



Année 2016

N°

MÉMOIRE DE DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES DE BIOLOGIE MÉDICALE

Conformément à l'arrêté du 10 Septembre 1990
Tient lieu de

THÈSE

Pour le
DOCTORAT EN MÉDECINE
Diplôme d'État

par
Nicolas TARLÉ

Né le 25 Septembre 1986 à Cambrai (59)

L'optimisation des tests ELISA anti-FP4 modifié est-elle possible en utilisant un anticorps monoclonal de thrombopénie induite par l'héparine (5B9) ?

Présentée et soutenue publiquement le **27 Octobre 2016** devant un jury composé de :

Président du Jury : Professeur Yves Gruel, Hématologie, transfusion, PU-PH, Faculté de Médecine -Tours

Membres du Jury :

Professeur Claire Pouplard, Hématologie, PU-PH Faculté de Pharmacie - Tours

Professeur Hervé Watier, Immunologie, PU-PH, Faculté de Médecine - Tours

Professeur Gilles Paintaud, Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique, PU-PH, Faculté de Médecine – Tours

Remerciements

À Monsieur le professeur Yves Gruel, c'est un honneur de vous avoir en tant que Président du Jury. Votre rigueur scientifique et votre bienveillance m'ont toujours poussé à donner le meilleur de moi-même.

À Madame le Professeur Claire Pouplard, je vous suis extrêmement reconnaissant de m'avoir fait confiance pour mener à bien ce travail. Votre soutien inconditionnel ainsi que votre bonne humeur ont été une force pour moi. Je vous adresse mes amitiés les plus sincères.

À Monsieur le Professeur Hervé Watier : pour avoir accepté de juger ce travail, soyez assuré de ma gratitude.

À Monsieur le Professeur Gilles Paintaud : pour avoir la gentillesse de venir juger ce travail, je vous adresse mes remerciements les plus sincères.

À la société Stago, je tenais à vous remercier pour l'aide matérielle que vous avez pu m'apporter ainsi que pour votre réactivité pour répondre à mes questions.

À mes parents, vous m'avez toujours soutenu et je sais à quel point je n'ai pas été facile à vivre. Merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir permis de devenir l'homme que je suis aujourd'hui.

À Laurie, ma sœur, pour tous nos fous rires partagés. 'Z'avez pas l'heure ?'

À Mélissa, merci de partager ma vie. De belles aventures nous attendent et j'ai bien hâte qu'elles commencent !

À Evan, mon Bro, pour avoir égayé ma scolarité de la sixième à aujourd'hui. Ça y est on la tient notre *Good Life* !

À Alban, Mathieu et Arnaud, mon noyau dur orléanais depuis tant d'années. C'est un plaisir que de vous avoir à mes côtés.

À mes amis proches, Steph, Popo, Fredo, Narine, Damich, MP, Kiki, Gui, Josy, Paulo, Maxou, Bourdoch', Kéké, Franky et Oliv, pour tous les bons moments passés ensemble et ceux à venir, j'vous kiffe putain !

À la promotion de Biologie Médicale 2012 : Eve Anne, David, Candice, Benoit et Martin. Les meilleurs !

Résumé

Le diagnostic biologique des thrombopénies induites par l'héparine (TIH) repose sur la détection d'anticorps (Ac) dirigés contre le FP4 modifié par l'héparine. Les tests ELISA sont couramment utilisés dans nos laboratoires et leur compte rendu doit mentionner le seuil de positivité du test ainsi que l'absorbance mesurée, une valeur supérieure à 1 étant associée à une plus forte probabilité de TIH. Cependant, l'ECAT rapporte des coefficients de variations inter-essais compris entre 16 et 37% selon les trouses.

Nous avons récemment développé un Ac monoclonal d'isotype IgG (5B9), possédant un fragment Fc humain et qui reconnaît spécifiquement le FP4 modifié par l'héparine.

L'objectif de ce travail a été d'évaluer l'intérêt d'utiliser cet Ac 5B9 comme calibrant des différentes trouses commercialisées : ASSERACHROM® HPIA – IgG (Stago), HAT45G® (GTI) et ZYMUTEST® HIA IgG (HYPHEN). Lors de chaque expérimentation, une gamme d'étalonnage a été réalisée avec des concentrations croissantes d'Ac 5B9 (0 à 10 µg/mL) et les absorbances mesurées avec les plasmas de 7 patients positifs ont été systématiquement converties en 'équivalent 5B9'. L'expression des résultats de ces 7 patients en 'équivalent 5B9' n'a pas permis de diminuer la variabilité inter kits.

Dans un second temps, nous avons évalué l'intérêt de l'Ac 5B9 pour standardiser les résultats au sein d'une seule trousse, la trousse Asserachrom HPIA IgG (Stago). Dans ce but, nous avons réalisé les tests dans les conditions extrêmes en faisant varier la température de la pièce ainsi que les temps d'incubation de l'échantillon, de l'immunoconjugué et du substrat. Quelques soient les conditions expérimentales testées, la courbe de calibration est d'allure hyperbolique avec un coefficient de corrélation égal à 0.99. L'expression des résultats en 'équivalent 5B9' diminue considérablement le CV de deux échantillons, C1 et un Pool au 1/5^{ème}, mais pas celui de la référence HPIA permettant de définir le seuil de positivité du test.

Un projet multicentrique prospectif en collaboration avec la société Stago et visant à étudier l'intérêt de l'utilisation du calibrant 5B9 avec la trousse ASSERACHROM® HPIA – IgG est en cours de rédaction. Une analyse en courbe ROC permettra de redéfinir le seuil de positivité du test.

Mots clés : Thrombopénie induite par l'héparine, ELISA, FP4, Anticorps, standardisation

Abstract

Laboratory testing for the diagnosis of Heparin induced thrombocytopenia (HIT) is based on the detection of antiplatelet factor 4 (PF4)/heparin antibodies. ELISA are commonly used and results should mention the cut off value of the test as well as the measured absorbance, a value higher than 1 being associated with a high probability of HIT. However, the ECAT foundation reports between-tests variations from 16 to 37% depending on manufacturers.

We recently developed an IgG chimeric monoclonal antibody (5B9), with a human Fc fragment that only recognizes PF4 modified by heparin.

The aim of this study was to assess the usefulness of 5B9 as a calibrator for different commercialised ELISA kits : ASSERACHROM® HPIA – IgG, HAT45G® and ZYMUTEST® HIA IgG.

During each experiment, a calibration range was performed with increasing concentrations of 5B9 (0 to 10 µg/mL) and measured absorbances with 7 plasma samples from positive patients were systematically converted in 'equivalent 5B9'. Expression of results in these 7 patients in 'equivalent 5B9' didn't reduce variations between the different methods evaluated.

Then, we assessed the usefulness of 5B9 as a calibrator within one kit, Asserachrom HPIA IgG (Stago). For this purpose, we performed tests in extreme conditions with variations of the room temperature or incubation time of sample, immunoconjugate and substrate.

Whatever the experimental conditions, calibration curve was hyperbolic with a correlation coefficient of 0,99. Expression of results in 'equivalent 5B9' of two samples C1 and a plasma Pool diluted at 1:5 greatly decreased the between-test variations but not for the HPIA reference used to define the cut-off value.

A prospective multicentre study in collaboration with Stago and assessing the usefulness of 5B9 as a calibrator of the ASSERACHROM® HPIA – IgG kit is in progress. A ROC curve analysis will further define the cut-off value of the assay.

Keywords : Heparin induced thrombocytopenia, ELISA, PF4, Antibody, standardization

UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS
FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

DOYEN

Pr. Patrice DIOT

VICE-DOYEN

Pr. Henri MARRET

ASSESEURS

Pr. Denis ANGOULVANT, *Pédagogie*
Pr. Mathias BUCHLER, *Relations internationales*
Pr. Hubert LARDY, *Moyens – relations avec l'Université*
Pr. Anne-Marie LEHR-DRYLEWICZ, *Médecine générale*
Pr. François MAILLOT, *Formation Médicale Continue*
Pr. Patrick VOURC'H, *Recherche*

SECRETAIRE GENERALE

Mme Fanny BOBLETER

DOYENS HONORAIRES

Pr. Emile ARON (†) – 1962-1966
Directeur de l'Ecole de Médecine - 1947-1962
Pr. Georges DESBUQUOIS (†) - 1966-1972
Pr. André GOUAZE - 1972-1994
Pr. Jean-Claude ROLLAND – 1994-2004
Pr. Dominique PERROTIN – 2004-2014

PROFESSEURS EMERITES

Pr. Catherine BARTHELEMY
Pr. Philippe BOUGNOUX
Pr. Etienne DANQUECHIN-DORVAL
Pr. Loïc DE LA LANDE DE CALAN
Pr. Noël HUTEN
Pr. Olivier LE FLOCH
Pr. Yvon LEBRANCHU
Pr. Elisabeth LECA
Pr. Gérard LORETTE
Pr. Roland QUENTIN
Pr. Alain ROBIER

PROFESSEURS HONORAIRES

P. ANTHONIOZ – A. AUDURIER – A. AUTRET – P. BAGROS – G. BALLON – P. BARDOS – J.L. BAULIEU – C. BERGER – J.C. BESNARD – P. BEUTTER – C. BINET – P. BONNET – M. BROCHIER – P. BURDIN – L. CASTELLANI – B. CHARBONNIER – P. CHOUTET – J.P. FAUCHIER – F. FETISSOF – J. FUSCIARDI – P. GAILLARD – G. GINIES – A. GOUAZE – J.L. GUILMOT – M. JAN – J.P. LAMAGNERE – F. LAMISSE – J. LANSAC – Y. LANSON – J. LAUGIER – P. LECOMTE – G. LELORD – E. LEMARIE – G. LEROY – Y. LHUINTRE – M. MARCHAND – C. MAURAGE – C. MERCIER – J. MOLINE – C. MORAINÉ – J.P. MUH – J. MURAT – H. NIVET – L. POURCELOT – P. RAYNAUD – D. RICHARD-LENOBLE – M. ROBERT – J.C. ROLLAND – A. SAINDELLE – J.J. SANTINI – D. SAUVAGE – B. TOUMIEUX – J. WEILL

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

ALISON Daniel	Radiologie et imagerie médicale
ANDRES Christian	Biochimie et biologie moléculaire
ANGOULVANT Denis	Cardiologie
ANGOULVANT Théodora	Pharmacologie clinique
ARBEILLE Philippe	Biophysique et médecine nucléaire
AUPART Michel.....	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
BABUTY Dominique	Cardiologie
BALLON Nicolas	Psychiatrie ; addictologie
BARILLOT Isabelle.....	Cancérologie ; radiothérapie
BARON Christophe	Immunologie
BERNARD Louis	Maladies infectieuses et maladies tropicales
BODY Gilles	Gynécologie et obstétrique
BONNARD Christian	Chirurgie infantile
BONNET-BRILHAULT Frédérique	Physiologie
BRILHAULT Jean	Chirurgie orthopédique et traumatologique
BRUNEREAU Laurent.....	Radiologie et imagerie médicale
BRUYERE Franck	Urologie
BUCHLER Matthias.....	Néphrologie
CALAIS Gilles.....	Cancérologie, radiothérapie
CAMUS Vincent	Psychiatrie d'adultes
CHANDENIER Jacques	Parasitologie, mycologie
CHANTEPIE Alain	Pédiatrie
COLOMBAT Philippe	Hématologie, transfusion
CONSTANS Thierry	Médecine interne, gériatrie
CORCIA Philippe.....	Neurologie
COSNAY Pierre.....	Cardiologie
COTTIER Jean-Philippe.....	Radiologie et imagerie médicale
COUET Charles.....	Nutrition
DE TOFFOL Bertrand	Neurologie
DEQUIN Pierre-François.....	Thérapeutique
DESTRIEUX Christophe	Anatomie
DIOT Patrice.....	Pneumologie
DU BOUEXIC de PINIEUX Gonzague	Anatomie & cytologie pathologiques
DUCLUZEAU Pierre-Henri	Endocrinologie, diabète, et maladies métaboliques
DUMONT Pascal.....	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
EL HAGE Wissam	Psychiatrie adultes
EHRMANN Stephan	Réanimation
FAUCHIER Laurent.....	Cardiologie
FAVARD Luc	Chirurgie orthopédique et traumatologique
FOUQUET Bernard	Médecine physique et de réadaptation
FRANCOIS Patrick.....	Neurochirurgie
FROMONT-HANKARD Gaëlle	Anatomie & cytologie pathologiques
GOGA Dominique	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
GOUDEAU Alain	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
GOUPILLE Philippe.....	Rhumatologie
GRUEL Yves	Hématologie, transfusion
GUERIF Fabrice	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
GUYETANT Serge	Anatomie et cytologie pathologiques
GYAN Emmanuel.....	Hématologie, transfusion
HAILLOT Olivier	Urologie
HALIMI Jean-Michel	Thérapeutique
HANKARD Régis.....	Pédiatrie
HERAULT Olivier.....	Hématologie, transfusion
HERBRETEAU Denis.....	Radiologie et imagerie médicale
HOMMET Caroline	Gériatrie
LABARTHE François.....	Pédiatrie
LAFFON Marc	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale, médecine d'urgence
LARDY Hubert.....	Chirurgie infantile
LARIBI Saïd.....	Médecine d'urgence
LARTIGUE Marie-Frédérique	Bactériologie-virologie
LAURE Boris	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
LECOMTE Thierry.....	Gastroentérologie, hépatologie
LESCANNE Emmanuel	Oto-rhino-laryngologie
LINASSIER Claude	Cancérologie, radiothérapie
MACHET Laurent	Dermato-vénérologie
MAILLOT François	Médecine interne

MARCHAND-ADAM Sylvain.....	Pneumologie
MARRET Henri.....	Gynécologie-obstétrique
MARUANI Annabel.....	Dermatologie-vénérologie
MEREGHETTI Laurent.....	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
MORINIERE Sylvain.....	Oto-rhino-laryngologie
MOUSSATA Driffa.....	Gastro-entérologie
MULLEMAN Denis.....	Rhumatologie
ODENT Thierry.....	Chirurgie infantile
OUAISSI Mehdi.....	Chirurgie digestive
PAGES Jean-Christophe.....	Biochimie et biologie moléculaire
PAINTAUD Gilles.....	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
PATAT Frédéric.....	Biophysique et médecine nucléaire
PERROTIN Dominique.....	Réanimation médical, médecine d'urgence
PERROTIN Franck.....	Gynécologie-obstétrique
PISELLA Pierre-Jean.....	Ophthalmologie
QUENTIN Roland.....	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
REMERAND Francis.....	Anesthésiologie et réanimation, médecine d'urgence
ROINGEARD Philippe.....	Biologie cellulaire
ROSSET Philippe.....	Chirurgie orthopédique et traumatologique
ROYERE Dominique.....	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
RUSCH Emmanuel.....	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
SAINT-MARTIN Pauline.....	Médecine légale et droit de la santé
SALAME Ephrem.....	Chirurgie digestive
SALIBA Elie.....	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
SANTIAGO-RIBEIRO Maria.....	Biophysique et médecine nucléaire
SIRINELLI Dominique.....	Radiologie et imagerie médicale
THOMAS-CASTELNAU Pierre.....	Pédiatrie
TOUTAIN Annick.....	Génétique
VAILLANT Loïc.....	Dermato-vénérologie
VELUT Stéphane.....	Anatomie
VOURC'H Patrick.....	Biochimie et biologie moléculaire
WATIER Hervé.....	Immunologie

PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

LEBEAU Jean-Pierre
LEHR-DRYLEWICZ Anne-Marie

PROFESSEURS ASSOCIES

MALLET Donatien..... Soins palliatifs
POTIER Alain..... Médecine Générale
ROBERT Jean..... Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

BAKHOS David.....	Physiologie
BARBIER Louise.....	Chirurgie digestive
BERNARD-BRUNET Anne.....	Cardiologie
BERTRAND Philippe.....	Biostatistiques, informatique médical et technologies de communication
BLANCHARD Emmanuelle.....	Biologie cellulaire
BLASCO Hélène.....	Biochimie et biologie moléculaire
CAILLE Agnès.....	Biostatistiques, informatique médical et technologies de communication
DESOUBEAUX Guillaume.....	Parasitologie et mycologie
DOMELIER Anne-Sophie.....	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
DUFOUR Diane.....	Biophysique et médecine nucléaire
FOUQUET-BERGEMER Anne-Marie.....	Anatomie et cytologie pathologiques
GATAULT Philippe.....	Néphrologie
GAUDY-GRAFFIN Catherine.....	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
GOUILLEUX Valérie.....	Immunologie
GUILLOIN Antoine.....	Réanimation
GUILLOIN-GRAMMATICO Leslie.....	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
HOARAU Cyrille.....	Immunologie
HOURIOUX Christophe.....	Biologie cellulaire
IVANES Fabrice.....	Physiologie

LE GUELLEC Chantal	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
MACHET Marie-Christine	Anatomie et cytologie pathologiques
PIVER Eric.....	Biochimie et biologie moléculaire
ROUMY Jérôme	Biophysique et médecine nucléaire
PLANTIER Laurent.....	Physiologie
SAMIMI Mahtab.....	Dermatologie-vénérologie
TERNANT David	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
ZEMMOURA Ilyess	Neurochirurgie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

AGUILLON-HERNANDEZ Nadia	Neurosciences
DIBAO-DINA Clarisse.....	Médecine Générale
LEMOINE Maël.....	Philosophie
MONJAUZE Cécile.....	Sciences du langage - orthophonie
PATIENT Romuald.....	Biologie cellulaire
RENOUX-JACQUET Cécile.....	Médecine Générale

CHERCHEURS INSERM - CNRS - INRA

BOUAKAZ Ayache	Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
CHALON Sylvie	Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
COURTY Yves	Chargé de Recherche CNRS – UMR INSERM 1100
DE ROCQUIGNY Hugues.....	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 966
ESCOFFRE Jean-Michel	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
GILOT Philippe.....	Chargé de Recherche INRA – UMR INRA 1282
GOUILLEUX Fabrice.....	Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 7292
GOMOT Marie.....	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
HEUZE-VOURCH Nathalie	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
KORKMAZ Brice.....	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
LAUMONNIER Frédéric	Chargé de Recherche INSERM - UMR INSERM 930
LE PAPE Alain	Directeur de Recherche CNRS – UMR INSERM 1100
MAZURIER Frédéric.....	Directeur de Recherche INSERM – UMR CNRS 7292
MEUNIER Jean-Christophe	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 966
PAGET Christophe.....	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
RAOUL William.....	Chargé de Recherche INSERM – UMR CNRS 7292
SI TAHAR Mustapha	Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
WARDAK Claire	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 930

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

Pour l'Ecole d'Orthophonie

DELORE Claire	Orthophoniste
GOUIN Jean-Marie.....	Praticien Hospitalier
MONDON Karl.....	Praticien Hospitalier
PERRIER Danièle	Orthophoniste

Pour l'Ecole d'Orthoptie

LALA Emmanuelle.....	Praticien Hospitalier
MAJZOUB Samuel	Praticien Hospitalier

Pour l'Ethique Médicale

BIRMELE Béatrice	Praticien Hospitalier
------------------------	-----------------------

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté,
de mes chers condisciples
et selon la tradition d'Hippocrate,
je promets et je jure d'être fidèle aux lois de
l'honneur
et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent,
et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon
travail.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux
ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira
les secrets qui me seront confiés et mon état ne
servira pas
à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres,
je rendrai à leurs enfants
l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime
si je suis fidèle à mes promesses.
Que je sois couvert d'opprobre
et méprisé de mes confrères
si j'y manque.

