porteur d'un LA testé dans 286 laboratoires, 48 % seulement des centres ont rendu un résultat positif.

Comme on le verra ci-dessous, des débats dont les conclusions vont probablement conduire à modifier certaines pratiques, sont en cours (voir compte rendu de

la réunion du sous-comité LA de l'ISTH, Vienne 2008 [www.med.unc.edu/isth/ssc/08sscminutes/08lupus.htm]).

#### Tests

La recherche de LA repose le plus souvent en France sur la réalisation de tests de coagulation de type TCA, dRVVT, TTD.

**TCA.** Le TCA (temps de céphaline + activateur) peut être employé pour le dépistage des LA. Cependant, deux points sont essentiels à connaître :

– le TCA est un test global influencé par de nombreuses anomalies du système de la coagulation et par les traitements anticoagulants, ce qui restreint ses possibilités d'utilisation ;

– *la sensibilité aux LA des réactifs commerciaux est variable.* Le type d'activateur, la nature du PL et sa concentration interviennent. Les réactifs les moins sensibles (qui ne doivent pas être utilisés pour le dépistage des LA) contiennent, par exemple, des PL extraits du soja (ex. : Actin FS, Siemens) ou de fortes concentrations de phosphatidylsérine ou du kaolin comme activateur (CK Prest, Stago). À l'inverse, il existe des réactifs (ex. : PTT-LA, Stago ; Actin FSL, Siemens) qui ont une sensibilité, qui sans être totale, est particulièrement importante.

La trousse commerciale Staclot LA (Stago) est conçue pour permettre la réalisation couplée d'un TCA de dépistage et d'un TCA de confirmation à l'aide de deux réactifs comportant respectivement une faible et une forte concentration de PL.

**Temps de venin de vipère Russell dilué (dRVVT).** Dans ce test, la coagulation est déclenchée par l'activation du FX à l'aide d'un extrait de VVR ou du venin lui-même, en présence de PL et de calcium. Le test n'est pas sensible aux déficits en facteurs de la voie endogène ou au déficit en FVII. Sa sensibilité et sa spécificité vis-à-vis des LA varient en fonction de la nature des PLs et du venin ou de l'extrait de venin utilisé. Les trousse commerciales sont nombreuses. Elles permettent de réaliser les tests de dépistage (en présence d'une faible concentration de PL) et de confirmation (forte concentration). La littérature est peu claire quant aux similarités/divergences des réactifs disponibles. En 2000, Triplett avait rapporté les compositions qualitatives de quelques réactifs commerciaux [120]. *Dans cette étude et avec ces réactifs, la sensibilité aux LA était comprise entre 96 et 100 % et la spécificité entre 60 et 73 %.* Nous n'avons pas trouvé dans la littérature d'étude comparative des performances analytiques des coffrets plus récente. Nous avons interrogé les fournisseurs au sujet de l'origine des réactifs actuellement disponibles. Les informations recueillies qui sont rapportées dans le *tableau VII* démontrent une relative homogénéité des sources d'approvisionnement.

**Temps de thromboplastine diluée. TTD, test de dépistage.** Le TTD est un temps de Quick sensibilisé aux LA

par réduction de la concentration de thromboplastine. Il existe une *importante diversité des réactifs* (thromboplastines animales, humaines ou recombinantes), *et des conditions techniques* utilisées. Schleider *et al.* avaient initialement proposé d'utiliser deux dilutions de thromboplastine au 1/50 et au 1/500 [111]. Pour les thromboplastines d'origine animale ou humaine, les résultats d'un travail multicentrique français réalisé en 1993 avec Thromborel S (Siemens) [PL d'origine placentaire humaine] avaient conduit à proposer l'emploi d'une seule dilution (1/500) [134] ; cette dilution a été retenue dans plusieurs études plus récentes. Pour la thromboplastine recombinante Innovin (Siemens), les dilutions au 1/100 et 1/200 paraissent les plus appropriées, une dilution plus forte pouvant entraîner une réduction de la sensibilité [12, 48, 56, 80].

**TTD, test de confirmation ?** À l'origine, le TTD est un test de dépistage des LA ; l'addition de céphaline à la thromboplastine peut permettre de réaliser un test de confirmation [48, 80]. Une trousse commerciale (Acticlot dPT, American Diagnostica) a repris ce schéma diagnostic.

**Autres tests.** D'autres tests sont décrits dans la littérature, en particulier le KCT (*Kaolin Clotting Time*), le CSCT (*Colloidal Silica Clotting Time*), le temps d'écarine et de textarine. En ce qui concerne les deux premiers, les PL présents dans le test sont les résidus membranaires présents dans le plasma du malade, il n'y a pas d'apport exogène. Les résultats obtenus sont donc très dépendants de la qualité de l'échantillon. De plus, le kaolin rend l'automatisation du KCT difficile. Écarine et textarine sont des venins de serpent activateurs directs de la prothrombine. Avec l'écarine, l'activation est indépendante de la présence de PL. Un ratio temps de textarine/temps d'écarine augmenté est donc en faveur de la présence d'un LA. Cette technique n'est pas commercialisée.

#### Pool normal

Pour réaliser des tests sur mélange et pour disposer d'un temps témoin local, il faut disposer d'un pool de plasmas normaux de *qualité optimale*.

Lorsqu'il est préparé localement, il doit être constitué d'un *mélange à parties égales* du plasma de *30 sujets sains*. Le mode de préparation des plasmas sera le même que celui qui a été indiqué plus haut pour les patients. Ils doivent être correctement déplaquetés (< 10 G/L) et présenter des concentrations normales des facteurs relevant. Le pool doit être fractionné et congelé sans délai. Il peut être conservé plusieurs mois à -70 °C [124, compte rendu de la réunion du sous-comité LA, ISTH 2008]. Le *décret n° 95-195 du 16 février 1995 du code de la santé publique* doit être respecté. Il précise que le sang et ses composants ne peuvent être utilisés en vue de préparer des réactifs qu'après recherche de l'antigène HBs, des anticorps anti-VIH-1 et -2 et anti-VHC et dépistage sérologique de la syphilis et qu'en

**Tableau VII**  
**A) dRVVT – Composition des réactifs**

Fournisseur	Nom du coffret	Origine du phospholipide	Venin de vipère Russel (RVV)
American Diagnostica	DVV test	Plante	RVV-X
Biopool	Bioclot LA	Cerveau de lapin	RVV-X
Instrumentation Laboratory	LAC screen	Plante	RVV
Stago**	LA-screen	?	RVV

RVV-X: activateur du FX extrait du RVV.

**B) dRVVT – Caractéristiques de quelques trouses**

Fournisseur	Source des réactifs	Nom du coffret	Caractéristiques	Interférences signalées par le fournisseur
American Diagnostica	American Diagnostica	DVV test DVV Confirm	Réactifs lyophilisés Présence d'un antihéparine	Inhibiteurs anti-II, anti-V ou anti-X (faux-positifs) FVIII 200% (faux-positifs) HNF > 1 UI/mL Lovenox > 0,25 UI/mL
Instrumentation Laboratory	Stago**	LA Screen LA Confirm	Réactifs lyophilisés Présence de polybrène	Non précisées, sauf interférences liées à la détection optique
Siemens/Siemens	Stago**	LA1 (dépistage) LA2 (confirmation)	Réactifs lyophilisés Présence d'un antihéparine	HNF > 1 UI/mL
Stago	Stago**	Sta clot DRVV Screen Sta clot DRVV Confirm	Réactifs lyophilisés Présence de polybrène	HNF > 0,8 UI/mL
Trinity Biotech/ Biopool	Stago**	Accuclot <sup>®</sup> dépistage dRVVT Accuclot <sup>®</sup> confirmation dRVVT	Réactifs lyophilisés Présence de polybrène	?

\*Changement de nom: TriniCLOT Lupus screen/TriniCLOT Lupus confirm.

\*\*Stago a acquis les activités de Life Diagnostics/Gradipore en 2009

cas de résultat anormal dans l'un de ces tests, le sang ne pourra être utilisé qu'après inactivation virale.

On commence à trouver dans le commerce des plasmas normaux de qualité adéquate qui peuvent éviter la préparation locale souvent très difficile d'un tel pool.

