UNIVERSITÉ TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTÉ DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNÉE: **2020** **2020/TOU3/2036**

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Obtenu après soutenance du
MÉMOIRE POUR LE DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE MÉDICALE

Présentée et soutenue publiquement
par
PERRIN CÉLINE,
Née le 11 avril 1992 à Clichy (92)

VALIDATION DE MÉTHODE DU TEST PHOTOMÉTRIQUE D'AGRÉGATION PLAQUETTAIRE DANS LE DIAGNOSTIC DES ANOMALIES FONCTIONNELLES PLAQUETTAIRES

Vendredi 18 septembre 2020

Directeur de thèse : Docteur Agnès Ribes

JURY

Président : Docteur Sophie VOISIN,
1er assesseur : Professeur Bernard PAYRASTRE,
2 -ème assesseur : Docteur Mimoza MANIKA,
3 -ème assesseur : Professeur Véronique DEMAS,

version du 02/03/2020

PERSONNEL ENSEIGNANT
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier
au 2 mars 2020

Professeurs Emérites

M.	BENOIST H.	Immunologie
M.	BERNADOU J	Chimie Thérapeutique
M.	CAMPISTRON G.	Physiologie
M.	CHAVANT L.	Mycologie
M.	GAIRIN J.E.	Pharmacologie
Mme	NEPVEU F.	Chimie analytique
M.	ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M.	SALLES B.	Toxicologie
M.	SIE P.	Hématologie

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires

Mme	AYYOUB M.	Immunologie
M.	CHATELUT E.	Pharmacologie
Mme	DE MAS MANSAT V.	Hématologie
M.	FAVRE G.	Biochimie
Mme	GANDIA P.	Pharmacologie
M.	PARINI A.	Physiologie
M.	PASQUIER C. (Doyen)	Bactériologie - Virologie
Mme	ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
Mme	ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme	SALLERIN B.	Pharmacie Clinique
M.	VALENTIN A.	Parasitologie

Universitaires

Mme	BARRE A.	Biologie
Mme	BERNARDES-GÉNISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme	BOUTET E.	Toxicologie - Sémiologie
Mme	COUDERC B.	Biochimie
M.	CUSSAC D. (Vice-Doyen)	Physiologie
M.	FABRE N.	Pharmacognosie
Mme	GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
M.	GUIARD B.	Pharmacologie
Mme	MULLER-STAUMONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme	REYBIER-VUATTOUX K.	Chimie analytique
M.	SEGUI B.	Biologie Cellulaire
Mme	SIXOU S.	Biochimie
M.	SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme	TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
M.	VERHAEGHE P.	Chimie Thérapeutique

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires

M. CESTAC P. (*)	Pharmacie Clinique
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique
Mme ROUZAUD-LABORDE C.	Pharmacie Clinique
Mme SERONIE-VIVIEN S (*)	Biochimie
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie

Universitaires

Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme AUTHIER H.	Parasitologie
M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme BON C.	Biophysique
M. BOUAJILA J. (*)	Chimie analytique
M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
Mme CABOU C.	Physiologie
Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
Mme CHAPUY-REGAUD S.	Bactériologie - Virologie
Mme COLACIOS C.	Immunologie
Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
M. DELCOURT N.	Biochimie
Mme DERAEVE C.	Chimie Thérapeutique
Mme ECHINARD-DOUIN V.	Physiologie
Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
Mme FALLONE F.	Toxicologie
Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
Mme LEFEVRE L.	Physiologie
Mme LE LAMER A-C.	Pharmacognosie
M. LEMARIE A.	Biochimie
M. MARTI G.	Pharmacognosie
Mme MONFERRAN S.	Biochimie
M. OLICHON A.	Biochimie
M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
M. STIGLIANI J-L.	Chimie Pharmaceutique
M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
Mme TOURRETTE-DIALLO A. (*)	Pharmacie Galénique
Mme VANSTEELANDT M.	Pharmacognosie
Mme WHITE-KONING M. (*)	Mathématiques

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires

Mme LARGEAUD L.	Immunologie
M. LE LOUEDEC F.	Pharmacologie
M. MOUMENI A.	Biochimie
M. PAGES A.	Pharmacie Clinique
Mme SALABERT A.S	Biophysique

Assistants Hospitalo-Universitaires

Mme ROUCH L.	Pharmacie Clinique

Remerciements

À Madame la Présidente du Jury,

Le Docteur Sophie VOISIN,

Médecin Biologiste Médical,
Praticien Hospitalier au Laboratoire d'Hématologie, à l'Hôpital de Toulouse,
Coordinatrice du Site Constitutif du Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires Constitutionnelles.

Merci de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse aujourd'hui.

Je suis très honorée d'avoir pu travailler à vos côtés et vous remercie de m'avoir accordée votre confiance pour ce projet « qualité ».

Je vous suis très reconnaissante de m'avoir poussée à en faire un projet de thèse.

Merci de l'intérêt porté à la finalisation de mon internat et du souci que vous avez eu de m'adresser vers les personnes compétentes, pour me permettre d'avancer.

Enfin, merci pour votre dynamisme positif et votre professionnalisme au sein du laboratoire qui fait du stage d'hématologie un des stages les plus convoité de l'inter-région.

Soyez assurée de ma profonde considération.

À ma Directrice de Thèse,

Le Docteur Agnès RIBES,

Médecin Biologiste Médical,
Assistant Hospitalier Universitaire au Laboratoire d'Hématologie à l'Hôpital de Toulouse à Rangueil.

Je te remercie d'avoir accepté de diriger cette thèse, malgré tout le travail que tu as par ailleurs.

Merci d'être aussi accessible et de l'exemple de détermination que tu représentes pour nous, petits internes.

À mes Juges,

Je vous remercie d'avoir accepté d'être membres de ce jury et de vous être rendu disponibles pour y participer.

Monsieur le Professeur Bernard PAYRASTRE,

Professeur des Universités,
Praticien Hospitalier,
Directeur de l'équipe 11 « production et fonctions plaquettaires : signalisation et phosphoinositides » de l'unité INSERM 1048 – Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC),
Responsable du secteur d'Hémostase spécialisée d'exploration des fonctions plaquettaires à l'Hôpital de Rangueil,
Membre du comité scientifique de la filière MHEMO.

Je vous remercie pour l'intérêt porté à la réalisation de cette thèse.

Un merci tout particulier à vos réponses toujours rapides, aux bibliographies transmises et écrites sur ce sujet passionnant.

Ce fut un honneur pour moi d'échanger avec vous et d'avoir pu assister à vos cours.

Soyez assuré de mon plus grand respect.

Madame le Professeur Véronique DEMAS,

Pharmacien Biologiste Médical,

Professeur des Universités,

Praticien Hospitalier au Laboratoire d'Hématologie à l'Hôpital de Toulouse.

Je tiens à vous remercier, l'équipe de l'IUCT et vous, pour cette formation de qualité en hématologie-cytologie.

Ce fut une chance pour moi d'avoir pu être formé au sein de votre service.

Merci pour la confiance et la disponibilité accordées pendant le stage qui nous responsabilise et nous sécurise.

Soyez assurée de ma sincère gratitude.

Madame Le Docteur Mimoza MANIKA,

Pharmacien Biologiste Médical,

Responsable Qualité et Praticien Hospitalier à l'Hôpital de Toulouse

Merci pour tous vos conseils sur le versant « qualité » qui nous ont permis de mener à bien ce projet.

Je vous remercie aussi pour vos cours et documents qui m'ont permis de mieux appréhender les exigences normatives au sein des laboratoires.

Je tiens à vous remercier particulièrement pour votre disponibilité durant l'avancement de cette thèse.

Soyez assurée de ma considération.

Aux Personnes qui m'ont aidée à l'aboutissement de ce projet,

Le **Docteur Vincent MEMIER,** *merci d'avoir participé activement à cette validation de méthode et de s'être rendu disponible pour répondre à mes questions la concernant*.

Les membres de l'HCV, **Cédric, Pierre, Jennifer**, **Patricia,** vous vous êtes montrés *toujours disponibles et professionnels. Une belle équipe passionnée, à la pointe de l'hémostase spécialisée sans laquelle ce travail n'aurait pas pu être possible.*

Sarah FRITTATION, *pour les conseils que tu m'as apportés sur la partie qualité.*

À tous les Chefs et Professeurs, *d'ici et d'ailleurs, qui se sont investis pour notre formation dans un souci de transmission.*

À Mes Parents, *pour les lectures et relectures attentives de cet écrit.*

À Ma Maminette d'Amour, *je te dédicace ma thèse...tu as été très émue de savoir que je la passais.. Et oui Maminette je deviens une grande fille.*

Je n'oublierai jamais ces grandes tablées avec Coco qui chante, toute la famille réunie, tonton, les cousins, tous ces étés, dimanches, jours fériés et anniversaires ... Aux « fêtes du cochon », aux grandes festivités qui suivaient, à ces colonies de chats que « j'éduquais ».. À toutes les douches que je n'ai pas prises, aux chocolats que Coco me donnait en cachette quand tu montais te coucher… au « sac de blat » que tu me chantais en me portant sur ton dos ! Quelle chance nous avons tous de t'avoir !

Je pense aussi à **Coco** *qui m'a tant gâtée et qui j'espère serait fier de moi.*

Pensée aussi pour La famille COQUELIN et nos moultes péripéties...

Je t'aime de tout mon cœur ma Maminette chérie.

À *Ausson et à mon enfance rêvée dont j'ai profitée, enivrée par la liberté de la campagne.*

À Mes Chers Parents, *après cette thèse vous serez enfin soulagés de savoir que vos deux enfants sont diplômés !!! Merci de nous avoir donné les moyens de faire de longues études enrichissantes. Je mesure ma chance ☺*

Je vous aime.

À Ma Sista *d'Amour* *que j'aime, à qui tout réussit et qui m'a poussée consciemment (ou pas) dans la voie de ces longues études médicales!!! A* **Vinz** *mon bof, continues de rendre ma sœur heureuse et de lui faire vivre une vie de rêve!*

Je vous remercie du soutien que vous m'avez apportée dans les moments difficiles.

Merci aussi et surtout pour tous ces moments familiaux chaleureux que vous nous faites vivre.

À Juliette *Ma Filleule d'Amour et* **Valentine** *ma nièce chérie, en toute objectivité vous êtes des petites perles d'enfants et je vous aime d'un amour inconditionnel.*

À Nanie *qui est si gentille, avec qui je partage la passion de ces petites perles d'enfants. Une pensée pour Claude qui nous a tant gâtés avec ses petits plats, ses barbecues et ses poissons pêchés à Saint-Girons !!*

À Claudine Ma Grande Tante, *un très grand Merci, pour tout.*

Une Super Tante sans aucun doute.

À Mon Tonton Chéri *(presque Parrain),* ***Ma Marraine Mimi, Mes Cousins, Leurs Femmes chéries, et Leur Grande Famille.*** *Pourvu que nos réunions familiales ne s'arrêtent jamais, merci pour votre soutien et ce cocon familial.*

Mon Couz, Nikow *qui me fait le plaisir d'être là aujourd'hui malgré la distance et les histoires de grands.*

Malika *ou plutôt Ma Pico d'amour, de loin la meilleure des co-internes et la meilleure des amies. Un petit ange tombé du ciel toujours dans la bienveillance. Ton intelligence me fascinera toujours. Je me souviens de ces corrections de chimie pour l'internat que toi seule réussissais à résoudre juste par la force de ta curiosité intellectuelle et surtout ce calme et cette patience inégalable. En tant que co-interne, je garde les images de toi pleurant de rire derrière le microscope de l'IUCT mais aussi cette efficacité et l'intérêt porté pour notre travail. Je te souhaite tout le bonheur que tu mérites.*

À Roro*, avec qui j'ai préparé ma deuxième P1 et parcouru ces longues années dans l'amour, la joie et le travail. On a passé sept ans de complicité folle qui a fait notre force. C'est aussi en partie grâce à toi que j'en suis là aujourd'hui. En espérant que tu feras bonne route dans ta vie professionnelle d'orthodontiste (la classe grave!) et personnelle. Je te souhaite tout le bonheur que tu mérites!*

Ma Floflow, Ma Pico, Ma Clacla *mes Copines du banc de la fac Pharma puis de l'internat.*

A nos longs mois de dur labeur où nous avons planché de 9h à 22h tous les jours côte à côte, sans broncher dans la canicule et le grand froid. A ces soirs de « nocturne » où on bossait encore plus. Ce rythme fou nous a animé pendant un temps. Des rires, des larmes, et beaucoup d'entraide, nous avons été fortes et je suis très fière de nous ☺ !

Jamais je ne pensai réussir Bio pourtant aujourd'hui nous sommes bien là et c'est en grande partie grâce à cette solidarité et notre solide amitié ! Un grand Merci, sincère.

S'en suivirent 3 mois d'externat au Vietnam, une expérience complètement folle qui restera dans nos souvenirs.

Lenou & Melou Cœur, *mes Copines de Pharma non internautes mais Pharma quand même.*

Lenou *tu as le don d'être immensément drôle et je te remercie pour ça. Tu es capable de transformer une banale routine en quelque chose de génial. C'est fort.*

Melou *bientôt maman, il me tarde de voir le royal baby! Merci d'être toujours une Amie et d'avoir le téléphone facile malgré la distance et quel que soit le moment.*

Thuthur et Loulou *mes deux Acolytes citadins. À tous nos « rêves » et à nos projets officinaux nouvelle génération « hitech » et connectés !*

À Tous Les Autres de Pharma, *Zamou, Coco, Val, les pharmaB,…*

À Mes Co-internes d'Ici et d'Ailleurs

- À Limoges : **Paolita, Chacha**, **Popo, Guillaume, Olivier**
- À Bordeaux : **Chloé et Florian**
- À Toulouse : **Gaspard, Orancie, Marine, Got Got** *(le meilleur des nouveaux internes il n'y a pas de doute),* **Maximus Dolbus, Aude, Emeline, Imane, Do, Alban, Julia, Nico**, **Cécile, Théo et Sebou**

Ma Laulau *un petit cœur. Je suis ravie de t'avoir rencontrée, pour ton dynamisme (notamment politique : VP bio svp), ta fantaisie, ton ouverture d'esprit, ton intérêt pour d'autres choses que la médecine et ta bienveillance. Je te souhaite plein de bonheur dans ta vie future.*

- Aux Albigeois,

Quel plaisir de finir l'internat dans ce petit « périph » si fort sympathique et en bonne compagnie ! Soirées barbec' avec vue sur la cathédrale Sainte Cécile, Piscine et Vignals !! Je suis gâtée.
Spécial dédicace à ***Jules*** *(avec le signe des mains), mon* ***Paulo, Tim*** *qui ne veut pas être mon médecin traitant mais qui me fait toutes les ordos de la terre, à* ***Poussin*** *(un peu bordelais),* ***Minou*** *(ou Mr Picard), à* ***Célia*** *la peumo qui rêve de savoir fumer l'e-cigarette et qui s'entraîne en vain.. à* ***Mathilde*** *et* ***Juliette*** *pour votre dynamisme sportif me poussant à pratiquer le CAF, CROSSFIT et autres bodymachins. A* ***Jaja*** *qui déteste ce surnom, à* ***Audrey*** *ma voisine de chambre,* ***à Vic*** *le chir ortho fou qui crée des passerelles à chats de balcons en balcons, à* ***Manon*** *la bretonne, à* ***Chloé*** *qui m'a aidée pour trouver le lieu du pot de thèse, à* ***Julien*** *le bordelais même pas snob (oui ça existe),* ***à Pauline*** *pour ses séances d'apprentissage à la belote, à* ***Hugo*** *pour le soutien scolaire, culinaire, et personnel à* ***Léa, Denis, Segolène, Florine,*** *les FFI,.. A Martine et Alexi de l'Aveyron, et surtout à nos barquettes qui vont nous permettent d'avoir un « body summer » de rêve tellement elles sont goûteuses.*

À Mes Amis d'Enfance Carcassonnais, **Nanoust, Dav, Cricri, Titou d'Amour, Loulou, Thomy, Nono, Maxime,** *parce que pendant toutes ces années vous avez toujours su rester présents!*

Cricri *que nos vacances durent encore et toujours. On a attendu désespérément le vent à Fuerte, l'ouverture des boîtes à Ibiza, en vain.. mais la fin de notre internat… elle est bel et bien là !!!!!*
Mon Cricri ne change pas t'es un vrai cœur j'ai de la chance de t'avoir !
Merci ***à toi*** *et* ***Dav*** *d'être venu de si loin, ça me fait très plaisir. Du cours de math avec Mr Gastou en 5A à aujourd'hui c'est beau. Je suis sure qu'il serait très fier de nous ☺ et lâcherai avec son chapeau et son sourire en coin « encore ensemble ces trois-là ».*

Debo, Clara, Charlotte*, mes copines de la danse. Á toutes ces longues heures où on se retrouve dans notre sous-sol des Carmes. A cette première heure nécessaire pour « enlever les nœuds » de notre vie quotidienne beaucoup trop intense. Á ces critiques vidéos et à notre Kassam préféré…*

Sans oublier, au plus près, mes Voisins Chéris**,** m*erci au confinement d'avoir permis la proximité, merci à tous ces anniversaires qui nous ont servi d'alibi pour se rassembler clandestinement à l'heure où c'était interdit et d'avoir pu lever la tête après ces journées rédactionnelles de thèse et de travail.* ***Xime*** *comme promis je te ferai un jour du vrai guacamole. À Maxou et tes expériences qui me donnent l'impression que tu as eu plusieurs vies. À mon* ***Benj*** *pour tous nos états d'âme échangés et le peps que tu mets dans ma routine quand je rentre aux Tourneurs !!! Je suis très contente de vous avoir rencontrés.*

Table des Matières

Remerciements....4
Table des Figures....17
Table des Annexes....19
Table des Abréviations....20
I. Introduction....23
I.1 Fonctions des plaquettes dans l'hémostase primaire....25
I.1.1 Adhésion plaquettaire....26
I.1.2 Activation plaquettaire....28
I.1.3 Sécrétion plaquettaire....30
I.1.4 Agrégation plaquettaire....32
I.2 Tests d'exploration des maladies hémorragiques....34
I.2.1 Principe du test photométrique d'agrégation plaquettaire....35
I.2.2 Interprétation du test photométrique d'agrégation plaquettaire....41
I.2.3 Autres techniques....53
II Place de la qualité au sein du Laboratoire d'analyse médicale....58
II.1 Origines et historique de la qualité au sein du Laboratoire d'analyse médicale....58
II.1.1 Guide de Bonne Exécution des Analyses de biologie médicale (GBEA)....58
II.1.2 Le manuel d'accréditation des établissements de santé de l'ANAES....59
II.1.3 Les démarches qualités volontaires....61
II.2 La réforme de la biologie médicale....62
II.2.1 Le rapport initial de l'Inspection Générale des Affaires Sociales (IGAS)....62
II.2.2 Le rapport Ballereau : « Rapport pour un projet de réforme de la biologie médicale »....63
II.2.3 L'ordonnance relative à la biologie médicale et la loi HSPT....64
II.2.4 La loi du 31 mai 2013 relative à la réforme de la biologie médicale....65
II.3 L'accréditation au sein du Laboratoire d'analyse médicale....66
II.3.1 Le COFRAC....67
II.3.2 Le processus d'accréditation....67
II.3.3 Avancement des démarches d'accréditations en Europe....68
III.Étude....71
III.1 Matériels et Méthodes....71
III.1.1 Matériels : Documentations du COFRAC....71
III.1.2 Méthodes : Critères de validation de méthode....74

III.2 Résultats 86
III.2.1 Description de la méthode.....86
III.2.2 Evaluation des performances de la méthode 86
III.3. Discussion 101
III.3.3 Points forts du test photométrique d'agrégation plaquettaire dans le diagnostic des maladies hémorragiques rares 101
III.3.4 Gestion des limites du test photométrique d'agrégation plaquettaire dans le diagnostic des maladies hémorragiques rares 104
III.3.5 Etudes en cours et perspectives dans l'étude des fonctions plaquettaires.....108
III.4. Conclusion 111
Bibliographie 112
Annexes.....118

Table des Figures

Figure 1 Schéma des principaux récepteurs et effecteurs plaquettaires 26
Figure 2 Structure du complexe GPIb-IX-V.....27
Figure 3 Forme typique « discoïde » des plaquettes de souris au repos (A) et modifications de forme induites par la stimulation (B), ...28
Figure 4 Signalisation "inside-out" et "outside-in" de l'intégrine αIIbβ3 (GpIIbIIIα). 32
Figure 5 Principe de l'agrégométrie par variation de la transmission lumineuse. 35
Figure 6 :Thrombo-agrégomètre, dispositif médical de diagnostic in vitro (DMDIV), SD médical, CE .35
Figure 7 Exemple de profils agrégométriques en réponse au collagène 36
Figure 8 Profil agrégométrique normal après stimulation par différents agonistes en plasma riche en plaquettes 38
Figure 9 Algorithme diagnostique de la Thrombasthénie de Glanzmann et des pathologies plaquettaires apparentées 44
Figure 10 Principales voies de l'activation plaquettaire 46
Figure 11 Interprétation de κ définie comme suit selon the measurement of observer agreement for categorical data. 82
Figure 12 Résultats du test de répétabilité pour l'agrégomètre 1 tiré du SH FORM 43 "Validation de méthode du test d'agrégométrie plaquettaire du laboratoire d'hémostase spécialisé du CHU de Toulouse » en Annexe1.....87
Figure 13 Résultats du test de répétabilité pour l'agrégomètre 3 tiré du SH FORM 43 "Validation de méthode du test d'agrégométrie plaquettaire du laboratoire d'hémostase spécialisé du CHU de Toulouse » en Annexe1.....88
Figure 14 Résultats du test de reproductibilité pour l'agrégomètre 3 tiré du SH FORM 43 "Validation de méthode du test d'agrégométrie plaquettaire du laboratoire d'hémostase spécialisé du CHU de Toulouse » en Annexe1.....89
Figure 15 Etude de la concordance inter-juge sur l'interprétation des tracés de chaque agoniste - Variabilité inter-opérateur pour l'agrégomètre 1 tiré du SH FORM 43 "Validation de méthode du test d'agrégométrie plaquettaire du laboratoire d'hémostase spécialisé du CHU de Toulouse » en Annexe1 91
Figure 16 Etude de la concordance inter-juge sur l'interprétation des résultats de chaque patient - Variabilité inter-opérateur pour l'agrégomètre 1 tiré du SH FORM 43 "Validation de méthode du test d'agrégométrie plaquettaire du laboratoire d'hémostase spécialisé du CHU de Toulouse » en Annexe1 92
Figure 17 Etude la concordance inter-juge sur les conclusions générales de l'agrégométrie pour chaque patient-Variabilité inter-opérateur pour l'agrégomètre 1 tiré du SH FORM 43 "Validation de méthode du test d'agrégométrie plaquettaire du laboratoire d'hémostase spécialisé du CHU de Toulouse » en Annexe1.....94
Figure 18 Résultats du test d'exactitude pour l'agrégomètre 1 tiré du SH FORM 43 "Validation de méthode du test d'agrégométrie plaquettaire du laboratoire d'hémostase spécialisé du CHU de Toulouse » en Annexe1.....97
Figure 19 Etude de la sensibilité, spécificité, VPP et VPN des patients atteints de Thrombasthénie de Glanzmann pour l'agrégomètre 1 tiré du SH FORM 43 "Validation de méthode du test

d'agrégométrie plaquettaire du laboratoire d'hémostase spécialisé du CHU de Toulouse » en Annexe1 97
Figure 20 Etude de la sensibilité, spécificité, VPP et VPN des patients atteints de syndrome de Bernard et Soulier pour l'agrégomètre 1 tiré du SH FORM 43 "Validation de méthode du test d'agrégométrie plaquettaire du laboratoire d'hémostase spécialisé du CHU de Toulouse » en Annexe1 98
Figure 21 Sensibilité, spécificité, VPP et VPN des patients atteints de syndrome de Bernard et Soulier et de la Thrombasthénie de Glanzmann pour l'agrégomètre 1 tiré du SH FORM 43 "Validation de méthode du test d'agrégométrie plaquettaire du laboratoire d'hémostase spécialisé du CHU de Toulouse » en Annexe1.....98
Figure 22 Intervalles de référence pour l'interprétation des tests d'agrégomètrie plaquettaire tiré du SH FORM 43 "Validation de méthode du test d'agrégométrie plaquettaire du laboratoire d'hémostase spécialisé du CHU de Toulouse » en Annexe.....100
Figure 23 Tableau indiquant le nombre de fournisseurs différents disponibles dans le commerce, pour les participants à l'étude, pour chaque agoniste 108

Table des Annexes

Annexe 1 Validation de méthode SH FORM 43 : Test d'agrégation plaquettaire 118
Annexe 2 Maitrise des risques.....140
Annexe 3 Formulaire d'interprétation de courbes d'agrégation plaquettaire.....151
Annexe 4 Formulaire destiné aux patients avant prélèvement pour évaluer la répétabilité et la reproductibilité.....152
Annexe 5 Préparation des réactifs.....153

Table des Abréviations

AA Acide Arachidonique

ADP Adénosine Diphosphate

AFNOR Agence Française de Normalisation

AINS Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens

AMP Adénosine Monophosphate

ANAES Agence National D'Evaluation en Santé

ARS Agence Régionale De Santé

ASA Agrégométrie sur Sang Total

Ca2+ Calcium

COX-1 Cyclo-oxygénase1

CMF Cytométrie de Flux

CNQ Contrôle National de Qualité

COFRAC Comité Français d'Accréditation

CQI Contrôle de Qualité Interne

CRPP Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires

CTA Comité Technique d'Accréditation

CV Coefficient de Variabilité

DAG Diacyl Glycerol

EEQ Evaluation Externe de la Qualité

FERMT3 Fermitin Family Homolog3

FORM Formulaire

GBEA Guide de Bonne Exécution des Analyses de Biologie médicale

GEHT Groupe d'Etudes sur l'Hémostase et la Thrombose

GFHT Groupe Français d'Hémostase et de Thrombose

GTA Guides Techniques d'Accréditation

GT Thrombasthénie de Glanzmann

HAS Haute autorité de Santé

IGAS Inspection Générale des Affaires Sociales

INF Documents d'Information

IP3 Inosine Monophosphate 3

ISTH International Society on Thrombosis and Haemostasis

LAD Leukocyte Adhesion Deficiency

LBMMS Laboratoire de Biologie Médicale Multi Sites

LBM Laboratoire de Biologie Médicale

LTA Light Transmission Aggregometry

MLC Chaîne Légère de la Myosine

MRC Matériaux de Référence Certifiées

NABM Nomenclature des Actes de la Biologie Médicale

NASCOLA North American Specialized Coagulation Laboratory Association

NIBSC National Institute for Biological Standardization and Control

NO Monoxyde d'azote

NP Numération Plaquettaire

PFA Platelet Function Analyzer

PGG2 Prostaglandine G2

PGH2 Prostaglandine H2

PLA2 Phospholipase A2

PLC2 Phospholipase C2

PPP Plasma Pauvre en Plaquettes

PRP Plasma Riche en Plaquettes

RCPG Récepteurs à sept segments transmembranaires couplés aux protéines G hétérotrimériques

REF Documents de Référence

SI Système International

SSC: Scientific and Standardization Committee

TAP Test d'Agrégation Plaquettaire

TC Comité Technique

TCA Temps de céphaline avec Activateur

TIH Thrombopénie Induite par l'Héparine

TQ Temps de Quick

TRAP Thrombin Receptor Activating Peptide

TxA2 Thromboxane A2

UAP Unitées d'Agrégation Plaquettaire

VMP Volume Plaquettaire Moyen

vWF Facteur Von Willebrand

WBA Well Plate-Based Light Transmission Aggregometry

I. Introduction

Le test photométrique d'agrégation plaquettaire (TAP) ou LTA pour light Transmission Aggregometry), est un acte inscrit à la Nomenclature des actes de biologie médicale (NABM) depuis juin 2013. Il est coté **B100** avec un nombre maximum de cotations ne pouvant être supérieur à 5. Il est pris en charge dans les indications suivantes :

- L'exploration d'un syndrome hémorragique évocateur d'anomalies des fonctions plaquettaires,
- Le diagnostic de thrombopénie induite par héparine (TIH) de type II associé à un test immunologique, dans les cas suivants :
    - Chute relative des plaquettes, sur deux numérations successives, de 30 % à 50%, sous traitement par héparine et/ou numération plaquettaire < 100 à 150G/L en l'absence de numération antérieure ;
    - Thrombose veineuse ou artérielle sous traitement par héparine ;
    - Thrombose ou thrombocytopénie, même si le patient n'est plus sous héparine depuis quelques jours ;
    - Résistance à l'héparinothérapie avec extension du processus thrombotique.(1)

Ce test est donc utilisé pour la prise en charge des patients **atteints de thrombopénies constitutionnelles ou de thrombopathies**, maladies dues à des déficits ou à des anomalies fonctionnelles des plaquettes.