TABLE DES MATIÈRES

Liste des tableaux	15
Liste des figures	16
Liste des abréviations	18
Introduction	19
I. PREMIÈRE PARTIE : GÉNÉRALITÉS	20
CHAPITRE 1 : PHYSIOPATHOLOGIE DES THROMBOPÉNIES INDUITES PAR L'HÉPARINE	20
CHAPITRE 2 : TABLEAU CLINIQUE DES THROMBOPÉNIES INDUITES PAR L'HÉPARINE	21
1. Délai d'apparition de la thrombopénie	21
2. Incidence des TIH	22
3. Complications cliniques	22
3.1 Les thromboses	22
a. Thromboses artérielles	22
b. Thromboses veineuses	23
3.2 Les nécroses	23
3.3 Les réactions systémiques	23
3.4 Les manifestations hémorragiques	23
CHAPITRE 3 : TRAITEMENT DES THROMBOPÉNIES INDUITES PAR L'HÉPARINE	24

CHAPITRE 4 : DIAGNOSTIC DES THROMBOPÉNIES INDUITES PAR L'HÉPARINE	26
1. Scores de probabilités pré-tests	27
2. Diagnostic biologique des thrombopénies induites par l'héparine	28
2.1 Les tests immunologiques	28
2.1.1 Les tests rapides	28
a. Immunofiltration sur gel (ID-Particle gel Immunoassay® BioRad)	28
b. Immunochromatographie sur membrane (STic Expert® HIT Stago)	29
c. Tests rapides automatisés	29
> HemosIL® HIT-Ab	29
> HemosIL® AcuStar HIT	30
d. Performances des tests rapides	30
2.1.2 Les tests immunoenzymatiques classiques	30
a. Différentes cibles antigéniques	31
> Complexes FP4/H	31
> Complexes FP4/Polyvinylsulfate(PVS)	31
> Complexes H/Sulfate de protamine avec ajout de lysat plaquettaire	31
b. Performances des tests ELISA	31
2.2 Les tests fonctionnels	32
a. Les tests d'agrégation plaquettaire	32
b. Le test HIPA (Heparin Induced Platelet Aggregation)	33
c. Le test de libération de sérotonine radiomarquée	33
d. Cytométrie en flux	34
e. Performances des tests fonctionnels	34
3. Stratégie diagnostique des thrombopénies induites par l'héparine	35
CHAPITRE 5 : ÉVALUATION EXTERNE DE LA QUALITÉ DES TESTS ELISA	37

II. DEUXIÈME PARTIE : TRAVAIL PERSONNEL	39
1. MATÉRIELS ET MÉTHODES	39
1.1 Anticorps monoclonal 5B9 et gamme d'étalonnage	39
1.2 Les tests ELISA	39
a. Le test ZYMUTEST® HIA IgG (HYPHEN®, Neuville-sur-oise, France)	39
1. Dépôt du lysat plaquettaire et fixation des anticorps héparine-dépendants	40
2. dépôt de l'immunoconjugué spécifique de l'IgG humaine	40
3. Développement de la réaction	41
4. Validation technique et interprétation des résultats	41
b. Le test HAT45G® (Immucor GTI Diagnostics®, Waukesha, USA)	41
1. Fixation des anticorps anti-facteur 4 plaquettaire modifié par l'héparine	42
2. Dépôt de l'immunoconjugué anti-IgG	42
3. Développement de la réaction	42
4. Validation technique et interprétation des résultats	43
c. Le test ASSERACHROM® HPIA – IgG (Diagnostica Stago, Asnières s/seine, France)	43
1. Fixation des anticorps anti-facteur 4 plaquettaire modifié par l'héparine	43
2. Dépôt de l'immunoconjugué anti-IgG	44
3. Développement de la réaction	44
4. Validation et interprétation des résultats	44
1.3 Echantillons patients	46
1.4 Lecteur de plaque ELISA	47
2. RÉSULTATS	48
1^{ère} partie : Standardisation des différentes trousse ELISA à l'aide de l'anticorps monoclonal de TIH 5B9	48
A. Gammes d'étalonnage réalisées avec l'anticorps monoclonal 5B9	48
B. Standardisation des absorbances mesurées avec les plasmas des patients	51

2^{ème} partie : Standardisation de la trousse ASSERACHROM® HPIA - IgG en conditions extrêmes	54
A. Variation de la température	54
B. Variation de la durée d'incubation de l'échantillon	56
C. Variation du temps d'incubation de l'immunoconjugué	58
D. Variation du temps d'incubation du substrat	60
E. Intérêt de la gamme d'étalonnage en Ac 5B9 appliqué à trois échantillons de patients	63
3. DISCUSSION	65
III. ANNEXES	68
IV. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	70

Liste des tableaux

Tableau I : Caractéristiques cliniques et biologiques des TIH d'après T. Warkentin (17).	26
Tableau II : Résultats des EEQ de l'échantillon positif de l'ECAT pour les années 2011 à 2013.	38
Tableau III : Caractéristiques des tests ELISA utilisés pour la recherche d'Ac héparine-dépendants.	45
Tableau IV : Tableau récapitulatif des caractéristiques des échantillons utilisés	46
Tableau V : Tableau des absorbances moyennes pour chaque point de gamme d'étalonnage.	50
Tableau VI : Valeurs moyennes d'absorbance à 450 nm (Abs 450) et d'équivalent 5B9 de C1 et de la référence HPIA selon la température de réalisation de l'expérimentation.	55
Tableau VII : Valeurs moyennes d'absorbance à 450 nm et d'équivalent 5B9 de C1, du Pool 1/5 ^{ème} et de la référence HPIA selon le temps d'incubation de l'échantillon.	57
Tableau VIII : Valeurs moyennes d'absorbance à 450 nm et d'équivalent 5B9 de C1, du Pool 1/5 ^{ème} et de la référence HPIA selon le temps d'incubation de l'immunoconjugué.	59
Tableau IX : Valeurs moyennes d'absorbance à 450 nm et d'équivalent 5B9 de C1, du Pool 1/5 ^{ème} et de la référence HPIA selon le temps d'incubation du substrat.	61
Tableau X : Absorbances à 450 nm et équivalent 5B9 des échantillons P12 à P14 selon les différentes variations des temps d'incubation.	64

Liste des figures

- Figure 1** : Démarche bayésienne pour le diagnostic de TIH d'après Pouplard et Gruel. 35
- Figure 2** : Démarche bayésienne pour le diagnostic de TIH d'après Cuker. 36
- Figure 3** : Gamme d'étalonnage en Ac 5B9 de la trousse ASSERACHROM® HPIA – IgG (Stago). Moyenne +/- Ecart type. n = 5 expérimentations. 49
- Figure 4** : Gamme d'étalonnage en Ac 5B9 de la trousse HAT45G® (GTI). Moyenne +/- Ecart type. n = 5 expérimentations. 49
- Figure 5** : Gamme d'étalonnage en Ac 5B9 de la trousse ZYMUTEST® HIA IgG (HYPHEN). Moyenne +/- Ecart type. n = 5 expérimentations. 50
- Figure 6** : Coefficients de variations inter-essais selon la concentration en Ac 5B9. 51
- Figure 7** : Absorbance des échantillons P1 à P7 selon la trousse utilisée. 52
- Figure 8** : Equivalent 5B9 en µg/mL des échantillons P1 à P7 selon la trousse utilisée. 53
- Figure 9** : Gammes d'étalonnage de la trousse ASSERACHROM® HPIA – IgG à température ambiante et à 30°C. Moyenne +/- Ecart type. n = 5 expérimentations. 54
- Figure 10** : Echantillon C1 et référence HPIA en absorbance et en équivalent 5B9 selon la température de réalisation de l'expérimentation. n = 5 expérimentations. 55
- Figure 11** : Gammes d'étalonnage de la trousse ASSERACHROM® HPIA – IgG avec incubation des points de gammes de 30 minutes, 1 heure et 1h30 minutes. Moyenne +/- Ecart type. n = 5 expérimentations. 56
- Figure 12** : Echantillons C1, Pool 1/5^{ème} et référence HPIA. Résultats indiqués en absorbance et en équivalent 5B9 selon le temps d'incubation de l'échantillon. 57
- Figure 13** : Gammes d'étalonnage de la trousse ASSERACHROM® HPIA – IgG avec incubation de l'immunoconjugué de 30 minutes, 1 heure et 1h30 minutes. Moyenne +/- Ecart type. n = 4 expérimentations. 58
- Figure 14** : Echantillons C1, Pool 1/5^{ème} et la référence HPIA en absorbance et en équivalent 5B9 selon le temps d'incubation de l'immunoconjugué. n = 4 expérimentations. 59
- Figure 15** : Gammes d'étalonnage de la trousse ASSERACHROM® HPIA – IgG avec incubation du substrat de 3, 5 et 7 minutes. 60

Figure 16 : Echantillons C1 et Pool 1/5^{ème} en absorbance et en équivalent 5B9 selon le temps d'incubation du substrat. n = 3 expérimentations. 61

Figure 17 : Valeurs en absorbance et en équivalent 5B9 des échantillons P12, P13 et P14 selon la variation du temps d'incubation de l'échantillon, de l'immunoconjugué et du substrat. n = 1 expérimentation. 63

Liste des abréviations

Abs 450	Absorbance à 450
Ac	Anticorps
AMM	Autorisation de mise sur le marché
AVK	Anti vitamine K
CIVD	Coagulation intravasculaire disséminée
CV	Coefficient de variation
ELISA	<i>Enzyme linked immuno sorbent assay</i>
EP	Embolie pulmonaire
Facteur Xa	Facteur X activé
FP4	Facteur 4 plaquettaire
FP4/H	Facteur 4 plaquettaire modifié par l'héparine
HBPM	Héparine de bas poids moléculaire
HEP score	<i>HIT Expert Probability score</i>
HIPA	<i>Heparin induced platelet aggregation</i>
HNF	Héparine non fractionnée
Ig	Immunoglobuline
IL10	Interleukine 10
INR	<i>International Normalised Ratio</i>
NC	Non connu
PNPP	p-nitrophénylphosphate
PRP	Plasma riche en plaquettes
PVS	Polyvinylsulfate
SRA	Test de libération de sérotonine radiomarquée
TCA	Temps de céphaline activée
TIH	Thrombopénie induite par l'héparine
TMB	3, 3', 5, 5'- Tetraméthylbenzidine
TVP	Thrombose veineuse profonde
ULR	Unité de lumière relative

INTRODUCTION

Les thrombopénies induites par l'héparine (TIH) sont une complication rare mais potentiellement grave des traitements anticoagulants hépariniques, due à une réponse immune atypique à l'héparine. Celle-ci est responsable d'une synthèse d'anticorps (Ac) d'isotype IgG dirigés contre le facteur 4 plaquettaire (FP4) modifié par l'héparine (FP4/H).

La TIH est un syndrome clinico-biologique dont le diagnostic repose sur l'existence de signes cliniques évocateurs associés à des tests biologiques permettant de détecter ces Ac héparine-dépendants pathogènes. En première intention, ces Ac sont recherchés par une méthode immunoenzymatique. Lorsqu'un test ELISA spécifique est réalisé, l'absorbance mesurée permet de rendre un résultat qualitatif mais également d'apprécier la quantité d'Ac anti-FP4/H en circulation.

Il existe cependant une grande variabilité inter-essais des valeurs d'absorbance car elles sont dépendantes des conditions de réalisation de ces tests ELISA.

Dans ce contexte, l'objectif de mon travail a été d'évaluer s'il était possible de standardiser les différentes trousse ELISA spécifiques des Ac de TIH en utilisant un Ac monoclonal développé dans notre laboratoire.

I. PREMIÈRE PARTIE : GÉNÉRALITÉS

CHAPITRE 1 : PHYSIOPATHOLOGIE DES THROMBOPÉNIES INDUITES PAR L'HÉPARINE

La TIH est une complication immunoallergique des traitements par héparine due à une réponse immune spécifique dirigée contre le facteur plaquettaire 4 modifié par l'héparine.

Le FP4 est une chémokine de la famille des CXCL4 libérée des granules α lors de l'activation plaquettaire et qui se lie à des substances polyanioniques comme l'héparine. Cette liaison entraîne un changement conformationnel du FP4 et l'apparition de néo-épitopes qui vont induire la synthèse d'anticorps spécifiques.

L'affinité de l'héparine et des polysaccharides pour le FP4 dépend grandement de leur longueur et de leur degré de sulfatation (1). L'héparine non fractionnée est de ce fait très immunogène puisque les larges fragments polysaccharidiques se lient fortement aux tétramères de FP4 et modifient fortement sa structure. Les héparines de bas poids moléculaire ayant par définition des fragments plus courts et une charge électro-négative plus faible, modifient moins la structure du FP4 et sont donc moins immunogènes.

La réponse immune à l'héparine, lorsqu'elle se produit, est atypique. En effet, elle se caractérise par l'apparition concomitante d'Ac anti-FP4/H de classe IgM, IgA et IgG. Le mécanisme de cette réponse immune reste en partie incompris.

Ces caractéristiques sont inhabituelles pour une réponse immune primaire et pourraient être expliquées par le fait que les mêmes épitopes antigéniques exprimés par le FP4 modifié par l'héparine aient été formés avant toute exposition à l'héparine.

De nombreux polysaccharides sulfatés autres que l'héparine comme les polysaccharides chargés négativement présents à la surface de bactéries (2) peuvent induire des modifications conformationnelles du FP4 similaires à ceux induits par l'héparine. Des Ac anti-FP4/H ont ainsi été mis en évidence chez des patients souffrants de parodontites, infections fréquentes dues à des germes à Gram négatif.

Les raisons expliquant pourquoi seulement une partie des patients traités par héparine synthétise des Ac anti-FP4 modifié par l'héparine et pourquoi une large proportion des patients immunisés ne développe pas de TIH ne sont pas entièrement élucidées.

Des variations génétiques du promoteur de l'IL10 pourraient avoir un rôle important dans la réponse immune associée aux traitements par héparine et influencer le développement d'Ac héparine-dépendants. (3)

Les Ac pathogènes sont principalement d'isotype IgG1 et leur présence à taux élevé est associée à un risque majoré de TIH.

Le rôle des polymorphismes génétiques situés sur les gènes codant pour FcγRIIA (42) ou CD148 (43) a également été démontré, expliquant en partie pourquoi seulement certains patients ayant développés des Ac anti-FP4/H développent une thrombopénie associée ou non à des thromboses. En effet, la TIH est connue pour son haut risque de complication thrombotique artériel ou veineux. Le rôle central des Ac de classe IgG découle de leur capacité à activer les cellules par leur récepteur Fc.

Les Ac de TIH pourraient également se lier aux cellules endothéliales, aux leucocytes et aux monocytes, et entraîner la synthèse de facteur tissulaire qui est le facteur déclenchant principal de la coagulation. (4,5)

CHAPITRE 2 : TABLEAU CLINIQUE DES THROMBOPÉNIES INDUITES PAR L'HÉPARINE

1. Délai d'apparition de la thrombopénie

La TIH apparait généralement dans les 5 à 14j suivant l'introduction d'héparine. Elle se manifeste par une chute de la numération plaquettaire supérieure à 40% de la numération plaquettaire initiale ou par une numération plaquettaire inférieure à 100 G/L. (6).

Toutefois, il existe des circonstances d'apparition retardée, jusqu'à 3 semaines après l'introduction du traitement, en particulier lors d'un traitement par héparine de bas poids moléculaire (HBPM), ou d'apparition précoce, inférieure à 5 jours, en cas de traitement héparinique dans les trois mois précédents. (6)

2. Incidence des TIH

Il est difficile d'évaluer l'incidence exacte des TIH en raison de la relative rareté de cette pathologie et de l'existence de nombreux paramètres qui peuvent modifier cette incidence.

En effet, le risque de développer une TIH est plus élevé sous héparine non fractionnée (HNF) que sous HBPM avec une incidence de la maladie de l'ordre de 1 à 5% avec les HNF et de 0,5% avec les HBPM (7). Ce risque moindre avec les HBPM est dû au fait que les fragments de faible poids moléculaire ont une affinité plus faible pour le facteur 4 plaquettaire et modifient moins sa structure tridimensionnelle (8). Ainsi le risque de TIH avec le fondaparinux (Pentasaccharide) est quasiment nul et est estimé à moins de 0,001% (9).

L'administration par voie intraveineuse et l'utilisation d'héparine à dose curative sont des situations qui entraînent une majoration du risque de TIH (10).

Le risque de TIH varie également selon l'indication du traitement par héparine. En effet, il est plus élevé lors de chirurgie orthopédique prothétique ou de chirurgie cardiaque que lors d'une prise en charge médicale (11).

Il semble également que les femmes soient plus à risque que les hommes. Ce phénomène est retrouvé dans de nombreuses pathologies auto-immunes (10).

3. Complications cliniques

3.1 Les thromboses

La survenue d'une thrombose lors d'un traitement héparinique doit faire suspecter une TIH même en l'absence de thrombopénie.

Les thromboses sont observées dans près d'un cas sur deux.

Les thromboses artérielles sont typiques de la TIH mais sont moins fréquentes que les thromboses veineuses. (12, 13)

a. Thromboses artérielles

Les thromboses artérielles ont été décrites pour la première fois en 1979 par Towne JB et coll. Il s'agit d'un thrombus riche en plaquettes, en fibrine et en leucocytes, d'aspect blanchâtre macroscopiquement d'où son nom de « White Clot Syndrome » ou « Syndrome du caillot blanc » (14).

Ces thromboses touchent préférentiellement l'aorte et le carrefour iliofémoral, donnant lieu à des ischémies des membres inférieurs, mais également les artères cérébrales et les artères coronaires responsables d'accident vasculaire cérébraux ischémiques et d'infarctus du myocarde pouvant engager le pronostic vital du patient.(11).

Ces évènements thrombotiques artériels expliquent la mortalité élevée des TIH.

b. Thromboses veineuses

Les thromboses veineuses représentent les complications thromboemboliques les plus fréquemment observées avec en première ligne les thromboses veineuses profondes (TVP) (50% des cas) associées ou non à une embolie pulmonaire (EP) (25% des cas).

Les TVP sont le plus souvent proximales et concernent principalement les veines des membres inférieurs, la veine cave, les veines surrenaliennes et les veines cérébrales. L'existence de thromboses veineuses infra clinique doit faire réaliser une échographie doppler des membres inférieurs de façon systématique chez tout patient suspect de TIH et lors de tout diagnostic de TIH. (15).

3.2 Les nécroses

Des nécroses cutanées au point d'injection de l'héparine ont été décrites et peuvent accompagner une coagulation intra-vasculaire disséminée (CIVD).

3.3 Les réactions systémiques

Des signes de choc systémique peuvent survenir dans les minutes suivant l'injection intraveineuse d'héparine : fièvre, détresse respiratoire aiguë, douleurs abdominales, flush, tachycardie, céphalées, diarrhées, hypertension.

Ces épisodes s'accompagnent le plus souvent d'une chute brutale et concomitante de la numération plaquettaire devant faire suspecter une TIH.

3.4 Les manifestations hémorragiques

Les TIH sont un modèle original de thrombopénie médicamenteuse car elles sont exceptionnellement associées à des hémorragies.

On retrouve rarement des saignements au point d'injection, des pétéchies ou des ecchymoses superficielles.

CHAPITRE 3 : TRAITEMENT DES THROMBOPÉNIES INDUITES PAR L'HÉPARINE

En France, les médicaments disponibles et autorisés pour le traitement d'une TIH sont le danaparoïde sodique (Orgaran®) et depuis 2011, l'argatroban (Arganova®). Le fondaparinux (Arixtra®) qui inhibe sélectivement le facteur X activé (Xa), n'a pas l'autorisation de mise sur le marché (AMM) pour cette indication mais son utilisation peut néanmoins être discutée dans certains cas.

La décision essentielle est l'arrêt de toute héparinothérapie si le diagnostic est fortement suspecté, et la mise en route d'un traitement anticoagulant substitutif en raison du très fort risque thrombotique associé aux TIH.

Le choix du traitement substitutif se fera après avoir vérifié la fonction rénale, la fonction hépatique ainsi que le poids du patient.

Le danaparoïde (Orgaran®) est un mélange d'héparane sulfate, de chondroïtine sulfate et de dermatane sulfate, inhibant essentiellement le facteur Xa en présence d'antithrombine, et très faiblement la thrombine.

Comme les HBPM, il est éliminé par les reins et n'a que peu d'effet sur le temps de céphaline activée (TCA). Un risque de surdosage existe donc, notamment chez l'insuffisant rénal chez lequel il est donc préférable de prescrire l'argatroban.

La surveillance de l'activité anti-Xa sous danaparoïde est recommandée surtout si la fonction rénale est altérée et chez les patients de poids extrêmes. L'activité anti-Xa mesurée par une méthode spécifique sera évaluée après le bolus et adaptation de la dose horaire et sera maintenue entre 0,5 et 0,8 U/mL.

Il existe de rares cas de TIH persistantes sous danaparoïde sodique dû à la présence de réaction croisée avec les Ac anti-FP4. Il faut la suspecter en l'absence de correction de la thrombopénie à 72h de traitement ou en cas d'aggravation de celle-ci.

L'argatroban (Arganova®) est un inhibiteur direct de la thrombine qui est éliminé par le foie. Il est donc contre-indiqué en cas d'insuffisance hépatocellulaire sévère (score de Child-Pugh ≥ 3).

Il est administré par voie parentérale à la posologie de 2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$. Elle peut être diminuée à 1 voire 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ en cas de comorbidité ou de chirurgie récente.

La surveillance est effectuée par mesure du TCA 2h après adaptation des doses avec une cible comprise entre 2 et 3.

Le fondaparinux (Arixtra®) n'a pas l'AMM dans cette indication mais pourra être utilisé à dose curative (7,5 mg/j) en particulier en cas de grossesse (16) ou si le danaparoïde sodique est indisponible.

Il est par contre contre-indiqué dans l'insuffisance rénale sévère.

Son suivi sera effectué par la mesure d'une activité anti-Xa spécifique.

Un relais par un anti vitamine K (AVK) est réalisé dès que possible à condition que la numération plaquettaire se soit corrigée.

La cible thérapeutique de l'INR est comprise entre 2 et 3.

CHAPITRE 4 : DIAGNOSTIC DES THROMBOPÉNIES INDUITES PAR L'HÉPARINE

La thrombopénie induite par l'héparine est un syndrome clinico-biologique dont le diagnostic repose sur une symptomatologie évocatrice de la maladie et la mise en évidence d'Ac anti-FP4 activant les plaquettes en présence d'héparine (17).

Les signes cliniques les plus évocateurs sont repris dans le tableau I.

Tableau I : Caractéristiques cliniques et biologiques des TIH d'après T. Warkentin (17).