Expression des résultats

**Chez les sujets qui ne reçoivent pas d'anticoagulants et chez les sujets sous AVK :**

– *TCA*. Le mode d'expression des résultats fréquemment utilisé pour le TCA est l'index de Rosner [(TCA mélange-TCA témoin normal (T))/TCA patient (M)] × 100. Le seuil de positivité souvent retenu est un index à 15.

– *dRVVT*. Différents modes d'expression ont été proposés: rapport simple des temps de coagulation (TC) du plasma du patient dans les tests de dépistage (D) et confirmation (C) ou calcul d'un pourcentage de correction [(D-C)/D × 100], rapport normalisé [TC(D) M/TC(D) T]/[TC(C) M/TC (C) T] ou [TC (D) M/TC (C) M]/[TC (D) T/TC (C) T]. Pour les patients traités par AVK, la réalisation

du test sur mélange M + T est recommandée [122]. Si cette pratique est associée à une amélioration de la spécificité, elle engendre malheureusement une réduction de la sensibilité [116].

– *TTD*. Le mode d'expression des résultats le plus courant est le ratio M + T/T qui, par rapport au ratio M/T, apporte une meilleure spécificité, en particulier chez les sujets traités par AVK ou présentant un déficit en facteur de la voie exogène. Le calcul d'un index de Rosner du TTD qui augmenterait la sensibilité a été proposé [33]. Dans le travail multicentrique français de 1993, une limite de positivité du M + T/T à 1.20 avait été retenue [134].

**Chez les sujets traités par héparines (HNF, HBPM).** Les héparines (HNF et dans une moindre mesure HBPM) allongent les temps de coagulation et peuvent engendrer des faux positifs. Au cours de ces traitements, les tests qui peuvent être réalisés sont uniquement ceux qui emploient des réactifs contenant des agents neutralisant l'héparine (polybrène, héparinase). L'hypothèse d'une contamination d'un plasma par de l'héparine doit conduire à la réalisation

d'un temps de thrombine qui en cas d'allongement sera complété par un temps de reptilase (qui sera normal) ou a une mesure d'héparinémie (activité anti-Xa-).

#### Interférences

**TCA**: la présence d'un anticorps spécifique dirigé contre un facteur de la voie intrinsèque va, comme le LA, entraîner un allongement du TCA non corrigé par le plasma témoin; le diagnostic différentiel se fera par le dosage de ces facteurs; pour s'affranchir de l'interférence du LA dans ces dosages, il est parfois nécessaire d'augmenter la dilution du plasma étudié.

**TTD**: l'hyperfibrinogénémie peut engendrer des faux-positifs. Eschwege *et al.* ont proposé d'utiliser une formule de calcul qui tient compte de cette influence [37].

Propositions exposées au cours de la réunion du sous-comité LA Vienne ISTH 2008

Le compte rendu de la réunion de Vienne accessible sur le site de l'ISTH apporte des propositions de recommandations qui modifient ou complètent celles de 1995. Une publication apportant des instructions complémentaires (en particulier au sujet du mode d'expression des résultats) devrait compléter ce compte rendu.

– *Les experts recommanderaient de mettre en œuvre deux examens de dépistage: le dRVVT et un TCA avec un réactif dont l'activateur est de la silice et qui comporte une faible concentration de PL.* Ces tests apparaissent comme les plus robustes (coefficients de variation les plus bas, contrôle de qualité ECAT 2008-1). Les experts soulignent que le dRVVT est sensible et robuste quel que soit le coffret commercial utilisé;

– *le TTD ne serait pas recommandé, à cause des coefficients de variation élevés observés dans les programmes ECAT, qui reflètent l'hétérogénéité des thromboplastines et des dilutions utilisées par les participants.*

Sans surprise, ne seraient pas recommandés: les TCA réalisés à l'aide de réactifs contenant de l'acide élaïque (sensibilité faible), les temps d'écarine/textarine parce qu'il n'existe pas de coffret commercial, le KCT (mauvaise reproductibilité).

– *Les limites de positivité des tests de dépistage, de mélange et de confirmation devraient être déterminées à partir des résultats obtenus sur une population de 40 sujets sains de moins de 50 ans étudiés localement. La limite de positivité est  $m + 3$  écart-types;*

– *les tests sur mélanges de plasmas malade et témoin devraient être réalisés dans la proportion 1/1;*

– *le sous-comité recommanderait d'exprimer les résultats en rapport temps du malade (M)/temps du pool normal (N) pour tous les types de tests (détection, mélange, confirmation) et dans les tests qui comportent d'emblée une détection (D) et une confirmation (C) d'exprimer les résultats à l'aide de l'une des deux formules suivantes:  $(D/C M)/(D/$*

*C N) ou en pourcentage de correction  $(D-C)/D \times 100$ . Les résultats étant positifs si ce pourcentage de correction est supérieur à la limite de positivité déterminée localement;*  
– *concernant les patients sous AVK, il est précisé que la recherche de LA n'est pas possible lorsque l'INR est supérieur à 3 et que chez les patients qui ont un INR compris entre 1,5 et 3, elle doit être réalisée sur mélange M + T.*

#### Qualité des tests

Comme pour toute analyse biologique, le laboratoire se doit d'assurer la bonne qualité des tests en appliquant les règles de bonne pratique. En ce qui concerne le LA, les biologistes se trouvent cependant dans une situation plus délicate que pour d'autres analyses à cause:

- de l'hétérogénéité des LA et de leurs titres, et de l'absence d'une technique *gold standard* de mise en évidence;
- de l'existence dans le commerce de réactifs qui, dans un test de même principe, ont des sensibilités variables à la présence de ces anticoagulants;
- de l'obligation d'utiliser, tout au moins jusqu'à ces derniers mois, des pools de plasmas normaux et des contrôles de qualité préparés « artisanalement » au sein des laboratoires.

Il est utile de rappeler les règles à respecter qui sont, outre le contrôle local des seuils de positivité des méthodes (voir *supra*), l'inclusion de *contrôles de qualité (négatif et positif)* dans chaque série de mesures (on en trouve dans le commerce depuis quelque temps), et l'adhésion à un programme de *contrôle de qualité externe* (au niveau européen, l'ECAT propose un tel programme).

L'utilisation de plasmas surchargés en anticorps anti- $\beta$ 2GPI devrait, dans l'avenir, permettre une meilleure définition des seuils de positivité dans les conditions analytiques propres à chaque laboratoire.

#### ACL et anti- $\beta$ 2GPI (IgM et IgG)

La recherche de ces anticorps est, la plupart du temps, réalisée dans les laboratoires à l'aide de trousse Elisa commerciales ou plus rarement à l'aide de techniques Elisa « maison ». Il n'existe pas, à ce jour, de méthode de référence. Les modalités pratiques sont diverses, et les nombreuses tentatives de standardisation réalisées depuis 20 ans n'ont pas réussi à résoudre tous les problèmes de variabilité des résultats [40, 41, 93, 99, 118]. Le problème de variabilité pourrait être moindre pour les trousse commerciales d'évaluation des anti- $\beta$ 2GPI que pour celles qui mesurent les ACL [14]. Les origines de cette variabilité sont multiples. Les experts européens ont dégagé à plusieurs reprises les origines suivantes:

- hétérogénéité des protocoles techniques;
- difficultés dans l'établissement des seuils de positivité;
- problèmes de calibration.

Pour des informations plus détaillées, le lecteur peut se référer à la revue très récente de Favarolo *et al.* [42].

Hétérogénéité des protocoles techniques

**Recherche des ACL par Elisa.** Les trousse commerciales de première génération évaluent la capacité du sérum ou du plasma dilué des patients à se lier au cardiolipide fixé sur la plaque, en présence d'un sérum animal (qui apporte la  $\beta$ 2GPI). Plus récemment ont été développées des méthodes qui utilisent de la  $\beta$ 2GPI humaine. Dans certaines trousse, l'antigène cible n'est pas de la cardioline mais un *mélange de PL*. Il existe donc une importante hétérogénéité des méthodologies. Ces tests peuvent évaluer des anticorps qui se lient au cardiolipide seul, au cardiolipide lié à la  $\beta$ 2GPI (animale ou humaine) et pour ceux qui utilisent un mélange de PL, des anticorps qui lient des complexes PL-protéines comportant des protéines différentes de la  $\beta$ 2GPI dont la pertinence clinique n'est pas établie. Une autre difficulté provient de l'hétérogénéité de *l'origine de la  $\beta$ 2GPI* qui intervient dans les tests. En ce qui concerne le rapport clinique, et bien qu'il n'y ait pas d'études comparatives publiées, il paraît bien évidemment raisonnable *de privilégier les trousse utilisant de la  $\beta$ 2GPI humaine*. Enfin, les anticorps dirigés contre le cinquième domaine de la  $\beta$ GPI ne peuvent pas être détectés parce que ce domaine est engagé dans la liaison aux PL.