Le principe repose sur la **mesure de l'agrégation d'un plasma riche en plaquettes (PRP),** par photométrie ou impédancemétrie, in vitro, après ajout d'agents dits « inducteurs », « agents agrégants » ou encore « agonistes ». Les résultats, après confrontation au contexte clinique permettront d'**évaluer la fonctionnalité des plaquettes ex vivo et leur capacités à agréger les unes aux autres**. Les agents agrégants utilisés doivent être précisés et une conclusion interprétant les résultats doit figurer sur le compte rendu.

Les contraintes pré-analytiques et analytiques étant relativement lourdes, le TAP nécessite d'être réalisé dans des **centres expérimentés**, ayant une activité suffisante pour assurer la compétence technique de réalisation, et l'interprétation biologique. Le CHU de Toulouse est l'un de ces centres experts. Le Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires (CRPP) a été labellisé en 2005 par le Ministère de la Santé et des Solidarités dans le cadre du Plan National « Maladies Rares ». Le CRPP est intégré à la filière de santé Maladie Hémorragiques Constitutionnelles (MHEMO) créée en 2014. Cette filière regroupe les centres de référence de l'hémophilie, et autres maladies hémorragiques constitutionnelles, la maladie de Willebrand et les pathologies plaquettaires. La coordination du CRPP est assurée par 4 sites constitutifs : CHU de Bordeaux, CHU de Marseille, les trois établissements de l'AP-HP (hôpital Kremlin Bicêtre, hôpital Robert Debré, hôpital Armand Trousseau) et le CHU de Toulouse.(2)

Dans notre étude, il s'agira de valider le LTA dans l'exploration d'un syndrome hémorragique évocateur d'anomalie fonctionnelle plaquettaire, selon les exigences qualités de la norme NF EN ISO 15189:2012.

I.1 Fonctions des plaquettes dans l'hémostase primaire

L'hémostase assure la prévention des saignements spontanés et l'arrêt des hémorragies en cas d'effraction vasculaire, par la formation d'un thrombus. Elle implique des systèmes cellulaires et plasmatiques dont le fonctionnement doit être coopératif, régulé dans le temps et dans l'espace, afin de maintenir le sang fluide dans les vaisseaux. L'hémostase comprend schématiquement 3 temps successifs : l'hémostase primaire, la coagulation, la fibrinolyse. L'hémostase primaire et la coagulation sont pratiquement simultanées. La fibrinolyse est retardée et se développe lorsque le vaisseau et les tissus lésés sont réparés.

Le rôle majeur des plaquettes sanguines est d'assurer l'intégrité des vaisseaux et l'hémostase primaire. Elles sont capables de former un agrégat plaquettaire stable. Dans les vaisseaux, le flux sanguin crée des forces tangentielles, dites forces de cisaillement, favorisant le jeu des protéines adhésives et l'activation des plaquettes. Les érythrocytes circulent dans la colonne centrale d'écoulement sanguin et repoussent les plaquettes vers la paroi, ce qui favorise les interactions plaquettes/paroi. La paroi vasculaire intacte est non thrombogène car les cellules endothéliales sécrètent des inhibiteurs de l'activation plaquettaire (prostacycline et NO notamment) et expriment à leur surface le CD39 qui transforme l'activateur plaquettaire ADP en AMP. De plus, les microfibrilles de collagène sont non accessibles au sang car il est sous l'endothélium.

En cas de brèche vasculaire, les cellules endothéliales disparaissent et le collagène sous-endothélial devient accessible à une protéine adhésive plasmatique, le facteur von Willebrand (vWF). Il permet la liaison aux plaquettes, qui vont ensuite interagir avec le collagène et s'activer. Les plaquettes sécrètent alors le contenu de leurs granules de sécrétion, notamment l'ADP, et produisent du TXA2 ce qui permet de recruter et activer d'autres plaquettes circulantes pour former un clou hémostatique. Il est composé de plaquettes et de fibrine produite au contact des plaquettes activées par la thrombine générée localement.

I.1.1 Adhésion plaquettaire

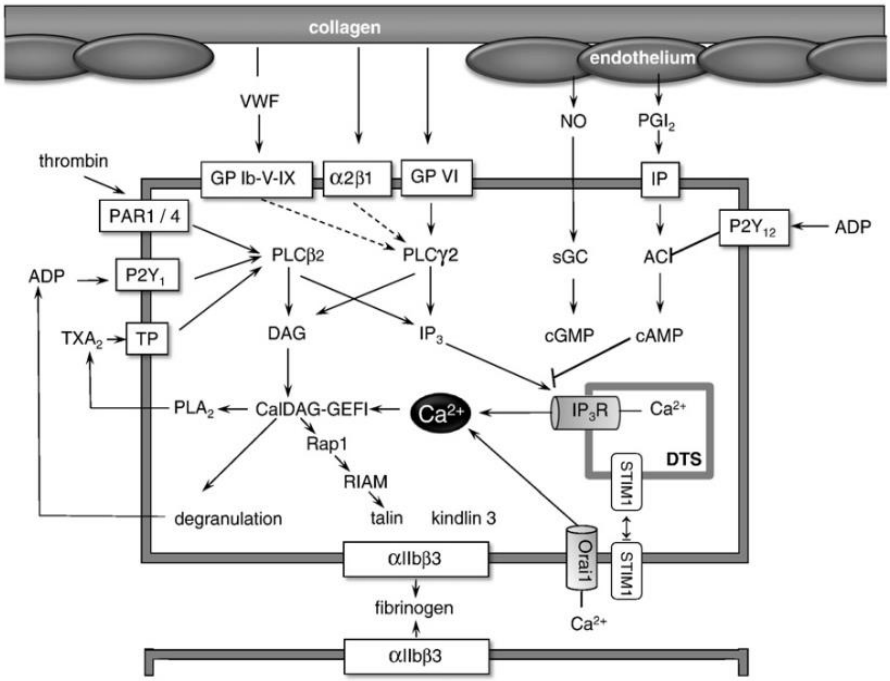

Figure 1 Schéma des principaux récepteurs et effecteurs plaquettaires d'après Broos K, Feys HB, De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H. Platelets at work in primary hemostasis. Blood Rev. 2011;25(4):155-167. doi:10.1016/j.blre.2011.03.002

La stabilité de l'adhésion plaquettaire à la matrice est possible grâce à des mécanismes coordonnés d'attachement incluant le « rolling », l'adhésion, l'étalement et l'activation. Le vWF est une glycoprotéine d'adhésion plasmatique, qui sert de « colle moléculaire » entre le collagène du sous-endothélium et les plaquettes pour lesquelles elles ont un récepteur membranaire spécifique, la glycoprotéine Ibα (GpIb/V/IX). Lorsqu'il y a une interaction vWF/sous-endothélium, dans des conditions de forces de cisaillement élevées, le vWF change de conformation est passe dans une conformation capable de lier GpIbα et le collagène. GpIbα est le seul récepteur, sur plaquette non activée, ayant une affinité significative pour vWF. **La maladie de Willebrand** est la plus fréquente des pathologies hémorragiques. Elle est causée par des **défauts de concentration, de structure ou de fonction du vWF**. Trois types de maladie de Willebrand sont décrits. Le type 1, forme la plus courante, est dû à un déficit quantitatif partiel du vWF, et le type 3, forme la plus rare, est dû à un déficit quantitatif sévère. Cette liaison n'est pas suffisante à elle seule pour créer une adhésion stable. Elle permet néanmoins une décélération de la vitesse

plaquettaire et les maintient en contact étroit avec le sous-endothélium (« le rolling »), permettant ainsi la mobilisation d'autres récepteurs plaquettaires et l'adhésion ferme avec des intégrines β1 et β3.(3) Chez les patients atteints du **Syndrome de Bernard-Soulier, le récepteur GPIb-IX-V est absent, faiblement exprimé ou anormal** du fait de mutations pouvant porter sur différentes sous-unités du récepteur.

Outre sa liaison au vWF, le collagène se lie à deux récepteurs plaquettaires spécifiques, la GPVI et l'intégrine α2β1 (aussi appelée GpIa/GpIIa, VLA-2 ou CD49a/CD29) qui agissent en synergie. La liaison du collagène au récepteur GPVI va déclencher une cascade de signalisation induisant l'activation de l'intégrine αIIbβ3 (aussi appelé GpIIb-IIIa) (cf figure1). Les patients atteints **de Thrombasthénie de Glanzmann** ont une **déficience au niveau de ce récepteur.** Ce récepteur permet une adhésion plaquettaire ferme et la formation du thrombus par sa liaison au vWF et au fibrinogène.

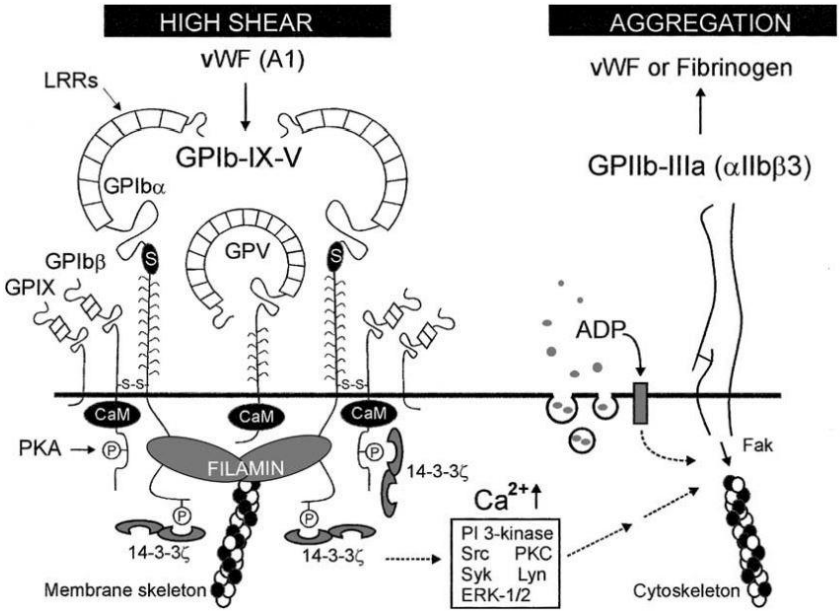

Figure 2 Structure du complexe GPIb-IX-V d'après Andrews RK, Gardiner EE, Shen Y, Whisstock JC, Berndt MC. Glycoprotein Ib-IX-V. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2003 Aug;35(8):1170-1174. DOI: 10.1016/s1357-2725(02)00280-7.

I.1.2 Activation plaquettaire

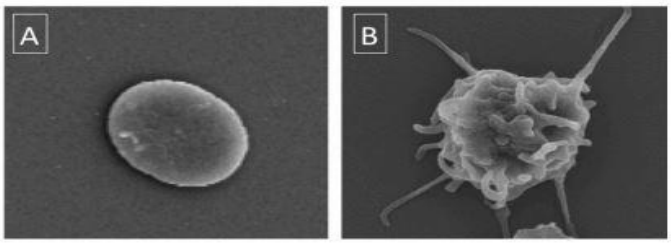

Figure 3 Forme typique « discoïde » des plaquettes de souris au repos (A) et modifications de forme induites par la stimulation (B), (Photo de microscopie électronique à balayage prise dans l'équipe 11 de l'Unité Inserm 1048, I2MC Toulouse)

Lors de l'activation plaquettaire, les plaquettes en suspension passent d'une forme discoïde à une forme sphérique et émettent des prolongements membranaires de type filopodes et lamellipodes. Elles augmentent ainsi considérablement la surface de la membrane plaquettaire, facilitant ainsi les contacts avec les autres cellules et les molécules matricielles.

Elles peuvent être activées par différentes voies de signalisation, l'une d'elles est la voie des tyrosines kinases. Les tyrosines kinases Src, Fyn et Lyn sont liées à la queue cytoplasmique de GPVI. De nombreuses voies de signalisation sont activées en aval de GPVI, notamment la phospholipase C2 (PLC2) qui produit de l'IP3 et du DAG (cf figure1). La mobilisation du Ca^{2+} induite par l'IP3 contribue à de multiples évènements dont l'activation de la phospholipase A2 (PLA2), un changement de forme des plaquettes, les sécrétions granulaires puis l'agrégation des plaquettes.

Parallèlement, l'exposition des PS à la surface des plaquettes est rendu possible par des enzymes de type scramblase, flippase et floppase. Récemment, il a été montré que TMEM16F est la scramblase responsable de l'exposition des PS à la surface des plaquettes activées. Cette surface pro-coagulante accélère la cascade de coagulation à la surface des plaquettes activées. L'importance de l'exposition de cette surface pro-coagulante est mis en évidence dans les phénotypes hémorragiques des patients ayant un **Syndrome de Scott,** c'est-à-dire **un déficit de translocation des PS due à une mutation au niveau du gène *TMEM16F*.**(4)

Lorsque la PLA2 est activée, elle clive les phospholipides libérant ainsi l'acide arachidonique (AA). L'AA est un substrat pour la cyclo-oxygénase (COX-1 dans les plaquettes), qui le transforme en PGG2 et PGH2. Ces derniers sont ensuite des substrats de la Thromboxane synthase (principalement dans les plaquettes) qui génère le TxA2, un puissant activateur plaquettaire à demi-vie faible. Le TXA2 possède deux récepteurs à sept segments transmembranaires couplés aux protéines G hétérotrimériques (RCPG):TPα et TPβ. Le récepteur à la thrombine PAR-1 et PAR-4, le récepteur P2Y1 à l'ADP, le récepteur PAF-1 du PAF acether, le récepteur V-1 de la vasopressine, et le récepteur 5HT2A de la sérotonine sont tous également des RCPG, couplés à la protéine Gq et agissent via la PLCβ2. La PLCβ2 génère l'IP3 et le DAG et font augmenter le niveau de Ca^{2+} intracellulaire(cf figure1).

TP et les récepteurs PAR déclenchent également une voie médiée par Rho/Rho-kinase. Cette voie régule la myosine phosphatase et aboutit finalement à la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine (MLC). La stimulation de Rho/Rho-kinase et MLC augmentent la contractilité de l'actomyosine lors du changement de forme des plaquettes.

L'ADP est libéré lors de la sécrétion plaquettaire des granules denses où il est stocké en forte concentration. Il a un rôle clé dans la potentialisation de l'activation plaquettaire via son récepteur P2Y12. Il se lie également au récepteur P2Y1. P2Y1 et P2Y12 sont des RCPG a effet synergique, qui interagissent respectivement avec la protéine Gq et Gi. La stimulation du récepteur P2Y1 aboutit à l'activation de PLCβ et donc à la mobilisation intracellulaire du Ca^{2+}. Le récepteur P2Y12 est couplé à une protéine Gi, responsable de l'inhibition de la formation d'AMP cyclique et, à ce titre, permissive de l'activation plaquettaire (cf figure1).

I.1.3 Sécrétion plaquettaire

Les granules plaquettaires fusionnent avec la membrane plasmique et déversent leur contenu qui enrichit l'environnement local avec une multitude de molécules bio-actives. Ces signaux de nature para et/ou autocrine amplifient l'activation plaquettaire.

Dans les plaquettes, on distingue trois types de granules, les granules α, les granules denses (δ) et les lysosomes (λ granules).

Le contenu des granules α est varié puisqu'on y retrouve plus de 280 protéines. Il y a des chimiokines, des molécules anti-angiogéniques, des facteurs de croissance, des molécules pro- et anti-thrombotiques. Les granules denses contiennent beaucoup moins de protéines mais contiennent une grande quantité d'ions et des métabolites comme les nucléotides, l'histamine et la sérotonine. Les lysosomes contiennent principalement des enzymes incluant un large spectre de sérines peptidases, des glucides et des phosphatases. De par leur contenu différent, la sécrétion de ces 3 types de granules provoque des réponses différentes du milieu environnant.

Granules α

Les granules α sont les plus abondantes de toutes et leur contenu est capable de moduler l'hémostase primaire, la coagulation, l'inflammation, l'angiogenèse ou encore la cicatrisation. Le rôle clé dans l'hémostase est mis en évidence chez les patients atteints **du Syndrome Des Plaquettes Grises**. Ces patients ont un **déficit variable en contenu des granules α** et présentent une diathèse hémorragique héréditaire légère à sévère.

Les granules α stockent le vWF sous sa forme la plus puissante, multimérique, à haut poids moléculaire et le fibrinogène. L'effet résultant de cette libération est pro-thrombotique, renforçant ainsi les interactions plaquettaires et le recrutement d'un plus grand nombre de plaquettes au site de la lésion.

Bien que les récepteurs αIIbβ3 et GpVI soient présents constitutivement sur la membrane plasmique des plaquettes au repos, il existe aussi une réserve intracellulaire, dans les granules α. Ainsi, lors de la fusion granulaire, on observe une augmentation du nombre de ces récepteurs membranaires.

Ainsi, la sécrétion des granules α amplifie la réponse plaquettaire non seulement en libérant des ligands prothrombotiques, mais aussi en augmentant le nombre de récepteurs nécessaire à la réponse.

Également, les facteurs de coagulation résident dans les granules α.

Granules denses δ

Les granules denses jouent un rôle clé dans l'amplification de la réponse plaquettaire notamment via l'ADP sécrété. L'importance des granules denses est mise en évidence chez les patients atteints **d'un déficit en pool δ** comme dans les **syndromes de Hermansky-Pudlak et Chediak-Higashi** où nous observons un phénotype hémorragique. Les granules denses libèrent aussi de grandes quantités d'ATP, qui se lient aux canaux cationiques P2X1 et génèrent un influx calcique. Ce flux contribue à l'activation des plaquettes dans certaines conditions. La signalisation P2X1 n'est pas considérée comme essentielle à l'agrégation plaquettaire, mais elle y contribue notamment en condition de flux élevé. Cette réponse n'est pas soutenue en raison de la désensibilisation rapide des récepteurs.

I.1.4 Agrégation plaquettaire

L'activation des récepteurs membranaires plaquettaires et d'un certain nombre de voies de signalisation en aval va conduire à un changement conformationnel de l'intégrine αIIbβ3 (signalisation dite « inside-out ») lui permettant de lier le fibrinogène (cf figure 4). Ces liaisons avec le fibrinogène vont permettre la création de « ponts » entre les plaquettes et le phénomène d'agrégation. Lorsque l'intégrine est engagée, elle va induire une signalisation dite outside-in qui va mettre en jeu différent acteurs de signalisation, permettre l'activité contractile des plaquettes, la croissance du thrombus plaquettaire et sa stabilité .(5)

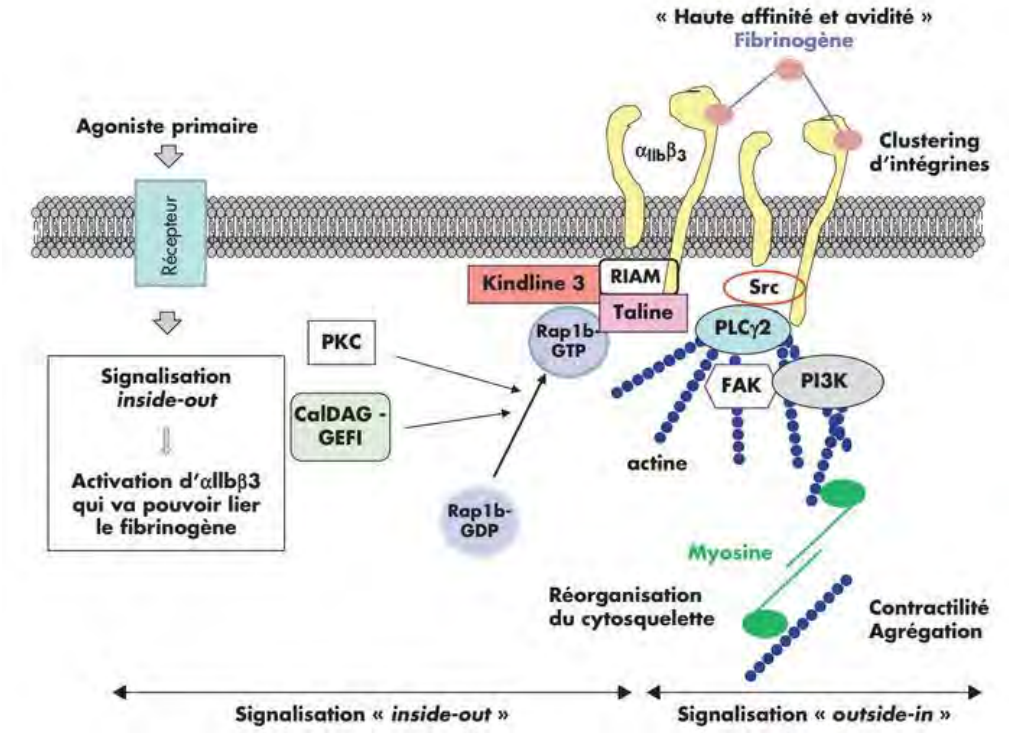

Figure 4 Signalisation "inside-out" et "outside-in" de l'intégrine αIIbβ3 (GpIIbIIIα) d'après Bernard Payrastre, Marie-Christine Alessi, Pierre Sie. Physiopathologie des thrombopathies constitutionnelles. Sang Thrombose Vaisseaux. 2014;26(6):300-316. doi:10.1684/stv.2014.0855

L'étape ultime de l'activation plaquettaire est l'agrégation plaquettaire rendue possible grâce à la liaison de l'intégrine αIIbβ3 au fibrinogène (cf figure 1). Elle conduit à la formation d'un thrombus riche en plaquette et fibrinogène au site de la lésion. ***Dans les artères de calibre moyen à gros,*** l'agrégation plaquettaire est principalement médiée par une interaction αIIbβ3-fibrinogène réversible. Un agoniste plaquettaire induit le changement conformationnel de l'intégrine à l'origine de sa liaison avec le fibrinogène. Le fibrinogène étant une molécule symétrique, deux récepteurs plaquettaires peuvent utiliser le même ligand, les plaquettes sont alors « pontées ». Ce processus est prédominant et indépendant de la liaison GpIbα-VWF. ***À des taux de cisaillement compris entre 1 000 et 10 000 s-1,*** l'agrégation se fait en 2 étapes. Une première étape dépendante de GpIbα et αIIbβ3 conduit à la formation d'agrégats plaquettaires réversibles. Une deuxième étape, impliquant l'activation irréversible de αIIbβ3 conduit à la formation d'agrégats plaquettaires stables. Ce processus d'activation est communément appelé **« inside-out signaling ».** De nombreux agonistes plaquettaires tels que la thrombine, l'ADP, les complexes immuns, le collagène ou le TXA2 sont capables d'induire ce signal « inside-out ». Lorsque l'intégrine ainsi modifiée est occupée par ses ligands, d'importants phénomènes de signalisation de l'extérieur vers l'intérieur de la plaquette ont lieu, appelés **« outside-in signaling ».** La signalisation « outside-in » débute dès la fixation du fibrinogène à l'intégrine αIIbβ3. Elle est suivie par un regroupement des intégrines, qui augmente l'avidité pour le fibrinogène. L'ensemble des processus qui en découle, lié à une réorganisation particulière du cytosquelette d'acto-myosine, permet la stabilisation des agrégats, la contraction du clou plaquettaire et la rétraction du caillot de fibrine.(6) L'adhésion dans des conditions de forts cisaillements est aussi médiée par VWF-GpIbα, et implique également GpVI, et P2Y12. ***Dans les artères sténosées,*** où le taux de cisaillement peut être supérieur à 10 000 s-1, l'agrégation plaquettaire peut se produire indépendamment de l'activation plaquettaire, à condition que le FVW soluble soit présent. L'agrégation plaquettaire est caractérisée par la formation d'agrégats de plaquettes qui roulent sur la surface du VWF, un procédé exclusivement médié par les interactions VWF-GpIbα. ***Au-dessus de 20 000 s-1***, la contrainte de cisaillement induit des changements morphologiques majeurs sur les plaquettes liées au VWF ou libre en les transformant de discoïdes à étirées. Cette conformation étirée réduits les forces mécaniques et permet aux agrégats de tenir plus longtemps. Les liaisons des agrégats se fait avec des formes multimériques du VWF.