Critères cliniques	Critères biologiques
<p>Thrombopénie ou diminution de plus de 40% de la numération plaquettaire associée ou non à :</p> <p>A. Thrombose veineuse profonde Embolie pulmonaire Thrombose veineuse cérébrale Hémorragie bilatérale des surrénales</p> <p>B. Thrombose artérielle Ischémie aiguë des membres inférieurs AVC Infarctus du myocarde</p> <p>C. Nécroses cutanées au point d'injection</p> <p>D. Réactions systémiques après injection</p> <p>E. CIVD</p>	<p>A. Test d'activation plaquettaire positif</p> <p>B. Test antigénique positif</p>

Ainsi, un patient qui développe des Ac héparine-dépendants sans thrombopénie ni complication clinique présente simplement une séroconversion.

De même, un patient dont les symptômes sont évocateurs d'une TIH mais chez qui les tests biologiques sont négatifs, ne doit pas être considéré comme ayant une TIH.

1. Scores de probabilités pré-tests

Deux scores clinico-biologiques ont été décrits afin d'aider à la démarche diagnostique d'une thrombopénie induite par l'héparine.

Le plus largement appliqué est le score des 4T's (*Thrombocytopenia, Timing, Thrombosis et oTher cause of thrombocytopenia*) élaboré par T. Warkentin (Annexe 1).

Ce score se base sur 4 paramètres :

- La profondeur de la **Thrombopénie**.
- Son délai d'apparition après l'introduction de l'héparine. (**T**iming)
- La survenue ou l'extension d'une **Thrombose**.
- L'existence d'autres causes possibles de thrombopénie. (**oT**her cause)

Il attribue des points (0, 1 ou 2) pour chaque *item* et la somme des points de chaque item permet de déterminer 3 niveaux de risque de développer une TIH :

- Faible risque de TIH pour les scores ≤ 3 ,
- Risque intermédiaire de TIH pour les scores de 4 ou 5,
- Risque élevé de TIH pour les scores ≥ 6 .

La valeur prédictive négative d'un score inférieur ou égal à 3 est de 99,8% (18), ce qui permet d'exclure la survenue d'une TIH sans réaliser d'examen biologique complémentaire. (19)

La valeur prédictive positive d'un score supérieur ou égal à 4 est de 14% ce qui est insuffisant et nécessite la réalisation de tests biologiques pour confirmer ou infirmer la pathologie.

Gruel et Pouplard ont montré que le score des 4T's n'est pas applicable après chirurgie cardiaque. En effet, en post-opératoire d'une chirurgie cardiaque avec circulation extra-corporelle, il est très fréquent de retrouver une thrombopénie et cette thrombopénie peut perdurer pendant plusieurs jours. Ils ont ainsi montré que l'étude du profil d'évolution de la numération plaquettaire après chirurgie reste l'outil le plus fiable pour identifier les patients à risque de TIH (20).

Afin d'améliorer la spécificité du score pré-test, Cuker a proposé en 2010, un nouveau score nommé score HEP (HIT Expert Probability) (21) (Annexe 2).

Ce score repose sur huit critères :

- L'amplitude de la chute de la numération plaquettaire,
- Le délai d'apparition de la thrombopénie,
- Le nadir de la numération plaquettaire,

- La mise en évidence d'une thrombose,
- La présence de nécrose cutanée,
- La survenue de saignements,
- L'existence d'une réaction systémique à l'injection d'héparine,
- La recherche d'autres causes possibles de TIH.

L'utilisation de ce score se révèle fastidieuse car il nécessite de répondre à beaucoup d'items dont il est parfois difficile de recueillir les informations. De plus aucune valeur seuil n'a été définie pour discriminer la probabilité de TIH.

Une seule étude réalisée sur un nombre limité de patients (47 cas de TIH suspectée) a été à ce jour publiée et ne montre pas de différence en termes de performance entre ces deux tests. (22).

2. Diagnostic biologique des TIH

Deux types de tests sont disponibles pour mettre en évidence la présence d'Ac héparine-dépendants :

- Les tests immunologiques qui détectent la fixation des Ac héparine-dépendants sur la cibles antigénique.
- Les tests fonctionnels qui démontrent l'aptitude de ces Ac à activer les plaquettes en présence d'héparine.

2.1. Les tests immunologiques

Parmi les tests immunologiques, nous devons dissocier les tests rapides des tests classiques ELISA.

2.1.1 Les tests rapides

Les tests rapides sont des tests unitaires adaptés à un diagnostic d'urgence. Ils peuvent être effectués dans tous les laboratoires non spécialisés et permettent de rendre un résultat qualitatif (positif, négatif, douteux) en moins d'une heure après le prélèvement sanguin. Ces tests ne permettent pas la quantification des Ac.

a. Immunofiltration sur gel (ID-Particle gel Immunoassay® BioRad)

Ce test est basé sur une immunofiltration sur gel.

Des billes de latex recouvertes de FP4/H sont incubées avec le plasma ou le sérum du patient suspect de TIH. Après centrifugation du dispositif, les billes de latex

sont retenues à la surface du gel lorsque des Ac anti-FP4/H sont présents dans le plasma de patients ou tombent au fond du puits en l'absence d'Ac.

b. Immunochromatographie sur membrane (STic Expert® HIT Stago)

Le Stic Expert® HIT (Stago diagnostica, Asnières, France) est un test immunochromatographique sur membrane conçu pour la détection qualitative spécifique des IgG dirigés contre les complexes PF4/H dans le sérum ou le plasma humain. Les Ac anti FP4/H du patient se fixent aux complexes macromoléculaires FP4/H biotinilés présents dans le tampon de réaction. Ces complexes Ac anti-FP4/H/Ag migrent le long de la membrane et entraînent avec eux des nanoparticules d'or recouvertes d'un Ac anti-biotine.

Ces nouveaux complexes Ac anti-FP4/H/complexes H/FP4/nanoparticules d'or sont ensuite immobilisés au niveau de la ligne test sensibilisée par des Ac anti IgG humaines. Les nanoparticules d'or en excès continuent leur migration à travers la membrane et se retrouvent capturées au niveau de la ligne témoin (C) par des anticorps spécifiques. Une ligne bien visible apparaît après un temps d'incubation de 10 minutes.

c. Tests rapides automatisés

Apparus en 2010, ces tests immunoenzymatiques présentent l'avantage d'être entièrement automatisés et ont un délai de réponse de l'ordre de 30 minutes après obtention du plasma quand les techniques manuelles de type ELISA demandent approximativement 3h. De plus, leur utilisation peut être envisagée simplement pour un seul échantillon alors qu'on préférera travailler sur une série d'échantillons de patients pour les techniques ELISA.

Ce sont des tests quantitatifs dont le résultat est rendu en unités de lumière relative (Relative Light Unit *RLU*), proportionnelle à la quantité d'Ac anti-FP4/H présents dans le plasma.

Leur seuil de positivité est fixé à 1 RLU/mL.(23).

Cependant, leur mise en œuvre requiert de posséder un automate de type AcL TOP ou AcL AcuStar du fabricant Werfen.

2 trousseaux sont disponibles :

> HemosIL® HIT-Ab

Le kit HemosIL® HIT- Ab(PF4-H) est un dosage immunologique automatisé sur bille de latex. Un anticorps monoclonal mimant les anticorps humains de TIH est

adsorbé sur les particules de latex (24). En présence de complexes FP4/Polyvinylsulfate et de plasma de patient, une réaction d'agglutination compétitive se met en place. L'importance de l'agglutination est inversement proportionnelle à la concentration d'anticorps anti-FP4/H présents dans l'échantillon et est déterminée en mesurant la diminution de la lumière transmise due à la formation d'agrégats.

> HemosIL® AcuStar HIT

La trousse HemosIL® AcuStar HIT est un test immunologique en 2 étapes qui utilise une détection en chimiluminescence. Dans un premier temps, le PF4 complexé au PVS adsorbé sur les particules magnétiques peut capturer, s'ils sont présents, les Ac anti-FP4/H du plasma du patient. Après une incubation puis séparation des particules magnétiques et lavage, un traceur constitué d'un Ac anti-Ig humaine marqué à l'Isoluminol est ajouté au milieu réactionnel et se fixe sur les Ac anti- PF4/Héparine dépendants capturés sur les particules. Après une seconde incubation et séparation des particules magnétiques, la réaction de chimiluminescence se développe et est mesurée par un système optique. Les ULRs sont directement proportionnelles à la concentration d'Anti- PF4/Héparine de l'échantillon.

Les 2 kits réactifs : HemosIL® AcuStar-Ab et HemosIL® AcuStar-IgG diffèrent seulement par l'isotype des Ac anti FP4/H reconnus. Le premier est dirigé contre les IgG, A et M, alors que le second est dirigé spécifiquement contre les IgG.

d. Performances des tests rapides

Les valeurs prédictives négatives des tests rapides sont de l'ordre de 100% ce qui permet d'exclure le diagnostic de TIH en cas de négativité du test.

Néanmoins, leurs valeurs prédictives positives sont de : 45% pour le PaGIA, 42% pour l'HemosIL® AcuStar-Ab, 66% pour le STIC expert et 71% pour l'HemosIL® AcuStar-IgG ce qui est insuffisant pour confirmer avec certitude le diagnostic de TIH (25). Il en est de même pour HemosIL® HIT-Ab pour lequel il est retrouvé une valeur prédictive positive de 45,5%. (26)

Ainsi, tout résultat positif ou douteux nécessite la réalisation d'un test immunoenzymatique permettant d'évaluer la concentration en Ac anti-FP4/H. (19)

2.1.2 Les tests immunoenzymatiques classiques

Les tests immunoenzymatiques ELISA (*Enzyme linked immuno sorbent assay*) permettent la détection et la « quantification » d'Ac anti PF4 modifiés par l'héparine.

Ces trousse diagnostiques peuvent être polyspécifiques et détecter à la fois les IgG, IgA et IgM ou spécifiques des IgG. Les recommandations actuelles préconisent d'utiliser un test spécifique des IgG, puisque ce sont les seuls anticorps pathogènes.

Ces techniques sont à la fois qualitatives, signant la présence ou l'absence d'anticorps et quantitatives puisque la mesure de l'absorbance est corrélée à la concentration en Ac anti-FP4/H présents chaque puits. Leur réalisation nécessite uniquement un lecteur de plaque ELISA. Le délai de rendu du résultat est de l'ordre de 3 à 4h après réception du prélèvement.

Il existe différentes trousse ELISA sur le marché, qui diffèrent par leur cible antigénique.

a. Différentes cibles antigéniques

> Complexes FP4/H

La trousse ASSERACHROM® HPIA IgG de STAGO utilise des plaques ELISA sensibilisées avec des complexes FP4/H.

> Complexes FP4/Polyvinylsulfate(PVS)

La trousse HAT45G® (Lifecodes Immucor) utilise des plaques sensibilisées par du FP4/polyvinylsulfate (FP4/PVS). Le PVS, chargé électronégativement, mime l'héparine et induit à la surface du FP4 des néo-antigènes reconnus par les Ac de TIH présents dans le plasma ou du sérum.

> Complexes H/Sulfate de protamine avec ajout de lysat plaquettaire

La trousse ZYMUTEST® HIA IgG de HYPHEN n'utilise pas le facteur 4 plaquettaire modifié comme cible antigénique ce qui la différencie des autres trousse commercialisées. Les microplaques sont sensibilisées par de l'héparine fixée par du sulfate de protamine. Le FP4 est apporté sous forme liquide par un lysat plaquettaire et se fixe à l'héparine présente au fond des puits. Les Ac anti-FP4/H reconnaissent alors le complexe sulfate de protamine/Héparine/FP4.

b. Performances des tests ELISA

Les tests ELISA polyspécifiques et spécifiques des IgG ont une excellente sensibilité puisque celle ci est supérieure à 95%. Néanmoins leur spécificité reste médiocre et s'établit autour de 85% (27).

Il est recommandé d'utiliser un test spécifique des IgG. En effet, ceux ci présentent une meilleure spécificité sans perte de sensibilité et leur valeur prédictive positive est bien meilleure que pour les tests polyspécifiques (28).

T. Warkentin a proposé (29) de modifier le seuil de positivité du test ELISA et de l'augmenter à une absorbance supérieure ou égale à 1 afin d'augmenter sa spécificité. De nombreuses études montrent que cela permet en effet d'augmenter la spécificité sans perte de sensibilité mais elles ont toutes été effectuées avec une seule trousse commercialisée (GTI) ou avec des tests ELISA « maison ». D'autres études seraient donc nécessaires avec les kits commercialisés par d'autres fabricants afin de pouvoir valider cette proposition. (30, 31).

En raison de la très bonne sensibilité des tests ELISA, lorsque celui ci est négatif, le diagnostic de TIH peut être écarté. En revanche, si le test ELISA est positif, la pathogénicité des anticorps détectés doit être démontrée et nécessite la réalisation d'un test d'activation plaquettaire.

2.2 Les tests fonctionnels

Les tests fonctionnels d'activation plaquettaire sont les seuls capables d'affirmer le diagnostic de TIH et impliquent l'utilisation de plaquettes humaines de sujets sains. Du fait de leur complexité de mise en œuvre, ils ne sont réalisés que dans des centres spécialisés ce qui en fait des tests peu compatibles avec l'urgence.

Le premier à avoir été mis au point est le test d'agrégation plaquettaire à la fin des années 70. Le test de libération de sérotonine radiomarquée, élaboré par Sheridan en 1986, est devenu le « gold standard » du diagnostic fonctionnel de la TIH. Afin de s'affranchir de la sérotonine radiomarquée, Greinacher a mis au point une nouvelle méthode d'agrégation plaquettaire réalisé sur plaquettes lavées en microplaque ELISA, le test HIPA (Heparin induced platelet aggregation).

Plus récemment, des techniques de cytométrie en flux ont été développées mais sont encore mal standardisées.

a. Les tests d'agrégation plaquettaire

Les tests d'agrégation plaquettaire sont réalisés sur du plasma riche en plaquettes (PRP) et mettent en évidence une agrégation des plaquettes de témoins sains induite par le plasma du patient en présence de concentrations variables d'héparine.

La variabilité de réponse des plaquettes d'un sujet sain aux Ac de TIH nécessite de sélectionner les donneurs et de tester les plaquettes d'au moins 5 donneurs différents avant de pouvoir conclure que le test est négatif (32). La bonne réponse des plaquettes est évaluée en testant, lors de chaque série, l'agrégabilité des plaquettes au collagène et en testant également le plasma d'un patient connu pour avoir des Ac de TIH. De même on s'assurera de l'absence d'agrégabilité spontanée en l'absence d'héparine. Le test est considéré positif si on met en évidence une agrégation plaquettaire avec des concentrations faibles d'héparine, voisines de celles utilisées en thérapeutique (0,1 à 0,5 UI/mL). Point capital, cette agrégation doit être inhibée pour de fortes concentrations d'héparine (10 à 100 UI/mL).

b. Le test HIPA (Heparin Induced Platelet Aggregation)

Le test HIPA, élaboré par Greinacher en 1991 (33), utilise les plaquettes lavées de quatre donneurs sains. L'utilisation de plaquettes lavées, comme pour le test de libération de sérotonine radiomarquée permet d'augmenter la sensibilité du test mais ajoute une difficulté technique. Les plaquettes sont incubées dans les puits d'une plaque ELISA non sensibilisée avec le sérum du patient soit en présence d'un tampon (témoin négatif), d'une concentration thérapeutique d'héparine (0,1 à 0,5 UI/mL) et enfin en présence d'une forte concentration en héparine (10 ou 100 UI/mL). Des agitateurs magnétiques sont utilisés comme sources de forces de cisaillements et la formation d'agrégats plaquettaires est déterminée visuellement toutes les cinq minutes. La durée du test est de trente minutes et le test est considéré positif si l'on retrouve une agrégation plaquettaire aux concentrations thérapeutiques en héparine chez au moins deux donneurs et en l'absence d'agrégation aux fortes concentrations d'héparine.

c. Le test de libération de sérotonine radiomarquée

Cette méthode est basée sur la libération du contenu des granules denses lors d'une activation plaquettaire. Les plaquettes d'un sujet sain sont marquées avec de la sérotonine radiomarquée au ^{14}C qui s'incorpore passivement dans les granules denses. Après lavage des plaquettes, celles-ci sont incubées en présence d'héparine à différentes concentrations et de plasma de patient.

La présence d'Ac pathogènes activateurs induit une activation des plaquettes avec libération du contenu des granules dans le surnageant.

La radioactivité ainsi libérée sera mesurée.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de libération de sérotonine. Le critère de positivité est un pourcentage de libération supérieur à 20 % pour de faibles concentrations d'héparine (0,1 et 1 UI/mL) et un pourcentage de libération inférieur à 20% en présence d'une forte concentration d'héparine (10 ou 100 UI /mL) ainsi qu'en absence d'héparine (34).

d. Cytométrie en flux

Ce test est beaucoup moins standardisé et utilisé seulement par quelques équipes (35). La cytométrie en flux détecte une augmentation d'expression de protéines, marqueurs d'activation plaquettaire, comme la p-selectine, grâce à un anticorps radiomarqué (anti-CD62P pour la p-selectine), en présence d'héparine à une concentration pharmacologique (0,2 à 0,3 UI/mL) ou élevée (100 à 200 UI/mL).

e. Performances des tests fonctionnels

Les tests fonctionnels doivent systématiquement être réalisés en présence d'au moins deux concentrations différentes d'héparine. L'une doit être proche de celles obtenues en thérapeutique (0,1 à 1 UI/mL) et doit permettre d'induire une activation plaquettaire. L'autre concentration d'héparine est plus élevée (10 ou 100 UI/mL) et doit inhiber l'activation plaquettaire précédemment obtenue pour de faibles concentrations d'héparine. Cette inhibition pour de fortes concentrations d'héparine est primordiale pour maintenir la spécificité du test. Le SRA est le test qui possède la spécificité la plus élevée, 100%, ainsi que la meilleure valeur prédictive positive (36).

Les tests d'agrégation plaquettaire ont une bonne spécificité, proche de 100%, mais une sensibilité pouvant varier de 39 à 81% selon la réactivité des plaquettes testées (37).

Les techniques de cytométrie en flux sont peu utilisées. Plusieurs études retrouvent des performances proches de celles des autres tests fonctionnels tout en restant un petit peu inférieures (35).

3. Stratégie diagnostique des thrombopénies induites par l'héparine

Pouplard et Gruel ont proposés un algorithme décisionnel basé sur une démarche bayésienne (32) qui associe le score des 4T's avec les résultats des différents tests biologiques (figure 1).

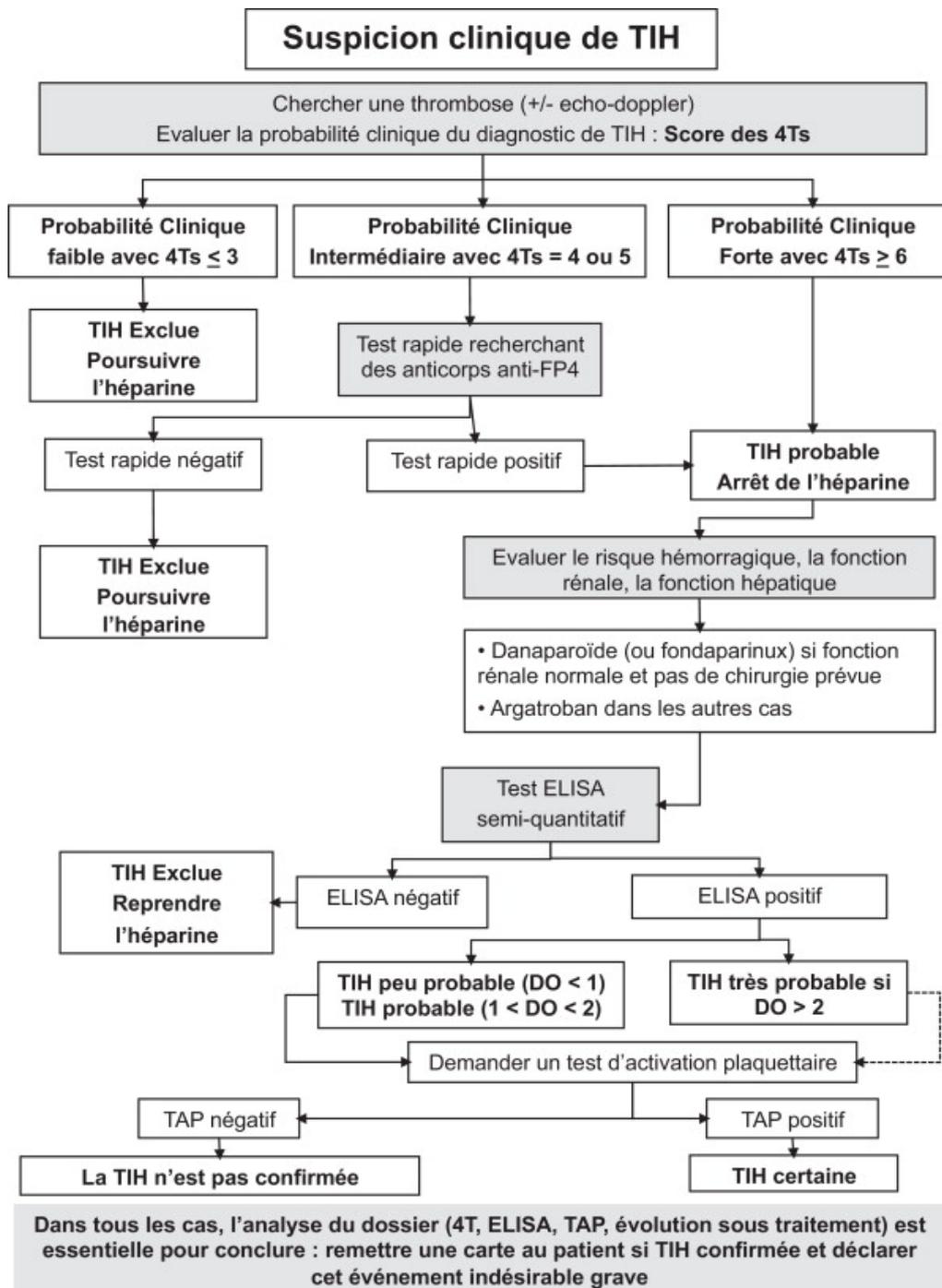


Figure 1 : Démarche bayésienne pour le diagnostic de TIH d'après Pouplard et Gruel (32).