Parmi les autres difficultés rencontrées, on peut citer les difficultés du revêtement (*coating*) des puits et l'hétérogénéité et l'absence d'optimisation de l'étape de blocage qui entraîne des problèmes de bruit de fond.

Par rapport aux trousse commerciales, *les techniques « maison » offrent la possibilité d'optimiser certaines conditions de travail*. Par exemple, il est possible de réaliser systématiquement des « blancs-échantillons », ce qui réduit les faux-positifs, de travailler sur des échantillons dilués dans des conditions optimales (1/100) [83], d'avoir la pleine maîtrise des conditions de blocage des plaques.

**Distinction entre ACL infectieux et auto-immuns.** Les tests Elisa, commerciaux ou « maison », ne permettent pas de distinguer les ACL de type infectieux des ACL de type auto-immun. Les ACL de type infectieux pourraient être mis en évidence si l'on modifie l'Elisa de telle sorte que les protéines capables de lier le cardiolipide, apportées par les échantillons ou dans l'étape de blocage de la plaque, soient en quantité négligeable. Les modifications sont les suivantes :

- dilution des échantillons supérieure ou égale à 1/400 [78];
- tampon de dilution des échantillons et tampon de blocage : albumine très pure ou gélatine.

**Recherche des anti- $\beta$ 2GPI par Elisa.** Dans ce type d'Elisa, l'antigène cible est la  $\beta$ 2GPI, fixée sur des plaques irradiées.

La plupart des laboratoires utilisent des trousse Elisa commerciales; des techniques « maison » ne sont employées que par quelques-uns. Les performances des

techniques sont influencées par l'origine et par le procédé de purification de la protéine, et par la nature du support utilisé. La  $\beta$ 2GPI utilisée comme cible des anticorps ne doit pas être d'origine bovine. L'antigène utilisé dans les tests est d'origine humaine ou recombinante. Une étude récente comparant trois préparations commerciales, dont une recombinante, a observé des différences importantes dans leur capacité à lier les anticorps [109].

En ce qui concerne la mise en route de techniques « maison », quelques points sont particulièrement importants :

- la  $\beta$ 2GPI humaine est polymorphe et se présente dans le plasma sous différentes isoformes plus ou moins glycosylées [19]; il est donc recommandé d'employer dans le test de la  $\beta$ 2GPI purifiée à partir d'un pool de plasmas d'individus différents;
  - le procédé de purification influence la réactivité de la protéine vis-à-vis des anticorps; en particulier, la précipitation par *l'acide perchlorique* peut entraîner une dénaturation partielle de la protéine; dans les techniques « maison », l'emploi de ce réactif doit donc être évité;
  - le *choix de la microplaque* est critique : les microplaques dont la surface plastique est fortement chargée négativement doivent seules être utilisées [85];
  - le *pH du tampon de coating* (PBS pH 7,4 ou carbonate pH 9,6) ne semble pas avoir d'influence sur les résultats [22];
  - le *blocage* de la microplaque peut être réalisé avec une solution d'albumine, de gélatine ou d'IgG. Il n'est pas indispensable pour autant que l'on utilise du Tween dans les tampons de lavage [22].
- La variabilité des trousse commerciales d'évaluation des anti- $\beta$ 2GPI serait, d'après les données de la littérature, moindre pour les recherches d'anti- $\beta$ 2GPI que pour les dosages d'ACL [47].

Détermination des seuils de positivité

La *nécessité d'une détermination locale des seuils de positivité* des méthodes a été soulignée dès 2004 par les experts du Forum européen sur les anti-PLs. Toutes les méthodes Elisa sont concernées qu'elles soient « maison » ou commerciales.

Les modalités de cette détermination ont été établies :

- dans chaque centre, les tests doivent être réalisés sur *au moins 50 échantillons de plasma issus de sujets sains*, si possible appariés en âge et en sexe à la population des patients étudiés dans le centre; la nécessité d'un tel appariement résulte du fait que le seuil de positivité augmente avec l'âge;
- le *seuil de positivité doit être déterminé par la méthode des percentiles*, car la distribution des valeurs de DO n'est pas gaussienne. Il est recommandé d'aligner graphiquement en ordre croissant les valeurs de DO afin d'estimer la linéarité et surtout l'inflexion des points en fin de distribution. Lors de la révision des critères de Sapporo, le seuil

recommandé a été fixé au 99<sup>e</sup> percentile de la distribution (ou 40 UGPLM/PL pour les ACL) [87]. D'après le travail récent de Ruffatti *et al.*, vis-à-vis du diagnostic de SAPL et pour les IgG, la sensibilité serait plus forte si l'on utilise le seuil au 99<sup>e</sup> percentile [107].

Avec cette approche, des ACL ou des anti- $\beta$ 2GPI sont détectés chez 1 % des sujets sains. La prévalence de ces anticorps chez les sujets sains augmente avec l'âge.

Problèmes de calibration et d'interprétation des résultats

**ACL.** La calibration des troussees commerciales est effectuée par comparaison avec les standards de l'université de Louisville (États-Unis); les unités sont les GPL et MPL (*IgG et IgM phospholipid unit*). Ces calibrateurs sont constitués de dilutions dans du plasma normal d'un pool de plasmas de patients positifs. Ils sont censés être représentatifs de la grande hétérogénéité des anticorps présents chez les patients.

Un des problèmes potentiels est le non-parallélisme entre la courbe standard obtenue avec ces calibrateurs et celle obtenue avec les dilutions de calibrateurs secondaires (ou tertiaires) présents dans les troussees. L'introduction de ces calibrateurs a créé l'illusion que le test ACL était standardisé. Beaucoup d'études, ainsi que les résultats des enquêtes de contrôle de qualité externes ont montré que ce n'était pas le cas. Les seuils de positivité varient d'un facteur trois selon les troussees [97]. Il en est de même pour les résultats des échantillons. Il n'est donc pas facile de définir la fourchette de valeurs qui caractérise un « positif moyen », condition nécessaire pour satisfaire le critère biologique du SAPL.

Le groupe de standardisation de l'*European Forum on Antiphospholipid Antibodies* a proposé d'utiliser les anticorps monoclonaux humanisés HCAL (isotype IgG) et EY2C9 (isotype IgM) décrits ci-dessous.

**Anti- $\beta$ 2GPI.** Comme il n'existe pas de calibrateur de référence pour ce test, les résultats sont exprimés en unités arbitraires définies par chaque fabricant. Les résultats obtenus avec les différentes troussees commerciales ne sont, par conséquent, pas comparables. Pour remédier à ce problème l'*European Forum on Antiphospholipid Antibodies* a proposé de prendre comme étalons les anticorps monoclonaux humanisés HCAL (isotype IgG) et EY2C9 (isotype IgM), dont les caractéristiques ont été largement investiguées [63]. Bien que l'affinité des monoclonaux ne soit pas comparable à l'avidité des anticorps polyclonaux des patients et bien qu'ils ne présentent pas leur hétérogénéité, ils ont l'avantage de la pérennité et de la stabilité dans le temps. Ils sont disponibles auprès du *Centre for Disease Control* (CDC, Bethesda, MD, États-Unis) ou chez Inova Diagnostics (San Diego, États-Unis). Un appel a été lancé aux fabricants afin qu'ils fournissent, en plus de leurs unités arbitraires, une courbe étalon et la valeur du seuil de positivité exprimées en ng/mL équivalents de HCAL et de EY2C9. Il faut être conscient que l'adoption d'un étalon

de référence ne va pas résoudre tous les problèmes de standardisation du test, comme l'a démontré l'introduction des standards de l'université de Louisville dans le test de dosage des aCL et comme observé dans deux études multicentriques de l'*European Forum*. Mais leur adoption permettra de parler un langage commun. En l'absence d'un tel standard, il est préférable d'exprimer les résultats sous forme qualitative (négatif, faiblement positif, moyennement positif et fortement positif).