I.2 Tests d'exploration des maladies hémorragiques

L'étude biologique de l'hémostase fait appel à des tests dits de première intention, comme le temps de céphaline + activateur (TCA), la numération plaquettaire (NP). L'un des test diagnostic le plus important pour les anomalies plaquettaires est le TAP, inventé par **Mr Born et O' Brien en 1962**.(7) Des recommandations dans la littérature sont désormais disponibles sur la façon de réaliser ce test et d'interpréter les résultats.(8) (9) Tous les aspects techniques ont été discutés y compris les intérêts cliniques, les facteurs de variation pré-analytiques, la préparation des échantillons, la diversité des équipements et réactifs, les concentrations et les types d'agonistes, le processus de réalisation, et l'interprétation des résultats. Il existe cependant certaines variations entre les recommandations provenant de différentes organisations (exemple : différence sur les concentrations d'agonistes à utiliser). (10) Malgré une utilisation répandue de ce test, les **protocoles expérimentaux restent relativement hétérogènes** avec certaines procédures locales particulières propres à chaque laboratoire. La standardisation espérée par les sociétés savantes est donc délicate.

Dans ce contexte, l'intérêt d'une accréditation de notre méthode, selon la norme NF EN ISO 15189:2012, trouve tout son intérêt. Il s'agit de :

- **rendre compte de la performance de notre technique analytique,**
- **prouver la qualité de nos résultats rendus,**
- **standardiser nos pratiques,**
- **améliorer la prise en charge des patients.**

I.2.1 Principe du test photométrique d'agrégation plaquettaire

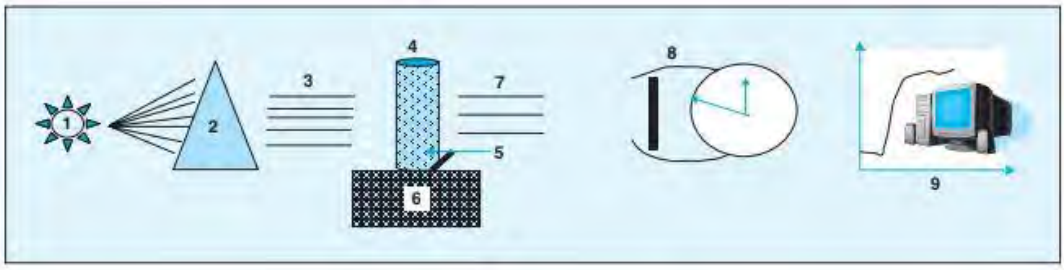

Figure 5 Principe de l'agrégométrie par variation de la transmission lumineuse. 1- Source lumineuse polychromatique ; 2- Filtre monochromatique ; 3- Faisceau monochromatique ; 4- Cuve contenant du PRP ; 5- Barreau métallique ; 6- Moteur rotatif 1 100 tours/min ; 7- Lumière transmise ; 8- Diode photoélectrique ; 9- Enregistreur d'après Elalamy I, Gkalea V, Gerotziafas G, Ketatni H, Hatmi M. L'exploration fonctionnelle plaquettaire : intérêts en pratique clinique. Ann Biol Clin 2013 ; 71(special 1) : 47-57 doi:10.1684/abc.2013.0905

L'agrégomètre est un **photomètre** constitué d'une source lumineuse avec un socle pouvant recevoir une ou plusieurs cuvettes. Le sang citraté est centrifugé pour obtenir un PRP qui est alors versé dans les cuvettes de l'agrégomètre. Ces cuvettes en verre siliconé contiennent un agitateur magnétique pour maintenir les cellules en suspension. Elles sont conservées à 37 ◦C grâce à un bloc thermostaté. Une cellule photoélectrique reçoit le faisceau lumineux après son passage à travers la suspension. La variation du signal lumineux émettant dans le **proche infra-rouge** est alors enregistrée et transmise à un ordinateur pour être transcrite en courbe d'agrégation. L'agrégomètre mesure en fait **l'augmentation de la transmission lumineuse à travers un échantillon de PRP en réponse à un stimulus externe.**

Figure 6 :Thrombo-agrégomètre, dispositif médical de diagnostic in vitro (DMDIV), SD médical, CE

L'addition de différents agonistes permet d'évaluer la fonctionnalité des voies de réponse plaquettaire qui sont multiples et la capacité des plaquettes à s'agréger les unes aux autres. On déclenche l'activation plaquettaire en les utilisant à différentes concentrations. Les plaquettes à l'état de repos sont libres et en suspension dans la cuvette de l'agrégomètre expliquant ainsi la turbidité du milieu. Comme le faisceau lumineux monochromatique ne peut traverser la cuve pour être capté par la diode, aucun signal n'est enregistré et cela correspond au zéro (0 %) ou ligne de base de la courbe. À l'inverse, le plasma citraté déplaquetté après une double centrifugation (PPP autologue) laissant passer totalement le faisceau de lumière permet d'établir le point d'agrégation maximale ou 100 %. La réponse plaquettaire à chaque agoniste est suivie de façon continue, et on détermine le temps de latence, la vélocité (pente de la courbe), la vague d'agrégation primaire réversible et la vague d'agrégation secondaire irréversible, le pourcentage maximal d'agrégation et le pourcentage final d'agrégation après un délai fixé (par exemple 10 minutes). En plus, l'aire sous la courbe ou l'aire sous la pente peuvent également être mesurées.

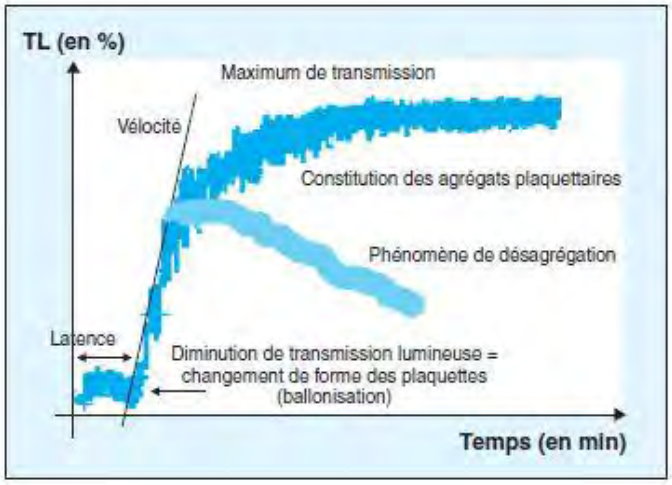

Figure 7 Exemple de profils agrégométriques en réponse au collagène d'après d'après Elalamy I, Gkalea V, Gerotziafas G, Ketatni H, Hatmi M. L'exploration fonctionnelle plaquettaire : intérêts en pratique clinique. Ann Biol Clin 2013 ; 71(special 1) : 47-57 doi:10.1684/abc.2013.0905

Après l'addition de l'agoniste donné, les plaquettes changent de forme en se ballonnisant et cela majore transitoirement la turbidité du milieu. Puis, au fur et à mesure de l'activation plaquettaire, les cellules s'agrègent et la lumière est transmise avec une variation rapide. L'agrégomètre suit donc ce changement de dynamique plaquettaire en temps réel et donne une courbe d'agrégation plaquettaire en fonction du temps. La courbe atteint un pic et une phase en plateau correspondant à l'amplitude maximale d'agrégation. Le caractère réversible ou irréversible de la courbe témoigne de la qualité d'amplification de la réponse cellulaire c'est-à-dire avec une libération optimale ou non du contenu des granules (figure 6).

En utilisant un agoniste faible tel que l'adrénaline, la courbe a un aspect bi phasique : une pente initiale correspondant à la réponse primaire avec une agrégation réversible puis une deuxième courbe aboutissant à l'agrégation irréversible des plaquettes après libération des agonistes endogènes contenus dans les granules cytoplasmiques plaquettaires (figure 7). Le profil d'agrégation à l'ADP dépend de la concentration d'ADP utilisée. Aux faibles concentrations (1 mM), l'agrégation n'est pas stable. La courbe est dite réversible. Aux concentrations intermédiaires (2-4 mM), l'activation induite par l'ADP exogène se complète par la sécrétion de l'ADP endogène contenu dans les granules denses (δ), ce qui peut donner lieu, au phénomène dit de double vague, c'est à dire à une agrégation suivie d'un début de désagrégation, puis une agrégation complète et stable. Aux fortes concentrations (10 mM), l'agrégation est stable. Il est important de noter qu'il existe une variabilité interindividuelle d'autant plus nette que les doses d'ADP sont faibles (1-4 mM).

L'ADP sécrété des granules δ est un amplificateur de l'activation plaquettaire induite par d'autres agonistes comme le TXA2, le collagène et les agonistes des récepteurs PAR à faibles doses. De ce fait, un défaut de réponse à l'ADP, quelle que soit son origine, en interrompant cette boucle d'amplification, réduit la réponse aux concentrations sous-optimales de ces agonistes.

Il existe de nombreux activateurs plaquettaires ayant des spécificités différentes.

- L'acide arachidonique : évalue la capacité de formation du thromboxane A2,
- L'adénosine diphosphate (ADP) : stimule les récepteurs membranaires purinergiques P2Y12, P2Y1,
- L'adrénaline: agoniste des récepteurs alpha1 et alpha2 adrénergiques,
- Le collagène : stimule GPVI ou d'autres récepteurs membranaires comme l'intégrine α2β1 (GPIaIIa),
- Un analogue de la thrombine, le TRAP (Thrombin Receptor Activating Peptide) : puissant activateur du récepteur plaquettaires PAR-1 (Protease Activated Receptor1).
- La ristocétine, antibiotique utilisé seulement in vitro : déclenche la fixation membranaire du facteur Willebrand sur la GpIb, (support de l'adhésion au sous-endothélium) entrainant une agglutination des plaquettes,
- Le CRP ou peptide activateur issu du collagène et la convulxine (venin de serpent), agonistes spécifiques de la GpVI : permettent d'évaluer la voie GpVI sans mettre en jeu la GpIa/IIa.(8)

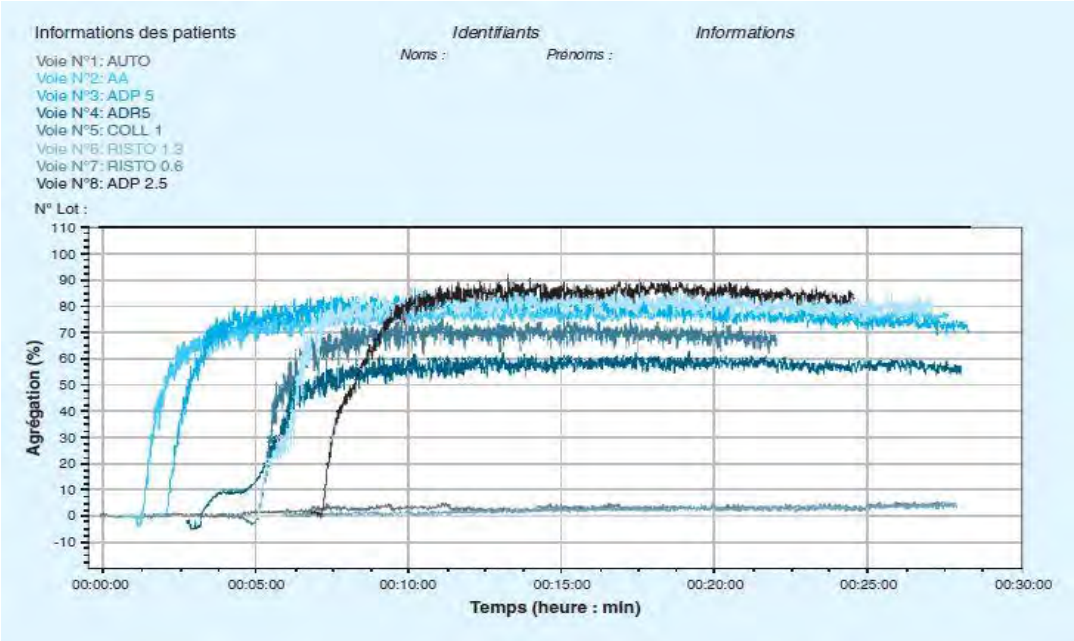

Figure 8 Profil agrégométrique normal après stimulation par différents agonistes en plasma riche en plaquettes d'après Elalamy I, Gkalea V, Gerotziafas G, Ketatni H, Hatmi M. L'exploration fonctionnelle plaquettaire : intérêts en pratique clinique. Ann Biol Clin 2013 ; 71(special 1) : 47-57 doi:10.1684/abc.2013.0905

Un dépistage d'anomalie des fonctions plaquettaires correspond à une **exploration de 1er niveau.** Au sein de notre laboratoire, nous utilisons les agonistes suivants :

- **ADP (2,5 µM, 5 µM et 10 µM)**
- **Ristocétine (1.25 mg/ml et 0.5 mg/ml)**
- **Epinéphrine (5 µM)**
- **Collagène (3,3 µg/ml)**
- **Acide arachidonique (1 mM)**

En cas de troubles cliniques de l'hémostase primaire ou d'anomalies de l'exploration plaquettaire de niveau 1, des explorations complémentaires de niveau 2 sont proposées.

Quand le premier niveau permet de mettre en évidence **un défaut plaquettaire**, le deuxième permet de **le confirmer et de le préciser** (récepteurs, voies en cause, défaut de sécrétion, d'adhésion, etc...). Pour cette exploration de niveau 2, on utilisera d'autres agonistes, à d'autres concentrations. Aussi, on fera éventuellement une étude de sécrétion granulaire, de la CMF, voire des tests d'adhésion avec le fibrinogène, des tests de rétraction du caillot. Les agonistes suivants sont utilisés pour l'exploration de niveau 2 :

- TRAP 14 (25 µM)
- Collagène (1.5 ou 10 µg/ml)
- Thromboxane A2 (5 µM)
- CRP (0,9 µg/ml)

Lors d'une anomalie d'agrégation significative détectée sur l'exploration de niveau 1, on confirme le défaut sur un prélèvement ultérieur. On refait une exploration de niveau 1 (avec les agonistes d'intérêt) et on lance une exploration de niveau 2.

Schématiquement, le TRAP 14 (25 µM) est testé en complément de l'ADP et va permettre de voir si l'anomalie est due au récepteur de l'ADP lui-même ou à un autre défaut (anomalie de sécrétion, autre voies de signalisation,...). S'il y a un défaut d'agrégation avec le Collagène (1.5 ou 10 µg/ml) on cherchera une anomalie intrinsèque de GpVI. On testera alors le CRP (0,9 µg/ml) qui stimule directement le récepteur GpVI pour écarter une prise d'AINS par exemple. Le Thromboxane A2 (5 µM) est testé si la réponse d'agrégation est anormale avec l'Acide Arachidonique (1 mM). On donne le métabolite final de la voie de signalisation plaquettaire pour shunter la voie du TXa2 et agir en aval. Si la courbe d'agrégation est toujours anormale, alors, il peut s'agir d'une anomalie sur le récepteur au TXA2.

Les agonistes de niveau 2 ne sont pas fait en systématique dans une exploration plaquettaire standard compte tenu de la précision qu'ils apportent. Ils n'ont d'intérêt à être testé qu'après un premier « screening » d'anomalies plaquettaires éventuelles. Egalement, la rareté des défauts imputables à ces agonistes ainsi que le coût du test justifie qu'ils ne soient testé qu'en seconde intention.

La CMF, la génétique et les tests complémentaires trouvent ainsi tout leur intérêt pour compléter l'ensemble des éléments et trouver le diagnostic.

I.2.2 Interprétation du test photométrique d'agrégation plaquettaire

Absence d'agrégation en réponse à l'ensemble des agonistes

Le défaut est lié à une absence ou à une **forte réduction de la liaison du fibrinogène à son récepteur plaquettaire, la GpIIbIIIα (αIIbβ3)** (cf figure1) et correspond à une **Thrombasthénie de Glanzmann** (GT).

La forme la plus fréquente de GT est celle pour laquelle il y a un déficit quantitatif de GpIIbIIIα à la surface des plaquettes. De transmission autosomique récessive, le diagnostic est dans la majorité des cas confirmé par la mise en évidence **d'une perte complète d'expression de la GpIIbIIIα** à la surface de la plaquette par cytométrie en flux et par des tests génétiques. Mais la GT peut aussi être liée à une anomalie fonctionnelle de l'intégrine αIIbβ3 (GpIIbIIIα).

C'est une maladie rare, touchant environ 500 patients en France, dont l'incidence est plus élevée dans les communautés à fort taux de consanguinité.

En France, les populations manouches sont affectées de la même mutation, dite Gypsy, (substitution c.1544 + 1G> A au niveau du site donneur d'épissage 5 'de l'intron 15), du gène ITGA2B, apparue chez un ancêtre commun il y a 300 à 400 ans. Il existe différents sous-types moléculaires, suivant que le déficit, quantifié par CMF, est **complet** (< 5 % de complexe membranaire, anciennement type I), **partiel** (5-20 % de complexe membranaire, anciennement type II) ou **qualitatif** (> 20 %, mais avec un déficit fonctionnel, dit « variant »). (11)

Le compte et la taille des plaquettes sont normaux, mais de rares variants se présentent avec une macrothrombocytopénie modérée.

La clinique est variable, les hémorragies sont de modérées à sévères, et habituellement précoce, mais sans relation véritable avec le sous-type. Les hétérozygotes, qui expriment des taux intermédiaires de complexe, ne saignent pas.

Les gènes ITGA2B et ITGB3, codent respectivement les sous-unités αIIb (GpIIb) et β3 (GpIIIa), et sont très proches l'un de l'autre. Bien qu'ils s'expriment indépendamment, le défaut d'un seul empêche la formation du complexe à la membrane. Les mutations en cause sont nombreuses (plus de 100 mutations différentes). (12) Selon la mutation, le phénotype

associe un défaut plus ou moins complet d'agrégation, un défaut de rétraction du caillot de fibrine, de stockage granulaire du fibrinogène et d'étalement des plaquettes sur les matrices extracellulaires en conditions de flux.

Le diagnostic de GT est envisageable devant un défaut d'agrégation à tous les agonistes plaquettaires, avec conservation de l'agglutination par la ristocétine. L'étude phénotypique quantitative de GpIIb (CD41) et GpIIIa (CD61) par CMF à la surface des plaquettes **est alors indispensable pour confirmer le diagnostic**.

Dans tous les cas, le diagnostic de certitude sera apporté par le **séquençage des gènes** concernés par ces pathologies (ITGA2B, ITGB3 pour la TG, FERMT3 pour le LAD-III). L'étude moléculaire doit être systématiquement proposée pour faciliter la réalisation des études familiales rendant possible le conseil génétique et le diagnostic prénatal. Elle a aussi un grand intérêt scientifique pour comprendre la relation entre la structure de l'intégrine, le phénotype biologique, clinique et concevoir des thérapeutiques ciblées.(5,13)

L'existence d'un défaut d'agrégation à tous les agonistes **avec conservation de l'expression de GpIIbIIIα** oriente vers deux possibilités.

La première **est le variant de la GT**, c'est une **anomalie qualitative de la GpIIbIIIα** entraînant un défaut d'activation plaquettaire.

La seconde possibilité est un **déficit en kindline 3 (ou leukocyte adhesion deficiency III (LAD-III)).** La kindline 3 est associée au cytosquelette et **est requise pour l'activation de la GpIIbIIIα** (cf figure 4). Pour ce déficit, l'agrégation plaquettaire est soit absente avec tous les agonistes, soit, parfois, seulement diminuée (d'environ 30 % de la normale) au TRAP et au collagène à très forte dose. Dans ce cas, l'addition de $MnCl_2$, in vitro, permet une activation de la GpIIbIIIα indépendante de la signalisation « inside-out » et corrige partiellement le défaut.

Ce défaut peut s'accompagner d'un déficit immunitaire, avec comme signes principaux une hyperleucocytose et des infections à répétition, ce qui permet de le distinguer d'un variant de GT.

Comme nous l'avons vu plus haut (cf I.1.4 agrégation plaquettaire) le passage rapide des plaquettes de l'état quiescent à l'état adhérant se fait sous l'action de stimuli activant la cascade de signalisation « inside-out » des intégrines.(13,14) La fixation de la taline et de la kindline 3 sur des régions distinctes de l'extrémité intracytoplasmique de la chaîne β des intégrines est indispensable à ce processus. La kindline 3 agirait comme coactivateur ou

comme une protéine de conformation de la taline et/ou d'une autre molécule de liaison. Son absence conduirait alors à une absence d'efficacité de la taline et se caractériserait par une dysfonction non seulement plaquettaire, mais également leucocytaire, puisqu'elle participe également à l'activation des β-intégrines leucocytaires.

Typiquement, les enfants déficitaires en kindline 3 sont issus de mariages consanguins et présentent dès la naissance des épisodes hémorragiques cutanéomuqueux spontanés sévères.

L'intensité des saignements s'explique probablement par un défaut d'activation de toutes les β-intégrines plaquettaires. Le défaut leucocytaire conduit par ailleurs, très tôt dans la vie, à l'apparition d'infections bactériennes associées à une hyperleucocytose chronique mixte à polynucléaires neutrophiles et lymphocytes. Le déficit immunitaire est cependant moins sévère que celui observé chez les patients atteints de LAD-I (déficit complet en β2-intégrines). L'association de ces défauts à la fois leucocytaires et plaquettaires est maintenant identifiée comme un déficit immunitaire primitif de l'adhésion leucocytaire de type III (LAD-III).

Ces dernières années, vingt et une mutations du gène FERMT3 (fermitin family homolog 3) codant la kindline 3 ont été rapportées chez des individus d'origine turque,(15,16) arabe(17) et maltaise,(16) aux Etats-Unis (18)et plus récemment en France, dans une famille d'origine gitane.(19) Dans tous les cas, les mutations rapportées s'associent à une **perte totale de la protéine**.

L'exploration plaquettaire de ces patients met en évidence un compte et un volume plaquettaire normaux, et **une absence d'agrégation à tous les agonistes exceptés à la ristocétine pouvant faire évoquer à tort un diagnostic de maladie de Glanzmann.**

La CMF va permettre d'étudier la capacité de αIIbβ3 à s'activer. Dans ce cas-là, l'exploration par cytométrie en flux révèle un défaut d'activation d'αIIbβ3 (GpIIbIIIα) même aux fortes doses d'agonistes car sans kindline 3 le récepteur αIIbβ3 ne peut s'activer.

La distinction entre une forme variante de TG, la LAD-III peut parfois être difficile, car l'expression à la surface du récepteur GpIIbIIIα est sensiblement normale dans ces deux situations. La distinction entre ces formes repose sur l'étude de la capacité de la GpIIbIIIα à s'activer. Il est possible de mesurer l'activation du récepteur en réponse à un agent

stimulant, par cytométrie en flux, à l'aide d'un anticorps (PAC-1) qui reconnaît uniquement la forme activée de la GpIIbIIIα ou d'étudier la fixation du fibrinogène sur celle-ci.

Dans le cas de la forme variante de TG, le récepteur GpIIbIIIα sera incapable d'adopter une conformation active quelles que soient les conditions d'activation testées puisqu'il a un défaut qualitatif intrinsèque.

Dans le cas du LAD-III, la conformation active pourra être obtenue après activation du récepteur par du manganèse (Mn2+) qui active directement le récepteur (n'a plus besoin du coactivateur la Kindline3). Par contre, même si on utilise de fortes doses d'agonistes le récepteur αIIbβ3 ne peut s'activer sans la kindline3 et on ne retrouve pas des courbes d'agrégations « normales ». (5)

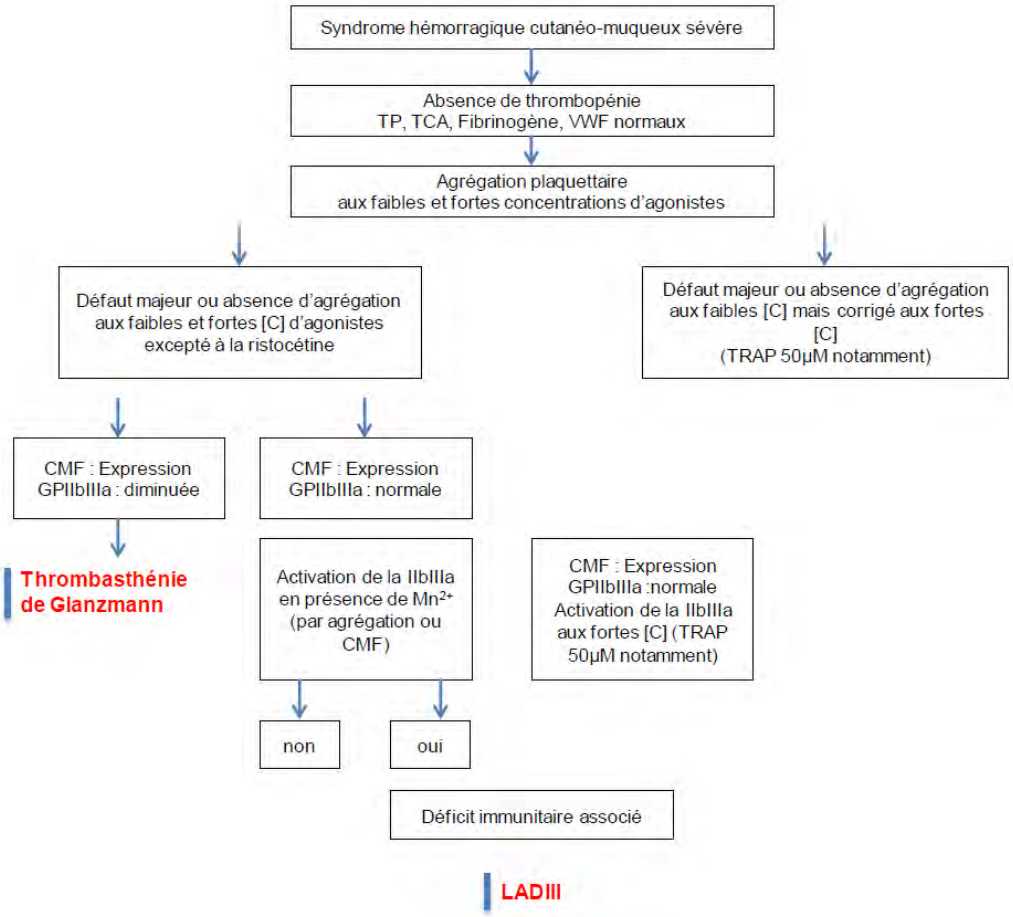

Figure 9 Algorithme diagnostique de la Thrombasthénie de Glanzmann et des pathologies plaquettaires apparentées selon l'Argumentaire du Protocole National de Diagnostic et de Soins (PNDS) du Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires Constitutionnelles / Décembre 2019

Réduction de l'agrégation en réponse à plusieurs agonistes

Anomalie de CalDAG-GEF1 (cf figure 4)

CalDAG-GEF1 un facteur d'échange de la GTPase monomérique Rap1. Rap1 est impliquée dans la signalisation « inside-out » des intégrines nécessaires à la formation d'un agrégat plaquettaire stable lors d'hémorragie. (20) Son rôle est central au sein de la signalisation plaquettaire et fortement dépendante de l'ADP (cf figure 1).