Comme souligné sur cet algorithme, 3 niveaux de conclusions sont possibles :

- TIH exclue
- TIH certaine
- TIH non confirmée

Selon cet algorithme, les auteurs prennent en considération la valeur de l'absorbance et distinguent les absorbances inférieures à 1, celles comprises entre 1 et 2 et les absorbances supérieures à 2.

La valeur absolue de la densité optique mesurée lors de la réalisation d'un test ELISA de diagnostic de TIH est en effet une donnée très importante pour l'interprétation du test. Ainsi Cuker propose une autre démarche bayésienne (38) en intégrant à la fois le score des 4T's et la densité optique mesurée en ELISA avec le kit HAT45® polyspécifique pour diagnostiquer une TIH. (Figure 2).

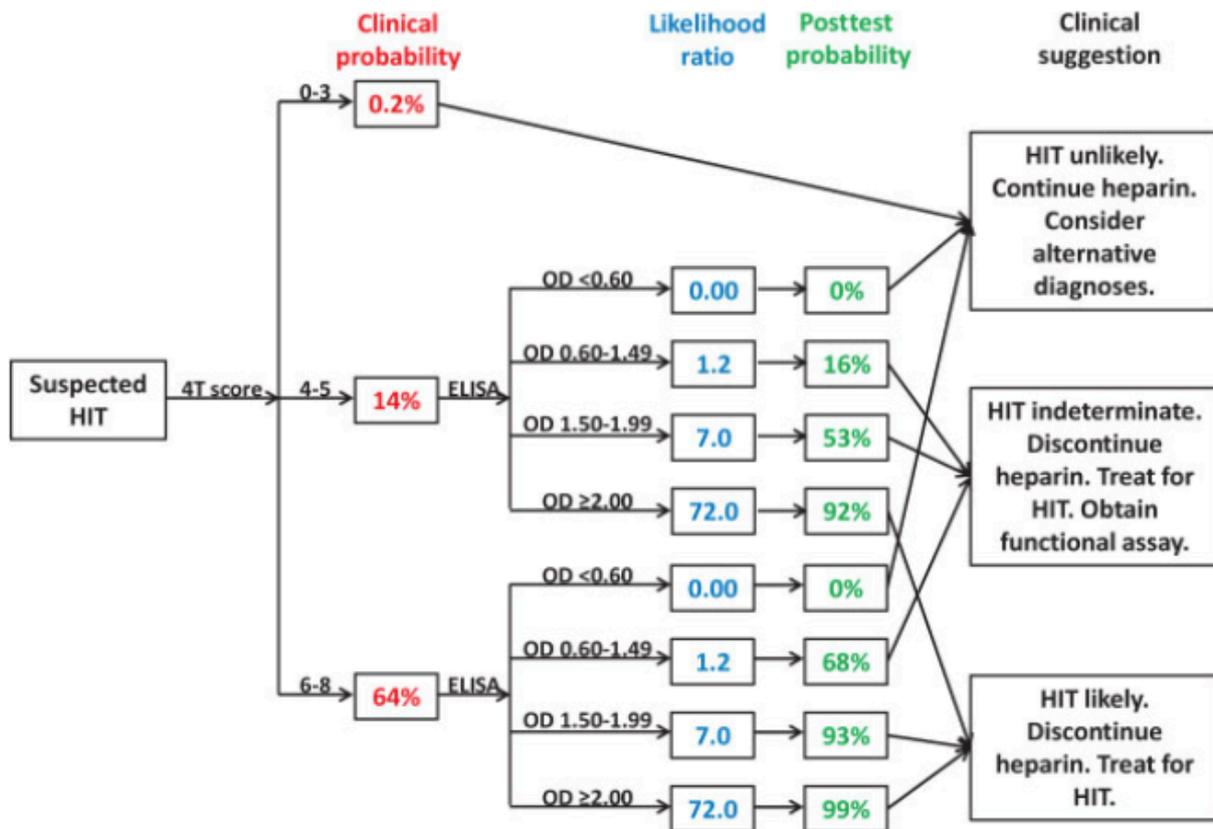


Figure 2 : Démarche bayésienne pour le diagnostic de TIH d'après Cuker (38).

Cette démarche aboutit également à trois conclusions clinico-biologiques :

- La TIH peut être exclue et l'héparine peut être poursuivie.
- La TIH reste incertaine et il est recommandé d'arrêter l'héparine. Un test fonctionnel doit être réalisé pour confirmer ou infirmer le diagnostic.
- La TIH est confirmée et l'héparine doit être arrêtée immédiatement.

Cet algorithme n'a été à ce jour validé par aucune étude prospective et il n'est pas certain qu'il soit applicable aux deux autres trousse ELISA commercialisées.

De plus, il est recommandé d'utiliser une trousse ELISA spécifique des IgG ce qui n'est pas le cas de ce travail.

CHAPITRE 5 : ÉVALUATION EXTERNE DE LA QUALITÉ DES TESTS ELISA

L'ECAT Foundation est un organisme indépendant néerlandais permettant aux laboratoires qui le souhaitent d'évaluer leur pratique.

Concernant la détection des Ac anti-FP4/H, les exercices ont lieu une fois par an avec l'envoi simultané de deux échantillons.

Les recommandations de cet organisme sont :

- d'utiliser un kit ne recherchant que les IgG plutôt que les IgG, A et M afin d'augmenter la spécificité du test sans en altérer sa sensibilité. De ce fait, on diminue le risque de faux positif.

- de bien faire apparaître sur le compte rendu biologique, la valeur absolue de l'absorbance mesurée lors de la réalisation d'un test ELISA car de nombreuses études ont démontré que le risque de TIH était fortement corrélé à l'absorbance.

Pour un même échantillon positif, les variations inter-essais sont importantes quelque soit la trousse utilisée avec des coefficients de variations (CV) allant de 16 à 39%. Les résultats des exercices 2011 – 2012 et 2013 sont représentés dans le tableau II.

Tableau II : Résultats des EEQ de l'échantillon positif de l'ECAT pour les années 2011 à 2013
(39)

Method	2011			2012			2013		
	N	OD	CVb (%)	N	OD	CVb (%)	N	OD	CVb (%)
Genprobe PF4 IgG	-	-	-	-	-	-	3	2.05	-
GTI PF4 Enhanced	19	2.04	16.0	23	0.43	25.4	22	2.51	16.7
GTI PF4 IgG	41	1.96	23.8	38	0.33	39.0	35	2.45	23.1
Hyphen Zymutest IgGAM	8	1.94	-	5	0.32	-	6	1.36	-
Hyphen Zymutest IgG	26	1.78	20.8	27	0.20	34.0	32	1.51	36.6
Stago Asserachrom HPIA	22	2.44	18.4	22	0.51	21.3	14	2.51	23.3
Stago Asserachrom HPIA IgG	2	2.60	-	7	0.11	-	12	2.44	22.0
Technoclone Technozyme IgG	3	0.97	-	2	0.16	-	3	0.73	-

Pour un même kit, il est intéressant de noter que les CV peuvent varier de manière importante d'une année à l'autre et qu'aucune tendance d'amélioration des CV n'apparaît au fil des années.

Comme tous les tests ELISA, les ELISA anti-FP4 sont très dépendants des conditions de réalisation et en particulier de la température de la pièce où ils sont effectués ainsi que du respect des temps d'incubations de l'échantillon, de l'immunoconjugué et du substrat.

A ce jour, aucune standardisation des trousse n'est proposée et la corrélation des absorbances d'une trousse à l'autre n'a jamais été étudiée. Chaque kit possède un contrôle positif, un contrôle négatif et un seuil de positivité qui est fixe pour les trousse GTI et HYPHEN et variable pour la trousse STAGO.

Nous avons développé au laboratoire un anticorps monoclonal 5B9 qui mime parfaitement les Ac de TIH. Cet anticorps est une IgG1 anti-FP4/H constitué d'une chaîne légère murine, d'une chaîne lourde chimérique dont la partie variable est murine, et d'une partie constante humaine. Il est capable de se lier de façon spécifique aux complexes FP4/H alors qu'il n'interagit que très faiblement avec le FP4 seul. Il est également capable d'induire une agrégation plaquettaire héparine-dépendante, entièrement inhibée par l'Ac anti-FcγRIIA.

Dans ce contexte, nous avons cherché s'il était possible d'étalonner les trousse ELISA anti-FP4 en utilisant cet Ac monoclonal comme et en exprimant les résultats en équivalent 5B9 afin d'homogénéiser les résultats d'une trousse à l'autre.

II. DEUXIÈME PARTIE : TRAVAIL PERSONNEL

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1.1. Anticorps monoclonal 5B9 et gamme d'étalonnage

Afin de réaliser une gamme d'étalonnage avec l'anticorps monoclonal 5B9, nous sommes parti d'une solution mère d'Ac 5B9 à 1 mg/mL congelée à -80°C. La décongélation s'est fait rapidement en mettant l'aliquot 5 minutes au bain marie à 37°C et nous avons utilisé un nouvel aliquot d'Ac 5B9 à chaque expérimentation afin d'éviter les cycles de décongélation/congélation pouvant nuire à la qualité de l'Ac. Nous avons réalisé ensuite une dilution initiale de l'Ac 5B9 au 1/100^{ème} dans du diluant échantillon propre à chaque trousse commerciale afin d'obtenir une concentration initiale de 10 µg/mL. Enfin, des dilutions en cascade au demi ont été réalisées en 'diluant échantillon' jusqu'à une concentration finale de 0,32 µg/mL.

Notre gamme d'étalonnage comprenait donc, pour chaque expérimentation, les six points de gamme suivants : 0,32 – 0,63 – 1,25 – 2,5 – 5 - 10 µg/mL.

1.2. Les tests ELISA

Les tests ELISA ont été réalisés avec trois trousse commercialisées en France pour la recherche d'anticorps héparine-dépendants.

Ils se distinguent entre eux par leur cible antigénique.

a. Le test ZYMUTEST® HIA IgG (HYPHEN®, Neuville-sur-oise, France) :

Cible antigénique : Sulfate de protamine/Héparine + lysat plaquettaire

La recherche des anticorps de TIH était réalisée au laboratoire avec des trousse prêtes à l'emploi et contenant :

- 12 barrettes de 8 puits, sensibilisées par de l'héparine non fractionnée, biologiquement disponible, saturée, stabilisée, et emballée dans un sachet aluminium en présence d'un déshydratant.
- 2 flacons de 50 mL de diluant échantillon, prêts à l'emploi.
- 3 flacons de contrôle positif lyophilisés, à reconstituer par 1 mL de diluant échantillon afin d'obtenir le contrôle positif prêt à l'emploi.

- 3 flacons de contrôle négatif lyophilisés, contenant du plasma humain normal dilué. Après reconstitution avec 1 mL de diluant échantillon, le contrôle négatif était prêt à l'emploi.
- 3 flacons de lysat plaquettaire lyophilisé. A reconstituer par 2 mL d'eau distillée, afin d'obtenir le réactif prêt à l'emploi.
- 3 flacons d'immunoconjugué (anticorps polyclonaux de chèvre) spécifique de la partie Fc γ de l'IgG humaine, couplé à la peroxydase et lyophilisé. L'immunoconjugué prêt à l'emploi était obtenu après reconstitution par 7,5 mL de diluant pour immunoconjugué.
- 1 flacon de 25 mL de diluant pour immunoconjugué.
- 1 flacon de 50 mL de solution de lavage, 20 fois concentrée.
- 1 flacon de 25 mL de substrat : 3, 3', 5, 5'- Tetraméthylbenzidine (TMB), contenant de l'eau oxygénée.
- 1 flacon de 6 mL de solution stop contenant de l'acide sulfurique 0,45M.

Le mode opératoire de l'industriel était le suivant :

1. Dépôt du lysat plaquettaire et fixation des anticorps héparine-dépendants

Les échantillons (plasmas) des patients à tester étaient dilués au 1/100ème en diluant échantillon.

Un contrôle positif et un contrôle négatif lyophilisés étaient reconstitués avec 1 mL de diluant échantillon et étaient prêts à l'emploi.

Le lysat plaquettaire lyophilisé était reconstitué avec 2 mL d'eau distillée et était déposé au fond de chaque puits sous un volume de 50 μ L.

Les échantillons ainsi que les contrôles étaient déposés immédiatement sous un volume de 200 μ L.

Le diluant échantillon était également déposé seul sous un volume de 200 μ L afin de déterminer le blanc de la réaction.

Après une heure d'incubation à température ambiante, les puits étaient lavés 5 fois de suite avec la solution de lavage diluée au 1/20ème.

2. dépôt de l'immunoconjugué spécifique de l'IgG humaine

L'immunoconjugué lyophilisé était reconstitué à l'aide de 7,5 mL de diluant pour immunoconjugué et déposé au fond de tous les puits sous un volume de 200 μ L.

Après une heure d'incubation à température ambiante, les puits étaient lavés 5 fois de suite avec la solution de lavage diluée au 1/20^{ème}.

3. Développement de la réaction

Le substrat TMB était déposé au fond des puits sous un volume de 200 µL en respectant un intervalle de temps défini à l'avance entre chaque barrette.

Précisément 5 minutes après l'introduction du substrat, la réaction était arrêtée par l'ajout de 50 µL d'acide sulfurique 0,45M au fond des puits.

Après 10 minutes de stabilisation à température ambiante, les absorbances étaient lues à 450 nm.

4. Validation technique et interprétation des résultats

Les contrôles fournis dans le coffret permettaient de valider la bonne réalisation du dosage.

L'expérimentation était validée si l'absorbance du contrôle positif est supérieure ou égale à 1 et si l'absorbance du contrôle négatif était inférieure ou égale à 0,25 à température ambiante (comprise entre 18 et 25°C).

Le seuil de positivité des échantillons est de 0,5 lorsque la réaction était réalisée à 20±1°C.

b. Le test HAT45G® (Immucor GTI Diagnostics®, Waukesha, USA) :

Cible antigénique : FP4/Polyvinysulfate

La détection des anticorps anti-PF4/H était faite à l'aide de plaques sensibilisées par un complexe FP4/PVS qui mimait la cible antigénique formée in vivo par le FP4 et l'héparine.

La trousse HAT45G® contient :

- 12 barrettes de 8 puits sensibilisés par le complexe FP4/PVS avec support.
- 1 flacon de 50 mL de solution de lavage concentrée 10 fois.
- 1 flacon de 30 mL de diluant échantillon.
- 1 flacon de 80 µL d'immunoconjugué anti-IgG humaine couplée à la phosphatase alcaline. L'immunoconjugué était à diluer au 1/100^{ème} dans du diluant échantillon avant utilisation.
- 6 flacons de 50 mg substrat p-nitrophénylphosphate (PNPP) lyophilisé, à reconstituer avec 0,5 mL d'eau distillée.
- 1 flacon de 14 mL de tampon substrat qui devait être protégé de la lumière.

- 1 flacon de 100 µL de contrôle positif contenant du sérum d'origine humaine à diluer avant utilisation.
- 1 flacon de 100 µL de contrôle négatif contenant du sérum d'origine humaine à diluer avant utilisation.
- 1 flacon de 14 mL de solution d'arrêt constituée de NaOH à 3M.

Le mode opératoire du test HAT45G® était le suivant :

1. Fixation des anticorps anti-facteur 4 plaquettaire modifié par l'héparine

La solution de lavage devait être diluée préalablement au 1/10ème en eau distillée. 300 µL de cette solution sont déposés au fond des puits puis incubés 5 à 10 minutes à température ambiante.

Les échantillons ainsi que les contrôles sont dilués au 1/50ème en diluant échantillon.

Les puits étaient vidés et les échantillons ainsi que les contrôles étaient déposés au fond des puits sous un volume de 50 µL.

Le diluant échantillon était également déposé seul sous un volume de 50 µL afin de déterminer le blanc de la réaction et la plaque était recouverte d'un film adhésif.

La plaque était ensuite mise à incuber au bain marie à 37°C pendant 30 minutes puis les puits étaient lavés 3 fois de suite avec la solution de lavage préalablement diluée.

2. Dépôt de l'immunoconjugué anti-IgG

L'immunoconjugué était dilué au 1/100ème en diluant échantillon puis celui-ci était déposé au fond des puits sous un volume de 50 µL.

Après avoir recouvert la plaque d'un film adhésif, celle-ci était à nouveau mise à incuber au bain marie à 37°C pendant 30 minutes.

Une nouvelle étape de 3 lavages successifs était effectuée avec la solution de lavage diluée.

3. Développement de la réaction

Le substrat PNPP était réhydraté avec 0,5 mL d'eau distillée puis dilué au 1/100ème en diluant substrat. Le produit obtenu était à conserver à l'abri de la lumière. 100 µL de substrat dilué était ajouté au fond des puits à intervalles réguliers et les barrettes étaient à nouveau recouvertes d'un film adhésif puis placées précisément 30 minutes à l'obscurité.

La réaction était arrêtée par le dépôt de 100 µL de solution d'arrêt et les absorbances, lues à 405 nm dans les 15 minutes suivant l'arrêt de la réaction.

4. Validation technique et interprétation des résultats

L'expérimentation était validée si l'absorbance du contrôle positif était supérieure ou égale à 1,8 et si l'absorbance du contrôle négatif était inférieure ou égale à 0,3 à température ambiante.

Les échantillons étaient considérés comme positifs pour des absorbances supérieures ou égales à 0,4 à 405 nm.

c. Le test ASSERACHROM® HPIA – IgG (Diagnostica Stago, Asnières sur seine, France) :

Cible antigénique : FP4/Héparine

La recherche des anticorps de TIH était réalisée à partir de coffrets prêts à l'emploi ASSERACHROM® HPIA – IgG contenant :

- 6 barrettes de 8 puits sensibilisées par le complexe PF4/H.
- 1 flacon de 50 mL de solution de lavage, 20 fois concentrée.
- 3 flacons de 30 mL de diluant échantillon.
- 6 flacons d'immunoconjugué anti-IgG humaine couplée à la peroxydase.
L'immunoconjugué devait être reconstitué par 2 mL de diluant échantillon avant utilisation.
- 6 flacons de 8 mL substrat TMB.
- 3 flacons de « Référence HPIA ». Un plasma humain lyophilisé contenant dans anticorps anti-PF4/H était utilisé dans ce test. Il devait être reconstitué par 1 mL de diluant échantillon.
- 3 flacons de contrôle positif lyophilisé, à reconstituer avec 1 mL de diluant échantillon.
- 3 flacons de contrôle négatif lyophilisé, à reconstituer avec 1 mL de diluant échantillon.

Le mode opératoire était décrit par le fournisseur :

1. Fixation des anticorps anti-facteur 4 plaquettaire modifié par l'héparine

Les échantillons à tester (plasmas) étaient dilués au 1/101ème en « diluant échantillon ».

Les échantillons, les contrôles et la solution « HPIA référence » étaient déposés au fond des puits sous un volume de 200 µL.

Le diluant échantillon était également déposé seul sous un volume de 200 µL afin de déterminer le blanc de la réaction.

Après une heure d'incubation à température ambiante, les puits étaient lavés 5 fois de suite avec la solution de lavage diluée au 1/20ème.

2. Dépôt de l'immunoconjugué anti-IgG

L'immunoconjugué préalablement reconstitué avec 2 mL de diluant échantillon était déposé au fond des puits sous un volume de 200 µL.

Après une heure d'incubation à température ambiante, les puits étaient lavés 5 fois de suite avec la solution de lavage diluée au 1/20ème.

3. Développement de la réaction

Le substrat TMB était déposé au fond des puits sous un volume de 200 µL en respectant un intervalle de temps défini entre chaque barrette.

Après exactement 5 minutes d'incubation à température ambiante, la réaction était arrêtée en déposant 50 µL d'acide sulfurique 1M au fond des puits, toujours en respectant l'intervalle de temps défini précédemment.

La lecture des absorbances s'effectuait à 450 nm, au moins 15 minutes après arrêt de la réaction.

4. Validation et interprétation des résultats

Le contrôle positif et le contrôle négatif permettaient de valider l'expérimentation. Leurs valeurs étaient indiquées dans le papillon fourni avec la trousse.

Un échantillon était considéré comme positif si la valeur de son absorbance était supérieure à un pourcentage de la valeur d'absorbance de la référence HPIA.

Ce pourcentage était écrit sur un papillon fourni avec le coffret et pouvait varier d'un lot à l'autre.

Les caractéristiques des différentes troussees utilisées sont regroupées dans le tableau III.