Contrôle de qualité externe

Compte tenu des problèmes énumérés ci-dessus, la participation à un contrôle de qualité externe est indispensable : l'ECAT organise quatre enquêtes par an pour les ACL et les anti- $\beta$ 2GPI sur l'échantillon destiné à la recherche des LAs. L'UK NEQAS propose également de telles enquêtes. Face au manque d'études comparant les performances des troussees, les organismes de contrôle de qualité externe sont actuellement seuls à pouvoir nous apporter des informations pertinentes en ce domaine.

Choix des tests

**Peut-on recommander une trousse plutôt qu'une autre ?**

En ce qui concerne les troussees commercialisées, il en existe plus d'une trentaine pour le dosage semi-quantitatif ou quantitatif des anticorps anti-PLs d'isotype IgG et IgM. Cette profusion contraste avec la pénurie d'études évaluant les performances des troussees actuellement disponibles; les études qui ont été conduites n'ont pas évalué plus d'une dizaine de coffrets et les plus récents n'ont pas été étudiés [97, 99]. Pour le dosage des ACL, aucune grande étude indépendante des fabricants de réactifs, comparant les troussees qui utilisent la cardiolipine à celles qui utilisent un mélange de PL n'a été menée. *Il est donc impossible de recommander une trousse plutôt qu'une autre; pour des raisons scientifiques, on peut conseiller de privilégier la  $\beta$ 2GPI humaine purifiée comme cible des anticorps.* Pour la recherche des anticorps anti- $\beta$ 2GPI, les troussees qui expriment les résultats (ainsi que la valeur seuil) en ng/mL équivalents des monoclonaux HCAL et EY2C9 doivent être préférées à celles qui utilisent des unités arbitraires. La détermination locale des seuils de positivité est indispensable.

**Faut-il faire le choix d'un « test maison » ?** En ce qui concerne les « tests maison », *il n'y a pas lieu de les déconseiller systématiquement* compte tenu des incertitudes qui planent sur les performances des troussees commerciales, car les conditions expérimentales qui permettent d'assurer une qualité adéquate ont été bien étudiées [22, 117]. Il convient de respecter de façon scrupuleuse les règles suivantes :

– pour la recherche des ACL: le plastique de la microplaque doit être de nature hydrophobe pour lier la cardiolipine. Le *coating* nécessite une nuit à 4 °C. Il est préférable d'utiliser de la  $\beta$ 2GPI humaine purifiée comme

source de cofacteur. La passivation de la microplaque peut être réalisée avec de l'albumine bovine ou de la gélatine. Lors de l'étape de *coating*, il est recommandé de réaliser de façon systématique des blancs échantillons (puits sans cardioplipide) et de tenir compte de la capacité de liaison non spécifique des échantillons étudiés, ce qui réduit les faux-positifs. Le calibrateur local doit être étalonné par rapport aux étalons de l'université de Louisville;

– pour la recherche des anti- $\beta$ 2GPI: le plastique de la microplaque doit être hydrophile (forte densité de charges négatives). Il est recommandé de tester des préparations de  $\beta$ 2GPI provenant de plusieurs fabricants avec un panel d'échantillons cliniquement bien caractérisés avant de faire le choix de l'antigène. Une fois l'antigène choisi, il faut tester plusieurs concentrations afin de déterminer celle qui présente le plus haut taux de liaison. Lors du *coating*, il faut prévoir des blancs échantillons. La passivation de la plaque peut se faire avec de la gélatine, de l'albumine bovine ou tout simplement par lavages avec des tampons contenant 0,1 % de Tween 20. Comme il n'existe pas de matériel de référence, il est fortement recommandé d'étalonner le calibrateur local avec les monoclonaux HCAL et EY2C9 et d'exprimer les valeurs de DO des échantillons et du seuil de positivité en ng/mL équivalents du monoclonal correspondant.

La participation à des programmes de contrôle de qualité externe est indispensable.

### Stratégie proposée du diagnostic biologique

La recherche des facteurs biologique de risque de MTEV comporte, comme on l'a vu plus haut, des tests plasmatiques souvent difficiles à standardiser; le recours à la biologie moléculaire est indispensable pour la recherche du polymorphisme 20210G>A du gène du FII; le rôle du biologiste dans l'interprétation des résultats est fondamental, et une relation étroite entre clinicien et biologiste est indispensable pour une prise en charge optimale des patients thrombophiliques. Pour toutes ces raisons, *la réalisation des bilans de thrombose doit se faire dans des centres experts qui maîtrisent tous les aspects techniques et cliniques.*

Les comptes rendus de résultats doivent être aisément interprétables. Pour chaque test, il est donc indispensable de mentionner dans le compte rendu d'analyse de la méthode et le réactif utilisé et les limites des valeurs usuelles. Un commentaire sera ajouté lorsque la complexité d'un dossier le nécessite.

#### Tests de première intention

##### Tests

La pathologie thrombotique veineuse fait, comme on l'a vu, intervenir plusieurs FBR. Le but de cette approche de

laboratoire *chez un sujet symptomatique* est d'établir son « potentiel thrombotique » et donc de *rechercher d'emblée tous les facteurs de risque reconnus* (déficit en inhibiteur AT, PC, PS, polymorphismes thrombogènes du FV et du FII, anticorps anti-PLs) dans le *respect des recommandations* et à l'aide *des tests les plus pertinents* (détaillés plus haut).

Compte tenu des causes d'anomalies acquises, le biologiste aura besoin d'une évaluation concomitante des paramètres suivants: *temps de Quick* pour estimer l'état de la fonction hépatique, dosage du *fibrinogène* dont l'élévation de la concentration plasmatique témoigne d'un syndrome inflammatoire. La connaissance de la concentration du *FVII (ou VII + X)* peut être une aide à l'interprétation des taux de PC, car la pharmacodynamie de la PC est similaire à celle du FVII.

En ce qui concerne la recherche du polymorphisme Leiden du FV, deux stratégies de dépistage sont possibles:

- réalisation d'emblée de la recherche du polymorphisme par test génétique mais les laboratoires agréés sont seuls habilités à effectuer cette recherche;
- recherche d'une RPCA (tests plasmatiques).

**Dans le cadre d'une enquête familiale.** Le groupe clinique a recommandé de ne rechercher en première intention chez les apparentés que le facteur de risque biologique diagnostiqué chez le cas index, de stopper l'étude en cas de négativité ou au contraire de la compléter par la recherche des autres facteurs de risque biologique de thrombose en cas de positivité de cette première investigation.

##### Aspect temporel

Jusqu'à présent, il était recommandé de réaliser ce bilan à *distance des épisodes aigus et des traitements anticoagulants* compte tenu des risques de faux diagnostics positifs ou négatifs ou de l'interprétation impossible de certains tests dans de telles situations.

Dans la mesure où la démonstration de la présence d'un anticorps anti-PL ou d'un déficit héréditaire en AT thrombogène peut simplifier la prise en charge thérapeutique initiale (en évitant interruption puis reprise de traitement par AVK), il apparaît pertinent de proposer une recherche précoce de ces anomalies au moment du diagnostic de thrombose (recommandation du groupe « clinique »). Cependant, il faut se souvenir que la présence d'un anticorps antiphospholipide mis en évidence moins de 12 semaines après un épisode thrombotique n'est pas un critère biologique de SAPL reconnu dans le consensus de Sydney [87]. La recherche des polymorphismes thrombogènes du FII et du FV par technique de biologie moléculaire n'est pas influencée par l'état clinique ou les traitements anticoagulants. En revanche, à la phase aiguë de thrombose, chez les patients traités par héparine ou par AVK peuvent exister des anomalies acquises des inhibiteurs. Pour mémoire, le bilan de thrombose *pendant la*

*grossesse n'est pas recommandé* compte tenu des anomalies acquises qui touchent de façon constante la PS et parfois l'AT pendant cette période.

### **Contrôles**

– Si un premier bilan complet a été effectué au moment du diagnostic de thrombose, on proposera systématiquement à distance de l'événement et des traitements anticoagulants un contrôle de la PS et de la PC (déficits pouvant être masqués en phase aiguë, difficultés d'interprétation au cours des traitements par AVK) ;

– les anomalies permanentes sont seules susceptibles d'influencer la prise en charge thérapeutique. Le contrôle de la permanence des anomalies décelées sur un premier bilan est donc fondamental :

- en cas de déficit inexpliqué en AT, PC ou PS, le contrôle sera effectué en dehors de tout contexte susceptible d'engendrer un déficit acquis. Si l'anomalie est retrouvée, le typage du déficit sera effectué sur ce deuxième prélèvement ;
- en cas de contrôle d'une mesure de RPCA anormale ou dans une zone « d'incertitude », la réalisation d'une recherche du FV Leiden par technique de biologie moléculaire sur ce deuxième prélèvement est impérative.