CalDAG-GEFI est recrutée à la membrane lors d'une stimulation plaquettaire et impliquée dans les phénomènes d'activation rapide en réponse à des doses d'agonistes faibles ou intermédiaires. Son activation peut être contournée par l'activation de la protéine kinase C (PKC). C'est une voie de substitution quand la stimulation est plus importante notamment aux fortes doses d'agonistes ou lors de stimulation prolongée.

Des mutations de son gène, RASGRP2 ont été décrites chez certaines races de veaux et de chiens souffrant de manifestations hémorragiques.(20,21). Il s'agit d'une mutation autosomique dominante.

Par comparaison avec LAD-III, le syndrome hémorragique, bien qu'ayant nécessité le recours à des transfusions dans l'enfance, est moins sévère et il n'existe pas d'atteinte leucocytaire.

Sur le plan biologique, l'anomalie s'apparente aux défauts de la voie P2Y12/Gi. En effet, CalDAG-GEF1 est un effecteur activé par la voie P2Y12 (cf figure1).

L'agrégation plaquettaire est fortement réduite lorsque les plaquettes sont stimulées par de faibles doses d'agonistes (ADP 2 mM, TRAP 10 mM, adrénaline 5 mM, AA 0,5-1 mM, collagène 2 mg/ml, épinéphrine). La perte de CalDAG-GEFI peut être compensée si de fortes doses d'agonistes sont utilisées comme le TRAP (50 mM), le collagène (10 mg/ml), l'AA (1,5 mM) voire l'ADP (50-100 mM) ou lors d'activation directe de la protéine kinase C (PKC) par le phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). La réponse est quasi-normale à l'AA aux concentrations usuelles (1-1.5mM) alors que l'agrégation à l'épinéphrine (25 µM) est fortement réduite. L'activation de la αIIbβ3 (GpIIbIIIα) mesurée par cytométrie en flux, est fortement réduite lorsque les plaquettes sont stimulées par de faibles doses d'agonistes (ADP, TRAP, adrénaline).(22)

Anomalie de la voie d'amplification médié par l'ADP

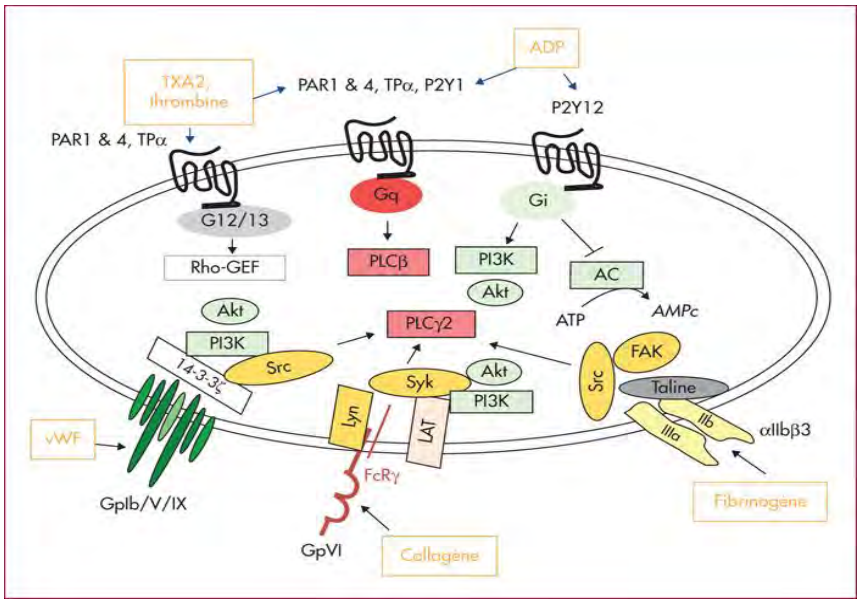

Figure 10 Principales voies de l'activation plaquettaire Marie-Christine Alessi, Bernard Payrastre, Pierre Sié. Intérêt et limites des tests d'agrégation pour le diagnostic des anomalies fonctionnelles plaquettaires constitutionnelles. Hématologie. 2017;23(5):298-311. doi:10.1684/hma.2017.1299

L'agrégation induite par l'ADP explore la voie P2Y1/Gq considérée comme une voie « starter » et la voie d'activation/amplification P2Y12/Gi. Il existe également le récepteur à l'ATP nommé P2X1, les trois récepteurs agissent en synergie (cf figure 10)

A ce jour, il n'a pas été décrit de thrombopathie constitutionnelle liée à **un déficit en P2Y1**, et seul un cas de **mutation ponctuelle du gène de P2X1** a été rapporté (l'exploration plaquettaire trouvait un défaut sélectif d'agrégation à l'ADP sans anomalie de l'agrégation à l'acide arachidonique, au TRAP et à la ristocétine). En pratique, un défaut constitutionnel d'agrégation à l'ADP en agrégométrie est lié à une **anomalie de la voie d'activation/amplification P2Y12/Gi/ IP3/Kinase/AKT/Rab1b** (cf figure 10).

Etant une voie d'amplification, un défaut sur la voie de l'ADP (quel que soit son origine) s'associe à des réponses diminuées aux faibles doses de nombreux agonistes. Les défauts d'agrégation induite par l'ADP peuvent avoir des causes multiples. Les réponses obtenues en fonction des doses d'ADP et l'association à des défauts d'agrégation initiée par d'autres agonistes vont cependant aider à l'orientation étiologique.

- *Anomalie du récepteur P2Y12*

Chez les patients porteurs d'une mutation délétère à l'état homozygote ou hétérozygote composite, **le défaut d'agrégation en réponse à l'ADP est souvent complet,** même aux très fortes doses d'ADP (100 mM). Le défaut d'agrégation est en général très net si le taux résiduel des récepteurs est inférieur à 30 %.(23,24)

Le porteur de mutation à l'état hétérozygote présentera en général un tableau intermédiaire avec une **agrégation quasi normale ou qui s'améliore aux fortes doses d'ADP.** (25,26)

L'intensité du défaut dépend du nombre et de la qualité des récepteurs P2Y12 présents à la surface des plaquettes. Les plaquettes de ces patients montrent des défauts semblables à ceux observés pour des sujets traités par un antagoniste de P2Y12 (thiénopyridines (Ticlopidine, Clopidogrel et Prasugrel) ou Ticagrelor).

Outre le défaut de réponse à l'ADP (faibles et fortes doses), ces plaquettes présentent une diminution de leur réponse aux faibles doses d'autres agonistes, (l'ADP intervient comme potentialisateur des autres voies de signalisation via P2Y12).

Dans les rares cas décrits, ces pathologies, de transmission autosomale récessive, sont liées à un défaut d'expression de P2Y12 ou à son incapacité à lier l'ADP. (27,28)

- *Anomalie de la sécrétion d'ADP*

Les maladies de Chediak-Higashi (29)**et de Hermansky-Pudlak**(30) sont des désordres autosomiques récessifs caractérisées par un déficit en granules δ et respectivement liées à des mutations sur le gène LYST ou les gènes HPS. Elles sont associées à un albinisme et selon les anomalies génétiques, d'autres anomalies sont possibles : DI (déficit immunitaire), fibrose digestive, ou pulmonaire.. Un cas de déficit en granules δ associé à un retard psychomoteur a été rapporté avec, comme autres anomalies, un défaut d'agrégation à l'épinéphrine et de sécrétion d'ATP. (31)

Un déficit en **granules denses δ de transmission autosomique dominante** peut s'observer, associé à un syndrome hémorragique modéré, sans albinisme.

Ces déficits sont de diagnostic plus difficile. Ils se caractérisent par une réduction de l'agrégation plaquettaire aux faibles doses d'agonistes dues à la réduction des rôles amplificateurs de la sécrétion granulaire. Les profils d'agrégation vont varier en fonction de la sévérité du déficit.

Dans les cas de déficit sévère, les profils d'agrégation s'apparentent au déficit en P2Y12, avec quelques nuances: le défaut d'agrégation à l'ADP 10 mM est modéré, laissant supposer qu'à cette dose la sécrétion influence peu l'agrégation induite par l'ADP lui-même. (32,33).Les réponses au collagène et au TRAP faibles doses sont réduites, ainsi que la réponse à l'épinéphrine.

Dans les déficits modérés, l'agrégation plaquettaire peut être normale ou peu perturbée.

En cas de suspicion, des méthodes complémentaires devront être mises en œuvre, notamment la mesure du contenu et de la sécrétion des granules denses (dosage de l'ATP, de la sérotonine, test à la mépacrine, expression membranaire du CD63, comptage en microscopie électronique à transmission des granules denses des plaquettes entières fixées).

Anomalie de la voie d'amplification médiée par le thromboxane A2

Lors de l'addition d'AA exogène au PRP, il est transformé en TXA2 par l'action de la COX1 et de la PGHS plaquettaire. De la même façon l'AA endogène est libérée des phospholipides membranaires par un jeu de phospholipases lors de l'activation plaquettaire par d'autres agonistes.

Le TXA2 a un effet autocrine et paracrine via TPα couplé aux protéines Gq et G12/13 (cf figure 9). Cette voie correspond à un mécanisme d'amplification essentiel pour obtenir l'agrégation aux faibles concentrations de nombreux agonistes.

Ce défaut se révèlera non seulement par un défaut de réponse à l'AA (qui peut se corriger si on augmente les doses d'AA) mais également par l'absence de deuxième vague en réponse à l'adrénaline, une absence d'agrégation aux faibles doses (2 mg/ml) de collagène et une agrégation franchement réversible à 10 mM d'ADP.

Ce défaut est le plus souvent lié à une **anomalie du récepteur TPα**, de transmission autosomique dominante, mais peut correspondre à un **défaut de conversion de l'AA exogène en TXA2**. L'utilisation d'analogues du TXA2, comme l'U46619 ou le STA2, et le dosage du TXB2 (métabolite stable du TXA2) dans le sérum permettent de distinguer ces deux mécanismes.

Dans le premier cas (34)(défaut de réponse au TXA2 par anomalie du TPα), l'agrégation induite par STA2 ou U46619 est affectée (l'agrégation se normalise parallèlement à l'augmentation des doses d'analogues). **Une liaison diminuée du TXA2 à son récepteur ou**

un défaut de couplage à la protéine Gq sans anomalie de la liaison au récepteur TP peuvent être en cause. (34,35)

Dans le deuxième cas, l'agrégation induite par les analogues du TXA2 est normale et le TXB2 sérique est très bas. Un défaut de ce type devra faire évoquer en premier lieu une **prise d'inhibiteurs de COX1 tels que des anti-inflammatoires non stéroïdiens, dont l'aspirine.**

Des mutations du gène *TBXAS1,* qui code une thromboxane synthase, ont été identifiées chez des patients atteints de dysplasie hémato diaphysaire de Ghosal (densité osseuse des diaphyses augmentée et anémie arégénérative corticosensible), associée à des défauts de réponse plaquettaire à l'AA essentiellement à faible dose alors que l'agrégation induite par le U46619 est normale.

Il n'a pas été décrit à ce jour d'anomalie des gènes de COX1 ou prostaglandine G/H synthase 1 (PGHS), bien que ce défaut ait été suggéré.

Défaut spécifique de réponse à un agoniste

Défaut d'agrégation au collagène

L'agrégation au collagène in vitro ne correspond pas à une voie d'amplification et met en jeu une signalisation spécifique en aval qui n'est pas essentielle pour les autres agonistes. Ceci explique le caractère spécifique du défaut d'agrégation. Ce défaut oriente le plus souvent vers un **déficit constitutionnel ou acquis (autoanticorps) en GpVI, de la voie de signalisation en aval de GpVI, ou encore de l'intégrine α2β1 (GpIa/IIa). L'agrégation plaquettaire peut être totalement absente ou seulement réduite, probablement en relation avec le nombre de récepteurs résiduels présents.** Le « Collagen Related Peptide » (CRP) ou peptide activateur issu du collagène et la convulxine (extraite d'un venin de serpent) sont des agonistes spécifiques de la GpVI permettant d'évaluer la voie GpVI sans mettre en jeu la voie α2β1 (GpIa/IIa). **Un déficit profond en GpIa** (15 à 25% résiduels) a été associé à une absence d'agrégation au collagène sans qu'une anomalie moléculaire de cette Gp n'ait été identifiée. **Des déficits acquis en GpIa-IIa** ont également été décrits. (36)Les défauts constitutionnels ou acquis en rapport avec les voies de signalisation en aval de GpVI sont rares. (31,37)Toutefois certaines **nouvelles thérapeutiques ciblées** (inhibiteurs de Src, de Syk ou de Btk) utilisées dans le traitement des hémopathies malignes lymphoïdes ou myéloïdes peuvent inhiber spécifiquement l'agrégation au collagène en interférant avec les voies de signalisation en aval de GpVI.

Défaut de réponse à la ristocétine

La réponse à la ristocétine n'est pas une réponse d'agrégation, mais d'agglutination en présence de facteur vWF. Les thrombopathies par anomalie du récepteur au vWF s'accompagnent d'un défaut spécifique de réponse à la ristocétine.

Dans **la maladie de Bernard et Soulier (déficit en GpIb/V/IX)**, de transmission récessive, l'agrégation à la ristocétine (>1,2 mg/ml) est réduite. C'est une pathologie très rare associant une macrothrombopénie avec plaquettes géantes à un défaut d'adhésion des plaquettes au vWF dû à une anomalie quantitative ou fonctionnelle de la chaîne Ibα du récepteur GPIb-V-IX. GPIb-V-IX est importante à la fois dans la maturation mégacaryocytaire et dans la fonction d'adhésion des plaquettes lors d'une lésion vasculaire. L'expression clinique, généralement précoce, est variable, de très modérée à sévère, et se caractérise par des saignements muqueux, des épistaxis et des hémorragies après un acte chirurgical. (31,37)Quatre protéines spécifiques de la lignée mégacaryocytaire (GpIbα, GpIbβ, GpV et GpIX) appartenant à la famille des protéines riches en leucine s'assemblent lors de la maturation du mégacaryocyte pour former le complexe GPIb-V-IX. Un assemblage adéquat de ce complexe protéique est indispensable pour que la chaîne Ibα puisse interagir avec le vWF. Des mutations sur leurs gènes respectifs empêchent la formation du complexe. Dans la majorité des cas, GPIb n'est plus exprimée à la surface des plaquettes mais dans de rares cas elle peut être exprimée sous une forme non fonctionnelle.

Plusieurs familles atteintes de thrombopénie transmise sur le mode autosomique dominant et secondaire à des mutations sur la GpIbα ont été caractérisées.

Le diagnostic repose sur la mise en évidence d'un défaut isolé d'agglutination des plaquettes du patient en présence de ristocétine. L'étude quantitative par CMF de GPIb (CD42) à la surface des plaquettes en utilisant un panel d'anticorps spécifiques et la mesure de la taille des plaquettes viendra confirmer le diagnostic.

Si on compare le profil biologique des thrombopénies de transmission autosomique dominante à celui de la maladie de Bernard-Soulier, on remarque que l'intensité de la thrombopénie est proche, mais les formes autosomiques dominantes conservent un taux peu diminué de GPIb, l'agrégation a la ristocétine est également faiblement diminuée et la macrocytose moins prononcée.

L'étude moléculaire doit être systématiquement proposée pour faciliter la réalisation des études familiales rendant possible le conseil génétique et le diagnostic prénatal.

Dans **le Pseudo-Willebrand** plaquettaire, la mutation augmente l'affinité de la GpIb/X/V pour le facteur Willebrand normal, l'agrégation à la ristocétine à faible dose (0,6 mg/ml) est présente alors qu'elle ne l'est pas dans des conditions « normales ». La pseudo-maladie de Willebrand plaquettaire résulte d'une anomalie fonctionnelle de la chaîne Ibα qui devient capable de se lier aux formes les plus polymérisées de vWF soluble et ce même en l'absence de force de cisaillement. Cette liaison spontanée entraîne un dysfonctionnement plaquettaire et une clairance accélérée des formes de haut poids moléculaire du vWF, responsables d'un syndrome hémorragique habituellement modérée. Les mutations sur le gène GpIbα affectent la zone régulatrice adjacente au domaine de liaison du vWF, ou des régions distantes. L'affection, transmise le plus souvent sur le mode dominant autosomique, est l'image en miroir du variant 2B de la maladie de Willebrand, dans laquelle le gain de fonction est liée à une mutation sur le gène du vWF. Dans les deux cas, une thrombopénie modérée avec présence de grandes plaquettes est fréquemment observée, témoignant de l'importance de l'interaction GpIb/vWF dans la maturation mégacaryocytaire.(38)

Le diagnostic différentiel avec un variant 2B de maladie de Willebrand est réalisé par l'épreuve croisée (persistance de l'agrégation à la ristocétine faible dose dans le mélange des plaquettes du patient avec un plasma normal en cas de pseudo-Willebrand plaquettaire) et le séquençage de GpIbα est fait.

Déficit en Gαs

Une tendance aux saignements a été décrite chez des patients présentant une hyperactivité de la voie Gs. Ces cas sont associés à un retard mental, à une épilepsie et à des anomalies modérées du squelette. **Le diagnostic passe par la mise en évidence d'une inhibition majorée de l'agrégation plaquettaire par les agonistes des récepteurs couplés à Gs comme la PGI2 et la PGE1. Le temps de saignement est fortement allongé.(22)**

I.2.3 Autres techniques

Well Plate-Based Light Transmission Aggregometry (WBA)

Le WBA est une variante du LTA avec une **lecture à haut débit** permise par des lecteurs de plaque (jusqu'à 96 puits) capables d'enregistrer la transmission lumineuse à travers de multiples échantillons en quelques secondes. Cela exige que les puits soient recouverts d'agonistes plaquettaires, lyophilisés ou en solution, pour permettre le déclenchement de l'agrégation après l'ajout de PRP dans chaque puit avec une pipette multicanaux. Selon le réglage du lecteur de plaque, la transmission de la lumière peut être lue soit à intervalles réguliers (en cinétique), soit à la fin d'une période fixe (en point final), ce qui permet de fournir des courbes similaires à l'ALT. Ce test est un outil prometteur pour le dépistage des troubles hémorragiques et le suivi du traitement antiplaquettaire, ainsi que pour la compréhension de la physiopathologie de base des plaquettes(39).

Whole Blood Aggregometry

L'agrégométrie sur sang total (ASA) mesure l'agrégation plaquettaire in vitro, dans le sang total. La technique est basée sur l'impédance électrique. Deux électrodes sont immergées dans du sang total dilué dans une solution saline, on ajoute des agonistes plaquettaires et on mesure l'agrégation au niveau des électrodes. L'adhésion des plaquettes activées sur les électrodes est responsable d'une variation de la différence de potentiel entre les deux électrodes et permet de déterminer le pourcentage d'agrégation. Il existe actuellement deux grands agrégomètres pour le sang total.

L'appareil Chronolog, informatisé avec deux ou quatre canaux, compatible à la fois avec un ensemble d'électrodes jetables à usage unique et des électrodes réutilisables qui nécessitent un nettoyage approfondi entre les utilisations. L'instrument le plus couramment utilisé est l'analyseur Multiplate®, semi-automatisé. Il utilise des cuvettes jetables avec des agonistes « calibrés » pour différentes applications.

Les avantages de ce test sont dus à l'utilisation du sang total comme matrice, éliminant ainsi l'activation artéfactuelle potentielle des plaquettes pendant les étapes de préparation du

PRP. Aussi ce test est plus facile et rapide d'utilisation, par rapport au LTA. Le volume sanguin nécessaire à l'analyse est aussi plus faible. Toutefois, le dosage reste influencé par un certain nombre de facteurs, notamment la numération plaquettaire et l'hématocrite, l'anticoagulant utilisé et le délai entre le prélèvement de l'échantillon de sang et l'analyse de la fonction plaquettaire.

Son utilisation en clinique est surtout axée sur la surveillance du traitement antiplaquettaire, car il existe peu de données publiées sur l'utilité de ce test dans l'étude des troubles plaquettaires héréditaires. (39) Cette méthode peut être couplé à de la bioluminescence permettant de mesurer la sécrétion granulaire d'ATP, c'est le lumiagrégomètre. L'ATP libéré des granules δ réagit avec les réactifs luciférine et luciférase (agents extraits de la luciole) qui subissent une décarboxylation oxydative et génèrent alors une émission lumineuse dans l'infrarouge. (40)

VerifyNow®

Le système VerifyNow® est peut-être le plus utilisé en routine. Il est spécialement conçu pour surveiller les traitements antiplaquettaires.

Dans le registre des dispositifs de biologie délocalisée le VerifyNow® est un système agrégométrique entièrement automatisé. Il permet avec du sang total citraté d'évaluer le temps d'agrégation des plaquettes soumises à différents agonistes chez les patients traités par antiplaquettaires dans des cartouches dédiées. Ces cartouches contiennent des billes de polystyrène recouvertes de fibrinogène et de petites quantités de sang sont alors suffisantes pour que les plaquettes fonctionnelles activées par les agonistes agrègent et induisent une variation de transmission lumineuse transcrite en unités d'agrégation plaquettaires(UAP).

Le tube de prélèvement est directement engagé dans le système pour que le sang total citraté soit aspiré et distribué dans des petites chambres d'agrégation. Il a été développé initialement pour s'assurer de l'inhibition plaquettaire des patients recevant des inhibiteurs des récepteurs GpIIbIIIα et l'association classique d'aspirine et de thiénopyridine en cardiologie interventionnelle. Sa facilité d'utilisation, sa rapidité et le fait qu'il nécessite peu ou pas d'expertise technique ont fait de ce test un test très populaire pour guider le traitement antiplaquettaire. Toutefois, des études sur de nombreux essais cliniques utilisant le test VerifyNow® pour guider le traitement antiplaquettaire rapporte qu'il n'y a pas de bénéfice clinique à l'utiliser. Néanmoins, le consensus recommande toujours l'utilisation de cette technique pour prédire les éventuels futurs événements hémorragiques.

Platelet Function Analyzer (PFA-100/200®)

L'instrument PFA-200® récemment mis à jour est un test utilisant des cartouches. Il a été conçu pour fournir un équivalent in vitro du temps de saignement.

Le sang doit être aspiré à travers une ouverture, où une membrane est recouverte d'agonistes plaquettaires. Le temps nécessaire à la formation d'un bouchon plaquettaire obstruant l'ouverture est mesuré, relevé par le système comme " temps de fermeture ".

Le test a gagné en popularité en tant qu'outil de dépistage général des troubles hémostatiques en raison de sa facilité d'utilisation, de sa rapidité, du faible volume sanguin requis et de la nécessité d'avoir peu ou pas de formation spécialisée. C'est également le seul

test de la fonction plaquettaire pour lequel un programme de contrôle qualité externe est disponible. Cependant, un certain nombre de facteurs sont connus pour affecter la performance du test, et ceux-ci doivent être pris en compte lors de l'interprétation des résultats.

Le test est inapproprié pour les patients dont la numération plaquettaire est inférieure à 50 G /L ou dont l'hématocrite est inférieur à 25 %. Les patients dont le groupe sanguin n'est pas O ont un temps de fermeture plus court que les patients du groupe sanguin O. La concentration de citrate de sodium utilisée pour l'anticoagulation de l'échantillon influence également les résultats.

La forte dépendance du test au facteur von Willebrand (due aux conditions de cisaillement élevé lorsque le sang est aspiré par l'ouverture) en fait un test intéressant pour le dépistage des pathologies plaquettaires sévères (TG et apparentés).(39)

Analyse des Plaquettes par Cytométrie de Flux

Dans un cytomètre à flux, les cellules alignées en suspension passent à travers une cellule à flux où elles sont frappées par un faisceau laser. Les détecteurs traitent la diffusion de la lumière et dans le cas d'un marquage fluorescent la fluorescence émise de chaque cellule.
Une vaste gamme d'anticorps couplés à des fluorochromes est disponible sur le marché, ciblant spécifiquement les protéines plaquettaires individuelles, les granules et les membranes lipidiques. Elle peut évaluer :

- La présence des glycoprotéines de surface (GpIIbIIIα, GpIb, autres récepteurs), ou les quantifier de manière relative,
- L'activation et la sécrétion plaquettaire induites par divers agonistes en suivant notamment
    - L'augmentation du niveau d'expression et la conformation active de GpIIbIIIα,
    - La diminution du niveau d'expression de la GpIb,
    - L'expression de CD62P (P-sélectine ou GMP140) et de CD63 (LAMP3 ou Gp53), marqueurs des granules alpha et denses respectivement,
    - L'exposition des phospholipides pro coagulants.

Cette méthode est réalisable en sang total à partir d'un faible volume de sang, même en cas de thrombopénie.
La cytométrie de flux est un outil puissant, en constante évolution pour étudier de nombreux aspects de la biologie et de la fonction plaquettaire. De plus, le test est activement développé pour évaluer la fonction plaquettaire chez les patients atteints de thrombocytopénie, car il est réalisé indépendamment de la numération plaquettaire. Des efforts ont été faits pour normaliser son utilisation dans l'étude de la fonction plaquettaire, mais l'homogénéisation inter-laboratoire des pratiques reste un défi. (22)

II Place de la qualité au sein du Laboratoire d'analyse médicale

II.1 Origines et historique de la qualité au sein du Laboratoire d'analyse médicale

Dans les années 70-80, on voit apparaitre les premières formalisations de la qualité dans le monde de la santé. **Le Laboratoire National de la Santé** est créé et **le contrôle national de qualité (CNQ) des analyses de biologie médicale** est rendu obligatoire par le décret du 7 décembre 1978. D'après l'ANSM, il « est une évaluation externe de la qualité des examens de biologie médicale réalisée au niveau national. Il consiste en la comparaison des résultats d'un examen de biologie médicale, réalisé par l'ensemble des Laboratoires d'analyse médicale, sur un même échantillon. »

A cette même période, certains laboratoires volontaires montent des associations pour permettre la mise en place du contrôle qualité au sein de leur établissement.