Tableau III : Caractéristiques des tests ELISA utilisés pour la recherche d'Ac héparine-dépendants

	ZYMUTEST HIA IgG	ASSERACHROM® HPIA IgG	HAT45G®
cible antigénique	Complexes Sulfate de protamine/Héparine + lysat plaquettaire	Complexes FP4/H	Complexes FP4/PVS
Anticorps recherchés	Anticorps anti-FP4/H		
Dépôt des échantillons	Dilution au 1/100 ^{ème} Incubation 1h à température ambiante	Dilution au 1/101 ^{ème} Incubation 1h à température ambiante	Dilution au 1/50 ^{ème} Incubation 30 minutes au bain marie à 37°C
Lavages	5		3
Dépôt de l'immunoconjugué anti-IgG	Couplé à la peroxydase Incubation 1h à température ambiante		Couplé à la phosphatase alcaline Incubation 30 minutes au bain marie à 37°C
Lavages	5		3
Révélation	Substrat : TMB Incubation 5 minutes à température ambiante		Substrat : PNPP Incubation 30 minutes à l'obscurité
Arrêt de la réaction	H ₂ SO ₄ 0,45M	H ₂ SO ₄ 1M	NaOH 3M
Lecture de l'absorbance	450 nm	450 nm	405 nm
Seuil de positivité	0,5	Pourcentage de la solution HPIA de référence	0,4

1.3. Echantillons patients

Quatorze plasmas de patients ayant un titre significatif d'anticorps de TIH ont été sélectionnés. Dans 12 cas, le diagnostic de TIH avait été confirmé par un test de libération de sérotonine radiomarquée. Les deux patients restants avaient eu une recherche d'Ac de TIH positive mais le test de libération de sérotonine radiomarquée était négatif.

Les caractéristiques de ces 14 échantillons sont représentées ci-dessous dans le tableau IV.

Tableau IV : Tableau récapitulatif des caractéristiques des échantillons utilisés

	Trousse utilisée	Absorbance	%age de libération de sérotonine en présence de 0-0,1-0,5-10 UI/mL d'HNF	Thrombose
P1	HAT45® G/A/M	2,836	15-89-84-66-5	Non
P2	HAT45G® G/A/M	2,165	78-95-93-93-40	Oui
P3	HAT45G® G/A/M	2,595	8-42-27-15-1	Non
P4	HAT45G® G/A/M	2,5	74-82-38-8	Non
P5	HAT45G® G/A/M	2,182	5-35-25-8	Oui
P6	HAT45G® G/A/M	2,845	20-90-69-11	Non
P7	HAT45G® G/A/M	3	19-94-51-1	Non
P8	HAT45G® G/A/M	2	4-45-48-0	Non
P9	HAT45G® G/A/M	>2	NC	Non
P10	HAT45G® G/A/M	3,2	5-54-45-2	Non
P11	HAT45G® G/A/M	2,5	0-4-50-0	Oui
P12	HAT45G® G/A/M	1,596	0-4-2-1-0	Non
P13	HAT45G® G/A/M	1,224	3-2-1-1-3	NC
P14	ZYMUTEST® G/A/M	0,604	29-36-36-27	NC

L'échantillon P8 était appelé C1 tout au long de ce travail.

Un pool de 4 plasmas a été réalisé avec les échantillons P8, P9, P10 et P11 et utilisé après dilution au 1/5ème en plasma normal (Cryocheck®, Cryopep). Nous l'avons nommé Pool 1/5ème dans ce travail.

1.4. Lecteur de plaque ELISA

Nous avons utilisé un lecteur d'absorbance Elx800TM de la marque BioTek®. La lecture a été effectuée aux longueurs d'ondes préconisées par nos 3 fabricants de trousse, respectivement 450 nm pour les trousse ASSERACHROM® HPIA – IgG de chez Stago Diagnostica® et ZYMUTEST® HIA IgG de chez HYPHEN® et 405 nm pour la trousse HAT45G® (Immucor GTI Diagnostics®).

2. RÉSULTATS

1^{ère} partie : Standardisation des différentes trouses ELISA à l'aide de l'anticorps monoclonal de TIH 5B9.

Afin d'évaluer la possibilité d'utiliser l'Ac 5B9 lors de la standardisation des différentes trouses, nous avons testés 7 échantillons de patients connus pour avoir un titre significatif d'anticorps anti FP4 modifié par l'héparine avec trois coffrets ELISA différents utilisés pour le diagnostic de TIH. Une gamme d'étalonnage a systématiquement été réalisée avec l'Ac 5B9.

Tous les résultats sont ainsi exprimés en absorbance et en « équivalent 5B9 ».

A. Gammes d'étalonnage réalisées avec l'anticorps monoclonal 5B9

Avec la trousse ASSERACHROM® HPIA – IgG (Stago) (figure 3) et la trousse HAT45G® (GTI) (figure 4), nous obtenons des courbes de calibration d'allure hyperbolique avec pour chacune d'elle, un coefficient R^2 égal à 0,99. On remarque un infléchissement de la courbe lorsque l'Ac 5B9 atteint une concentration supérieure ou égale à 2,5 µg/mL avec ces deux trouses ce qui témoigne d'une saturation du signal.

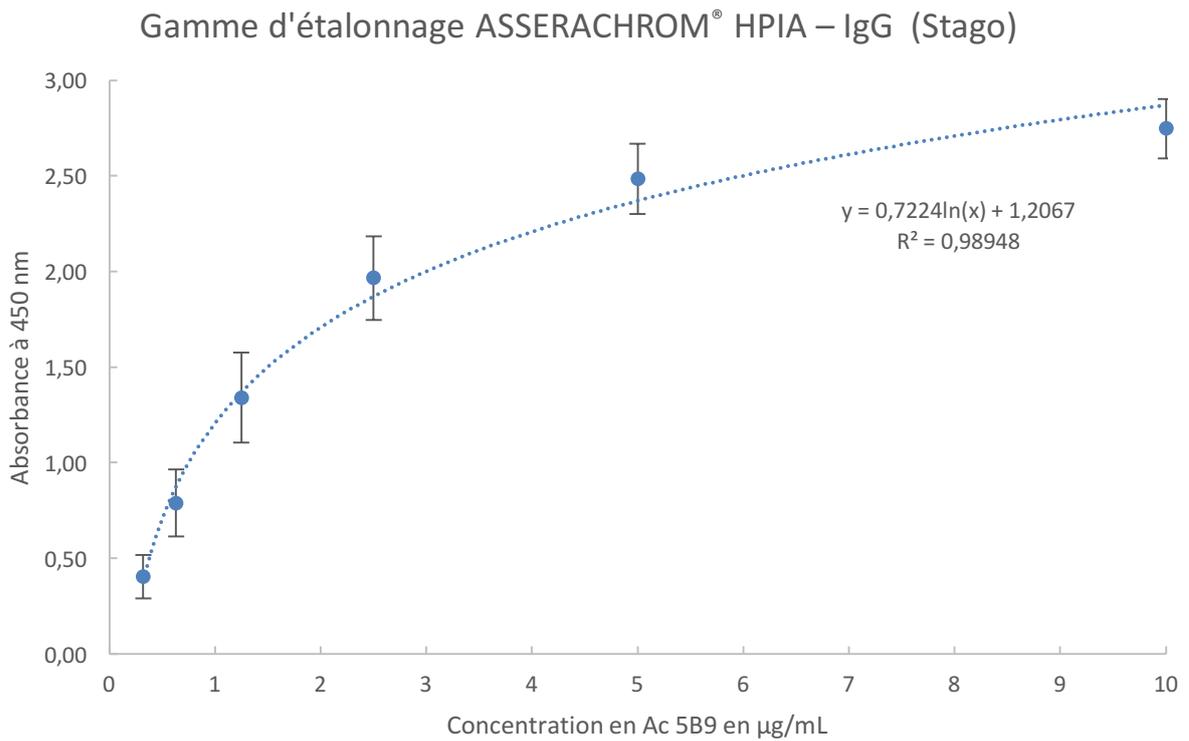


Figure 3 : Gamme d'étalonnage en Ac 5B9 de la trousse ASSERACHROM® HPIA – IgG (Stago). Moyenne +/- Ecart type. n = 5 expérimentations.

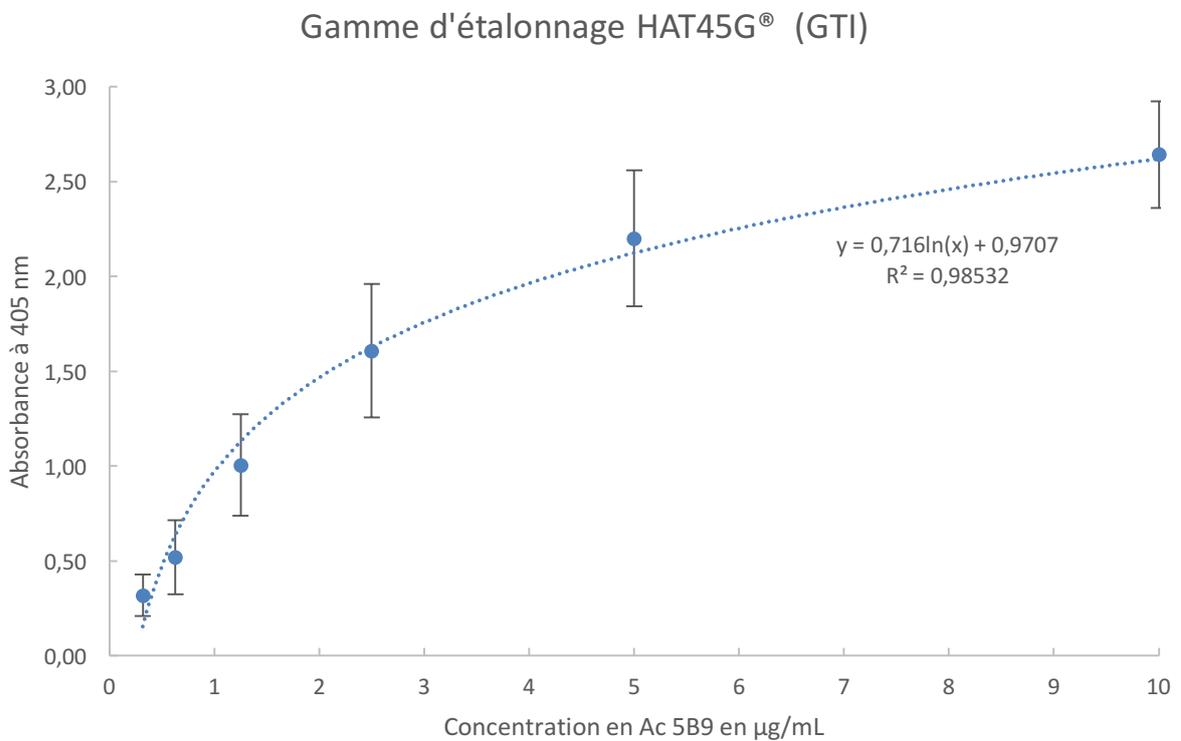


Figure 4 : Gamme d'étalonnage en Ac 5B9 de la trousse HAT45G® (GTI). Moyenne +/- Ecart type. n = 5 expérimentations.

L'amplitude des absorbances mesurées avec ces deux kits sont similaires puisqu'elles varient entre 0,41 et 2,75 avec la trousse ASSERACHROM® HPIA – IgG, et entre 0,32 et 2,64 avec la trousse HAT45G®.

Avec la trousse ZYMUTEST® HIA IgG (HYPHEN) (figure 5), l'allure de la courbe de calibration est linéaire avec un coefficient de corrélation R^2 égal à 0,97. Les absorbances varient entre 0,12 et 2,07.

Gamme d'étalonnage ZYMUTEST® HIA IgG (HYPHEN)

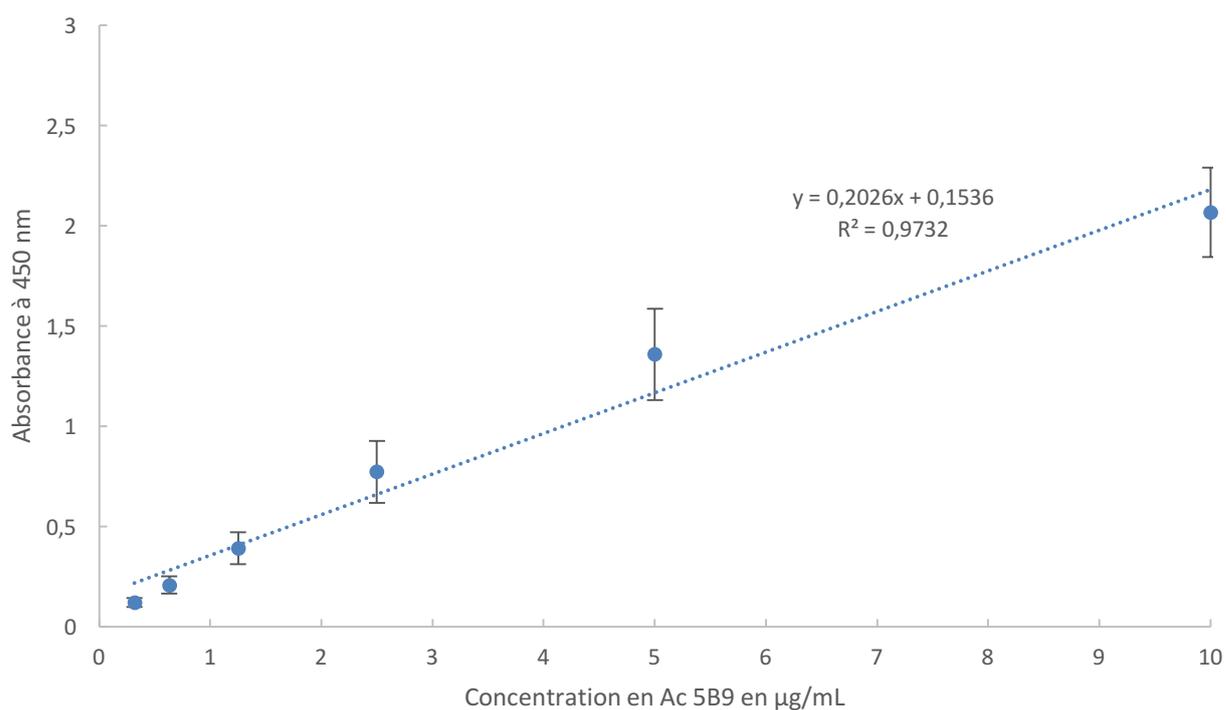


Figure 5 : Gamme d'étalonnage en Ac 5B9 de la trousse ZYMUTEST® HIA IgG (HYPHEN).
Moyenne +/- Ecart type. n = 5 expérimentations.

Les absorbances moyennes de nos gammes d'étalonnage pour chaque trousse testée sont représentées dans le tableau V.

Tableau V : Tableau des absorbances moyennes pour chaque point de gamme d'étalonnage.

Absorbance	Concentration en Ac 5B9 en µg/mL					
	0,41	0,79	1,34	1,97	2,48	2,75
Absorbance ASSERACHROM® HPIA – IgG	0,41	0,79	1,34	1,97	2,48	2,75
Absorbance HAT45G®	0,32	0,52	1,01	1,61	2,20	2,64
Absorbance ZYMUTEST® HIA IgG	0,12	0,21	0,39	0,77	1,36	2,07

Quelle que soit la trousse utilisée, les coefficients de variations (CV) inter-essais calculés pour chaque point de gamme, varient entre 5 et 37%, avec une nette augmentation des CV pour les faibles concentrations d'Ac 5B9. (Figure 6)

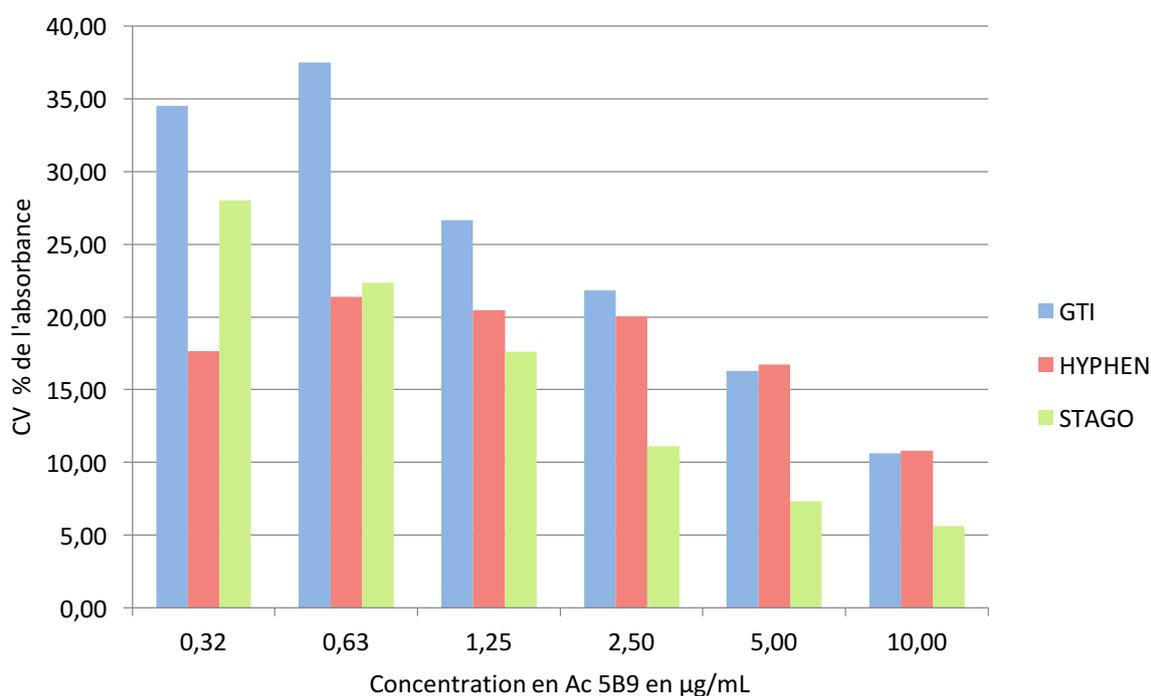


Figure 6 : Coefficients de variations inter-essais selon la concentration en Ac 5B9.

Avec la trousse ASSERACHROM® HPIA – IgG de Stago, les coefficients de variations sont inversement proportionnels à la concentration en Ac 5B9 et varient de 6 à 28%. Ce phénomène n'est pas observé pour la trousse ZYMUTEST® HIA IgG puisque les CV varient de 11 à 21% avec des CV proches de 20% pour des concentrations en Ac 5B9 comprises entre 0,63 et 2,5 µg/mL. Avec la trousse HAT45G® de GTI, nous observons de très forts CV, supérieurs à 20% pour des concentrations en Ac 5B9 comprises entre 0,32 et 2,5 µg/mL.

B. Standardisation des absorbances mesurées avec les plasmas des patients

Dans un second temps, nous avons regardé si la réalisation d'une courbe de calibration lors de chaque essai associée à une expression des résultats en « Equivalent 5B9 », permettait de standardiser les résultats obtenus avec les plasmas de patients.

Dans ce but, nous avons testé les échantillons de plasmas de 7 patients sur chacune des trois trouses.

Les absorbances mesurées avec chaque trousse sont présentées sur la figure 7 ainsi que les moyennes calculées avec les absorbances mesurées pour un même échantillon avec les trois kits commerciaux.

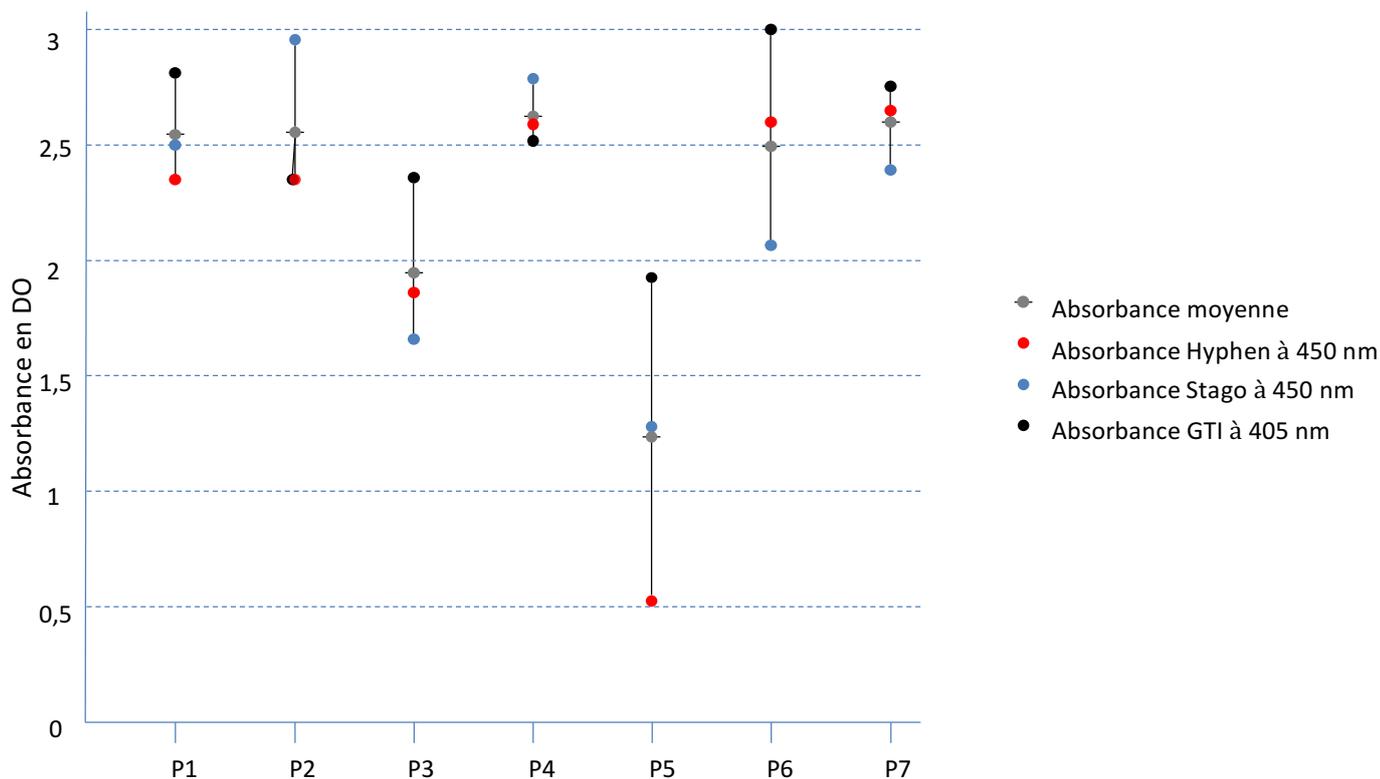


Figure 7 : Absorbance des échantillons P1 à P7 selon la trousse utilisée.