– En ce qui concerne les recherches des polymorphismes thrombogènes du FII et du FV par technique de biologie moléculaire, le diagnostic étant établi pour la vie entière, il apparaît particulièrement important de prendre toutes les précautions pour éviter les faux diagnostics. Même s'il n'existe, à ce jour, aucune obligation légale et tout, au moins, lorsque le résultat d'une première recherche est positif, le contrôle sur un deuxième prélèvement nous paraît devoir être conseillé (accord professionnel).

Le diagnostic biologique des anticorps anti-PLs du SAPL repose sur la mise en évidence d'anticorps permanents. Les conditions de réalisation dans le temps de la recherche de ces anticorps ont été précisées lors de la réunion de Sydney [87]. Les points essentiels sont les suivants :

- la présence des anticorps doit avoir été démontrée entre 12 semaines et 5 ans après les manifestations cliniques ;
- la démonstration de leur persistance est indispensable au diagnostic : la recherche doit être positive lors d'au moins deux contrôles réalisés à plus de 12 semaines d'intervalle. Compte tenu de l'hétérogénéité des méthodologies et de leurs performances, il est important de réaliser le dépistage et les contrôles dans un même laboratoire, avec les mêmes méthodologies.

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

La présence d'un déficit isolé confirmé en inhibiteur de la coagulation ne permet pas d'affirmer son caractère héréditaire, et l'enquête familiale est indispensable.

L'analyse du gène ne doit pas être une analyse de routine, d'autant plus qu'avec les techniques disponibles une sensibilité complète n'est pas atteinte.

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

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

En France, les gènes des trois inhibiteurs de la coagulation (AT, PC, PS) sont analysés à Paris dans le service d'hématologie biologique de l'hôpital Européen Georges-Pompidou (sous l'égide du Pr M. Aiach, contact : Dr M. Alhenc Gelas) ; l'analyse des gènes de la PC et de la PS est également pratiquée à Bordeaux (plateau technique de biologie moléculaire du CHU, Dr G. Freyburger).

### **Analyses des caractéristiques génétiques : aspects légaux**

En tant qu'examen touchant les caractéristiques génétiques, c'est-à-dire la nature intime de l'individu et ses liens familiaux, la recherche des polymorphismes Leiden du FV et 20210G>A du gène du FII et les recherches des mutations des gènes des inhibiteurs de la coagulation doivent être réalisées dans le cadre de règles qui ont été définies par les décrets n° 2000-570 du 23/06/2000 et n° 2008-321 du 4/04/2008 insérés dans le code de la santé publique (livre Ier, titre VI, chapitre 1<sup>er</sup>). Ce code définit que l'examen des caractéristiques génétiques d'une personne à des fins médicales a pour objet « soit de confirmer ou d'infirmer le diagnostic de maladie génétique chez une personne qui en présente les symptômes, soit de rechercher, chez une personne asymptomatique, les caractéristiques d'un ou plusieurs gènes susceptibles d'entraîner à terme le développement d'une maladie chez la personne elle-même ou sa descendance ». Quatre sections précisent respectivement les conditions de prescription, d'agrément et d'autorisation à la pratique, de communication du résultat, et de conservation du document.

### **Prescription**

Elle suppose un entretien préalable avec le patient lui expliquant la nature de l'examen, la signification du résultat et les conséquences éventuelles de ce résultat sur son suivi thérapeutique et son pronostic. L'accord écrit du sujet est requis pour réaliser le test, et il peut refuser d'en connaître le résultat. L'information préalable à la réalisation du test (directe, puis consignée par écrit) comme la remise du résultat doivent être faites par un médecin ayant

des compétences en génétique médicale. Le secret médical doit être respecté vis-à-vis des tiers. Les mineurs ne sont testés qu'en cas de bénéfice individuel direct attendu.

#### Réalisation des analyses

Elle est restreinte à des praticiens agréés exerçant dans des établissements ou organismes autorisés. L'agrément des praticiens est nominatif et attribué pour une durée de cinq ans renouvelable par arrêté du préfet de région pris après avis de la Commission consultative nationale en matière d'examens des caractéristiques génétiques à des fins médicales.

#### Compte rendu d'analyse

Commenté et signé par le praticien responsable agréé, il doit être adressé exclusivement au praticien prescripteur des examens génétiques, qui remettra le résultat au patient dans le cadre d'une consultation médicale individuelle.

#### Consentement écrit, double des prescriptions et comptes rendus d'analyse

Ils doivent être conservés par le médecin prescripteur dans le dossier médical du patient pour une durée de 30 ans. Les comptes rendus d'analyse et leur commentaire explicatif sont également conservés par le laboratoire de biologie médicale pour une durée de 30 ans.

## Références

1. Adcock DM, Hoefner DM, Kottke-Marchant K, Marlara RA, Szamosi DI, Warunek DJ. Collection, transport and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline — Fifth edition Clinical and Laboratory Standard Institute approved guideline 2008 H21-A5. 28.
2. Aiach M, Nicaud V, Alhenc-Gelas M, et al. Complex association of protein C gene promoter polymorphism with circulating protein C levels and thrombotic risk. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1573-6.
3. Alhenc-Gelas M, Gandrille S, Aubry ML, Aiach M, and the French Inserm network on molecular abnormalities responsible for protein C and protein S deficiencies: thirty-three novel mutations in the protein C gene. French Inserm network on molecular abnormalities responsible for protein C and protein S. *Thromb Haemost* 2000; 83: 86-92.
4. Alhenc-Gelas M, Plu-Bureau G, Guillonnet S, et al. Impact of progestagens on activated protein C (APC) resistance among users of oral contraceptives. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1594-600.
5. Alhenc-Gelas M, Aiach M. Anomalies constitutionnelles de la coagulation prédisposant aux thromboses. Hématologie. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale*, Elsevier: Paris, 2007, 10 p. (2007 ref 1).
6. Alhenc-Gelas M, Juin F, de Raucourt E, Gandrille S, Borgel D, Aiach M. Influence of *PROS1* gene mutations affecting protein S amino-acid 275 on plasma free protein S measurement. *Thromb Haemost* 2007; 97: 678-80 (2007 ref 2).
7. Allaart C, Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM, Brië E. Increased risk of venous thrombosis in carriers of hereditary protein C deficiency defect. *Lancet* 1993; 341: 134-8.
8. Amiral J, Grosley B, Boyer-Neumann C, et al. New direct assay of free protein S antigen using two distinct monoclonal antibodies specific for the free form. *Blood Coagul Fibrinol* 1994; 5: 179-86.
9. Andrew M, Paes B, Milner R, et al. Development of the human coagulation system in the full-term infant. *Blood* 1987; 70: 1657-2.
10. Andrew M, Vegh P, Johnston M, Bowker J, Ofosu F, Mitchell L. Maturation of the hemostatic system during childhood. *Blood* 1992; 80: 1998-2005.
11. Antolini-Gouvtis J, Morange PE, Aillaud MF, et al. Evaluation of a functional test in the screening of PS. *Ann Biol Clin* 2003; 61: 597-601.
12. Arnout J, Vanrusselt M, Huybrechts E, Vermeylen J. Optimization of the dilute prothrombin time for the detection of the lupus anticoagulant by use of recombinant tissue thromboplastin. *Br J Haematol* 1994; 87: 94-9.
13. Arnout J. Antiphospholipid syndrome: diagnostic aspects of lupus anticoagulants. *Thromb Haemost* 2001; 86: 83-91.
14. Audrain MA, Colonna F, Morio F, Hamidou MA, Muller JY. Comparisons of different kits in the detection of autoantibodies to cardiolipin and beta-2-glycoprotein I. *Rheumatology (Oxford)* 2004; 43: 181-5.
15. Bertina R, Ploos van Amstel HK, van Wijngaarden A, et al. Heerlen polymorphism of protein S, an immunologic polymorphism due to dimorphism of residue 460. *Blood* 1990; 76: 538-48.
16. Besser M, Baglin C, Luddington R, van Hylckama Vlieg A, Baglin T. High rate of unprovoked recurrent venous thrombosis is associated with high thrombin-generating potential in a prospective cohort study. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 1720-5.
17. Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. *Thromb Haemost* 1995; 74: 1185-90.
18. Brenner B. Haemostatic changes in pregnancy. *Thromb Res* 2004; 114: 409-14.
19. Brighton TA, Dai YP, Hogg PJ, Chesterman CN. Microheterogeneity of beta-2-glycoprotein I: implications for binding to anionic phospholipids. *Biochem J* 1999; 340: 59-67.
20. Castaman G, Biguzzi E, Razzari C, et al. Association of protein S Pro677Pro dimorphism with plasma protein S levels in normal individuals and patients with inherited protein S deficiency. *Thromb Res* 2007; 120: 421-6.
21. Castoldi E, Hackeng TM. Regulation of coagulation by protein S. *Curr Opin Hematol* 2008; 15: 529-36.
22. Cavazzana A, Ruffatti A, Tonello M, Bortolati M, De Moerloose P, Reber G. An analysis of experimental conditions influencing the anti-beta-2-glycoprotein I Elisa assay results. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1109: 484-92.
23. Clark P, Brennand J, Conkie JA, McCall F, Greer IA, Walker ID. Activated protein C sensitivity, protein C, protein S and coagulation in normal pregnancy. *Thromb Haemost* 1998; 79: 1166-70.
24. Corral J, Hernandez-Espinosa D, Soria JM, et al. Antithrombin Cambridge II (A384S): an underestimated genetic risk factor for venous thrombosis. *Blood* 2007; 109: 4258-63.
25. Criado Garcia O, Sánchez-Corral P, Rodríguez de Córdoba S. Isoforms of human C4b-binding protein. II. Differential modulation of the *C4BPA* and *C4BPB* genes by acute phase cytokines. *J Immunol* 1995; 155: 4037-43.
26. Dahlbäck B, Villoutreix B. Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway: novel insights into structure-function relationships and molecular recognition. *Arterioscler. Thromb. Vasc Biol* 2005; 25: 1311-20.
27. Dahlbäck B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor

- anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:1004-8.
28. De Groot PG, Lutters B, Derksen RH, Lisman T, Meijers JC, Rosendaal FR. Lupus anticoagulant and the risk of a first episode of deep venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1993-7.
29. De Laat B, Derksen RH, van Lummel M, Pennings MT, de Groot PG. Pathogenic anti-beta-2-glycoprotein I antibodies recognize domain I of beta-2-glycoprotein I only after conformational change. *Blood* 2006; 107: 1916-24.
30. De Visser MC, Rosendaal FR, Bertina RM. A reduced sensitivity for activated protein C in the absence of factor V Leiden increases the risk of venous thrombosis. *Blood* 1999; 93: 1271-6.
31. De Ronde H, Bertina RM. Laboratory diagnosis of APC-resistance: a critical evaluation of the test and the development of diagnostic criteria. *Thromb Haemost* 1994; 72: 880-6.
32. Denis CV, Roberts SJ, Hackeng TM, Lenting PJ. *In vivo* clearance of human protein S in a mouse model: influence of C4b-binding protein and the Heerlen polymorphism. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 2209-15.
33. Devreese KM. Interpretation of normal plasma mixing studies in the laboratory diagnosis of lupus anticoagulants. *Thromb Res* 2007; 119: 369-76.
34. Dolan G, Neal K, Cooper P, Brown P, Preston FEI. Protein C, antithrombin III and plasminogen: effect of age, sex and blood group. *Br J Haematol* 1994; 86: 798-803.
35. Dykes AC, Walker ID, McMahon AD, Islam SI, Tait RC. A study of PS antigen levels in 3,788 healthy volunteers: influence of age, sex and hormone use, and estimate for prevalence of deficiency state. *Br J Haematol* 2001; 113: 636-41.
36. Eichinger S, Hron G, Hirschl M, *et al.* Prediction of recurrent venous thromboembolism by measuring ProC global. *Thromb Haemost* 2007; 98: 1232-6.
37. Eschwege V, Seddiki S, Robert A. The tissue thromboplastin inhibition test in the detection of lupus anticoagulants: importance of a correction factor eliminating the influence of fibrinogen level. *Thromb Haemost* 1996; 76: 65-8.
38. Faioni E, Valsecchi C, Palla A, Taioli E, Razzari C, Mannucci PM. Free protein S deficiency is a risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1997; 78: 1343-6.
39. Favaloro EJ. Pre-analytical variables in coagulation testing. *Blood Coagul Fibrinol* 2007; 18: 86-9 (2007 ref 1).
40. Favaloro EJ, Silvestrini R. Assessing the usefulness of anticardiolipin antibody assays: a cautious approach is suggested by high variation and limited consensus in multilaboratory testing. *Am J Clin Pathol* 2002; 118: 548-57.
41. Favaloro EJ, Wong RC, Jovanovich S, Roberts-Thomson P. A review of  $\beta_2$ -glycoprotein-I antibody testing results from a peer-driven multilaboratory quality assurance program. *Am J Clin Pathol* 2007; 127: 441-8 (2007 ref 2).
42. Favarolo EJ, Wong RC. Laboratory testing and identification of antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome: a pot pourri of problems, a compilation of possible solutions. *Semin Thromb Hemost* 2008; 34: 389-410.
43. Freyburger G, Andras M, Sanchez G, Hall CM, Rosen S. Response to activated protein C upon storage of whole blood and plasma. *Thromb Res* 1999; 93: 89-95.
44. Freyburger G, Labrousse S. FV Leiden et RPCA, FII Leiden, aspects physiopathologiques et stratégie diagnostique. *Spectrabiologie* 2007; 162: 60-74.
45. Galli M, Finazzi G, Bevers EM, Barbui T. Kaolin clotting time and dilute Russel's viper venom time distinguish between prothrombin-dependent and  $\beta$ 2GPI dependent antiphospholipid antibodies. *Blood* 1995; 86: 617-23.
46. Galli M, Luciani D, Bertolini G, Barbui T. Lupus anticoagulants are stronger risk factors for thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipid syndrome: a systematic review of the literature. *Blood* 2003; 101: 1827-32 (2003 ref 1).
47. Galli M, Luciani D, Bertolini G, Barbui T. Anti-beta-2-glycoprotein I, antiprothrombin antibodies, and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2003; 102: 2717-23 (2003 ref 2).
48. Galli M, Borrelli G, Jacobsen EM, *et al.* Clinical significance of different antiphospholipid antibodies in the WASP study. *Blood* 2007; 110: 1178-83.
49. Galli M, Reber G, de Moerloose P, de Groot PG. Invitation to a debate on the serological criteria that define the antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 399-401.
50. Gandrille S, Borgel D, Sala N, *et al.* Protein S deficiency: a database of mutations — summary of the first update. *Thromb Haemost* 2000; 84: 918.
51. Garcia de Frutos P, Alim RI, Härdig Y, Zöller B, Dahlbäck B. Differential regulation of alpha and beta chains of c4bBP during acute phase response resulting in stable plasma levels of free anticoagulant protein S. *Blood* 1994; 84: 815-22.
52. Garcia de Frutos P, Fuentes-Prior P, Hurtado B, Sala N. Molecular basis of protein S deficiency. *Thromb Haemost* 2007; 98: 543-56.
53. Giannakopoulos B, Passam F, Ioannou Y, Krilis SA. How we diagnose the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2009 29; 113: 985-94 [Epub 2008 Aug 28].
54. Giri TK, Hillarp A, Härdig Y, Zöller B, Dahlbäck B. A new direct fast and quantitative enzyme linked ligand sorbent assay for measurement of free PS antigen. *Thromb Haemost* 1998; 79: 767-72.
55. Goodwin AJ, Rosendaal FR, Kottke-Marchant K, Bovill EG. A review of the technical, diagnostic, and epidemiologic considerations for protein S assays. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126: 1349-66.
56. Goudemand J, Caron C, De Prost, *et al.* Evaluation of sensitivity and specificity of a standardized procedure using different reagents for the detection of lupus anticoagulants. The Working Group on Hemostasis of the Société française de biologie clinique and for the Groupe d'études sur l'hémostase et la thrombose. *Thromb Haemost* 1997; 77: 336-42.
57. Gray E, Hawkins JR, Morrison M, *et al.* Establishment of the 1<sup>st</sup> international genetic Reference panel for factor V Leiden, human gDNA. *Thromb Haemost* 2006; 96: 215-9.
58. Harper PL, Carrell RW. The serpins. In: Bloom AL, Forbes CD, Thomas DP, Tuddenham EG, eds. *Haemost Thromb* 1994; 641-53.
59. Hataway W, Corrigan J. Report of SSC committee on neonatal hemostasis. *Thromb Haemost* 1991; 65: 323-5.
60. Hemker HC, Giesen P, AlDieri R, *et al.* The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002; 32: 249-53.
61. Hermida J, Faioni EM, Mannucci PM. Poor relationship between phenotypes of protein S deficiency and mutations in the protein S alpha gene. *Thromb Haemost* 1999; 82: 1634-8.
62. Hron G, Kollars M, Binder BR, Eichinger S, Kyrle PA. Identification of patients at low risk for recurrent venous thromboembolism by measuring thrombin generation. *JAMA* 2006; 296: 397-402.
63. Ichikawa K, Khamashta MA, Koike T, Matsuura E, Hughes GR. Beta-2-glycoprotein I reactivity of monoclonal anticardiolipin antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 1453-61.
64. Jennings I, Kitchen S, Cooper P, Makris M, Preston FE. Sensitivity of functional protein S assays to protein S deficiency: a comparative study of three commercial kits. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1112-4.