Puis en 1983, **le contrôle de bonne exécution des analyses de biologie médicale et ses modalités** font leur apparition et sont définis par le décret 83-104. Ce contrôle est réalisé par des inspecteurs de la santé et de la pharmacie avec l'aide de biologistes experts.

Cette première approche de la qualité fut très limitée faute de référentiels définissant les exigences et les objectifs à atteindre.

II.1.1 Guide de Bonne Exécution des Analyses de biologie médicale (GBEA)

En 1994, est apparu **le Guide de Bonne Exécution des Analyses de biologie médicale (GBEA),** premier texte réglementant les pratiques professionnelles des laboratoires d'analyse médicale tant privés que publics. Ce guide retrouvé en annexe de l'arrêté ministériel du 2 novembre 1994 a été révisé en 1999 et 2002. Il est un premier pas vers la notion d'assurance qualité. En effet, d'après le GBEA, la « recherche de la qualité doit être la préoccupation essentielle et constante du biologiste et de l'ensemble du personnel du laboratoire » (41).

Cinq ans après sa publication, le GBEA a été modifié par l'arrêté du 26 novembre 1999 publié au journal officiel du 11 décembre 1999 afin d'introduire des évolutions telles que la gestion des équipements et des réactifs, la métrologie, l'informatique, le transport des échantillons

et la mise en place de techniques de biologie moléculaire. Il permet de formaliser par écrit les procédures opératoires.

Le référentiel actuellement en vigueur est fixé par l'arrêté du 26 avril 2002. Ce dernier s'articule autour de plusieurs chapitres :

-Les règles de fonctionnement sur l'organisation, l'installation avec l'aménagement, l'entretient, la sécurité, ou encore l'élimination des déchets. D'après le GBEA « La qualité ne dépend pas seulement de l'analyse proprement dite, mais aussi de l'organisation générale du laboratoire ».

-Plusieurs points sont abordés tels que la gestion des échantillons, l'identification, la validation et l'expression et la transmission des résultats.

-Un chapitre est consacré à l'assurance qualité mais le guide reste très succinct et peu directif sur le sujet. Il aborde principalement la notion de contrôle qualité avec l'Evaluation Externe de la Qualité (EEQ) et la présentation des Contrôles de Qualité Interne (CQI).

-Des directives concernant les recherches biomédicales, ainsi que des « dispositions législatives et réglementaires relatives à l'exercice en Laboratoire d'analyse médicale de statut privé » sont aussi retrouvés dans le GBEA.(41)

II.1.2 Le manuel d'accréditation des établissements de santé de l'ANAES

En 1996, **le premier manuel d'accréditation** de l'Agence National d'Evaluation en Santé (ANAES) a été introduit au sein du système de santé français par l'ordonnance n°96-34.

Ce manuel va plus loin qu'une simple démarche qualité, en intégrant les mots accréditation et autoévaluation, afin que chaque Laboratoire d'analyse médicale s'assure que les procédures en vigueur sont écrites, vérifiées, approuvées, et mises en œuvre par le personnel.

L'accréditation est définie par l'ANAES comme « une procédure d'évaluation externe à un établissement de santé, effectuée par des professionnels, indépendante de l'établissement de santé et de ses organismes de tutelle, concernant l'ensemble de son fonctionnement et de ses pratiques. Elle vise à s'assurer que les conditions de sécurité et de qualité des soins et de prise en charge du patient sont prises en compte par l'établissement de santé.»(42)

Le GBEA et le manuel d'accréditation de l'ANAES (spécifiquement français) sont complémentaires. Ce manuel s'applique à l'ensemble de l'organisation hospitalière, et met l'accent sur les relations existantes entre les différentes structures et activités. De plus, elle place le patient au centre des préoccupations à l'aide de trois référentiels : « le patient et sa prise en charge », « management et gestion au service du patient » et « qualité et prévention ».

En 2005, les activités de l'ANAES ont été reprises par l'HAS (Haute Autorité de Santé), qui est alors définie comme une « autorité publique indépendante à caractère scientifique dotée de la personnalité morale ».

Le manuel de certification actuellement en vigueur est celui de 2014 dont les références 21 a et 21 b concernent les Laboratoires d'analyse médicale.(43)

II.1.3 Les démarches qualités volontaires

En 1979, l'ISO : International Organisation for Standardization met en place **le comité Technique (TC 176)** en charge de **l'élaboration des normes sur le management et l'assurance qualité.** Le but recherché par la création d'un référentiel **international** est de faciliter les relations entre client et fournisseur. La biologie médicale a été intégrée à ce processus international de normalisation (via l'ISO TC 212).

Certaines de ces normes sont applicables aux Laboratoires d'analyse médicale sur la base du volontariat : c'est le cas de la **norme ISO 9001**, non spécifique à la biologie médicale. Elle évalue l'organisation **du système qualité** et non les compétences techniques sur la réalisation des examens biologiques. Puis la norme **NF EN ISO/CEI 1702** : 2005 fut créée, norme internationale satisfaisant les exigences générales concernant la **compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais**. Elle assure d'un système de management conforme aux exigences de la norme ISO 9001 et apporte la preuve des compétences techniques. En 2003, en France, sur 4000 laboratoires privés et publics, 60 étaient accrédités selon cette norme et 91 en 2005. Cette norme s'avéra incomplète car elle ne concernait que la phase analytique de l'examen de biologie médicale. Les biologistes participent donc en Octobre 2003, à l'élaboration **de la norme ISO 15189** qui concerne **spécifiquement et la totalité des étapes de l'examen de biologie médicale (pré-analytique, analytique et post analytique).**

II.2 La réforme de la biologie médicale

II.2.1 Le rapport initial de l'Inspection Générale des Affaires Sociales (IGAS)

En 2006, l'IGAS dresse un état des lieux de la biologie médicale privée, trente ans après la dernière réforme datant du 11 juillet 1975. Elle dresse un rapport intitulé : « La biologie médicale libérale en France : bilan et perspectives »(44). Cette enquête et évaluation de la biologie médicale a été proposée au ministère de la santé afin de décrire l'existant et d'envisager des axes d'actualisation et d'amélioration.

Ce rapport fait remarquer que la biologie médicale a subi de nombreuses transformations depuis ces trente dernières années. Une des évolutions majeures est l'automatisation des laboratoires. Les méthodes manuelles d'analyse sont remplacées par des réactifs et des automates de plus en plus performants.

D'après l'IGAS, les principaux éléments susceptibles de justifier le coût élevé des actes de biologie et les particularités de notre dispositif sont la qualité des examens, la proximité, et plus généralement le service rendu au patient. Mais ce rapport tend à montrer que le biologiste ne maîtrise pas la totalité des processus qui compose l'examen biologique tel que le prélèvement ou la qualité des automates et que les délais de rendus des résultats et la présence des biologistes sont variables selon les laboratoires.

L'IGAS a soulevé une **forte inégalité dans l'effort produit par les biologistes pour « assurer la qualité » au sein des laboratoires.** La participation à la formation continue est relevée « insuffisante ».

Un autre constat de l'IGAS est **la grande dispersion des laboratoires** sur le territoire français ainsi que l'omniprésence des laboratoires de petite taille. Alors que « la notion de laboratoire de proximité n'existe pratiquement nulle part ailleurs » elle reste très présente en France. Ce constat émane de la réglementation qui permet la liberté d'installation ..

Le rapport signale aussi que « les laboratoires ayant un fonctionnement à risques ne sont pas amenés à modifier leur pratique car les inspections ne sont pas en nombre suffisant, et les manquements sérieux à la qualité sont rarement sanctionnés ».

Face à tous ces constats l'IGAS conclut sur le fait que « la loi du 11 juillet 1975 n'est plus adaptée aux enjeux actuels, notamment ceux de la qualité et de la compétitivité et qu'une réforme de l'ensemble du système est indispensable » (44).

II.2.2 Le rapport Ballereau : « Rapport pour un projet de réforme de la biologie médicale »

Le Docteur Michel Ballereau, conseiller général des établissements de santé en 2008, pose les premières bases de la réforme de la biologie médicale. Suite au rapport de l'IGAS, il a été mandaté par le ministère de la santé afin de proposer cette réforme.

Roselyne Bachelot-Narquin explique dans sa lettre de mission que « la biologie a été confrontée ces dernières années à de nombreuses évolutions internes et externes: évolutions des connaissances médicales, automatisation des techniques, assurance et contrôle qualité, impact de la législation européenne» et qu'il est temps « d'envisager une évolution substantielle de l'encadrement juridique de cette discipline» afin de garantir la sécurité des soins et un plus haut niveau de qualité pour les examens. (45)

Pour la réalisation de ce rapport, Michel Ballereau s'est entouré de représentants des professionnels de la biologie médicale, des Ordres professionnels, de l'administration et de divers cabinets ministériels.

La réforme de la biologie médicale proposée dans ce rapport marque « le passage d'obligations de moyens à des obligations de résultats tournées vers le patient ». Il devient impératif « qu'un patient qui se rend dans un laboratoire de biologie médicale soit assuré de la qualité des résultats ». Le rapport propose donc une nouvelle orientation : celle de la « qualité prouvée » en **rendant obligatoire l'accréditation à tous les Laboratoires d'analyse médicale privés comme publics selon la norme NF EN ISO 15189.**

II.2.3 L'ordonnance relative à la biologie médicale et la loi HSPT

Pour faire face aux insuffisances et aux incompatibilités en matière de santé publique relevées ces dernières années, la loi « Hôpital Patient Santé Territoire » n°2009-879 est votée le 21 juillet 2009. Cette loi est une réforme en profondeur du système de santé français.

L'article 69 de cette loi porte sur la biologie médicale dont l'une des missions est de garantir la qualité des examens de biologie médicale, notamment par une procédure d'accréditation des laboratoires.

Cet article sera suivi six mois plus tard, d'une ordonnance proposée par la Ministre de la santé le 13 janvier 2010. L'ordonnance, n°2010-49 devient la nouvelle référence en matière de réglementation.

Elle fournit ainsi une nouvelle définition de la **biologie médicale.** Elle est considérée comme un **« acte médical ». L'interprétation du résultat et l'analyse des données cliniques sont intégrées à l'examen de biologie médicale. Le biologiste devient garant du résultat rendu vis à vis du patient.**

De plus, la réforme tend à harmoniser les règles de fonctionnement des LBM entre le secteur privé et le secteur public. Elle **autorise et encourage le regroupement des laboratoires** afin de créer des laboratoires multi-sites (LBMMS). (46)

Le rapport Ballereau signait les prémisses de la « qualité prouvée », l'ordonnance quant à elle, institue un régime d'accréditation obligatoire pour tous les Laboratoires d'analyse médciale. Elle modifie le Code de la Santé Publique et notamment l'Article L6221-1 qui stipule à présent : « **Un laboratoire de biologie médicale ne peut réaliser d'examen de biologie médicale sans accréditation** » (46).

Cette accréditation concerne l'ensemble des laboratoires, privés et publics, universitaires et non universitaires, afin de renforcer la qualité et la sécurité des examens. Celle-ci se fera selon les normes ISO 15189 et ISO 22870. L'ordonnance définit également le caractère obligatoire de la participation au CNQ des résultats des examens de biologie assurés par l'ANSM et aux EEQ, et toute anomalie sera immédiatement remontée à l'ARS par les organismes d'évaluation externes (OCIL). (14)

II.2.4 La loi du 31 mai 2013 relative à la réforme de la biologie médicale

La loi du 31 mai 2013 n° 2013-442 portant sur la réforme de la biologie médicale ratifie l'ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale et **fixe les objectifs de l'accréditation.**

La loi prévoit la présence d'un biologiste médical sur les sites afin que sur chacun des sites: « un biologiste du laboratoire doit être en mesure de répondre aux besoins du site et, le cas échéant, d'intervenir dans des délais compatibles avec les impératifs de sécurité des patients. Pour assurer le respect de cette obligation, le laboratoire doit comporter un nombre de biologistes médicaux au moins égal au nombre de sites qu'il a créés. Le biologiste assumant la responsabilité du site doit être identifiable à tout moment. » (47)

Une nouvelle date limite et un nouveau calendrier progressif de l'accréditation des Laboratoires d'analyse médicale jusqu'en 2020 sont fixés. En effet la loi du 31 mai 2013 prévoit que « jusqu'au 31 octobre 2020, aucun laboratoire de biologie médicale non accrédité, au sens de l'article L. 6221-1 du code de la santé publique, ne peut fonctionner sans respecter les conditions déterminées par un arrêté du ministre chargé de la santé relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale. (...) L'autorisation peut être retirée lorsque les conditions de sa délivrance cessent d'être remplies. » (47)

Depuis le 20 mars 2020, compte tenu du contexte pandémique du au SARS-CoV-2, la Haute Autorité de santé à pris la décision de reporter le lancement de la procédure de certification V2020. L'obligation d'accréditation de 100% des examens au 1er novembre 2020 est levée (cf article 23 de la loi n°2020-734 du 17 juin 2020 relative aux diverses dispositions liées à la crise sanitaire). **Toutes les lignes de portées ou demande d'extension formulées doivent être accréditées pour le 1er mai 2021.**

Enfin d'autres points sont abordés tel que la régulation de l'implantation des Laboratoires d'analyse médicale par les ARS, l'aménagement de l'accréditation pour la biologie médicale hors métropole ou la nomination dans les CHU, la facturation des actes au tarif des actes de biologie médicale fixé par la sécurité sociale.

II.3 L'accréditation au sein du Laboratoire d'analyse médicale

Selon l'AFNOR : Agence Française de Normalisation : « L'accréditation est une procédure selon laquelle un organisme tiers, faisant autorité, fournit une reconnaissance formelle de la compétence d'une personne ou d'un organisme à réaliser des activités spécifiques d'évaluation de la conformité ».

L'accréditation est à différencier de la certification qui est une attestation de conformité, une procédure par laquelle une tierce partie donne une assurance écrite qu'un produit, un processus ou un service est conforme aux exigences spécifiées. C'est un gage de confiance pour les clients reconnaissant ainsi un système de qualité global pour l'entreprise (normes de la série ISO9001…). La certification atteste la conformité aux exigences du référentiel, l'accréditation est la preuve de la compétence technique.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'accréditation des laboratoires de biologie médicale n'est pas une nouveauté; elle existait déjà à travers les démarches de qualité volontaires, c'est son caractère obligatoire qui l'est et ce depuis 2010 avec l'ordonnance n°2010-49. L'accréditation s'inscrit dans la réforme de la biologie médicale. Elle est un système mis en place par les pouvoirs publics dans le but de délivrer des jugements impartiaux lors de l'évaluation et de l'inspection des Laboratoires d'analyse médicale. De plus, elle est une activité d'évaluation de la conformité à but non lucratif, sans objectifs commerciaux, afin d'être complètement indépendante.

Cette accréditation touche toutes les phases de réalisation de l'examen de biologie médicale : la phase pré-analytique, le recueil des éléments cliniques pertinents, le transport, phase analytique, la phase post-analytique, la validation biologique et l'interprétation du résultat.

II.3.1 Le COFRAC

L'accréditation est fournie par l'organisme national d'accréditation. Il existe un seul organisme par pays. En France, il s'agit du Comité Français d'Accréditation (COFRAC).

Le COFRAC, créé en 1994, a été désigné comme **unique instance nationale d'accréditation** par le décret du 19 décembre 2008, reconnaissant ainsi l'accréditation comme une activité de puissance publique.

C'est une association à but non lucratif, à qui a été confiée une mission de service public : celle de s'assurer de la compétence, de l'impartialité et de la rigueur des organismes de contrôle. Il est du ressort du Laboratoire d'analyse médicale de réaliser une demande d'accréditation auprès du COFRAC afin de l'obtenir. (48)

L'EA ou European cooperation for Accreditation, est une association à but non lucratif, créée en 1994, qui regroupe tous les organismes d'accréditation européens. Elle assure la mise en place d'un système d'audits « croisés » entre les différents organismes d'accréditation européens afin d'assurer «la reconnaissance internationale de l'accréditation ». Une accréditation en France est donc reconnue en Europe et dans le monde.

II.3.2 Le processus d'accréditation

Le processus d'accréditation auquel sont soumis les Laboratoires d'analyse médicale est standardisé.

Après dépôt du dossier de demande d'accréditation au COFFRAC une première visite d'évaluation aura lieu suivie de trois évaluations de surveillance. Une première réévaluation a lieu quatre ans après la première visite. L'accréditation est ensuite renouvelée tous les cinq ans avec trois visites de surveillance entre chaque renouvellement.

Les évaluations sont réalisées par des « pairs », c'est à dire des experts techniques. Ces auditeurs sont des biologistes médicaux avec une forte expérience en qualité. Ils sont accompagnés par des évaluateurs qualiticiens missionnés par le COFRAC.

Une fois les audits réalisés, des rapports d'évaluation sont réalisés présentant les écarts à la Norme relevés, ceux-ci pouvant être contestés par les Laboratoires d'analyse médicale si cela est dûment justifié.

Ces rapports sont ensuite présentés au Comité Technique d'Accréditation (CTA) composé de personnes indépendantes et n'ayant pas été auditeurs. C'est au directeur général du COFRAC que revient la décision finale d'accréditation. En cas de non accréditation, il en informe l'HAS, l'ANSM et l'ARS.

II.3.3 Avancement des démarches d'accréditations en Europe

L'enquête menée par le Cofrac au printemps 2019 avait pour **but d'actualiser l'avancement de la démarche d'accréditation des laboratoires médicaux en Europe**, la dernière enquête datait de mi-2016. Trente-quatre organismes nationaux d'accréditation (OA), membres du groupe de travail « Healthcare » d'EA (European cooperation for Accreditation), ont été sollicités. Quatre-vingts quatorze pour cent d'entre eux (32 OA) ont répondu : Allemagne (DAkkS), Autriche (AA), Belgique (BELAC), Biélorussie (BSCA), Chypre (CYS-CYSAB), Croatie (HAA), Danemark (DANAK), Espagne (ENAC), Estonie (EAK), Finlande (FINAS), France (COFRAC), Géorgie (GAC), Grèce (ESYD), Hongrie (NAH), Irlande (INAB), Italie (ACCREDIA), Lettonie (LATVIA), Lituanie (LA), Luxembourg (OLAS), Macédoine du Nord (IARNM), Malte (NAB MALTA), Moldavie (MOLDAC), Norvège (NA), Pays-Bas (RvA), Pologne (PCA), Portugal (IPAC), République Tchèque (CAI), Royaume-Uni (UKAS), Serbie (ATS), Suède (SWEDAC), Suisse (SAS) et Turquie (TURKAK).

Norme utilisée pour l'accréditation des laboratoires médicaux

Cinquante-neuf pour cent des OA ont répondu utiliser uniquement la norme **EN ISO 15189**. Vingt-cinq pour cent des OA ont répondu utiliser les normes **EN ISO 15189 et EN ISO/IEC 17025** avec une préférence pour l'EN ISO 15189. Cette situation n'a pas évolué depuis 2016.

Nombre de laboratoires médicaux accrédités ou engagés dans le processus d'accréditation

Globalement, la situation est stable depuis 2016 avec plus de 3200 laboratoires médicaux accrédités au moins pour une partie de leur activité (hors Roumanie et Slovaquie, pays pour lesquels les données sont absentes). Dans certains pays comme l'Allemagne, la Grèce, la Lettonie, la Finlande, la Macédoine du Nord ou l'Italie, le **nombre a fortement augmenté**. Cette augmentation est par exemple due en Lettonie ou en Italie au fait que l'accréditation a été rendue obligatoire pour tout ou partie de l'activité des laboratoires médicaux.

Dans d'autres pays comme la France ou la Suisse, **ce nombre a diminué** en raison du processus de regroupement des laboratoires. Le processus d'accréditation européen reste dynamique car même dans les pays où le nombre de laboratoires médicaux accrédités n'augmente pas ou diminue, le pourcentage de laboratoires médicaux ayant engagé un processus d'extension de leur portée d'accréditation peut être important comme en Irlande (67%), en Belgique (65%), au Luxembourg (56%), en Suède (51%) ou en France (43%).

Le nombre et la structure des laboratoires médicaux pouvant être très différents d'un pays à l'autre, les OA ont été sollicités sur le pourcentage que représente les laboratoires médicaux accrédités par rapport à la totalité des laboratoires médicaux. Ce sont des estimations partielles car les OA n'ont pas toujours cette visibilité. Néanmoins, il est possible de constater que :

- Pour 6 pays (France, Royaume-Uni, Irlande, Pays-Bas, Danemark et Lettonie) **plus de 80% des laboratoires médicaux sont accrédités au moins pour une partie de leur activité.**
- Pour 3 pays (Belgique, Luxembourg et République Tchèque), ce pourcentage est compris **entre 50 et 79%.**
- Pour 12 pays, ce pourcentage représente **moins de 10%** de l'ensemble des laboratoires médicaux.

Les OA ont également été sollicités sur la structure des laboratoires médicaux accrédités, sous l'angle du pourcentage de laboratoires médicaux multi-sites accrédités et du nombre de sites couverts par la portée d'accréditation. La France dispose du plus grand pourcentage de laboratoires médicaux multi-sites accrédités (57). La situation est assez hétérogène en Europe et se confronte à la difficulté d'une définition non harmonisée de la notion de « site » et en conséquence d'une approche multi-site différente.

Les laboratoires médicaux hospitaliers sont en général engagés dans la démarche d'accréditation. Ils peuvent représenter dans certains pays plus de 60% de l'ensemble des laboratoires médicaux accrédités.

Activité couverte par l'accréditation

Si le nombre et la structure des laboratoires médicaux accrédités peuvent être très différents d'un pays à l'autre, l'activité couverte par la portée d'accréditation peut également être très variée. La chimie clinique (97%), l'immunologie (97%), la microbiologie clinique (88%), l'immunohématologie (84%) et la génétique humaine (84%) arrivent en premier.

Contexte de l'accréditation

Trente-quatre pour cent des OA, dont la France, prennent en compte des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires médicaux. Ces exigences peuvent venir de la réglementation nationale mais également d'ordres professionnels (ex : Allemagne) ou de sociétés savantes (ex : Pays-Bas). Dans beaucoup de cas, il s'agit d'exigences relatives à la formation et à la qualification du personnel ou aux contrôles de qualité.

Seuls 3 pays, la France, la Hongrie et la Lettonie, ont rendu l'accréditation obligatoire pour l'ensemble des laboratoires médicaux sur la totalité de leur activité.

Neuf pays disposent d'une accréditation obligatoire pour certaines activités : c'est le cas de la Belgique (examens de biologie moléculaire, examens de génétique), de l'Irlande (transfusion sanguine), de la République Tchèque (examens de génétique constitutionnelle) ou encore de l'Italie (laboratoires de la province de Trento pour certains examens).

Dans les 20 autres pays, il n'y a aucune obligation légale d'accréditation.

Cependant aux Pays Bas et au Luxembourg, l'accréditation est fortement recommandée par les compagnies d'assurance dans le cadre du remboursement des examens. Dans ces 2 pays et dans 16 autres (56%), **l'état dispose d'un système de surveillance de la qualité des laboratoires médicaux**, souvent par le biais des évaluations externes de la qualité. Parfois, comme en Belgique, en République Tchèque ou en Lituanie, ce système s'appuie sur des inspections ou des audits.(49)

III.Étude

III.1 Matériels et Méthodes

III.1.1 Matériels : Documentations du COFRAC

Les documents utiles à l'accréditation sont disponibles sur le site internet du Cofrac dans la section « santé humaine ». Il s'agit des documents de référence (REF), des guides techniques d'accréditation (GTA), des formulaires (FORM), des documents d'information (INF). Ces documents sont mis à jour régulièrement et seule la version électronique fait foi. Les GTA sont les principaux documents nécessaires pour la réalisation des vérifications/validations de méthode en biologie médicale. Les recommandations présentées dans ces guides sont celles reconnues comme étant les plus appropriées par le Cofrac pour répondre aux exigences de la norme NF EN ISO 15189. Toutefois, l'application des recommandations des GTA n'est pas obligatoire. Le Laboratoire d'analyse médicale garde la possibilité de répondre d'une autre manière aux exigences du référentiel mais toute autre démarche doit être argumentée et documentée. Dans tous les cas, le laboratoire devra démontrer que les dispositions prises permettent de satisfaire les exigences de la norme.
Ces guides s'adressent aux Laboratoires d'analyse médicale mais aussi aux auditeurs du Cofrac en tant que base d'harmonisation, aux membres des instances du Cofrac et aux fournisseurs afin de les aider à comprendre et accompagner les laboratoires dans leur démarche.

Les documents nécessaires pour notre validation de méthode sont les suivants :

SH REF02 révision 05 « Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale selon la norme NF EN ISO 15189 : 2012 » (50)

Le SH REF 02, révisé en juin 2016, a pour objet **de préciser les exigences organisationnelles et techniques générales nécessaires pour la réalisation des examens de biologie médicale.**

Des dispositions législatives et réglementaires citées dans ce guide concernant la qualité des pratiques en biologie médicale complètent les exigences de la norme NF EN ISO 15189 (version 2012). La satisfaction de ces exigences est la condition de l'accréditation des laboratoires de biologie médicale. Leur non-respect constitue un écart.

SH GTA 01 « Guide technique d'accréditation en biologie médicale »(51)

Le SH GTA 01 « Guide technique d'accréditation en biologie médicale »**,** révisé en avril 2015, présente un état des lieux des bonnes pratiques et **établit certaines recommandations** préconisées par le Cofrac pour l'accréditation en biologie médicale.

SH REF 08 « Expression et évaluation des portées d'accréditation » (52) et SH INF 50 « Portée type d'accréditation » (53)

Le document SH REF 08, applicable depuis le 3 mars 2017, a pour objet de **présenter le mode d'expression de la portée d'accréditation des Laboratoires d'analyse médicale et leurs modalités d'évaluation** par le Cofrac.

Le document SH INF 50, applicable depuis mars 2017, **présente les portées-types recensant les examens de biologie médicale**. Ces examens sont classés selon la thématique de la section santé humaine (domaines - sous-domaines - familles) dans le but de faciliter et d'harmoniser l'expression des portées d'accréditation.