On note que pour les échantillons P1, P4 et P7, les résultats exprimés en absorbance sont très comparables quel que soit le kit utilisé alors que pour les autres échantillons, des variations de plus de 0,5 d'absorbance sont observées d'une trousse à l'autre.

Ceci est particulièrement remarquable avec l'échantillon P5, pour qui l'absorbance est de 0,55 avec le kit ZYMUTEST® HIA IgG, 1,28 avec la trousse ASSERACHROM® HPIA – IgG et 1,95 avec la trousse HAT45G®.

A l'aide des courbes de calibrations propre à chacune des trouses et réalisées lors de chaque expérimentation, nous avons également exprimé les résultats de chaque échantillon en « équivalent 5B9 ». Ces résultats sont représentés sur la figure 8.

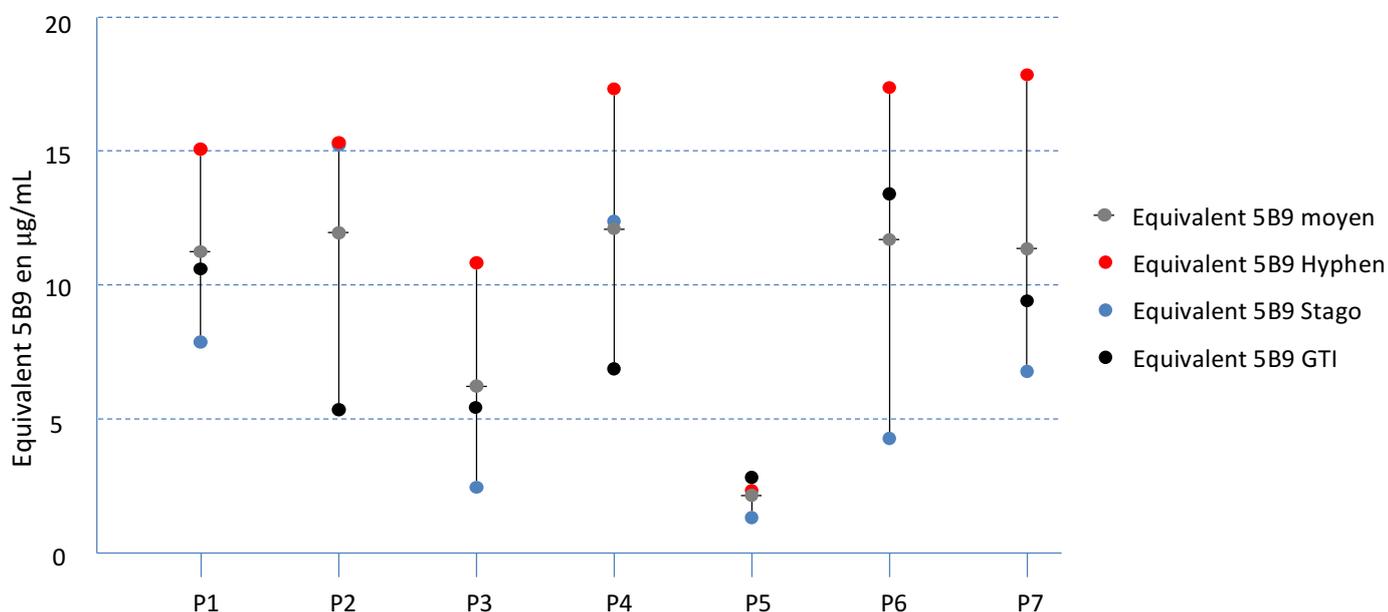


Figure 8 : Equivalent 5B9 en µg/mL des échantillons P1 à P7 selon la trousse utilisée.

L'expression des résultats en équivalent 5B9 ne permet pas de diminuer les variations de résultats des patients à l'exception de l'échantillon P5. Nous observons également que tous les échantillons, à l'exception de P5, ont des résultats en équivalent 5B9 plus élevés avec la trousse ZYMUTEST® HIA IgG ce qui n'était pas observé lorsque les résultats étaient exprimés en absorbance.

2^{ème} partie : Standardisation de la trousse ASSERACHROM® HPIA – IgG en conditions extrêmes

Dans la mesure où les résultats de la première partie de ce travail montrent que l'anticorps monoclonal 5B9 ne permet pas de standardiser les résultats des patients lorsqu'ils sont testés sur des kits différents, nous avons évalué si l'anticorps 5B9 pouvait permettre de diminuer les coefficients de variations inter-essais pour une même trousse.

La trousse ASSERACHROM® HPIA – IgG a été utilisée dans la deuxième partie de ce travail puisqu'elle utilise des plaques sensibilisées par des complexes FP4/H et que ces mêmes complexes ont été utilisés pour immuniser les souris avec lesquelles nous avons obtenu le clone 5B9. Les différentes étapes du test ELISA ont été soumises à des conditions de réalisations extrêmes.

A. Variation de la température

Nous avons tout d'abord réalisé les tests en respectant les recommandations du fournisseur qui stipulent de réaliser les tests à température ambiante ($20\pm 2^\circ\text{C}$) et nous nous sommes mis à une température extrême de 30°C . Les gammes d'étalonnage sont représentées sur la figure 9.

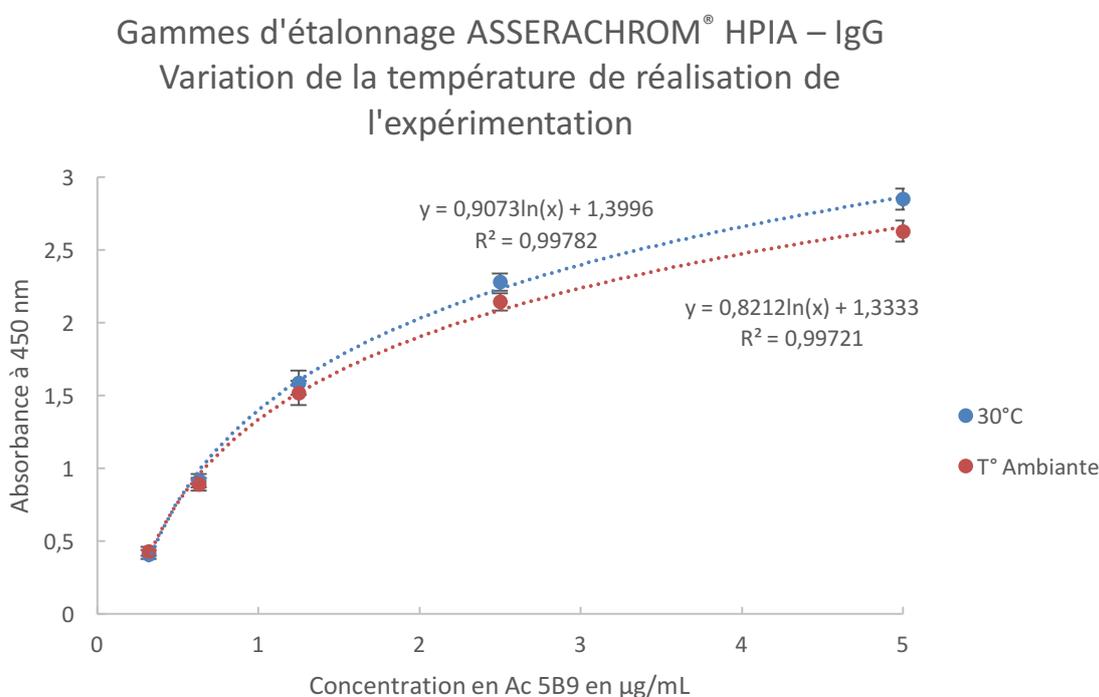


Figure 9 : Gammes d'étalonnage de la trousse ASSERACHROM® HPIA – IgG à température ambiante et à 30°C . Moyenne +/- Ecart type. n = 5 expérimentations.

Nous obtenons des courbes de calibration d'allure hyperbolique avec un coefficient R^2 à 0,99 quelle que soit la température à laquelle ont été effectués les tests.

Une température élevée lors de la réalisation des expérimentations ne modifie pas l'allure de la gamme d'étalonnage ni l'amplitude des absorbances mesurées. Lors de chaque expérimentation, nous avons exprimé les résultats de notre échantillon C1 ainsi que ceux de la référence du kit HPIA en absorbance et en équivalent 5B9 (Tableau VI). Les résultats sont représentés sur la figure 10.

Tableau VI : Valeurs moyennes d'absorbance à 450 nm (Abs 450) et d'équivalent 5B9 de C1 et de la référence HPIA selon la température de réalisation de l'expérimentation.

		C1		Référence HPIA	
		Abs 450	Equivalent 5B9	Abs 450	Equivalent 5B9
30°C	Moyenne	0,92	0,64	1,97	2,23
	Valeurs extrêmes	[0,83-0,98]	[0,53-0,82]	[1,69-2,15]	[1,58-2,83]
Température ambiante	Moyenne	0,93	0,64	1,88	2,1
	Valeurs extrêmes	[0,72-1,11]	[0,44-0,77]	[1,62-2,26]	[1,54-2,85]
	CV global %	12	17	11	23

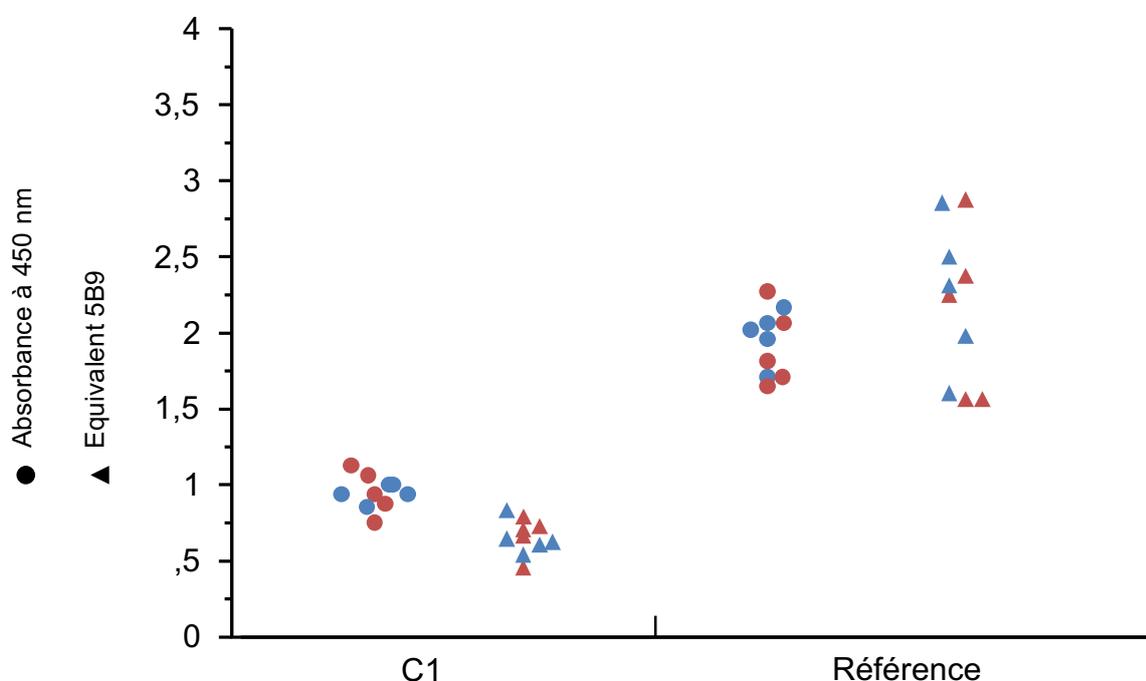


Figure 10 : Echantillon C1 et référence HPIA en absorbance et en équivalent 5B9 selon la température de réalisation de l'expérimentation. n = 5 expérimentations.

Lorsque les résultats sont exprimés en absorbance, les CV de C1 et de la référence HPIA sont très proches, respectivement de 12 et 11%. A l'inverse, si les résultats sont exprimés en équivalent 5B9, le CV augmente respectivement à 17 et 23%.

B. Variation de la durée d'incubation de l'échantillon

Dans un second temps, nous avons fait varier la durée d'incubation des échantillons C1, Pool 1/5^{ème}, référence HPIA et des points de gamme d'étalonnage par rapport aux conditions préconisées par le fabricant. Nous avons ainsi testé des temps d'incubation de 30 minutes, 1 heure et 1 heure 30 minutes.

Les gammes d'étalonnage pour ces trois temps d'incubation sont représentées sur la figure 11.

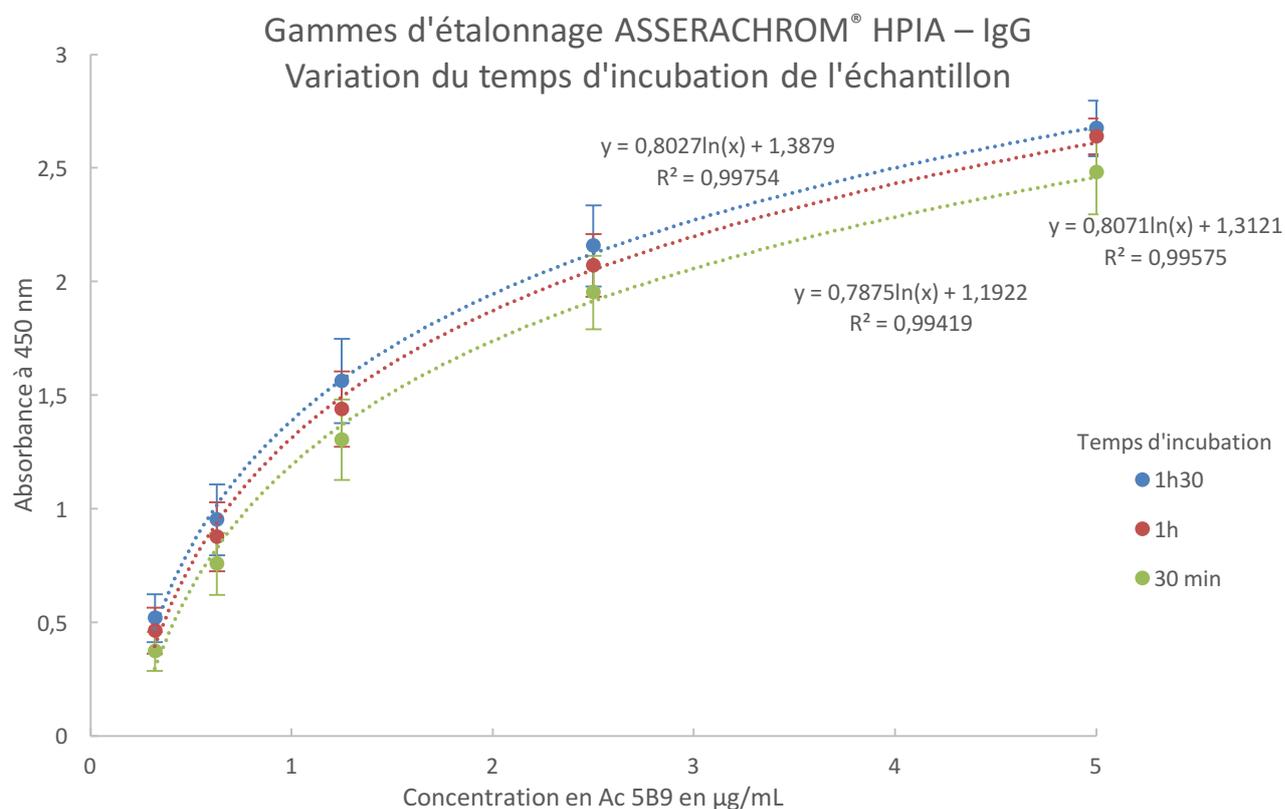


Figure 11 : Gammes d'étalonnage de la trousse ASSERACHROM® HPIA – IgG avec incubation des points de gammes de 30 minutes, 1heure et 1h30 minutes. Moyenne +/- Ecart type. n = 5 expérimentations.

Les résultats des échantillons C1, Pool 1/5^{ème} ainsi que ceux de la référence HPIA sont exprimés à la fois en absorbance et en équivalent 5B9 et présentés dans le tableau VII et sur la figure 12.

Tableau VII : Valeurs moyennes d'absorbance à 450 nm et d'équivalent 5B9 de C1, du Pool 1/5^{ème} et de la référence HPIA selon le temps d'incubation de l'échantillon.

		C1 (n=5)		Pool 1/5 ^{ème} (n=1)		Référence HPIA (n=5)	
		Abs 450	Equivalent 5B9	Abs 450	Equivalent 5B9	Abs 450	Equivalent 5B9
1h30	Moyenne	1	0,62	1,3	0,81	2,06	2,4
	Valeurs extrêmes	[0,77-1,18]	[0,54-0,71]			[1,73-2,21]	[1,61-3,54]
1h	Moyenne	0,94	0,63	1,18	0,77	1,89	2,09
	Valeurs extrêmes	[0,77-1,11]	[0,52-0,75]			[1,65-2,04]	[1,57-2,97]
30 minutes	Moyenne	0,81	0,63	0,96	0,64	1,61	1,75
	Valeurs extrêmes	[0,73-0,91]	[0,55-0,71]			[1,58-1,63]	[1,34-2,11]
CV global %		16	12	15	12	12	30

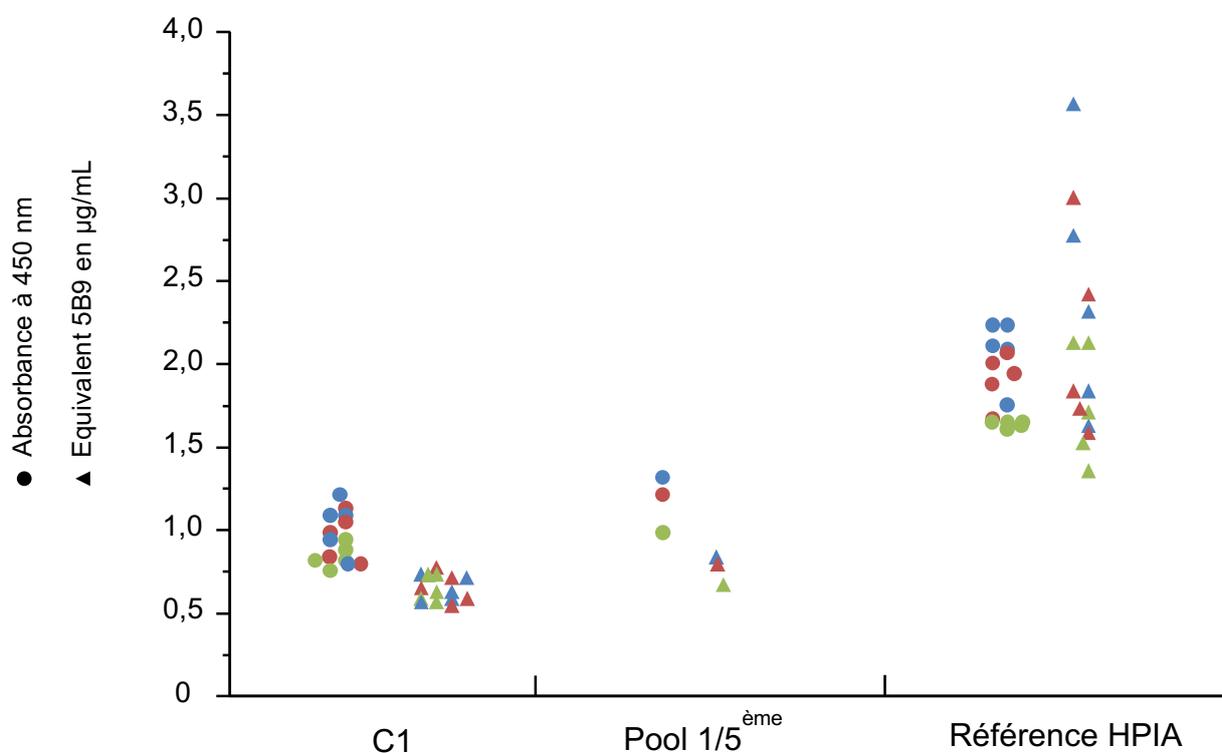


Figure 12 : Echantillons C1, Pool 1/5^{ème} et référence HPIA. Résultats indiqués en absorbance et en équivalent 5B9 selon le temps d'incubation de l'échantillon.