65. Jennings I. Protein S assays : method related discrepancies SSC-ISTH plasma coagulation inhibitors 2008; *Rapports ECAT* 2006-2007-2008.
66. Kjellberg U, Andersson NE, Rosén S, Tengborn L, Hellgren M. APC resistance and other haemostatic variables during pregnancy and puerperium. *Thromb Haemost* 1999; 81 : 527-31.
67. Koenen RR, Christella M, Thomassen LG, Tans G, Rosing J, Hackeng TM. Effect of oral contraceptives on the anticoagulant activity of protein S in plasma. *Thromb Haemost* 2005; 93 : 853-9.
68. Kottke-Marchant, K Duncan A. Antithrombin deficiency: issues in laboratory diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126 : 1326-36 (2002 ref 1).
69. Kottke-Marchant K, Comp P. Laboratory issues in diagnosing abnormalities of protein C, thrombomodulin and endothelial cell protein C receptor. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126 : 1337-48 (2002 ref 2).
70. Kristensen SR, Rasmussen B, Pedersen S, Bathum L. Detecting antithrombin deficiency may be a difficult task-more than one test is necessary. *J Thromb Haemost* 2007; 5 : 617-8.
71. Labrousche S, Reboul MP, Guérin V, Vergnes C, Freyburger G. Protein C and protein S assessment in hospital laboratories: which strategy and what role for DNA sequencing? *Blood Coagul Fibrinol* 2003; 14 : 531-8.
72. Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, *et al*. Inherited thrombophilia: part I. *Thromb Haemost* 1996; 76 : 651-2.
73. Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, *et al*. Inherited thrombophilia: part II. *Thromb. Haemost*. 1996; 76 : 824-34.
74. Lane DA, Bayston T, Olds RJ, *et al*. Antithrombin mutation database: 2<sup>nd</sup> (1997) update. *Thromb Haemost* 1997; 77 : 197-211.
75. Lee ST, Kim HJ, Kim DK, Schuit RJ, Kim SH. Detection of large deletion mutations in the *SERPINC1* gene causing hereditary antithrombin deficiency by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *J Thromb Haemost* 2008; 6 : 701-3.
76. Leroy-Matheron C, Duchemin J, Levent M, Gouault-Heilmann M. Genetic modulation of plasma protein S levels by two frequent dimorphisms in the *PROS1* gene. *Thromb Haemost* 1999; 82 : 1088-92.
77. Leroy-Matheron C, Duchemin J, Levent M, Gouault-Heilmann M. Influence of the nt 2148 A to G substitution (Pro 626 dimorphism) in the *PROS1* gene on circulating free protein S levels in healthy volunteers: reappraisal of protein S normal ranges. *Thromb Haemost* 2000; 83 : 798-9.
78. Levy RA, de Meis E, Pierangeli S. An adapted Elisa method for differentiating pathogenic from nonpathogenic aPL by a beta-2-glycoprotein I dependency anticardiolipin assay. *Thromb Res* 2004; 114 : 573-7.
79. Liberti G, Bertina RM, Rosendaal FR. Hormonal state rather than age influences cut-off values of protein S: reevaluation of the thrombotic risk associated with protein S deficiency. *Thromb Haemost* 1999; 82 : 1093-6.
80. Liestöl S, Jacobsen EM, Wisløff F. Dilute prothrombin time-based lupus ratio test. Integrated LA testing with recombinant tissue thromboplastin. *Thromb Res* 2002; 105 : 177-82.
81. Lijfering WM, Mulder R, Ten Kate MK, Veeger NJ, Mulder AB, van der Meer J. Clinical relevance of decreased free protein S levels. Results from a retrospective family cohort study involving 1,143 relatives. *Blood* 2009 5; 113 : 1225-30 [Epub 2008 Oct 22].
82. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Poli G, Guidi GC. Influence of centrifuge temperature on routine coagulation testing. *Clin Chem* 2006; 52 : 537-8.
83. Loizou S, McCrea JD, Rudge AC, Reynolds R, Boyle CC, Harris EN. Measurement of anti-cardiolipin antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa): standardization and quantitation of results. *Clin Exp Immunol* 1985; 62 : 738-45.
84. Lowe G, Rumley A, Woodward, *et al*. Epidemiology of coagulation factors, inhibitors and activation markers: the third Glasgow MONICA survey. I. Illustrative reference ranges by age, sex and hormone use. *Br J Haematol* 1997; 97 : 775-84.
85. Matsuura E, Igarashi Y, Yasuda T, Triplett DA, Koike T. Anticardiolipin antibodies recognize beta-2-glycoprotein I structure altered by interacting with oxygen modified solid phase surface. *J Exp Med* 1994; 179 : 457-62.
86. Meade T, Dyer S, Howard DJ, Imeson JD, Stirling Y. Antithrombin III and procoagulant activity; sex differences and effects of the menopause. *Br J Haematol* 1990; 74 : 77-81.
87. Myiakis S, Lockshin MD, Atsumi T, *et al*. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4 : 295-306.
88. Naess IA, Christiansen SC, Cannegieter SC, Rosendaal FR, Hammerstroem J. A prospective study of anticardiolipin antibodies as a risk factor for venous thrombosis in a general population (the HUNT study). *J Thromb Haemost* 2006; 4 : 44-9.
89. Nicolaes GA, Dahlbäck B. Factor V and thrombotic disease: description of a Janus-faced protein. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol* 2002; 22 : 530-8.
90. Olson ST, Stephens AW, Hirs CH, Bock PE, Björk I. Kinetic characterization of the proteinase-binding defect in a reactive site variant of the serpin antithrombin. *J Biol Chem* 1995; 270 : 9717-24.
91. Pengo V, Biasiolo A, Pegoraro C, Cucchini U, Noventa F, Ilceto S. Antibody profile for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 2005; 93 : 1147-52.
92. Pengo V, Biasiolo A, Gresele P, *et al*. Survey of lupus anticoagulant diagnosis by central evaluation of positive plasma samples. *J Thromb Haemost* 2007; 5 : 925-30 (2007 ref 1).
93. Pengo V, Biasiolo A, Bison E, *et al*. Antiphospholipid antibody Elisas: survey on the performance of clinical laboratories assessed by using lyophilized affinity-purified IgG with anticardiolipin and anti-beta-2-glycoprotein I activity. *Thromb Res* 2007; 120 : 127-33 (2007, ref 2).
94. Picard V, Nowak-Göttl U, Biron-Andreani C, *et al*. Molecular bases of antithrombin deficiency: twenty-two novel mutations in the antithrombin gene. *Hum Mutat* 2006; 27 : 600.
95. Picard V, Dautzenberg MD, Villoutreix BO, Orliaguet G, Alhenc-Gelas M, Aiach M. Antithrombin Phe229Leu: a new homozygous variant leading to spontaneous antithrombin polymerization *in vivo* associated with severe childhood thrombosis. *Blood* 2003; 102 : 919-25.
96. Picard V, Présot I, Scarabin PY, Aiach M, Emmerich J, Alhenc-Gelas M. Antithrombin Cambridge II (A384S): prevalence in patients of the Paris Thrombosis Study (PATHROS). *Blood* 2007; 110 : 2777-8.
97. Reber G, Arvieux J, Comby E, *et al*. Multicenter evaluation of nine commercial kits for the quantitation of anticardiolipin antibodies. The Working Group on Methodologies in Haemostasis from the GEHT (Groupe d'études sur l'hémostase et la thrombose). *Thromb Haemost* 1995; 73 : 444-52.
98. Reber G, Tincani A, Sanmarco M, de Moerloose P, Boffa MC. Standardization group of the European Forum on antiphospholipid antibodies proposals for the measurement of anti-beta-2-glycoprotein I antibodies. *J Thromb Haemost* 2004; 2 : 1860-2.
99. Reber G, Tincani A, Sanmarco M, *et al*. Variability of anti-beta-2-glycoprotein I antibodies measurement by commercial assays. *Thromb Haemost* 2005; 94 : 665-72.
100. Regnault V, Béguin S, Wahl D, de Maistre E, Hemker CH, Lecompte T. Thrombinography shows acquired resistance to activated protein C in patients with lupus anticoagulants. *Thromb Haemost* 2003; 89 : 208-12.