SH GTA 04 « Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) validation (portée B) des méthodes en biologie médicale » (54)

L'accréditation d'un Laboratoire d'analyse médicale passe forcément par cette étape qui permet d'avoir une bonne connaissance des méthodes d'analyse, de ses performances et de ses limites. **L'objectif est de s'assurer que ses performances sont suffisantes pour assurer la fiabilité des résultats d'analyse et par conséquent des interprétations cliniques du prescripteur.**

Ce guide, applicable depuis avril 2015, décrit les deux phases d'une validation de méthode : **la phase initiale, avant sa mise en œuvre effective en routine, puis la phase de vérification continue et de confirmation des performances,** dans le cadre du fonctionnement quotidien du laboratoire.

La première phase correspond à la validation/vérification de méthode et la seconde phase est relative à la gestion des contrôles de qualité. La démarche à suivre est entièrement détaillée dans ce document.

SH GTA *06 « Guide technique d'accréditation : contrôle de qualité en biologie médicale »(55)*

Le SH GTA 06, applicable depuis le 1er juillet 2012, constitue **un guide pratique d'aide à la mise en place des contrôles qualité**. Le contrôle de qualité constitue un moyen de vérification continu de la maîtrise du processus analytique pour le couple équipement-réactif. L'objectif est d'apporter une confirmation et une preuve permanente de la validité des résultats rendus.

Le guide **décrit les critères de performances évaluables grâce aux résultats des contrôles de qualité, ainsi que les modalités de choix des critères d'acceptabilité**. On présente ensuite les différents types de contrôles de qualité pour les méthodes quantitatives et qualitatives, avec les modalités de leur mise en place dans le laboratoire.

SH GTA14 « Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale »(56)

L'objet de ce document est de **définir la méthodologie permettant de démontrer la maîtrise de la qualité des résultats d'analyse quantitative en évaluant l'incertitude de mesure**. L'incertitude associée à ce résultat permet une meilleure évaluation en confortant le diagnostic et la prise de décision thérapeutique. Le présent guide technique définit des méthodes d'évaluation de l'incertitude de mesure qui permettent de répondre à l'exigence du paragraphe §5.6.2 de la norme NF EN ISO 15189 qui stipule que : "le laboratoire doit déterminer l'incertitude des résultats, dans les cas où cela est pertinent et possible.

SH FORM43 « Fiche type de vérification et validation de méthode de biologie médicale »(57)

Le SH FORM 43 est un **modèle de présentation d'une validation de méthode**. C'est un tableau pré rempli structurant tous les paramètres pour maîtriser et valider notre méthode selon les exigences de la norme ISO 15189. Il permet une présentation homogène de toutes les validations de méthode.

III.1.2 Méthodes : Critères de validation de méthode

Choix de la portée

Les demandes d'accréditation d'un laboratoire sont classées en 2 catégories.

Portée A : La validation des méthodes pour un Laboratoire d'analyse médicale sera réduite à une « vérification » sur site. Elle a pour objectif de montrer que des performances suffisantes sont atteintes dans les conditions de travail du laboratoire (conditions ambiantes, personnel, équipements, etc.). La grande majorité des Laboratoires d'analyse médicale adopte des méthodes reconnues (DM-DIV marqués CE ou méthodes « fournisseur ») qui sont a priori validées dans leur domaine d'application. La majorité des analyses sera accréditée selon ce type de portée. C'est une simple vérification des performances annoncée par le fournisseur.

Portée B : Il s'agit d'une « validation » de la méthode adaptée ou développée. Dans ce cas, le laboratoire établit l'ensemble des critères de la qualité de la méthode afin d'en démontrer la maîtrise et d'en assurer la validation. C'est notre cas pour le test d'agrégation plaquettaire. En effet, nos réactifs ne sont pas certifiés CE (Conformité Européenne) et il n'existe pas de « trousse » fournisseur qui propose des performances. Il s'agit d'une « méthode maison ».

Analyse des risques

Afin de gérer nos paramètres critiques nous avons réalisé une maîtrise des risques avec la méthode des 5M (cf annexe 2). Le point le plus critique de notre méthode concerne la **phase pré-analytique.** Il existe de nombreuses causes potentiellement responsables d'artefacts et de biais compromettant la fiabilité des résultats. Le respect rigoureux des conditions pré- et per-analytiques est indispensable et constitue un préalable incontournable à toute exploration fonctionnelle plaquettaire.(8)

Les étapes pré-analytiques pour les tests d'hémostase en général ont été décrites en France par le Groupe d'études sur l'Hémostase et la Thrombose (GEHT) en 2001. (58) Face au manque de standardisation des pratiques pour le TAP (paramètres de centrifugation, nature et concentration des agonistes) le *Clinical and Laboratory Standard Institute*, organisation multidisciplinaire à but non lucratif, a publié, en 2008, des recommandations internationales sur les procédures à utiliser. (59)

Cette technique d'hémostase spécialisée, requiert du personnel qualifié et compétent. Elle est chronophage et exigeante. Près de deux heures sont nécessaires pour explorer la qualité fonctionnelle des différentes voies plaquettaires. Elle exige aussi de grandes quantités de sang par patient sang total parfois difficilement prélevables dans des contextes d'âge extrême ou de patients cancéreux thrombopéniques, par exemple. La préparation de l'échantillon et des réactifs se fait manuellement. Les conditions nécessaires retenues pour satisfaire les exigences pré-analytiques sont les suivantes selon le comité du SSC/ISTH (Scientific and Standardization Committee/The International Society on Thrombosis and Haemostasis).

Pour la variabilité pré-analytique patient-dépendante,

1. Les échantillons de sang nécessaires pour le LTA doivent être prélevés chez le sujet après une courte période de repos pour atténuer l'effet de l'adrénaline sur l'agrégation plaquettaire induite par l'exercice.
2. Les échantillons de sang nécessaires pour le LTA doivent être prélevés sur des sujets qui s'abstiennent de fumer pendant au moins 30 minutes.
3. Les échantillons de sang nécessaires pour le LTA doivent être prélevés sur des sujets qui s'abstiennent de consommer de la caféine pendant au moins 2 h.
4. La liste de toutes les drogues que le sujet a consommées dans la semaine précédant le test doit être faites.
5. Tout traitement par des médicaments connus pour inhiber de manière réversible les plaquettes (par exemple, les AINS) doit être arrêté au moins 3 jours avant le prélèvement.
6. Tout traitement par des médicaments connus pour inhiber de manière irréversible la fonction plaquettaire (par exemple aspirine, thiénopyridines) doit être arrêté au moins 10 jours avant le prélèvement
7. Lorsque le traitement par des médicaments qui inhibent la fonction plaquettaire ne peut pas être arrêté avant le prélèvement, la prise du médicament doit être renseignée et prise en compte lors de l'interprétation des résultats du LTA.
8. Il n'est pas certain que les échantillons de sang destinés au LTA doivent être recueillis auprès de sujets à jeun bien que les variations de la glycémie et de la lipidémie pourraient légèrement affecter les résultats des courbes d'agrégation du LTA. Les effets des repas légers sont probablement négligeables. Cependant, les patients ne devraient pas être étudiés après avoir pris des repas associés à une forte teneur en matières grasses pour éviter la formation de chylomicrons dans le plasma, qui interfèrent avec la transmission de la lumière.
9. Il n'est pas certain qu'un traitement avec un médicament quelconque doit être arrêté avant le prélèvement.

Pour la variabilité pré-analytique technicien et infirmière-dépendante,

Pour minimiser l'activation des plaquettes durant le recueil du prélèvement les recommandations sont les suivantes.

1. 1 Les échantillons de sang nécessaires pour le LTA doivent être prélevés avec un minimum de veinostase. Il est également suggéré que si un garrot doit être utilisé, il doit être immédiatement enlevé dès que le premier tube commence à se remplir.
2. Les prélèvements sanguins nécessaires pour le LTA doivent être effectués à l'aide d'une aiguille d'un calibre d'au moins 21.
3. Les échantillons de sang nécessaires pour le LTA doivent être prélevés dans du plastique (polypropylène) ou des tubes en verre siliconé.
4. Les échantillons de sang nécessaires pour le LTA doivent être prélevés dans un tube avec un anticoagulant pour aider à maintenir le pH stable.
5. Les échantillons de sang nécessaires pour le LTA doivent être prélevés dans un tube avec 109 mM de citrate de sodium, anticoagulant tamponné.
6. Les échantillons de sang pour la LTA doivent être prélevés dans 129 mM citrate de sodium, anticoagulant tamponné.
7. Les 3-4 premiers ml de sang prélevés doivent être jetés ou utilisés pour des tests autres que le LTA.
8. Lorsque des difficultés sont rencontrées pour prélever, les tubes sous-remplis ne peuvent être utilisés que pour exclure les troubles graves de la fonction plaquettaire, tels que Thrombasthénie de Glanzmann ou Syndrome de Bernard-Soulier

Pour la préparation du PRP et du PPP,

1. Les échantillons de sang doivent être laissés au "repos" à température ambiante pendant 15 minutes avant la centrifugation.
2. La PRP doit être préparé par centrifugation du sang échantillons à 200 g pendant 10 min
3. Cette recommandation a été récemment validée par Femia et al., qui ont démontré que la centrifugation du sang des échantillons à 200 g (ou 250 g) pendant 10 min semble être la meilleure condition pour préparer les PRP pour les études sur LTA, tant en ce qui concerne le degré de contamination des PRP par d'autres cellules sanguines ou la réactivité des plaquettes. Des résultats similaires en termes de réactivité plaquettaire ont été signalés par Merolla et autres.
4. La PRP doit être préparé par centrifugation des échantillons de sang à la température ambiante (environ 21 °C).
5. La PRP doit être préparé par centrifugation sans utiliser de frein.
6. La PRP doit être préparé par sédimentation sanguine pour les échantillons contenant de très grosses plaquettes.
7. Il n'est pas certain qu'il soit conseillé de conserver les tubes à un angle de 45° lors de la préparation des PRP par sédimentation d'échantillons de sang contenant de très grosses plaquettes.
8. Le PPP doit être préparé par centrifugation du sang total, ou par des tubes de sang où le PRP a été retiré à température ambiante après avoir été centrifugé à 1500 g pendant 15 min.

Différents éléments de preuve à évaluer

Population étudiée pour Répétabilité et Reproductibilité

La population étudiée est composée d'adultes, entre 25 et 50 ans, de sexe masculin et féminin en bonne santé. Ils n'ont eu dans leur vie aucun épisode hémorragique grave et n'ont donc à priori pas de maladie plaquettaire. Nous leur avons fourni des formulaires dédiés pour tracer leur identité (nom, prénom, DDN) et confirmer l'absence de facteur interférant avec les résultats du test d'agrégation (groupe sanguin, prise d'AINS dans les 10 jours, autres traitements, prise de caféine, tabac ou activité physique faites avant prélèvement (cf annexe 4)).

Répétabilité

L'essai de répétabilité consiste à analyser un même **échantillon dans les conditions suivantes**: même opérateur, même lot de réactifs, même instrument, même étalonnage dans un délai le plus court possible. L'objectif est de caractériser la meilleure performance possible, dans des conditions optimales et de vérifier le bon fonctionnement du système (instrument/réactif) pour l'analyte concerné. L'évaluation de la répétabilité est indispensable lors de l'installation d'un nouvel analyseur afin de connaître les performances initiales. Ce calcul est répété pour **chacune des matrices** (sérum, urine, LCR,…) soumises à analyse, en utilisant des échantillons biologiques ou des échantillons du contrôle interne de Qualité (CIQ). Pour un même analyseur, ce calcul doit être effectué pour **chaque analyte** à mesurer et à **plusieurs niveaux de concentration.** Il peut être nécessaire de réitérer des essais de répétabilité pour vérifier le bon fonctionnement du système notamment après une intervention importante (panne, maintenance,…).Le laboratoire défini au préalable les critères d'acceptation des résultats obtenus (exemple : CV de répétabilité) grâce à des sociétés savantes, des fournisseurs,… (54)

Dans notre étude, chaque agoniste est étudié avec le PRP de 3 tubes différents d'un même témoin prélevés au même moment, sur chaque agrégomètre. Pour ce faire, nous avons recruté quatre sujets sains, et les avons prélevé de 14 tubes citratés de 2,7 ml.

Reproductibilité intra-laboratoire ou fidélité intermédiaire

L'essai de fidélité intermédiaire consiste à analyser **un même échantillon dans des conditions différentes en faisant varier au moins un des facteurs** : l'opérateur, le temps, les lots de réactifs, les étalonnages,… Il permet de paramétrer les critères d'acceptation des antériorités en combinaison avec les variations biologiques notamment dans le cas de systèmes d'aides à la décision. Lorsque les résultats obtenus sont supérieurs aux limites de conformité préétablies, le laboratoire vérifiera si les différences observées, compte tenu du nombre de valeurs et du niveau de concentration des échantillons, sont significatives et les confrontera aux exigences cliniques.(54)

Nous avons testé chaque agoniste sur les 2 agrégomètres du laboratoire (N°1 et 3) et l'agrégomètre de prêt (N°2), avec les prélèvements de 3 sujets sains, en 2 à 3 jours selon les agonistes évalués, par le technicien et l'ingénieur du secteur.

Pour étudier la répétabilité et la reproductibilité nous avons choisi de tester les principaux agonistes utilisés en pratique courante aux concentrations usuelles, soit : ADP 5 µmol/L, ADP 10 µmol/L, Ristocétine 0,5mg/L Ristocétine 1,25mg/ml TRAP 25 µM, Acide Arachidonique 1mmol/L, CRP, collagène 1.5µg/mL, collagène 3.3µg/mL, Epinéphrine 5 µM, et TXA2 5 µM.

Nous avons étudié 3 paramètres : la vélocité, l'agrégation maximale et l'aire sous la courbe et les avons évalués quantitativement et qualitativement. Aucune recommandation n'est actuellement disponible concernant une variabilité quantitative acceptable, étant donné qu'il s'agit d'une interprétation qualitative des courbes d'agrégation. Par convention, nous décidons de suivre les recommandations du Groupe Français d'Hémostase et de Thrombose (GFHT) concernant les analyses d'hémostase automatisées (CV<15%).

Variabilités inter/opérateurs

La variabilité inter-opérateurs constitue un indicateur de la maîtrise de la réalisation des méthodes non automatisées. Un moyen d'assurer cette maîtrise repose sur **la vérification de la compétence des opérateurs** (habilitation). Des critères objectifs pourront être établis, par exemple, par l'intermédiaire d'une analyse de la robustesse.(54)

Pour ce faire, nous avons constitué un formulaire d'interprétation de 18 courbes d'agrégations plaquettaires, de 18 patients d'intérêts (cf annexe 3)

Le diagnostic de ces patients est orienté par l'histoire clinique et les résultats biologiques (agrégation plaquettaire, phénotypage des glycoprotéines de membrane plaquettaire en CMF, étude d'activation - sécrétion plaquettaire, dosage de VWF, étude d'hémostase primaire et secondaire, hémogramme plaquettes, génétique éventuelle).

Sur chaque formulaire, une courbe d'agrégation plaquettaire anonymisée, un QCM qualifiant le test d'agrégation plaquettaire, un QCM proposant différents diagnostics et un texte libre est proposé.

Nous avons invité 6 opérateurs différents, 1 technicien, 1 ingénieur et 4 biologistes habilités à y répondre afin de comparer leur interprétation.

Nous avons comparé les différentes conclusions des courbes d'agrégations plaquettaires de chaque opérateur et évalué la concordance inter-juges à l'aide du coefficient Kappa de Fleiss ; (κ car plusieurs juges) définit comme suit : $\kappa = \frac{\bar{P} - \bar{P}_e}{1 - \bar{P}_e}$.

Avec : $\bar{P} - \bar{P}_e$ la concordance observée – la concordance attendue

Les sujets sont indexés par *i* = 1, ... *N* les catégories sont indexées par *j* = 1, ... *k*. Soit n_{ij} qui représente le nombre d'observateurs qui attribuent le *i*-ème sujet à la *j*-ème catégorie. On a $p_j = \frac{1}{Nn}\sum_{i=1}^{N} n_{ij}, \qquad 1 = \frac{1}{n}\sum_{j=1}^{k} n_{ij}$ qui représente la proportion de toutes les attributions à la *j*-ème catégorie: $P_i = \frac{1}{n(n-1)}\sum_{j=1}^{k} n_{ij}(n_{ij}-1)$ qui représente à quel point les observateurs sont d'accord entre eux pour le *i*-ème sujet, et $\bar{P} = \frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N} P_i$ et $\bar{P}_e = \sum_{j=1}^{k} p_j^2$.

κ	interprétation
<0	Désaccord
0.0 — 0.20	Accord très faible
0.21 — 0.40	Accord faible
0.41 — 0.60	Accord modéré
0.61 — 0.80	Accord fort
0.81 — 1.00	Accord presque parfait

Figure 11 Interprétation de κ définie comme suit selon the measurement of observer agreement for categorical data. Landis J.R et Koch G.G.Biometrics ; 33 :159-174

La concordance interjuges a examiné les résultats de chaque agoniste pour les 18 patients, pour chaque patient, les conclusions de plusieurs agonistes, et la conclusion générale d'agrégométrie de chaque patient.

Exactitude

L'exactitude est définie comme **l'étroitesse de l'accord entre une valeur mesurée et la valeur vraie d'un mesurande.** Comme la justesse, l'exactitude devrait être vérifiée à partir d'étalons primaires, de matériaux de référence certifiés (MRC) ou de méthodes de référence traçables au SI ou à des étalons internationaux. A ce jour, les laboratoires évaluent l'exactitude à partir des résultats des évaluations Externes de la Qualité.

Une étude d'exactitude correspond à la comparaison **du résultat d'un seul dosage d'un échantillon inconnu à une valeur cible consensuelle**. L'écart observé correspond à l'inexactitude (erreur d'exactitude). L'exactitude d'une méthode peut être établie à partir des résultats des EEQ (analysés une seule fois) en **comparant la valeur trouvée à la valeur cible attendue** (généralement la moyenne des participants et/ou du groupe de pairs), assimilée à la valeur « vraie » (v) de l'échantillon testé. L'écart observé quantifie l'inexactitude. L'évaluation de l'inexactitude est d'autant plus pertinente que le nombre d'échantillons d'EEQ est élevé. L'inexactitude est exprimée en pourcentage de la valeur cible, selon le calcul suivant : inexactitude (%) = ((x-v)*100)/v avec x la valeur trouvée pour l'EEQ et

v la valeur cible. Ces valeurs permettront un calcul d'une valeur moyenne et de sa dispersion nécessaire pour le calcul d'incertitude.(54)

Cependant, il n'existe pas d'EEQ analytique pour le TAP, seulement des EEQ interprétatifs, proposée par le North American Specialized Coagulation Laboratory Association (NASCOLA). NASCOLA est une organisation américaine à but non lucratif et dont les missions sont de

- Fournir des tests de compétence aux laboratoires qui effectuent des tests de diagnostic pour les troubles hémorragiques ou thrombotiques,
- Mettre des forums en ligne pour l'évaluation critique des procédures, des réactifs et des instruments du test de coagulation,
- Élaborer des lignes directrices pour l'utilisation, l'interprétation des tests de coagulation et leurs résultats,
- Améliorer la communication entre les laboratoires effectuant des tests de coagulation spécialisés,
- Promouvoir la formation sur les tests de laboratoire d'hémostase spécialisée
- Soutenir les activités de recherche entre les laboratoires participants.

Les EEQ envoyés par NASCOLA sont des ensembles de « cas patients » regroupant leur histoire clinique et leurs résultats biologiques (hémogramme, plaquettes, agrégation plaquettaire, bilan d'hémostase tels que dosage de Willebrand et agrégation plaquettaire, sécrétion plaquettaire d'ATP). Les biologistes doivent analyser les conditions pré-analytiques, interpréter les résultats proposés, et proposer des explorations complémentaires si nécessaires. L'évaluation est effectuée individuellement par au moins 5 personnes dont l'ingénieur hospitalier et le technicien du secteur, au minimum 3 des 4 biologistes habilités, 1 ou 2 PU-PH du laboratoire, puis la conclusion est envoyée après concertation. NASCOLA donne ensuite son retour avec le pourcentage de « bonnes réponses » selon leurs appréciations et une correction détaillée des réponses attendues.

Sensibilité et Spécificité

La sensibilité et la spécificité diagnostique sont les critères de performance les plus importants pour une analyse de type qualitatif. Ils **représentent respectivement le pourcentage de « vrais positifs » parmi une population pathologique et les « vrais négatifs »** parmi une population saine. Il est souvent difficile d'obtenir des échantillons connus et en nombre suffisant pour la vérification expérimentale. La vérification bibliographique prend ici toute son importance. La vérification expérimentale s'appuiera surtout sur l'étude des performances aux EEQ. (54)

Nous avons étudié la sensibilité et la spécificité diagnostique du test d'agrégation plaquettaire à l'aide d'un formulaire d'interprétation de 18 courbes d'agrégations plaquettaires, de 18 patients. Le diagnostic de ces patients est orienté par l'histoire clinique et les résultats biologiques (agrégation plaquettaire, phénotypage des glycoprotéines de membrane plaquettaire en CMF, étude d'activation - sécrétion plaquettaire, dosage de VWF, étude d'hémostase primaire et secondaire, hémogramme plaquettes, génétique éventuelle). Sur chaque formulaire, une courbe d'agrégation plaquettaire anonymisée, un QCM qualifiant le test d'agrégation plaquettaire, un QCM proposant différents diagnostics et un texte libre est proposé. Nous avons invité 6 opérateurs différents, le technicien, l'ingénieur et 4 biologistes habilités à y répondre afin de comparer leur interprétation. On a ensuite vérifié la concordance des conclusions des courbes d'agrégations plaquettaires de chacun et du diagnostic pour les thrombopathies majeures : syndrome de Bernard et Soulier (BSS), et Thrombasthénie de Glanzmann (TG) donné par chaque opérateur avec ceux préalablement établis et rendus au clinicien. A l'aide de ces données, nous avons pu ainsi calculer une sensibilité et spécificité diagnostique.

Intervalles de référence

L'intervalle de référence et les seuils de décision médicale **sont définis et documentés par le laboratoire**, en fonction de l'âge, du sexe, ... et doivent être adaptés à l'usage des résultats par les cliniciens en pratique courante. Si la distribution de la population est gaussienne, le calcul peut se faire de la manière suivante : après une période d'utilisation permettant d'obtenir un nombre de valeurs significatif (n > 100), à partir de patients exempts de pathologie (si possible), en écartant les valeurs aberrantes, en écartant toutes les valeurs > m + 2s et < m – 2s, en recalculant la moyenne (moyenne tronquée) mt et l'écart-type (écart-type tronqué)st à partir des valeurs ainsi retenues. (26)

Dans notre étude, nous avons recueilli des valeurs de vélocité, de surface et d'agrégation 6 min pour 52 sujets sains dont l'agrégation plaquettaire a été rendue normale au cours de l'utilisation de l'agrégomètre. Nous avons calculé la moyenne géométrique et exclu les valeurs aberrantes pour définir des intervalles de référence d'après la formule [moyenne géométrique +/-2 ET].

III.2 Résultats

Cf annexe 1 : validation de méthode SH FORM 43

III.2.1 Description de la méthode

Notre examen de biologie médicale est le **test photométrique d'agrégation plaquettaire**, c'est un **processus simple** pour lequel nous avons réalisé une validation de méthode, de **portée B**, selon la norme NF EN ISO 15189:2012. C'est une méthode que l'on peut qualifier de **qualitative** car nous rendons une interprétation biologique qualitative d'un examen analytique. Pour ce faire, nous étudions une courbe d'agrégation plaquettaire établie à partir de valeurs numériques que sont la vélocité (pente de la courbe), le temps de latence, la vague d'agrégation primaire réversible, la vague d'agrégation secondaire irréversible, le pourcentage maximal d'agrégation, le pourcentage final d'agrégation après un délai fixé (par exemple 10 minutes), l'aire sous la courbe ou l'aire sous la pente établies par la mesure in vitro du temps nécessaire à un plasma pour former un agrégat plaquettaire « stable » après adjonction d'agonistes plaquettaires. Nous avons donc aussi tenu à vérifier des critères demandés dans le cas de validation de méthode d'une méthode quantitative en plus de ceux exigés dans le cas d'une méthode qualitative. Cette **technique manuelle** est faite sur des agrégomètres SD médical à partir d'un échantillon primaire **le plasma riche en plaquettes.** Les réactifs utilisés ne sont pas marqués CE sauf pour le collagène et sont commandés sous forme de poudres lyophilisées. Nous avons donc établi des protocoles de reconstitution (cf annexe 5) afin de pouvoir en disposer en quantité souhaitable tout en respectant leurs conditions de stabilité. Il a fallu étudier la littérature scientifique de chacun des réactifs afin de connaitre leurs caractéristiques chimiques afin d'anticiper leur utilisation.

III.2.2 Evaluation des performances de la méthode

Notre évaluation des performances de la méthode s'est heurtée aux nombreuses difficultés techniques évoquées plus haut (III.1Matériels et méthodes). De plus, en pratique, pour réaliser cette évaluation il faut être rapide et disposer de nombreux patients. En effet, le plasma ne peut être ni congelé, ni transporté, ni conservé. Il est donc nécessaire d'exécuter la technique d'agrégation rapidement après prélèvement, sur des plaquettes « fraîches » (prélèvement sanguin datant de moins de 3 heures), pour se rapprocher au mieux des conditions physiologiques.

Également, nous avons besoin d'une quantité assez importante d'échantillons primaires afin d'évaluer la performance de la méthode pour l'ensemble des agonistes.