Lorsque les résultats de l'échantillon C1 sont exprimés en absorbances, les valeurs varient entre 0,73 et 1,18 avec un CV global de 16%. Lorsque les résultats sont exprimés en équivalent 5B9, le CV des résultats diminue à 12% ce qui diminue de façon importante l'impact de la durée d'incubation de l'échantillon sur le résultat final.

On observe le même phénomène avec le Pool 1/5^{ème} puisque le CV global passe de 15% lorsque les résultats sont exprimés en absorbance, à 12% si les résultats sont exprimés en équivalent 5B9.

Des résultats différents sont obtenus avec la référence HPIA. En effet, les résultats obtenus en absorbance varient entre 1,58 et 2,21 avec un CV de 12%, et ce dernier augmente à 30% si les résultats sont exprimés en équivalent 5B9.

C. Variation du temps d'incubation de l'immunoconjugué

Nous avons également fait varier la durée d'incubation de l'immunoconjugué par rapport aux conditions préconisées par le fabricant. Nous avons ainsi testé une incubation de 30 minutes, 1 heure et 1 heure 30 minutes de l'immunoconjugué.

Les gammes d'étalonnage obtenues dans ces trois conditions sont représentées sur la figure 13.

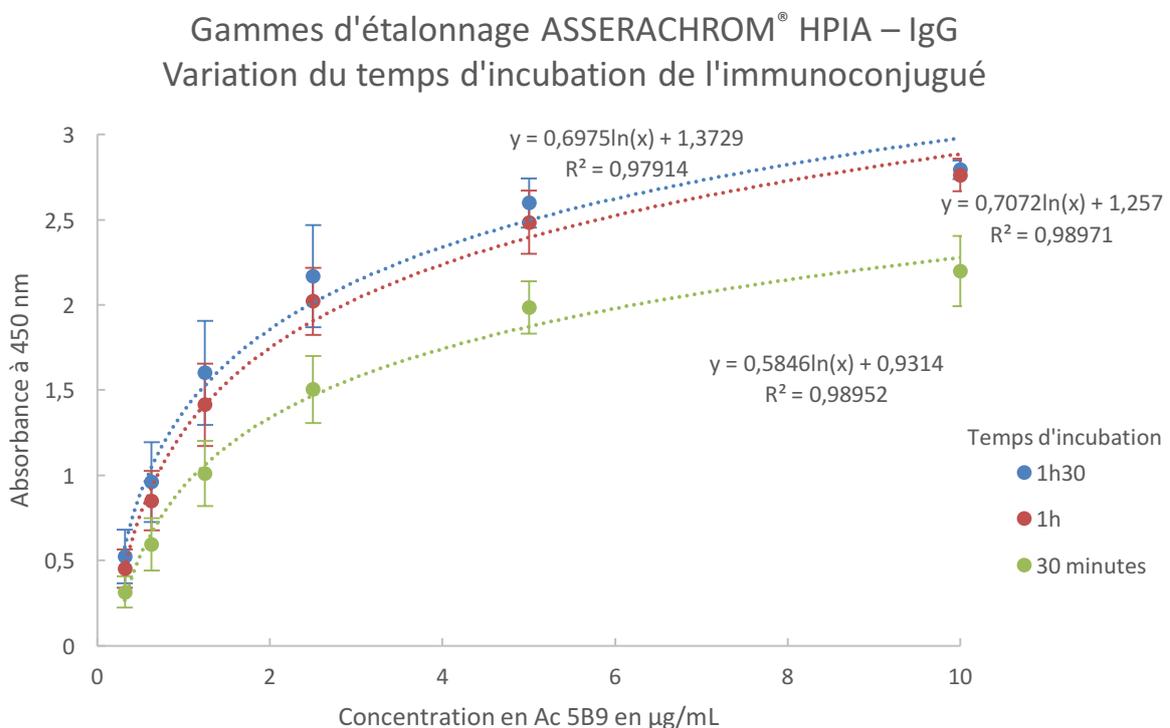


Figure 13 : Gammes d'étalonnage de la trousse ASSERACHROM® HPIA – IgG avec incubation de l'immunoconjugué de 30 minutes, 1 heure et 1h30 minutes. Moyenne +/- Ecart type. n = 4 expérimentations.

Les échantillons C1, Pool 1/5^{ème} et la référence HPIA ont été testés dans ces trois conditions et les résultats sont représentés sur la figure 14 et dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Valeurs moyennes d'absorbance à 450 nm et d'équivalent 5B9 de C1, du Pool 1/5^{ème} et de la référence HPIA selon le temps d'incubation de l'immunoconjugué.

		C1 (n=4)		Pool 1/5 ^{ème} (n=4)		Référence HPIA (n=4)	
		Abs 450	Equivalent 5B9	Abs 450	Equivalent 5B9	Abs 450	Equivalent 5B9
1h30	Moyenne	1,13	0,65	1,06	0,59	1,9	1,68
	Valeurs extrêmes	[0,90-1,41]	[0,54-0,80]	[0,69-1,47]	[0,34-0,72]	[1,41-2,38]	[1,02-2,31]
1h	Moyenne	0,96	0,61	0,93	0,6	1,61	1,47
	Valeurs extrêmes	[0,71-1,24]	[0,51-0,70]	[0,57-1,22]	[0,35-0,72]	[1,26-2,04]	[0,97-1,87]
30 minutes	Moyenne	0,7	0,62	0,66	0,58	1,14	1,28
	Valeurs extrêmes	[0,52-0,94]	[0,54-0,70]	[0,44-0,92]	[0,40-0,69]	[0,89-1,49]	[0,89-1,68]
CV global %		29	14	34	24	29	31

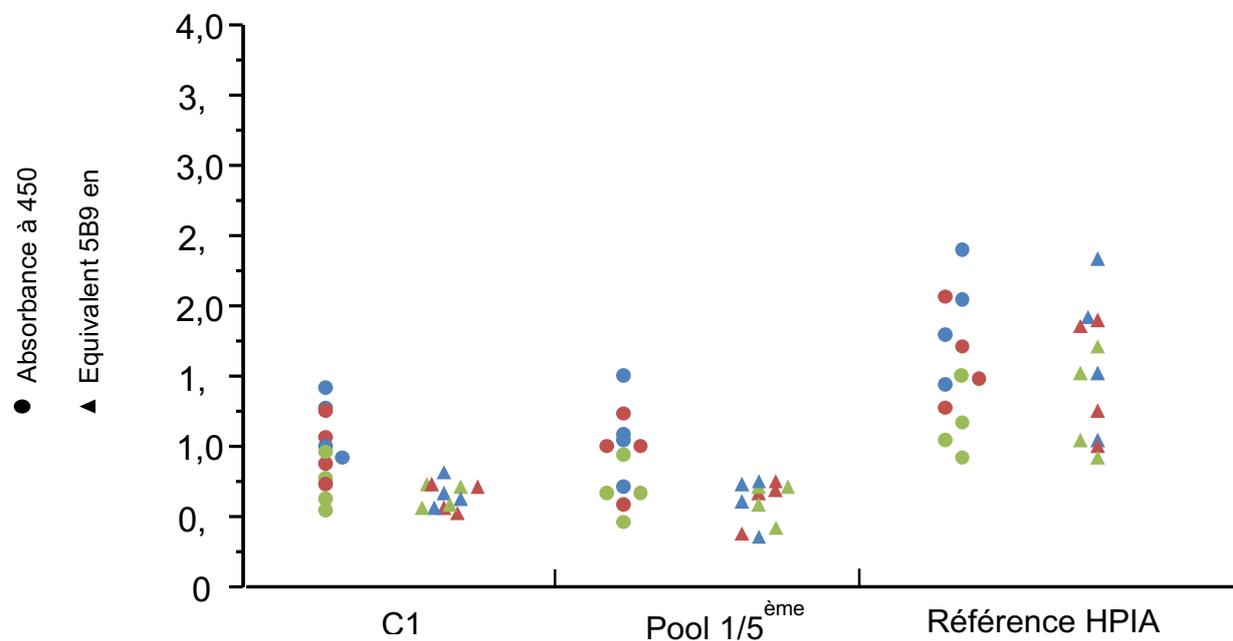


Figure 14 : Echantillons C1, Pool 1/5^{ème} et la référence HPIA en absorbance et en équivalent 5B9 selon le temps d'incubation de l'immunoconjugué. n = 4 expérimentations.

Les valeurs des absorbances mesurées avec l'échantillon C1 varient de 0,52 à 1,41 avec un CV global égal à 29%. Lorsque les résultats sont exprimés en équivalent 5B9, le CV diminue à 14%. On observe le même phénomène avec le Pool 1/5^{ème} dont les absorbances varient de 0,44 à 1,47 avec un CV en absorbance est de 34% et qui diminue à 24% si les résultats sont exprimés en équivalent 5B9.

Avec la référence HPIA, les valeurs en absorbance varient entre 0,89 et 2,38 avec un CV de 29% et l'expression des résultats en équivalent 5B9 ne permet pas de diminuer le CV des résultats puisqu'il augmente légèrement à 31%.

D. Variation du temps d'incubation du substrat

Nous avons finalement fait varier la durée d'incubation du substrat par rapport aux conditions préconisées par le fabricant. Nous avons donc testé une incubation du substrat de 3, 5 et 7 minutes.

Les gammes d'étalonnage obtenues dans ces trois conditions sont représentées dans la figure 15.

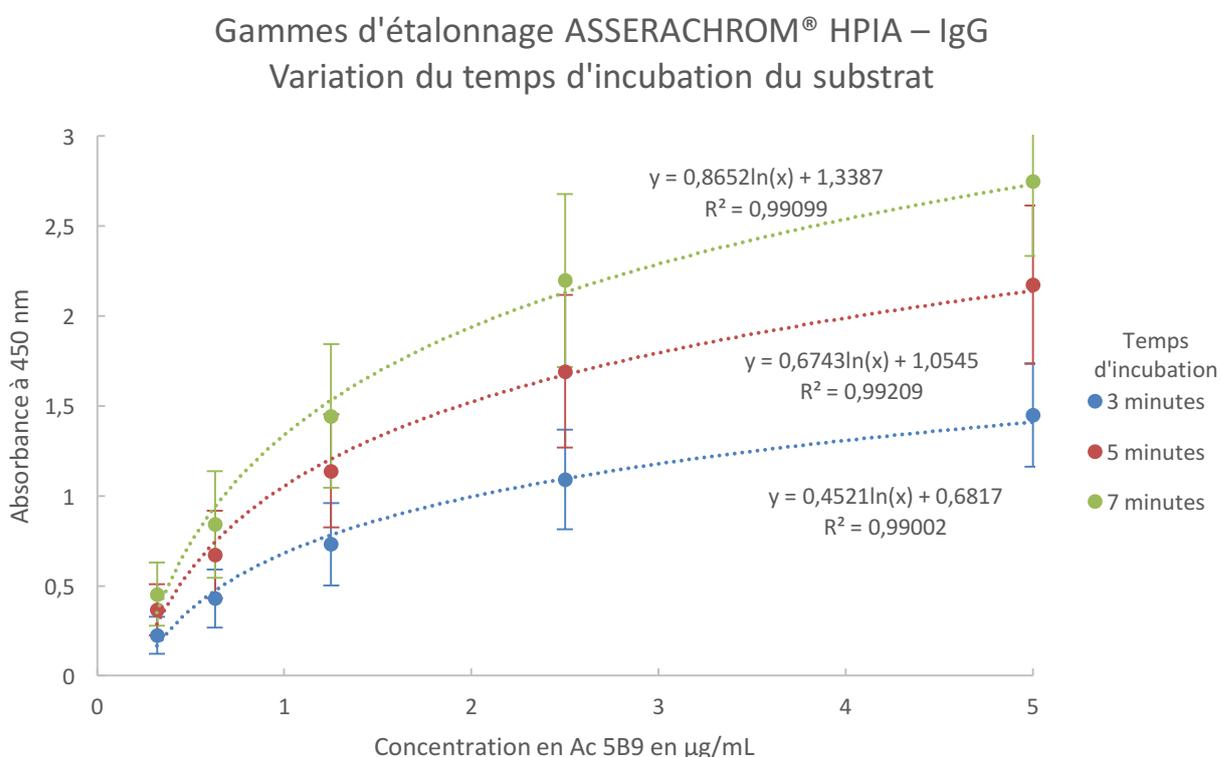


Figure 15 : Gammes d'étalonnage de la trousse ASSERACHROM® HPIA – IgG avec incubation du substrat de 3, 5 et 7 minutes.

Les valeurs en absorbance et en équivalent 5B9 des échantillons C1, Pool 1/5^{ème} et de la référence HPIA sont représentées dans le tableau IX et sur la figure 16.

Tableau IX : Valeurs moyennes d'absorbance à 450 nm et d'équivalent 5B9 de C1, du Pool 1/5^{ème} et de la référence HPIA selon le temps d'incubation du substrat.

		C1 (n=3)		Pool 1/5 ^{ème} (n=3)		Référence HPIA (n=3)	
		Abs 450	Equivalent 5B9	Abs 450	Equivalent 5B9	Abs 450	Equivalent 5B9
3 minutes	Moyenne	0,46	0,61	0,56	0,75	1,06	2,33
	Valeurs extrêmes	[0,30-0,69]	[0,53-0,69]	[0,33-0,79]	[0,65-0,85]	[0,78-1,30]	[2,26-2,41]
5 minutes	Moyenne	0,73	0,62	0,83	0,71	1,59	2,27
	Valeurs extrêmes	[0,51-1,06]	[0,56-0,68]	[0,51-1,13]	[0,61-0,77]	[1,25-1,87]	[2,11-2,45]
7 minutes	Moyenne	0,92	0,62	1,14	0,79	2,11	2,56
	Valeurs extrêmes	[0,66-1,30]	[0,55-0,68]	[0,75-1,49]	[0,72-0,83]	[1,70-2,35]	[2,04-3,01]
CV global %		45	10	44	11	33	12

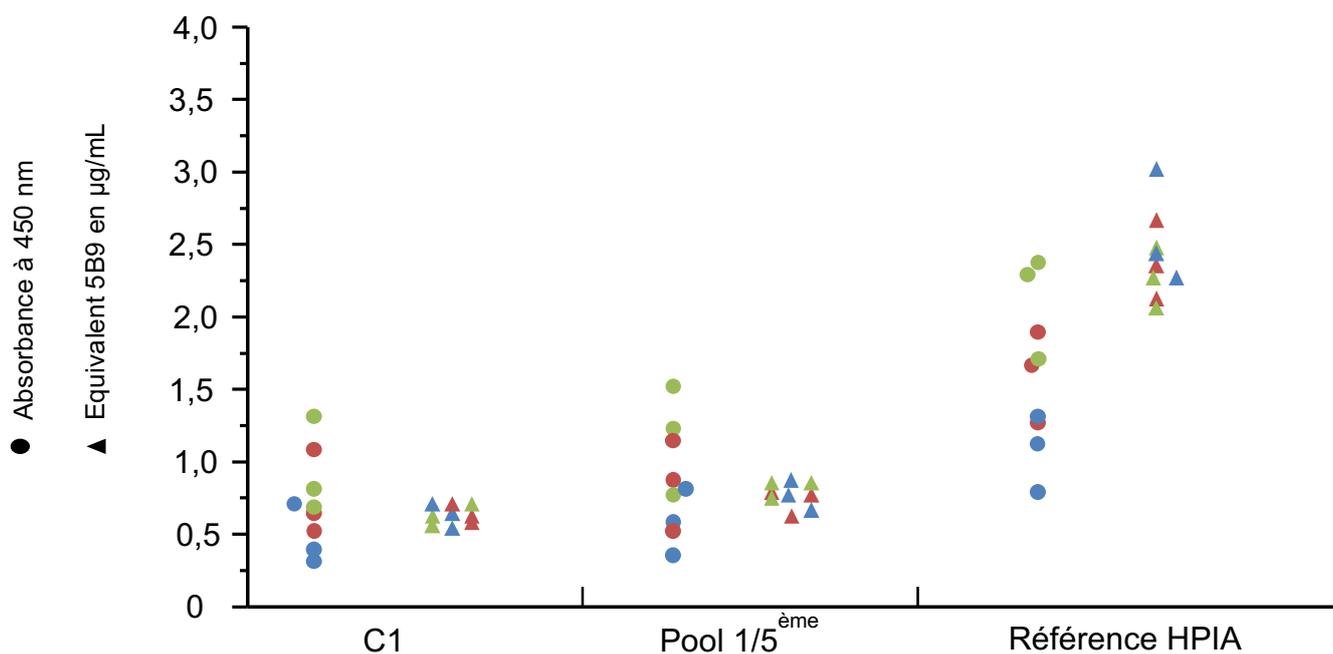


Figure 16 : Echantillons C1 et Pool 1/5^{ème} en absorbance et en équivalent 5B9 selon le temps d'incubation du substrat. n = 3 expérimentations.

Lorsque les résultats de C1 sont exprimés en absorbances, les valeurs varient entre 0,30 et 1,30 avec un CV de 45%. Une fois exprimés en équivalent 5B9, le CV est de 10%. On observe le même phénomène avec le Pool 1/5^{ème} avec un CV qui passe de 44% lorsque les résultats sont exprimés en absorbance, à 11% lorsque les résultats sont exprimés en équivalent 5B9. Des résultats comparables sont observés avec la référence HPIA.

E. Intérêt de la gamme d'étalonnage en Ac 5B9 appliqué à trois échantillons de patients

Afin de confirmer les résultats obtenus avec nos les échantillons C1 et le Pool 1/5^{ème}, nous avons répété nos expérimentations avec 3 échantillons de nouveaux patients nommés P12, P13 et P14 en faisant varier les temps d'incubation de l'échantillon, de l'immunoconjugué et du substrat. Les résultats sont présentés sur la figure 17 et dans le tableau X.

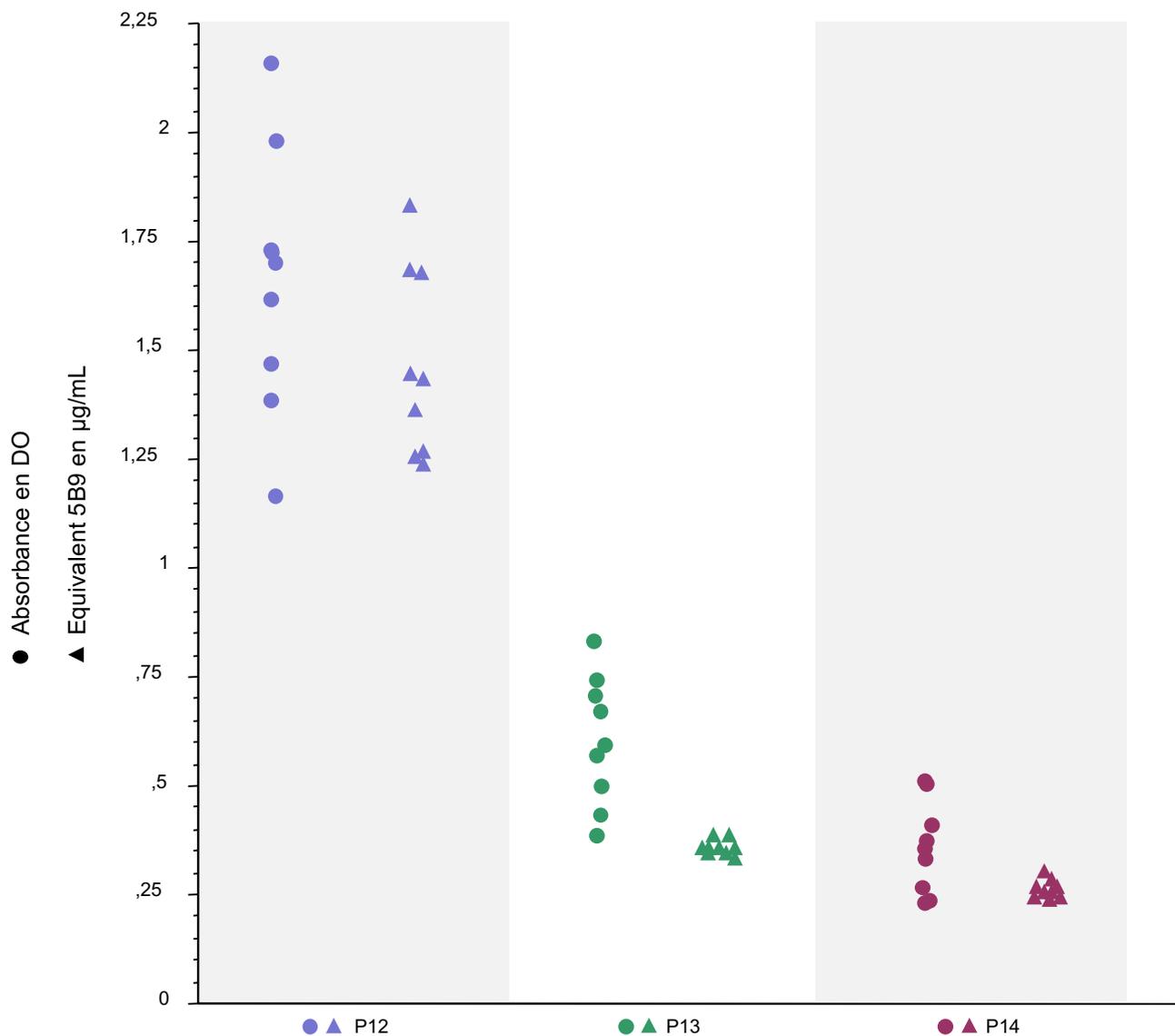


Figure 17 : Valeurs en absorbance et en équivalent 5B9 des échantillons P12, P13 et P14 selon la variation du temps d'incubation de l'échantillon, de l'immunoconjugué et du substrat. n = 1 expérimentation.