- 101.** Reitsma P, Bernardi F, Doig RG, *et al.* Protein C deficiency: a database of mutations, 1995 update. *Thromb Haemost* 1995; 73: 876-89.
- 102.** Rezende S, Lane DA, Mille-Baker B, Samama MM, Conard J, Simmonds RE. Protein S Gla-domain mutations causing impaired Ca<sup>2+</sup>-induced phospholipid binding and severe functional protein S deficiency. *Blood* 2002; 100: 2812-9.
- 103.** Rodeghiero F, Tosetto A. The VITA project: population-based distributions of protein C, antithrombin III, heparin cofactor II and plasminogen. *Thromb Haemost* 1996; 76: 226-33.
- 104.** Rodeghiero F, Tosetto A. Activated protein C resistance and factor V Leiden mutation are independent risk factors for venous thromboembolism. *Ann Intern Med* 1999; 130: 643-50.
- 105.** Rosenkranz A, Hiden M, Leschnik B, *et al.* Calibrated automated thrombin generation in normal uncomplicated pregnancy. *Thromb Haemost* 2008; 99: 331-7.
- 106.** Rossi E, Chiusolo P, Za T, *et al.* Report of novel kindred with antithrombin heparin-binding site variant (47 Arg to His): demand for an automated progressive antithrombin assay to detect molecular variants with low thrombotic risk. *Thromb Haemost* 2007; 98: 695-7.
- 107.** Ruffatti A, Olivieri S, Tonello M, *et al.* Influence of different IgG anticardiolipin antibody cut-off values on antiphospholipid syndrome classification. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 1693-6.
- 108.** Sanchez C, Alessi MC, Saut N, Aillaud MF, Morange PE. Relation between the antithrombin Cambridge II mutation, the risk of venous thrombosis and the endogenous thrombin generation. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 1975-7.
- 109.** Sanmarco M, Bardin N, Blank M, *et al.* Heterogeneity of anti-beta-2-glycoprotein I antibodies. A factor of variability in test results. *Thromb Haemost* 2005; 93: 80-7.
- 110.** Sarig G, Aberbach I, Schliamsler L, Blumenfeld Z, Brenner B. Evaluation of ProC global assay in women with a history of venous thromboembolism on hormonal therapy. *Thromb Haemost* 2006; 96: 578-83.
- 111.** Schleider MA, Nachman RL, Jaffe EA, Coleman M. A clinical study of anticoagulant. *Blood* 1976; 48: 499-509.
- 112.** Siegert G, Schellong S, Knoefler R, Jaross W. Low molecular weight heparin: a possible cause for higher protein S activity than free protein S concentration. *Blood Coagul Fibrinol* 2000; 11: 747-54.
- 113.** Simmonds R, Zöller B, Ireland H, *et al.* Genetic and phenotypic analysis of a large protein S deficient kindred provides an explanation for the familial coexistence of type I and type III plasma phenotypes. *Blood* 1997; 89: 4364-70.
- 114.** Spector EB, Grody WW, Matteson CJ, *et al.* Technical standards and guidelines: venous thromboembolism (FV Leiden and prothrombin 20210G>A testing): a disease-specific supplement to the standards and guidelines for clinical genetics laboratories. *Genet Med* 2005; 7: 444-53.
- 115.** Ten Kate MK, Platteel M, Mulder R, *et al.* PROS1 analysis in 87 pedigrees with hereditary protein S deficiency demonstrates striking genotype-phenotype associations. *Hum Mut* 2008; 29: 939-47.
- 116.** Thom J, Ivey L, Eikelboom J. Normal plasma mixing studies in the laboratory diagnosis of lupus anticoagulant. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 2689-91.
- 117.** Tincani A, Allegri F, Sanmarco M, *et al.* Anticardiolipin antibody assay: a methodological analysis for a better consensus in routine determinations — a cooperative project of the European Antiphospholipid Forum. *Thromb Haemost* 2001; 86: 575-83.
- 118.** Tincani A, Allegri F, Balestrieri G, *et al.* Minimal requirements for antiphospholipid antibodies Elisas proposed by the European Forum on antiphospholipid antibodies. *Thromb Res* 2004; 114: 553-8.
- 119.** Toulon P, Adda R, Perez P. Sensitivity of the ProC global assay for protein C pathway abnormalities. Clinical experience in 899 unselected patients with venous thromboembolism. *Thromb Res* 2001; 104: 93-103.
- 120.** Triplett DA. Use of the dilute Russell viper venom time (dRVVT): its importance and pitfalls. *J Autoimmun* 2000; 15: 173-8.
- 121.** Tripodi A, Chantarangkul V, Negri B, Mannucci PM. Standardization of the APC resistance test. Effects of normalization of results by means of pooled normal plasma. *Thromb Haemost* 1998; 79: 564-6.
- 122.** Tripodi A, Chantarangkul V, Clerici M, Mannucci PM. Laboratory diagnosis of lupus anticoagulants for patients on oral anticoagulant treatment. Performance of dilute Russell viper venom test and silica clotting time in comparison with Staclot LA. *Thromb Haemost* 2002; 88: 583-6.
- 123.** Tripodi A. Issues concerning the laboratory investigation of inherited thrombophilia. *Mol Diagn* 2005; 9:181-6.
- 124.** Tripodi A. Laboratory testing for lupus anticoagulants: a review of issues affecting the results. *Clin Chem* 2007; 53: 1629-35.
- 125.** Tuddenham EG, Cooper DN. Protein C and protein C inhibitor. In: Tuddenham EG, Cooper DN, eds. The molecular genetics of haemostasis and its inherited disorders. New York: Oxford University Press, 1994: 149-160.
- 126.** Ungerstedt JS, Schulman S, Egberg N, Antovic J, Blombäck N. Discrepancy between antithrombin activity methods revealed in AT Stockholm. *Blood* 2002; 99: 2271-2.
- 127.** Van Voorthuizen H, Klufft C. Improved assay conditions for automated antithrombin III determination with the chromogenic substrate S2238. *Thromb Haemost* 1984; 52: 350-3.
- 128.** Vos HL. Inherited defects of coagulation factor V: the thrombotic side. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 35
- 129.** Walker FJ, Fay PJ. Regulation of blood coagulation by the protein C system. *Am Soc Exp Biol J* 1992; 6: 2561-7.
- 130.** Walker ID, Greaves M, Preston FE. Investigation and management of heritable thrombophilia. *Br J Haematol* 2001; 114: 512-28.
- 131.** Wickström K, Edelstam G, Löwbeer CH, Hansson LO, Siegbahn A. Reference intervals for plasma levels of fibronectin, von Willebrand factor, free protein S and antithrombin during pregnancy. *Scand J Clin Lab Invest* 2004; 64: 31-40.
- 132.** Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, *et al.* International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome report of an international workshop. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1309-11.
- 133.** Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Colesse G, Gourmelin Y. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coagul Fibrinol* 2001; 12: 229-36.
- 134.** Working Group on Hemostasis of the Société française de biologie clinique. Comparison of a standardized procedure with current laboratory practices for the detection of lupus anticoagulant in France. *Thromb Haemost* 1993; 70: 781-6
- 135.** Zürcher M, Sulzer I, Barizzi G, Lämmle B, Alberio L. Stability of coagulation assays performed in plasma from citrated whole blood transported at ambient temperature. *Thromb Haemost* 2008; 99: 416-26.