Répétabilité

AGREGOMETRE 1	Vélocité			Agrégation maximale			surface		
Agoniste	m	ET	CV	m	ET	CV	m	ET	CV
ADP 5 µM	92,38	2,573	2,78	65,34	2,110	**3,23**	158,33	5,453	3,44
ADP 10 µM	128,77	17,562	13,64	69,28	1,026	**1,48**	182,75	5,202	2,85
Ristocétine 1,25 mg/mL	114,46	12,613	11,02	81,74	6,114	**7,48**	228,09	14,348	6,29
Ristocétine 0,5 mg/mL	7,95	1,495	18,81	3,60	0,240	**6,66**	1,77	2,514	141,75
TRAP 14 25 µM	252,11	10,349	4,10	104,37	6,501	**6,23**	243,74	8,508	3,49
Acide Arachidonique 1 mM	230,02	41,523	18,05	100,82	11,114	**11,02**	231,37	15,900	6,87
CRP 0,9 µg/mL	221,67	18,150	8,19	80,96	1,679	**2,07**	201,03	8,969	4,46
Collagène 1,5 µg/mL	226,27	12,763	5,64	78,33	3,010	**3,84**	179,50	6,890	3,84
Collagène 3,3 µg/mL	152,45	13,112	8,60	77,62	1,012	**1,30**	175,46	14,942	8,52
Epinéphrine 5 µM	57,63	10,147	17,61	76,93	3,078	**4,00**	89,50	6,720	7,51
TXA2 5µM	172,38	7,152	4,15	85,33	3,010	**3,53**	234,56	12,368	5,27

Figure 12 Résultats du test de répétabilité pour l'agrégomètre 1 tiré du SH FORM 43 "Validation de méthode du test d'agrégométrie plaquettaire du laboratoire d'hémostase spécialisé du CHU de Toulouse » en Annexe1

AGREGOMETRE 3	Vélocité			Agrégation maximale			surface		
Agoniste	m	ET	CV	m	ET	CV	m	ET	CV
ADP 5 µM	94,09	12,530	13,32	61,57	4,974	**8,08**	149,75	24,932	16,65
ADP 10 µM	115,30	17,315	15,02	72,63	7,773	**10,70**	192,69	29,718	15,42
Ristocétine 1,25 mg/mL	108,91	17,968	16,50	80,46	9,722	**12,08**	227,37	31,157	13,70
Ristocétine 0,5 mg/mL	5,92	2,141	36,15	2,86	0,742	**25,95**	1,90	0,609	32,09
TRAP 14 25 µM	267,38	7,056	2,64	80,39	3,661	**4,55**	237,45	12,587	5,30
Acide Arachidonique 1 mM	225,90	35,685	15,80	83,97	4,007	**4,77**	226,40	10,194	4,50
CRP 0,9 µg/mL	211,21	15,601	7,39	78,11	4,584	**5,87**	189,60	22,356	11,79
Collagène 1,5 µg/mL	231,77	22,532	9,72	79,51	3,586	**4,51**	186,16	10,446	5,61
Collagène 3,3 µg/mL	175,05	37,856	21,63	79,62	2,104	**2,64**	177,76	12,907	7,26
Epinéphrine 5 µM	53,21	8,320	15,64	82,81	5,118	**6,18**	143,82	14,432	10,04
TXA2 5µM	207,11	8,035	3,88	85,69	3,070	**3,58**	245,07	14,812	6,04

Figure 13 Résultats du test de répétabilité pour l'agrégomètre 3 tiré du SH FORM 43 "Validation de méthode du test d'agrégométrie plaquettaire du laboratoire d'hémostase spécialisé du CHU de Toulouse » en Annexe1

Reproductibilité

Agoniste	nb témoins	nb agrégomètres	nb jours	M vélocité	ET vélocité	CV vélocité	M agrég max	ET agrég max	**CV agrég max**	M	ET surface	CV surface
ADP 5 µM/L	2	3	2	97,21	13,76	14,16%	65,59	5,22	**7,96%**	167,40	10,43	6,23%
ADP 10 µM/L	2	3	2	96,03	22,44	23,36%	69,04	0,68	**0,98%**	182,57	3,62	1,98%
Ristocétine 1,25 mg/mL	2	3	2	8,67	1,61	18,55%	5,64	1,28	**22,61%**	13,00	6,09	46,85%
Ristocétine 0,5 mg/mL	2	3	2	129,91	16,02	12,34%	81,99	1,27	**1,54%**	233,13	5,12	2,20%
Acide Arachidonique 1 mM/L	3	3	3	132,40	40,80	30,82%	74,53	9,95	**13,35%**	197,31	23,06	11,69%
Collagène1,5 µg/mL	2	3	3	185,07	73,81	39,88%	72,73	10,96	**15,06%**	170,76	37,59	22,01%
Collagène 3,3 µg/mL	2	3	3	176,53	23,44	13,28%	66,29	8,72	**13,15%**	191,74	17,70	9,23%
TRAP 14 25 µM	2	3	3	258,19	71,45	27,67%	82,83	13,83	**16,70%**	229,97	12,09	5,26%
CRP 0,9 µg/mL	2	3	3	182,64	41,24	22,58%	80,29	4,00	**4,98%**	206,94	14,93	7,22%
Epinéphrine 5 µM/L	2	3	3	82,19	25,66	31,23%	77,84	3,70	**4,75%**	164,45	32,16	19,56%
TXA2 5µM	2	3	3	236,07	53,18	22,53%	85,04	8,22	**9,67%**	250,17	21,72	8,68%
CV MEDIAN						**22,58%**			**9,67%**			**8,68%**

Figure 14 Résultats du test de reproductibilité pour l'agrégomètre 3 tiré du SH FORM 43 "Validation de méthode du test d'agrégométrie plaquettaire du laboratoire d'hémostase spécialisé du CHU de Toulouse » en Annexe1

Il n'y a pas de CV acceptable défini par une société savante ou par le fournisseur. Néanmoins, nous retrouvons dans l'ensemble **une variabilité non majeure** pour cette technique qualitative (CV médian pour l'agrégation maximale estimé de 5 à 15 % selon les éléments mesurés), ce qui reste conforme au CV acceptable proposé par le GFHT pour les tests de coagulation automatisé.

Nous retrouvons une variabilité calculée importante pour la ristocétine faible dose, du fait d'une agrégation maximale très faible. Cela n'a aucune incidence clinique, car définie qualitativement comme absence d'agglutination, ici de façon répétée, ce qui est attendu chez ces témoins sains.

L'évaluation qualitative de toutes les courbes est normale.

Variabilité inter-opérateurs

Etude de la concordance inter-juge sur l'interprétation des tracés de chaque agoniste

Avec N le nombre total de sujets ici 18, soit n le nombre de juges ici 6, et soit k le nombre de catégorie dans laquelle les attributions sont faites ici 9.

Agoniste	**κ**
ADP 2,5 µM	0,66
ADP 5 µM	0,76
ADP10 µM	0,62
Collagène 3,3 µg/mL	0,63
Ristocétine 1,25 mg/mL	0,74
Ristocétine 0,5 mg/mL	0,90
Acide arachidonique 1 mM	0,68
Epinéphrine 5 µM	0,69
Kappa Moyen	**0,71**
Interprétation	**Accord fort**

Figure 15 Etude de la concordance inter-juge sur l'interprétation des tracés de chaque agoniste - Variabilité inter-opérateur pour l'agrégomètre 1 tiré du SH FORM 43 "Validation de méthode du test d'agrégométrie plaquettaire du laboratoire d'hémostase spécialisé du CHU de Toulouse » en Annexe1

Il y a dans l'ensemble une **excellente concordance dans l'interprétation qualitative de chaque agoniste** pour les différents patients avec un Kappa moyen estimé à κ=0,71, ce qui constitue un accord fort, montrant donc une bonne homogénéité d'interprétation des tests d'agrégométrie dans l'équipe. Quelques catégories avec des courbes de faible amplitude ou réversible doivent être mieux définies : pour l'ADP 2,5 µM, les catégories « absente » et « très diminuée » ; pour l'ADP 2.5, 5 et 10 µM, la catégorie « réversible » ; les catégories « très diminuée » et « diminuée » pour l'ADP 10 µM et le collagène 3.3 µg/mL ; pour le collagène 3.3 µg/mL, l'Acide arachidonique et l'épinéphrine la catégorie « retardée » ; pour la ristocétine 1.25 mg/mL, la caractérisation d'une double vague.

Etude de la concordance inter-juge sur l'interprétation des résultats de chaque patient

Avec N = 18 nombre total de sujets, soit n= 6 le nombre de juges et soit k = 9 le nombre de catégorie dans laquelle les attributions sont faites.

Numéro Patient	**Kappa de Fleiss**	**Kappa moyen**	**0,74**
1	1,00		
2	0,69	**Interprétation**	**Accord fort**
3	0,17		
4	0,81		
5	0,89		
6	0,73		
7	1,00		
8	0,63		
9	0,87		
10	1,00		
11	1,00		
12	1,00		
13	0,68		
14	0,77		
15	0,17		
16	0,84		
17	0,38		
18	0,62		

Figure 16 Etude de la concordance inter-juge sur l'interprétation des résultats de chaque patient - Variabilité inter-opérateur pour l'agrégomètre 1 tiré du SH FORM 43 "Validation de méthode du test d'agrégométrie plaquettaire du laboratoire d'hémostase spécialisé du CHU de Toulouse » en Annexe1

Il y a dans l'ensemble **une excellente concordance dans l'interprétation qualitative des différents agonistes pour les différents patients** avec un Kappa moyen estimé à κ=0,74, ce qui constitue un accord fort, montrant donc une bonne homogénéité d'interprétation des tests d'agrégométrie dans l'équipe.

Pour les patients 3, 15 et 17 les courbes de l'ADP 2.5, et 10 µM, le collagène, l'Acide arachidonique et l'épinéphrine ont été classées dans la catégorie « ininterprétable » par deux opérateurs devant la présence d'une agrégation à la ristocétine faible dose vs « normal » pour les autres. Cette discordance dans l'interprétation des tracés des différents agonistes n'impacte pas la conclusion générale du test d'agrégométrie. Si une agrégation est présente à la ristocétine 0,5 mg/mL elle doit être contrôlée et systématiquement complétée par l'agrégation aux faibles doses décroissantes de ristocétine 0,4; 0,3; 0,2 et 0,1 mg/mL comme définit dans les documents du système qualité du laboratoire.

Pour le patient 8, l'ADP 2.5, 5 et l'AA ont été classés en « réversible » pour quatre opérateurs et 2 les ont classés en « diminué ». Pour l'ADP 10 µM deux opérateurs l'ont classé en « normal » et 4 en « réversible ». Cette différence d'interprétation des tracés des agonistes n'a pas impacté la conclusion générale du test d'agrégation plaquettaire. Tous les opérateurs ont conclu à une agrégation « pertubée ».

Pour le patient 13, l'ADP 2.5 µM a été classé par 4 opérateurs en « très diminuée », par 1 en « réversible », et par 1 en « absente ». Pour le collagène 3.3, 3 opérateurs l'ont classé dans « réversible » et 3 l'ont classé dans « normal ». Tous les opérateurs ont conclu in fine à une agrégation « pertubée ».

Pour le patient 14, l'épinéphrine 5 µM a été classé en « réversible » par 2 opérateurs et en « normal » par 4 opérateurs sans impact dans la conclusion générale de l'agrégométrie.

Pour le patient 18, l'ADP 2.5, 5, et 10 µM a été classé par 1 opérateur en « réversible » vs en « diminuée » par 5 opérateurs. Le collagène a été classé 3 fois en « diminuée » vs 3 fois en « très diminuée ». L'AA a été classé 5 fois en « absente » vs 1 fois en « normale ». L'épinéphrine a été classée une fois en « diminuée » vs 5 fois en « très diminuée » sans impact dans la conclusion générale de l'agrégométrie.

Etude la concordance inter-juge sur les conclusions générales de l'agrégométrie pour chaque patient

Avec N le nombre total de sujets (ici 18), soit n le nombre de juges ici 6, et soit k le nombre de catégorie dans laquelle les attributions sont faites ici 4.

N° patients	Nombres de Juges	Normale	Légèrement perturbée - Sensiblement normale	Perturbée - Fortement perturbée	Ininterprétable	Somme	Pi	
Patient 1	6	6	0	0	0	6	1,00	
Patient 2	5	0	4	0	1	5	0,55	
Patient 3	6	0	0	6	0	6	1,00	
Patient 4	6	0	5	1	0	6	0,67	
Patient 5	6	1	5	0	0	6	0,67	
Patient 6	6	0	0	6	0	6	1,00	
Patient 7	6	5	1	0	0	6	0,67	
Patient 8	6	0	4	2	0	6	0,47	
Patient 9	6	0	6	0	0	6	1,00	
Patient 10	6	0	0	6	0	6	1,00	
Patient 11	6	0	0	6	0	6	1,00	
Patient 12	6	0	0	6	0	6	1,00	
Patient 13	6	0	0	6	0	6	1,00	
Patient 14	6	1	5	0	0	6	0,67	
Patient 15	6	0	0	4	2	6	0,33	
Patient 16	6	6	0	0	0	6	1,00	
Patient 17	6	0	0	6	0	6	1,00	
Patient 18	5	0	0	5	0	5	1,00	
Somme		19	30	54	3	106	$\bar{P}$	**0,83**
							somme pi	**15,02**
Pj	0,18	0,28	0,51	0,03	Somme pj²	$\bar{P}_e$	**0,372**	

			Intervalle de Confiance					
			-	**+**				
Kappa de Fleiss	**0,74**	**0,44**	**1,04**					
ET	**0,15**							
Interprétation	**Accord fort**							

Figure 17 Etude la concordance inter-juge sur les conclusions générales de l'agrégométrie pour chaque patient-Variabilité inter-opérateur pour l'agrégomètre 1 tiré du SH FORM 43 "Validation de méthode du test d'agrégométrie plaquettaire du laboratoire d'hémostase spécialisé du CHU de Toulouse » en Annexe1

Il y a également dans l'ensemble une **excellente concordance dans l'interprétation qualitative de conclusion d'agrégométrie pour les différents patients** avec un Kappa moyen estimé à κ=0,74, ce qui constitue un accord fort, montrant donc une bonne homogénéité d'interprétation des tests d'agrégométrie dans l'équipe

On effectuera quelques remarques, ne grevant pas la conclusion générale :
Pour le patient 3, les différences d'interprétations inter-opérateurs par agoniste n'ont aucun impact significatif sur la conclusion générale de l'agrégométrie car l'agrégation aux faibles doses décroissantes de ristocétine 0,4; 0,3; 0,2 et 0,1 mg/mL a été faite en systématique confirmant l'anomalie d'agrégation chez ce patient et levant les doutes d'interprétation.
Pour le patient 8, nos catégories « légèrement pertubée-sensiblement normale » et « pertubée-fortement pertubée » sont mal distinctes. La conclusion sur le degré de sévérité de la perturbation est donc légèrement discordante car elle est sujette à la subjectivité des opérateurs mais n'a aucun retentissement sur le dépistage d'une éventuelle maladie hémorragique. Le patient 8 était sous AINS ce qui a pertubé les test d'agrégation plaquettaire.
Pour le patient 15, 4 opérateurs ont conclu à « fortement pertubée » et 2 à « ininterprétable ».

On note dans l'ensemble une concordance dans l'interprétation des courbes d'agrégométries dans cette étude avec une bonne homogénéitée, constituant une variabilité interopérateur définie comme conforme pour le laboratoire.

Justesse

La justesse est l'étroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et une valeur de référence (ou valeur vraie). Dans les Laboratoires d'analyses médicales, les matériaux de référence certifiés sont peu utilisés en pratique courante ; il est donc difficile de parler stricto sensu de « valeur vraie » et par là-même de justesse. Une approche de la justesse peut être envisagée en **comparant la moyenne de plusieurs dosages d'un même échantillon à une valeur cible,** assimilée à la « valeur vraie ». L'écart observé correspond au biais. Le biais peut être évalué à partir des résultats obtenus avec des échantillons de contrôle titrés ou des valeurs observées dans des programmes de contrôle interne couplés à une comparaison inter-laboratoire (externalisation des CIQ). La valeur assignée peut être biaisée, et devrait, idéalement, être déterminée grâce à une méthode de référence dont les résultats sont traçables au SI ou aux étalons internationaux.

La commutabilité des échantillons, c'est-à-dire leur **capacité à se comporter comme des échantillons réels (échantillons de patient) quelle que soit la méthode utilisée, doit être prise en compte.** En effet, les effets de matrice engendrés par les différents traitements subis par les échantillons de contrôle durant leur préparation (lyophilisation, congélation, ajout de conservateur, surcharge, mélange, …) peuvent être à l'origine de biais qui ne sont pas retrouvés avec des échantillons patients. La connaissance de la valeur vraie repose actuellement sur les valeurs assignées associées aux échantillons de contrôle. Ce sont des valeurs consensuelles (moyenne de l'ensemble des participants (si les seuils de décision pour l'examen concerné sont standardisés (HAS, consensus, …)) ou moyenne par groupe de pairs en fonction des méthodes, des analyseurs ou des fournisseurs.(54)

Pour le test photométrique d'agrégation plaquettaire il n'existe pas de CQI externalisé. En effet comme évoqué plus haut (3.1 matériels et méthodes) le type d'échantillon primaire utilisé ne permet pas la création de CQI (pas de congélation ni conservation des plaquettes possible).

Exactitude

Exercice	Nb participants	N° Cas	Conformité du Résultat (%)	N° cas	Conformité du Résultat (%)	N° Cas	Conformité du Résultat (%)	N° cas	Conformité du Résultat (%)	Moyenne exercice (%)	CONCLUSION
2014-1	122	1	100	2	88,9	3	100	4	100	**97,23**	**CONFORME**
2014-2	122	5	100	6	100	7	100	8	100	**100**	**CONFORME**
2016-1	110	1	100	2	100	3	100	4	100	**100**	**CONFORME**
2016-2	110	5	85	6	80	7	84	8	100	**87,25**	**CONFORME**
2018-1	103	1	100	2	100	3	85,7	4	100	**96,**	**CONFORME**
2018-2	111	5	100	6	100	7	100	8	100	**100**	**CONFORME**
2019-1	110	1	100	2	100	3	100	4	100	**100**	**CONFORME**

Figure 18 Résultats du test d'exactitude pour l'agrégomètre 1 tiré du SH FORM 43 "Validation de méthode du test d'agrégométrie plaquettaire du laboratoire d'hémostase spécialisé du CHU de Toulouse » en Annexe1

Des difficultés organisationnelles ont été rencontrées, par exemple, l'accès aux corrigés des 2 exercices 2017 n'a pas été envoyé par NASCOLA au laboratoire.

Sensibilité et spécificité analytiques

	Patients TG	Patients non TG	**Total**
Diagnostic TG évoqué par les juges sur les différentes courbes d'agrégation	**VP 12**	**FN 0**	**12**
Autres orientations/pas d'orientation évoquée par les juges sur les différentes courbes d'agrégation	**FP 0**	**VN 95**	**95**
Total	**12**	**95**	**107**

Figure 19 Etude de la sensibilité, spécificité, VPP et VPN des patients atteints de Thrombasthénie de Glanzmann pour l'agrégomètre 1 tiré du SH FORM 43 "Validation de méthode du test d'agrégométrie plaquettaire du laboratoire d'hémostase spécialisé du CHU de Toulouse » en Annexe1

	Patients BSS	Patients non BSS	**Total**
Diagnostic BSS évoqué par les juges sur les différentes courbes d'agrégation	**VP 6**	**FN 0**	**6**
Autres orientations/pas d'orientation évoquée par les juges sur les différentes courbes d'agrégation	**FP 0**	**VN 101**	**101**
Total	**6**	**101**	**107**

Figure 20 Etude de la sensibilité, spécificité, VPP et VPN des patients atteints de syndrome de Bernard et Soulier pour l'agrégomètre 1 tiré du SH FORM 43 "Validation de méthode du test d'agrégométrie plaquettaire du laboratoire d'hémostase spécialisé du CHU de Toulouse » en Annexe1

	Diagnostic de TG	**Diagnostic de BSS**
Spécificité	100%	100%
Sensibilité	100%	100%
Valeur prédictive négative	100%	100%
Valeur prédictive positive	100%	100%

Figure 21 Sensibilité, spécificité, VPP et VPN des patients atteints de syndrome de Bernard et Soulier et de la Thrombasthénie de Glanzmann pour l'agrégomètre 1 tiré du SH FORM 43 "Validation de méthode du test d'agrégométrie plaquettaire du laboratoire d'hémostase spécialisé du CHU de Toulouse » en Annexe1

Notre méthode est conforme pour le diagnostic des Thrombasthénies de Glanzmann, et syndrome de Bernard Soulier avec une très bonne sensibilité, spécificité, VPP et VPN évaluée à 100% dans cette étude expérimentale. Néanmoins, il est nécessaire de s'appuyer sur un ensemble de données cliniques et biologiques (CMF, génétique, etc…) pour aboutir à ce type de diagnostic, l'agrégation plaquettaire seule étant un élément important du diagnostic mais non exclusif.

L'incertitude de mesure

Pour établir l'incertitude de mesure nous pouvons nous appuyer sur notre maîtrise des risques. Cf annexe.2

Etendue de mesure

L'étendue de mesure est définie préalablement pour chaque patient entre 0% et 100%. Il n'est pas possible de définir une limite de détection. Les 0% et 100% sont établis avec respectivement le PRP et le PPP du patient. Le résultat est un résultat fonctionnel dont l'interprétation ne requiert pas une analyse au % près.

Interférences

	Etude Bibliographique - Fournisseurs (sources & valeurs)	**Etudes expérimentales** (Essais de surcharge *(module LIH)*)
Hémolyse	Relargage d'ADP qui peut activer et désensibiliser les plaquettes et elle peut gêner la détection de la variation d'intensité lumineuse.Les prélèvements hémolysés sont à rejeter ou à interpréter avec précaution.	Non réalisée
Turbidimétrie	Eviter les repas riches en graisses car la présence de chylomicrons dans le prélèvement peut gêner la détection de la variation d'intensité lumineuse. Prélèvement à rejeter ou à interpréter avec précaution.	Non réalisée
Bilirubine ictère	Il n'existe pas de bibliographie sur l'impact de la bilirubine sur l'agrégation plaquettaire. Ajustement du 100% d'agrégation par l'utilisation du PPP du patient, ce qui permet de s'affranchir de l'effet matrice propre au patient.	Non réalisée
Médicaments antiplaquettaires (antiagrégants,	Les antiagrégants plaquettaires de façon générale (évaluation du retentissement sur demande pour l'aspirine et thiénopyridine type clopidogrel). Tout médicament ayant un retentissement sur la fonction plaquettaire, recherché ou effet indésirable.	Vérification préalable des prises d'antiagrégants par inhibition de la réponse à l'acide arachidonique et ou ADP.
Nb des plaquettes dans le PRP	Adaptation de la centrifugation en fonction de la numération plaquettaire et du VMP (selon MT-PTAR-HEMA-030)	Non réalisée
Taille des plaquettes	Les plaquettes de grandes tailles risquent d'être perdues à la centrifugation. La connaissance de ce critère doit induire une réduction de la vitesse de centrifugation voire une sédimentation (selon MT-PTAR-HEMA-030)	Non réalisée
Effet effort physique	L'adrénaline produite lors d'un effort peut provoquer une activation des plaquettes. (8)	Repos du patient 15 -20 mn avant prélèvement sanguin

Contamination

Sur l'agrégomètre, utilisation de tube en verre à usage unique et embouts de pipettes jetables pour chaque patient et pour chaque réactif évitant la contamination inter-échantillon. Changement de l'embout de pipette entre chaque réactif évitant la contamination entre réactifs.

Robustesse et stabilité des réactifs

Le TAP s'effectue uniquement la semaine. Tous les réactifs sont préparés le lundi puis jetés le vendredi soir donc ils ne sont jamais utilisés au-delà de 5 jours (cf. MT-PTAR-HEMA-035). Nous avons vérifié la stabilité des réactifs du collagène, de l'épinéphrine et du thromboxane A2, 5 jours après leur reconstitution. Pour ce faire, le témoin utilisé lors de la répétabilité de ces trois réactifs (effectuée un lundi) est reprélevé le vendredi en utilisant les mêmes réactifs. Nous comparons les résultats de ce même patient, et imputerons un résultat différent à un changement qualitatif du réactif. En routine, un témoin est passé dans la série si l'ensemble des échantillons a des résultats perturbés, afin de valider la qualité du réactif utilisé.

Intervalles de référence

Agonistes	IR Vélocité	IR Surface	IR Agrégation 6 minutes
ADP 2,5 µM	[53,58 - 119,17	[53,30 - 226,09]	[-0,20 - 90,63]
ADP 5 µM	[43,90 - 176,00	[135,46 - 234,11	[54,30 - 84,96]
ADP 10 µM	[64,10 - 197,20	[166,08 - 253,51	[63,03 - 85,35]
Collagène 3,3µg/mL	[73,39 - 253,94	[150,98 - 244,04	[68,25 - 89,84]
Ristocétine 1,25mg/mL	[67,19 - 202,47	[186,23 - 290,06	[71,55 - 95,33]
Ristocétine 0,5mg/mL	[-20,06 - 38,56]	[-12,33 - 18,61]	[-3,85 - 6,35]
Acide Arachidonique	[49,73 - 337,95	[162,26 - 301,94	[59,22 - 97,23]
Epinephrine 5µM	[15,76 - 138,85	[-4,70 - 172,99]	[52,81 - 86,44]
TRAP	[74,53 - 236,45	[195,99 - 253,13	[66,88 - 83,41]
TXA2	[-11,52 - 301,89	[121,94 - 310,75	[53,43 - 97,09]

Figure 22 Intervalles de référence pour l'interprétation des tests d'agrégomètrie plaquettaire tiré du SH FORM 43 "Validation de méthode du test d'agrégométrie plaquettaire du laboratoire d'hémostase spécialisé du CHU de Toulouse » en Annexe

III.3. Discussion

III.3.3 Points forts du test photométrique d'agrégation plaquettaire dans le diagnostic des maladies hémorragiques rares

L'objectif de cette validation de méthode, est de **confirmer les critères de performance de notre technique et conclure quant à leur acceptabilité afin d'assurer sa pertinence diagnostique dans les syndromes hémorragiques.**

Notre test est qualitatif, mais nous avons pris l'initiative de rendre des résultats chiffrés, plus parlant pour l'analyse des performances. C'est pourquoi en plus de la comparaison qualitative des courbes des résultats de l'agrégation plaquettaire pour chaque échantillon testé nous avons calculé des CV pour quantifier la variabilité analytique. Etant une technique peu répandue, une des difficultés de l'étude est l'absence de tout CV acceptable défini par une société savante ou par un fournisseur sur lequel nous appuyer. Néanmoins, si l'on compare nos CV à ceux proposés pour les tests de coagulation automatisé nous retrouvons de très bons CV, et ce, bien que notre méthode soit semi-automatique est donc beaucoup moins standardisable.

Pour la répétabilité, si on considère l'agrégation maximale comme le critère majeur dans l'interprétation des tests d'agrégations plaquettaires, nous avons un CV médian entre 3 et 6% ce qui traduit une très faible variabilité de nos résultats dans la répétabilité de nos mesures. Dans des conditions optimales, les performances initiales de notre système (instrument/réactif) sont donc très bonnes.