Tableau X : Absorbances à 450 nm et équivalent 5B9 des échantillons P12 à P14 selon les différentes variations des temps d'incubation.

	P12		P13		P14	
	Abs 450	Equivalent 5B9	Abs 450	Equivalent 5B9	Abs 450	Equivalent 5B9
Moyenne	1,66	1,46	0,6	0,35	0,36	0,26
Valeurs extrêmes	[1,17-2,16]	[1,23-1,83]	[0,39-0,83]	[0,33-0,38]	[0,24-0,51]	[0,23-0,30]
CV global %	18	15	25	4	29	8

On remarque que pour les trois échantillons étudiés, P13 et P14 ont un comportement identique avec une très nette diminution du CV lorsque les résultats sont exprimés en équivalent 5B9. En effet le CV passe de 25% à 4% avec l'échantillon P13 et de 29 à 8% avec l'échantillon P14 lorsque les résultats sont exprimés respectivement en absorbances et en équivalent 5B9. Ces deux échantillons ont des absorbances inférieures à 1.

Avec l'échantillon P12, les valeurs des absorbances varient entre 1,17 et 2,16 avec un CV des résultats de 18% et l'expression des résultats en équivalent 5B9 ne diminue que légèrement le CV qui passe à 15%.

3. DISCUSSION

La première étape du diagnostic biologique de TIH repose sur la réalisation d'un test immunoenzymatique et les tests ELISA sont les plus couramment utilisés. Ces tests permettent d'informer le clinicien sur l'absence ou la présence d'anticorps anti-FP4/H et le résultat numérique de l'absorbance donne également une indication sur l'importance de la réponse immune. Plusieurs travaux ont montré que la valeur de l'absorbance est corrélée au risque de TIH (29,38) et certains auteurs proposent de conclure à une TIH certaine si l'absorbance est supérieure à 2 sans avoir recours aux tests d'activation plaquettaire (38).

À ce jour, il n'existe aucune standardisation des tests ELISA et la proposition d'Adam Cuker d'évaluer la probabilité de TIH uniquement sur le résultat de l'absorbance est basée sur des travaux réalisés avec la trousse HAT45G® de GTI et n'est peut-être pas applicable aux absorbances mesurées avec les autres trousse commercialisées. De plus, l'édition spéciale de la fondation ECAT publiée en 2014 souligne l'absence de standardisation de ces trousse et montre, en utilisant les résultats des évaluations externes de la qualité, que pour un même échantillon positif avec une absorbance proche de 2, les coefficients de variations sont compris entre 16 et 37% selon les trousse utilisées. Les recommandations de l'ECAT insistent sur l'importance de reporter les absorbances mesurées de manière quantitative sur les compte-rendus des tests ELISA transmis aux cliniciens.

Dans ce contexte, il nous a paru intéressant d'envisager une standardisation des différentes trousse ELISA commercialisées et le développement par l'équipe du Pr. Gruel, d'un anticorps monoclonal de TIH ayant un fragment Fc humain nous a rapidement conduit à envisager ce travail.

Les résultats de la première partie de cette étude font apparaître un comportement très proche de l'Ac 5B9 sur la cible antigénique FP4/H ou FP4/PVS comme en témoignent leurs courbes de calibration d'allure similaires. Le procédé de fixation de l'héparine aux plaques ELISA influence fortement la modification conformationnelle du FP4.

Les travaux de Suh et al (40) ont montré que lorsque l'héparine est plaquée au fond des puits avec une perte de sa flexibilité, le FP4 n'est pas modifié de façon optimale. Ces résultats pourraient expliquer les différences observées entre les trousse qui utilisent des complexes FP4/PVS ou FP4/H et la trousse ZYMUTEST® HIA IgG (HYPHEN) qui utilise de l'héparine fixée par le sulfate de protamine.

Lorsque les échantillons de 7 patients ayant tous développés des anticorps pathogènes (positif en SRA) sont testés avec les trois trousse et les résultats exprimés en absorbance ou en équivalent 5B9, nous observons que l'expression en équivalent 5B9 ne permet pas de diminuer la variabilité des résultats inter kits.

Il est ici important de souligner que la réponse immunitaire développée au cours des TIH est polyclonale et C. Pouplard avait bien montré qu'un certain nombre de patients développaient des anticorps qui reconnaissent de façon identique le FP4 seul ou complexé à l'héparine (41) alors que l'Ac 5B9 ne reconnaît que le FP4 complexé à l'héparine. L'ensemble de ces résultats nous conduisent à renoncer au projet de standardiser ces trois trousse ELISA en utilisant un même anticorps monoclonal.

Dans la deuxième partie de cette étude nous avons continué cette approche de standardisation mais en utilisant une seule trousse.

La trousse ASSERACHROM® HPIA – IgG a été choisie dans la mesure où elle utilisait comme cible antigénique le complexe FP4/H à l'origine de la réponse immune développée au cours de la TIH. De plus l'Ac monoclonal 5B9 a été obtenu après immunisation de souris GammaPrim™ avec ces mêmes complexes.

Lorsque nous utilisons la trousse dans des conditions extrêmes, il est intéressant de noter que le kit n'est pas sensible aux variations de température et qu'une diminution ou une augmentation sensible (\pm 30 minutes) du temps d'incubation de l'échantillon n'impacte que très modérément le résultat, qu'il soit exprimé en absorbance ou en équivalent 5B9.

De plus, une particularité de la trousse ASSERACHROM® HPIA – IgG est la définition du seuil de positivité du test qui varie d'une expérimentation à l'autre puisqu'il est défini par un pourcentage de l'absorbance mesurée avec la référence HPIA fournie dans le kit. Lorsque les résultats de la référence HPIA sont exprimés en absorbance ou en équivalent 5B9, on observe une très forte variabilité du résultat en fonction de la durée d'incubation de l'échantillon. La composition de cette référence n'est pas connue mais il semble que son comportement soit très différent de celui des échantillons plasmatiques.

En effet, lorsque nous avons fait varier la durée d'incubation de l'immunoconjugué ou du substrat, l'expression des résultats en équivalent 5B9 diminue considérablement le CV des échantillons C1 et du Pool au 1/5^{ème} mais pas celui de la référence.

La pertinence d'utiliser la référence HPIA pour définir le seuil de positivité du test devrait donc être étudié.

Actuellement, la rédaction d'un projet multicentrique visant à étudier l'intérêt de l'utilisation du calibrant 5B9 avec la trousse ASSERACHROM® HPIA – IgG est en cours.

Ce projet sera réalisé de façon prospective et inclura toute suspicion de TIH. Le diagnostic biologique de TIH sera confirmé par un test de libération de sérotonine radiomarquée et des renseignements cliniques suffisants devront être colligés de manière à évaluer de façon précise la probabilité clinique de la TIH.

De plus, à l'aide d'une analyse en courbe ROC, le seuil de positivité du test sera redéfini.

L'inclusion d'un nombre minimal de 500 patients sera nécessaire pour ce travail afin d'obtenir environ 50 cas de thrombopénies induites par l'héparine.

IV. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Greinacher A, Alban S, Omer-Adam MA, Weitschies W, Warkentin TE. Heparin-induced thrombocytopenia: A stoichiometry-based model to explain the differing immunogenicities of unfractionated heparin, low-molecular-weight heparin, and fondaparinux in different clinical settings. *Thrombosis Research*. 2008;122(2):211-20.
2. Krauel K, Pötschke C, Weber C, Kessler W, Fürll B, Ittermann T, et al. Platelet factor 4 binds to bacteria, inducing antibodies cross-reacting with the major antigen in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*. 27 janv 2011;117(4):1370-8.
3. Pouplard C, Cornillet-Lefebvre P, Attaoua R, Leroux D, Lecocq-Lafon C, Rollin J, et al. Interleukin-10 promoter microsatellite polymorphisms influence the immune response to heparin and the risk of heparin-induced thrombocytopenia. *Thrombosis Research*. avr 2012;129(4):465-9.
4. Cines DB, Tomaski A, Tannenbaum S. Immune Endothelial-Cell Injury in Heparin-Associated Thrombocytopenia. *New England Journal of Medicine*. 5 mars 1987;316(10):581-9.
5. Pouplard C, Iochmann S, Renard B, Herault O, Colombat P, Amiral J, et al. Induction of monocyte tissue factor expression by antibodies to heparin-platelet factor 4 complexes developed in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*. 15 mai 2001;97(10):3300-2.
6. Greinacher A. Heparin-induced thrombocytopenia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 1 juill 2009;7:9-12.
7. Martel N, Lee J, Wells PS. Risk for heparin-induced thrombocytopenia with unfractionated and low-molecular-weight heparin thromboprophylaxis: a meta-analysis. *Blood*. 15 oct 2005;106(8):2710-5.
8. Warkentin TE, Levine MN, Hirsh J, Horsewood P, Roberts RS, Gent M, et al. Heparin-Induced Thrombocytopenia in Patients Treated with Low-Molecular-Weight Heparin or Unfractionated Heparin. *New England Journal of Medicine*. 18 mai 1995;332(20):1330-6.

9. Warkentin TE. Fondaparinux: does it cause HIT? can it treat HIT? Expert Review of Hematology. 1 oct 2010;3(5):567-81.
10. Warkentin TE, Sheppard J-AI, Sigouin CS, Kohlmann T, Eichler P, Greinacher A. Gender imbalance and risk factor interactions in heparin-induced thrombocytopenia. Blood. 1 nov 2006;108(9):2937-41.
11. Elalamy I. Thrombopénies induites par l'héparine. EMC Hématologie. 2011;1-14.
12. Warkentin TE, Kelton JG. A 14-year study of heparin-induced thrombocytopenia. The American Journal of Medicine. 1 nov 1996;101(5):502-7.
13. Wallis DE, Lewis BE, Walenga JM. Failure of current strategies in the prevention of thrombosis in patients with heparin-induced thrombocytopenia: a clinician's perspective. Semin Thromb Hemost. 1999;25 Suppl 1:3-7.
14. Towne JB, Bernhard VM, Hussey C, Garancis JC. White clot syndrome: Peripheral vascular complications of heparin therapy. Arch Surg. 1 avr 1979;114(4):372-7.
15. Tardy B, Tardy-Poncet B, Fournel P, Venet C, Jospe R, Dacosta A. Lower Limb Veins Should be Systematically Explored in Patients with Isolated Heparin-induced Thrombocytopenia. Thromb Haemost. 1999;82(3):1199-200.
16. De Carolis S, di Pasquo E, Rossi E, Del Sordo G, Buonomo A, Schiavino D, et al. Fondaparinux in pregnancy: Could it be a safe option? A review of the literature. Thrombosis Research. juin 2015;135(6):1049-51.
17. Warkentin TE. Heparin-induced thrombocytopenia: pathogenesis and management. British Journal of Haematology. 1 mai 2003;121(4):535-55.
18. Cuker A, Gimotty PA, Crowther MA, Warkentin TE. Predictive value of the 4Ts scoring system for heparin-induced thrombocytopenia: a systematic review and meta-analysis. Blood. 15 nov 2012;120(20):4160-7.
19. Linkins L-A, Dans AL, Moores LK, Bona R, Davidson BL, Schulman S, et al. Treatment and Prevention of Heparin-Induced Thrombocytopenia. Chest. févr 2012;141(2):e495S - e530S.
20. Gruel Y, Pouplard C. Post-operative platelet count profile: the most reliable tool for identifying patients with true heparin-induced thrombocytopenia after cardiac surgery. Journal of Thrombosis and Haemostasis. 1 janv 2010;8(1):27-9.

21. Cuker A, Arepally G, Crowther MA, Rice L, Datko F, Hook K, et al. The HIT Expert Probability (HEP) Score: a novel pre-test probability model for heparin-induced thrombocytopenia based on broad expert opinion. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 1 déc 2010;8(12):2642-50.
22. Uaprasert N, Chanswangphuwana C, Akkawat B, Rojnuckarin P. Comparison of diagnostic performance of the heparin-induced thrombocytopenia expert probability and the 4Ts score in screening for heparin-induced thrombocytopenia: *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. avr 2013;24(3):261-8.
23. Legnani C, Cini M, Pili C, Boggian O, Frascaro M, Palareti G. Evaluation of a new automated panel of assays for the detection of anti-PF4/heparin antibodies in patients suspected of having heparin-induced thrombocytopenia: *Thrombosis and Haemostasis*. 10 juin 2010;104(2):402-9.
24. Arepally GM, Kamei S, Park KS, Kamei K, Li ZQ, Liu W, et al. Characterization of a murine monoclonal antibody that mimics heparin-induced thrombocytopenia antibodies. *Blood*. 1 mars 2000;95(5):1533-40.
25. Sun L, Gimotty PA, Lakshmanan S, Cuker A. Diagnostic accuracy of rapid immunoassays for heparin-induced thrombocytopenia: A systematic review and meta-analysis. *Thrombosis and Haemostasis*. 14 janv 2016;115(5):1044-55.
26. Althaus K, Hron G, Strobel U, Abbate R, Rogolino A, Davidson S, et al. Evaluation of automated immunoassays in the diagnosis of heparin induced thrombocytopenia. *Thrombosis Research*. mars 2013;131(3):e85-90.
27. Nagler M, Bachmann LM, Cate H ten, Cate-Hoek A ten. Diagnostic value of immunoassays for heparin-induced thrombocytopenia: a systematic review and meta-analysis. *Blood*. 4 févr 2016;127(5):546-57.
28. Bakchoul T, Giptner A, Najaoui A, Bein G, Santoso S, Sachs UJH. Prospective evaluation of PF4/heparin immunoassays for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 1 août 2009;7(8):1260-5.

29. Warkentin TE, Sheppard JI, Moore JC, Sigouin CS, Kelton JG. Quantitative interpretation of optical density measurements using PF4-dependent enzyme-immunoassays. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 1 août 2008;6(8):1304-12.
30. Althaus K, Strobel U, Warkentin TE, Greinacher A. Combined use of the high heparin step and optical density to optimize diagnostic sensitivity and specificity of an anti-PF4/heparin enzyme-immunoassay. *Thrombosis Research*. sept 2011;128(3):256-60.
31. Raschke RA, Curry SC, Warkentin TE, Gerkin RD. Improving Clinical Interpretation of the Anti-Platelet Factor 4/Heparin Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Diagnosis of Heparin-Induced Thrombocytopenia Through the Use of Receiver Operating Characteristic Analysis, Stratum-Specific Likelihood Ratios, and Bayes Theorem. *Chest*. oct 2013;144(4):1269-75.
32. Gruel Y, Rollin J, Leroux D, Pouplard C. Les thrombocytopénies induites par l'héparine : données récentes. *La Revue de Médecine Interne*. mars 2014;35(3):174-82.
33. Greinacher A, Michels I, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C. A rapid and sensitive test for diagnosing heparin-associated thrombocytopenia. *Thromb Haemost*. 2 déc 1991;66(6):734-6.
34. Sheridan D, Carter C, Kelton JG. A diagnostic test for heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*. 1 janv 1986;67(1):27-30.
35. Maličev E, Kozak M, Rožman P. Evaluation of a flow cytometric assay for the confirmation of heparin-induced thrombocytopenia. *Int Jnl Lab Hem*. 1 juin 2016;38(3):240-5.
36. Pouplard C, Amiral J, Borg J-Y, Laporte-Simitsidis S, Delahousse B, Gruel Y. Decision Analysis for Use of Platelet Aggregation Test, Carbon 14-Serotonin Release Assay, and Heparin-Platelet Factor 4 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Heparin-Induced Thrombocytopenia. *American Journal of Clinical Pathology*. 1 mai 1999;111(5):700-6.

37. Chong BH, Burgess J, Ismail F. The clinical usefulness of the platelet aggregation test for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost.* 1 avr 1993;69(4):344-50.
38. Cuker A. Clinical and Laboratory Diagnosis of Heparin-Induced Thrombocytopenia: An Integrated Approach. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis.* 21 déc 2013;40(01):106-14.
39. Heparin-Induced – Thrombocytopenia : Clinical and Laboratory Aspects. ECAT Foundation Special issue 4 2014.
40. Suh J-S, Aster RH, Visentin GP. Antibodies From Patients With Heparin-Induced Thrombocytopenia/Thrombosis Recognize Different Epitopes on Heparin: Platelet Factor 4. *Blood.* 1 févr 1998;91(3):916-22.
41. Pouplard C, Amiral J, Borg JY, Vissac AM, Delahousse B, Gruel Y. Differences in specificity of heparin-dependent antibodies developed in heparin-induced thrombocytopenia and consequences on cross-reactivity with danaparoid sodium. *Br J Haematol.* nov 1997;99(2):273-80.
42. Rollin J, Pouplard C, Sung HC, Leroux D, Saada A, Gouilleux-Gruart V, et al. Increased risk of thrombosis in FcγRIIA 131RR patients with HIT due to defective control of platelet activation by plasma IgG2. *Blood.* 9 avr 2015;125(15):2397-404.
43. Rollin J, Pouplard C, Gratacap M-P, Leroux D, May M-A, Aupart M, et al. Polymorphisms of protein tyrosine phosphatase CD148 influence FcγRIIA-dependent platelet activation and the risk of heparin-induced thrombocytopenia. *Blood.* 9 août 2012;120(6):1309-16.

Vu, le Directeur de Thèse

**Vu, le Doyen
de la Faculté de Médecine de TOURS**

TARLÉ Nicolas

77 pages – 10 tableaux – 17 figures – 2 annexes.

Résumé :

Le diagnostic biologique des thrombopénies induites par l'héparine (TIH) repose sur la détection d'anticorps (Ac) dirigés contre le FP4 modifié par l'héparine. Les tests ELISA sont couramment utilisés dans nos laboratoires et leur compte rendu doit mentionner le seuil de positivité du test ainsi que l'absorbance mesurée, une valeur supérieure à 1 étant associée à une plus forte probabilité de TIH. Cependant, l'ECAT rapporte des coefficients de variations inter-essais compris entre 16 et 37% selon les trousse.

Nous avons récemment développé un Ac monoclonal d'isotype IgG (5B9), possédant un fragment Fc humain et qui reconnaît spécifiquement le FP4 modifié par l'héparine. L'objectif de ce travail a été d'évaluer l'intérêt d'utiliser cet Ac 5B9 comme calibrant des différentes trousse commercialisées : ASSERACHROM® HPIA – IgG (Stago), HAT45G® (GTI) et ZYMUTEST® HIA IgG (HYPHEN).

Lors de chaque expérimentation, une gamme d'étalonnage a été réalisée avec des concentrations croissantes d'Ac 5B9 (0 à 10 µg/mL) et les absorbances mesurées avec les plasmas de 7 patients positifs ont été systématiquement converties en 'équivalent 5B9'. L'expression des résultats de ces 7 patients en équivalent 5B9 n'a pas permis de diminuer la variabilité inter kits.

Dans un second temps, nous avons évalué l'intérêt de l'Ac 5B9 pour standardiser les résultats au sein d'une seule trousse, la trousse Asserachrom HPIA IgG (Stago). Dans ce but, nous avons réalisé les tests dans les conditions extrêmes en faisant varier la température de la pièce ainsi que les temps d'incubation de l'échantillon, de l'immunoconjugué et du substrat. Quelques soient les conditions expérimentales testées, la courbe de calibration est d'allure hyperbolique avec un coefficient de corrélation égal à 0.99. L'expression des résultats en équivalent 5B9 diminue considérablement le CV de deux échantillons, C1 et un Pool au 1/5^{ème}, mais pas celui de la référence HPIA permettant de définir le seuil de positivité du test.

Un projet multicentrique prospectif en collaboration avec la société Stago et visant à étudier l'intérêt de l'utilisation du calibrant 5B9 avec la trousse ASSERACHROM® HPIA – IgG est en cours de rédaction. Une analyse en courbe ROC permettra de redéfinir le seuil de positivité du test.

Mots clés : Thrombopénie induite par l'héparine, ELISA, FP4, Anticorps, standardisation

Jury :

Président du Jury : Professeur Yves Gruel, Hématologie, transfusion, PU-PH, Faculté de Médecine -Tours

Membres du Jury :

Professeur Claire Pouplard, Hématologie, Faculté de Pharmacie - Tours

Professeur Hervé Watier, Immunologie, PU-PH, Faculté de Médecine - Tours

Professeur Gilles Paintaud, Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique, PU-PH, Faculté de Médecine – Tours