Ceci est d'autant plus vrai que notre matrice de départ, les plaquettes, sont fragiles dans le temps, et sujettes à la manipulation. Nos modes opératoires sont tels, et la compétence de nos opérateurs telles, que les **contraintes pré-analytiques sont rigoureusement respectées et ne constituent plus une source de variabilité dans le rendu des résultats.** La compétence des opérateurs a été rendue possible par la spécialisation du secteur d'hémostase cardio-vasculaire, avec un espace dédié dans le laboratoire, où seules les techniques spécialisées sont réalisées. Leur compétence s'est renforcée grâce à l'expérience acquise au fil des années, mais également à la formation respective de chacun, et à leur complémentarité. De plus, l'infirmière est dédiée aux prélèvements sanguins des patients de la consultation

d'hémostase spécialisée, les règles strictes de prélèvement sont respectées et l'acheminement jusqu'au laboratoire est précautionneusement fait. L'ingénieur hospitalier a conçu lui-même, entre autres les modes opératoires pour la reconstitution des réactifs, nécessaires à la réalisation du test. Le technicien de laboratoire, a mis au service ses compétences pour les ajuster à une technique rigoureuse. Nous avons également mis en place un système d'habilitation nécessaire à la formation de tous nouveaux opérateurs, lourde mais primordiale afin d'attester des compétences de tout nouveau technicien.

Pour la reproductibilité, si on considère l'agrégation maximale comme le critère majeur dans l'interprétation des tests d'agrégations plaquettaires, nous avons un CV médian <10% ce qui traduit une très faible variabilité de nos résultats dans la fidélité intermédiaire de nos mesures. Concrètement, en faisant varier notre opérateur, le temps, le lot de réactif, la variabilité des résultats restent minime. Notre **système est donc robuste et ceci confirme la compétence de tous nos opérateurs, le respect strict des contraintes pré-analytiques dans le temps, la maitrise de la reconstitution de nos réactifs.**

Concernant la variabilité inter-opérateurs, la concordance inter-juges sur l'interprétation des tracés de chaque agoniste, ainsi que la concordance sur les conclusions générales de l'agrégométrie pour chaque patient est forte (κ=0.71, κ=0.74, κ=0.74 respectivement). Ces résultats montrent donc une bonne homogénéité d'interprétation des tests d'agrégométrie au sein de notre équipe et donc une **cohérence dans l'interprétation de nos résultats**. En effet, nos biologistes ont tous requis les compétences nécessaires à l'interprétation de ces résultats.

La plupart des patients, sont adressés en consultation d'hémostase, sur avis médical, afin d'établir le contexte de la demande (anamnèse, histoire de la maladie, antécédents, histoire familiale). Cette prise en charge clinico-biologique est primordiale pour une prise en charge optimale, tant pour le diagnostic que pour le suivi du malade. Les biologistes se répartissent la validation du secteur selon un planning structuré, mais en cas de doute ils se concertent.

Egalement, deux fois par an, l'équipe pluridisciplinaire se réunit pour répondre à des « cas cliniques-EEQ » envoyés par NASCOLA à l'ensemble des laboratoires utilisant la méthode. Ceci font office « d'évaluation externe de la qualité » afin d'assurer une formation continue du personnel.

Ces évaluations externes de la qualité, nous permettent d'évaluer ***l'exactitude*** de l'interprétation des tests d'agrégation plaquettaire par comparaison avec les autres laboratoires et validation par NASCOLA.

Chaque laboratoire impliqué, reçoit plusieurs cas avec une description clinique contextualisée avec l'ensemble des résultats biologiques fait dont le test d'agrégation. Il s'agit pour les biologistes de rendre leur avis, éventuellement, demander de tests complémentaires, établir un diagnostic, comme ils le feraient pour leur propre patient. NASCOLA envoie ensuite une correction et note la concordance des « bonnes réponses » afin de permettre au laboratoire de s'évaluer sur sa démarche d'exploration et de s'ajuster si besoin est lors d'une deuxième réunion.

Nous avons une sensibilité et spécificité de 100% pour le diagnostic de maladie de Bernard et Soulier et la Thrombasthénie de Glanzman, notre technique a donc une forte validité intrinsèque.

III.3.4 Gestion des limites du test photométrique d'agrégation plaquettaire dans le diagnostic des maladies hémorragiques rares

Pré-analytique

Une des limites majeures du test est la ***maîtrise du pré-analytique***. Le test d'agrégation plaquettaire est soumis à des interférences du fait de la matrice utilisée, les plaquettes. C'est pourquoi nous les avons listées, afin de les référencer dans le système documentaire du laboratoire. Leur maîtrise est primordiale pour les minimiser. Une conduite à tenir est prévue pour chacune d'entre elles.

Pour chaque agrégation perturbée, un contrôle est recommandé afin de s'affranchir des interférences, pour contrôler et/ou confirmer l'anomalie par une exploration complémentaire. Le bon sens, la logique, et les concertations quotidiennes avec l'équipe permettent de rendre un résultat fiable et de les limiter, ou de tenir compte de celles-ci dans l'interprétation.

L'hémolyse entraine une libération d'ADP issue des globules rouges dans le plasma. Les plaquettes étant stimulées par l'ADP, l'exploration est ininterprétable. Les tubes hémolysés sont systématiquement écartés. Si le volume de plasma non hémolysé est en quantité insuffisante pour étudier tous les agonistes, alors l'exploration est priorisée à l'ADP 10µM, au collagène 3.3µg/mL et aux 2 doses de ristocétine.

En cas de **thrombopénie,** l'interprétation peut être difficile. La diminution du nombre de plaquettes ne permet pas forcément d'atteindre une agrégation maximale convenable. On priorisera les agonistes (ADP 10, Collagène, Ristocétine aux 2 doses) qui permettent d'écarter les thrombopathies majeures. La numération du PRP est nécessaire afin de s'assurer qu'il y a suffisamment de plaquettes (50 G/L) et qu'il n'y a pas de globules blancs. Une discussion des résultats est nécessaire avec le biologiste. La présence de globules blancs dans le PRP limite la transmission lumineuse et masque l'agrégation. Cet artefact peut être présent lorsque la centrifugation est plus lente que 200G/10min ou en cas d'hyperleucocytose > 15 G/L. On veillera à ce que la préparation du PRP permette d'obtenir une numération < 1G/L.

Pour ces raisons, nous avons décidé, de vérifier systématiquement la numération plaquettaire et le VMP avant centrifugation et de dresser la conduite à tenir suivante :

- **Numération plaquettaire entre 125 et 500 G/L :**

Les tubes sont centrifugés **10mn à 200G** afin de recueillir du plasma riche en plaquettes (**PRP**). Après avoir récupéré le PRP dans un tube à hémolyse, les tubes sont centrifugés à **10mn à 350G** 1 fois pour recueillir du plasma pauvre en plaquettes (**PPP**) pour réaliser le réglage de l'agrégomètre.

- **Numération plaquettaire supérieure à 500G/L** :

Les tubes sont centrifugés **10mn à 200G** afin de recueillir du plasma riche en plaquettes (**PRP**) puis faire une dilution du **PRP** avec son propre PPP au 1/2.
L'agrégation spontanée sera faite avec du **PRP** natif non réajusté.

- **Numération plaquettaire entre 100 et 125 G/L avec VMP >13 :**

Les tubes sont centrifugés **10mn à 60 – 70G** afin de recueillir du plasma riche en plaquettes (**PRP**).
Vérifier systématiquement la numération des plaquettes et leucocytes sur PRP, pour rechercher une trop grande contamination par des globules blancs pouvant perturber l'agrégation plaquettaire.

- **Numération plaquettaire <125 G/L avec VMP <13 :**

Les tubes sont centrifugés **10mn à 200G** afin de recueillir du plasma riche en plaquettes (**PRP**).
Vérifier systématiquement la numération des plaquettes et leucocytes sur PRP, pour voir s'il n'y a pas une trop grande contamination par des globules blancs pouvant perturber l'agrégation plaquettaire.

- **Numération plaquettaire <100 G/L avec VMP >13 :**

Le PRP est obtenu après sédimentation. Les tubes sont posés, inclinés sur un portoir durant au moins **30 minutes**. Le PRP est récupéré, puis vérifié sur automate. La numération des **GB doit être inférieure à 1 G/L** pour ne pas gêner l'agrégation in vitro. Sinon, centrifuger les tubes à **60 -70 G** selon le volume récupéré à raison de 1 minute par mL de PRP.
Vérifier systématiquement la numération des plaquettes et des leucocytes sur PRP et centrifuger à nouveau si nécessaire.

- **Numération plaquettaire <50 G/L :**

Le biologiste décidera de faire l'agrégation ou non, ainsi que le traitement des tubes pour obtenir le PRP.

Une numération du PRP est effectuée pour voir s'il n'y a pas une trop grande contamination par des globules blancs pouvant perturber l'agrégation plaquettaire.

Pour remarque, la vitesse de centrifugation dépend du diamètre de la centrifugeuse. La vitesse exacte à programmer est indiquée sur chaque appareil afin de se rapprocher le plus possible des consignes ci-dessus.

La lactescence entraîne ce même phénomène de transmission lumineuse. La bilirubine absorbe à la même longueur d'onde que le faisceau lumineux.

Une baisse d'agrégation peut être constatée avec un plasma très **ictérique**.

Le transport et son délai pré-analytique ont un impact sur le résultat. Une étude interne a montré qu'un délai de réalisation du test inférieur à 2H est idéal, un délai entre 4 et 6h entraîne une diminution de l'agrégation maximale et l'ISTH et CRPP recommandent un délai inférieur à 4h. Dans ce contexte si le délai n'est pas respecté, la réponse est diminuée, le laboratoire ne peut pas certifier qu'il s'agit d'une anomalie réelle ou d'une interférence. A l'arrivée de chaque échantillon, le délai est vérifié. Au-delà de 4 heures, la conduite à tenir est définie par le biologiste qui peut accepter la réalisation pour des prélèvements précieux. Dans tous les cas, aucune agrégation n'est réalisée après 5h.

Également, une **température d'acheminement** trop basse entraine également une diminution de l'agrégation maximale.

D'un point de vue analytique, il faut noter que le LTA est relativement peu physiologique car les plaquettes sont isolées des autres composants du sang total, agité dans des **conditions de faibles cisaillements**, ces conditions sont donc non représentatives des conditions physiologiques trouvées dans une artère. Ces conditions n'imitent pas entièrement l'adhésion, l'activation et l'agrégation plaquettaire vu in vivo après l'action d'un agoniste plaquettaire suites à une blessure vasculaire.

Post-analytique

La partie post-analytique requiert une expertise biologique avisée. **L'interprétation des tracés** peut s'avérer difficile. C'est donc pour cela que l'utilisation de cette technique est limitée à certains centres spécialisés, comme le nôtre, qui peuvent maintenir leur compétence avec un plus grand nombre de patients.

Nous avons également défini des consensus dans notre laboratoire quant à la qualification des courbes de chaque agoniste afin d'avoir des seuils décisionnels et des interprétations homogènes. L'agrégation est dite :

- **« Normale »** si l'agrégation maximale est supérieure à 60% atteinte en moins de 2 minutes.
- **« Diminuée »** si l'agrégation maximale est entre 40 et 60%
- **« Très diminuée »** si l'agrégation maximale est entre 20 et 40%
- **« Retardée** » : si le temps de latence est supérieur à 1 minute pour le collagène ou lorsque l'agrégation maximale n'est atteinte qu'après 4 minutes pour les autres agonistes
- **« Absente » :** si l'agrégation maximale est inférieure à 20%.
- **« Réversible »** : s'il y a une inhibition de la release reaction et une désagrégation d'au moins 50% de l'agrégation maximale.
- **« Double Vague »** si l'agrégation est non linéaire, avec un palier. Cette anomalie est surtout constatée à la ristocétine forte dose chez la maladie de Willebrand ou aux faibles doses d'ADP.

III.3.5 Etudes en cours et perspectives dans l'étude des fonctions plaquettaires

Bien ***que le LTA*** soit la référence pour l'analyse de la fonction plaquettaire, **sa standardisation** dans la pratique clinique reste insuffisante (59) (60). Une étude récente menée en Allemagne et en Autriche a souligné qu'une des sources majeures de la variabilité inter-laboratoires était dû aux réactifs utilisés par les laboratoires, plutôt que par la méthode LTA elle-même. (30)

Le comité de la physiologie plaquettaire de l'ISTH a lancé une étude internationale multicentrique pour évaluer l'ampleur de la variabilité des résultats du LTA(22). Cette étude utilise des agonistes « de référence » venant soit de STAGO soit du NIBSC (National Institute for Biological Standardisation and Control). On quantifiera la variation de résultats pour un même patient avec l'utilisation d'agonistes plaquettaires commerciaux et ceux internes aux différents laboratoires. Ceci fournira la preuve de l'existence d'une forte variabilité inter-laboratoires et rendra nécessaire l'utilisation de réactifs commerciaux communs à tous les laboratoires afin de standardiser nos pratiques.

Collagen	PAR-4AP	TRAP-6	CRP-XL	ADP	Epinephrine	Arachidonic Acid	U46619	Ristocetin
6	3	7	2	7	8	7	9	8

Figure 23 Tableau indiquant le nombre de fournisseurs différents disponibles dans le commerce, pour les participants à l'étude, pour chaque agoniste

Aussi la transcriptomique plaquettaire est une piste d'étude des fonctions plaquettaires intéressante. Avec les progrès techniques d'étude de séquençage de l'ARN, l'étude du transcriptome suscite de l'intérêt. Cependant, on rencontre des difficultés du même ordre que pour le LTA, les techniques d'isolement des plaquettes, de séquençage ne sont pas uniformes entre les laboratoires. Certains utilisent les lavages plaquettaires, d'autres les récupèrent par épuisement à l'aide de billes magnétiques, or ce pré-traitement semble être à l'origine d'une variation quantitative du transcriptome plaquettaire. Peu d'études à ce jour étudient l'impact réel de ces variables pré-analytiques sur les résultats rendus. Ces différences limitent considérablement la comparaison, la reproductibilité, et la généralisation des études transcriptomiques plaquettaires.

Un projet d'étude international en ce sens est en cours, réunissant les participants de l'ISTH-SSCs de plusieurs pays, Italie, l'Allemagne, le Royaume-Uni, les Pays-Bas, la Hongrie, les États-Unis et le Canada, et des experts dans le domaine de la transcriptomique. Cette étude plurisdiciplinaire permettra pour la première fois de dresser des conduites rigoureuses et testées expérimentalement dans le domaine de la transcriptomique plaquettaire. L'objectif est donc d'établir des protocoles validés pour l'acquisition de plaquettes hautement purifiées provenant de donneurs sains. Dans un second temps, les conclusions de l'étude permettront de développer des ateliers de formation en laboratoires pour éduquer la communauté sur les meilleures pratiques en matière de transcriptomique plaquettaire.

Les troubles plaquettaires héréditaires sont rares mais plus fréquents qu'on ne le pensait. Comme nous l'avons vu plus haut (cf I.2.2 Interprétation du test photométrique d'agrégation plaquettaire) des enquêtes récentes ont permis d'identifier de nombreux gènes responsables de ces dysfonctions, mais le diagnostic en pratique reste difficile. En effet, la nécessité de laboratoires spécialisés et/ou la nécessité de quantités importantes de sang fraîchement prélevé le rend compliqué. La problématique est d'autant plus vraie dans les pays émergents où l'accès aux outils de diagnostics est très limité.

On sait cependant que l'ensemble de ces troubles plaquettaires est associé à des défauts de composants plaquettaires qui peuvent être détectés par l'analyse ***en immunofluorescence*** du frottis sanguin. On pourrait donc envisager que les frottis sanguins soient expédiés, et ce même sur de grandes distances. On pourrait par la suite confirmer le diagnostic avec d'autres examens. Une étude est actuellement en cours afin de connaître l'utilisation de

l'immunofluorescence dans les laboratoires pour le diagnostic des dysfonctions plaquettaires ; également, prendre connaissance de l'utilité de l'immunofluorescence dans ces diagnostics et comparer des tests de validation de méthode au sein des sites participants.(61)

L'existence de laboratoires spécialisés implique que de nombreux échantillons primaires soient transportés. Des études sont actuellement en cours afin de connaître les méthodes les plus optimales de préparation, conservation et d'expédition des plaquettes.

La cytométrie de flux comme évoquée plus haut (cf I.2.3 Autres techniques) est prometteuse dans l'étude des fonctions plaquettaire. L'avantage de la CMF est que l'on peut étudier le plasma de patient ayant un taux faible de plaquettes. De plus, la technique ne nécessite que peu de sang pour les analyses contrairement au LTA. Cependant les réactifs utilisés sont nombreux et différents entre chaque laboratoire ce qui rend l'interprétation des résultats difficilement comparable.

III.4. Conclusion

Contrairement aux tests qui déterminent une quantité définie ou la mesure d'un biomarqueur clinique, **les tests de la fonction plaquettaire évaluent la dynamique des cellules vivantes**. En reproduisant in vitro les conditions homéostasiques favorables à une agrégation plaquettaire le LTA nous permet d'évaluer son temps et sa qualité.

Cette configuration implique une série de **problématiques analytiques inédites** et obligent donc le biologiste à connaître remarquablement cet outil de dépistage des dysfonctions plaquettaires. Il doit maîtriser l'ensemble du processus analytique de la prescription au rendu du résultat en ayant connaissance des risques et limites de la méthode afin d'en assurer un résultat conforme.

C'est dans cette optique que « la démarche qualité » des laboratoires d'analyse médicale trouve tout son sens. La norme **ISO NF EN ISO 15189:2012** impose une rigueur scientifique traçable et transparente au sein de la communauté scientifique (médecins, chercheurs, docteurs) ainsi qu'aux patients.

Notre travail reflète la complexité de la mise en œuvre de l'agrégométrie plaquettaire par photométrie et l'intér et justifie la **nécessité d'un centre expert spécialisé** comme l'HCV (hémostase cardiovasculaire) dans le laboratoire de Rangueil, à Toulouse.

Bibliographie

1. has 2011 biologie_anomalie_hemostase_t3_tap_-_rapport_devaluation_2011-08-10_14-55-5_343.pdf.

2. https://maladies-plaquettes.org/.

3. Andrews RK, Gardiner EE, Shen Y, Whisstock JC, Berndt MC. Glycoprotein Ib–IX–V. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. août 2003;35(8):1170‑4.

4. Bergmeier W, Stefanini L. Novel molecules in calcium signaling in platelets. Journal of Thrombosis and Haemostasis. juill 2009;7:187‑90.

5. Payrastre B, Alessi M-C, Sie P. Pathophysiology of inherited platelet disorders. Hématologie. janv 2014;20(1):20‑35.

6. Gachet C. Les mécanismes moléculaires de l'activation plaquettaire. Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine. févr 2013;197(2):361‑73.

7. born1962.pdf. article n°4832 écrit par BORN dans Nature

8. Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, Hayward CPM, Kenny D, Nugent D, et al. Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry: a consensus of the working party from the platelet physiology subcommittee of SSC/ISTH. J Thromb Haemost. juin 2013;11(6):1183‑9.

9. Cattaneo et al. - 2013 - Recommendations for the standardization of light t.pdf.

10. Harrison et al. - 2011 - Guidelines for the laboratory investigation of her.pdf.

11. Fiore M, Pillois X, Nurden P, Nurden AT, Austerlitz F. Founder effect and estimation of the age of the French Gypsy mutation associated with Glanzmann thrombasthenia in Manouche families. Eur J Hum Genet. sept 2011;19(9):981‑7.

12. Nurden AT, Fiore M, Nurden P, Pillois X. Glanzmann thrombasthenia: a review of ITGA2B and ITGB3 defects with emphasis on variants, phenotypic variability, and mouse models. Blood. 1 déc 2011;118(23):5996‑6005.

13. Coller BS, Shattil SJ. The GPIIb/IIIa (integrin αIIbβ3) odyssey: a technology-driven saga of a receptor with twists, turns, and even a bend. Blood. 15 oct 2008;112(8):3011‑25.

14. Durrant TN, van den Bosch MT, Hers I. Integrin αIIbβ3 outside-in signaling. Blood. 5 oct 2017;130(14):1607‑19.

15. Jurk K, Schulz AS, Kehrel BE, Räpple D, Schulze H, Möbest D, et al. Novel integrin-dependent platelet malfunction in siblings with leukocyte adhesion deficiency-III (LAD-III) caused by a point mutation in FERMT3. Thromb Haemost. mai 2010;103(5):1053‑64.

16. Svensson L, Howarth K, McDowall A, Patzak I, Evans R, Ussar S, et al. Leukocyte adhesion deficiency-III is caused by mutations in KINDLIN3 affecting integrin activation. Nature Medicine. mars 2009;15(3):306‑12.

17. Mory A, Feigelson SW, Yarali N, Kilic SS, Bayhan GI, Gershoni-Baruch R, et al. Kindlin-3: a new gene involved in the pathogenesis of LAD-III. Blood. 15 sept 2008;112(6):2591.

18. Malinin NL, Zhang L, Choi J, Ciocea A, Razorenova O, Ma Y-Q, et al. A point mutation in KINDLIN3 ablates activation of three integrin subfamilies in humans. Nat Med. mars 2009;15(3):313‑8.

19. Robert P, Canault M, Farnarier C, Nurden A, Grosdidier C, Barlogis V, et al. A novel leukocyte adhesion deficiency III variant: kindlin-3 deficiency results in integrin- and nonintegrin-related defects in different steps of leukocyte adhesion. J Immunol. 1 mai 2011;186(9):5273‑83.

20. Boudreaux MK, Catalfamo JL, Klok M. Calcium-Diacylglycerol Guanine Nucleotide Exchange Factor I gene mutations associated with loss of function in canine platelets. Translational Research. 1 août 2007;150(2):81‑92.

21. Boudreaux MK, Schmutz SM, French PS. Calcium diacylglycerol guanine nucleotide exchange factor I (CalDAG-GEFI) gene mutations in a thrombopathic Simmental calf. Vet Pathol. nov 2007;44(6):932‑5.

22. Alessi M-C, Payrastre B, Sié P. Strengths and weaknesses of platelet aggregation in diagnosis of hereditary platelet disorders. Hématologie. sept 2017;23(5):298‑311.

23. Schulman S, Kearon C, Subcommittee on Control of Anticoagulation of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Definition of major bleeding in clinical investigations of antihemostatic medicinal products in non-surgical patients. J Thromb Haemost. avr 2005;3(4):692‑4.

24. Tosetto A, Castaman G, Rodeghiero F. Bleeders, bleeding rates, and bleeding score. Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2013;11(s1):142‑50.

25. Cattaneo M, Zighetti ML, Lombardi R, Martinez C, Lecchi A, Conley PB, et al. Molecular bases of defective signal transduction in the platelet P2Y12 receptor of a patient with congenital bleeding. PNAS. 18 févr 2003;100(4):1978‑83.

26. Dawood B, Lester W, Peake I, Rodeghiero F, Goodeve A, Makris M, et al. Identification and characterization of a novel P2Y12 variant in a patient diagnosed with type 1 von Willebrand disease in the European MCMDM-1VWD study. Blood. 1 mars 2009;113:4110‑3.

27. Cattaneo M. The platelet P2Y12 receptor for adenosine diphosphate: congenital and drug-induced defects. Blood. 17 févr 2011;117(7):2102‑12.

28. Watson S, Daly M, Dawood B, Gissen P, Makris M, Mundell S, et al. Phenotypic approaches to gene mapping in platelet function disorders: Identification of new variant of P2Y12, TxA2 and GPVI receptors. Hamostaseologie. 2010;30(01):29‑38.

29. Buchanan GR, Handin RI. Platelet function in the Chediak-Higashi syndrome. Blood. juin 1976;47(6):941‑8.

30. Études des plaquettes dans une variante du syndrome Hermansky-Pudlak. [Internet]. [cité 28 juill 2020]. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2047499/

31. Salles II, Feys HB, Iserbyt BF, De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H. Inherited traits affecting platelet function. Blood Rev. mai 2008;22(3):155‑72.

32. Dawood BB, Lowe GC, Lordkipanidzé M, Bem D, Daly ME, Makris M, et al. Evaluation of participants with suspected heritable platelet function disorders including recommendation and validation of a streamlined agonist panel. Blood. 13 déc 2012;120(25):5041‑9.

33. Ingerman CM, Smith JB, Shapiro S, Sedar A, Silver MJ. Hereditary abnormality of platelet aggregation attributable to nucleotide storage pool deficiency. Blood. 1 août 1978;52(2):332‑44.

34. A novel thromboxane A2 receptor N42S variant results in reduced surface expression and platelet dysfunction - Strathprints [Internet]. [cité 28 juill 2020]. Disponible sur: https://strathprints.strath.ac.uk/49156/

35. Mumford AD, Dawood BB, Daly ME, Murden SL, Williams MD, Protty MB, et al. A novel thromboxane A2 receptor D304N variant that abrogates ligand binding in a patient with a bleeding diathesis. Blood. 14 janv 2010;115(2):363‑9.

36. Handa M, Watanabe K, Kawai Y, Kamata T, Koyama T, Nagai H, et al. Platelet unresponsiveness to collagen: involvement of glycoprotein Ia-IIa (alpha 2 beta 1 integrin) deficiency associated with a myeloproliferative disorder. Thromb Haemost. mars 1995;73(3):521‑8.

37. Lanza F. Bernard-Soulier syndrome (hemorrhagiparous thrombocytic dystrophy). Orphanet J Rare Dis. 16 nov 2006;1:46.

38. Nurden P, Gobbi G, Nurden A, Enouf J, Youlyouz-Marfak I, Carubbi C, et al. Abnormal VWF modifies megakaryocytopoiesis: studies of platelets and megakaryocyte cultures from patients with von Willebrand disease type 2B. Blood. 1 avr 2010;115(13):2649‑56.

39. Platelets+in+Thrombotic+and+Non-Thrombotic.pdf.

40. Elalamy I, Gkalea V, Gerotziafas G, Ketatni H, Hatmi M. The usefulness of platelet function evaluation in clinical practice. Annales de biologie clinique. nov 2013;71(S1):47‑57.

41. Arrêté_du_26_novembre_1999_version_initiale.rtf.

42. Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé (ANAES). Acta Endosc. avr 1998;28(2):151‑5.

43. Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé (ANAES). Acta Endosc. avr 1998;28(2):151‑5.

44. rapport_IGAS_2006.pdf.

45. Ballereau M. Rapport pour un projet de réforme de la biologie médicale. :89.

46. Ordonnance_n°_2010-49_du_13_janvier_2010_version_initiale.rtf.

47. LOI_n°2013-442_du_30_mai_2013_version_consolidee_au_20200221.rtf.

48. guide-accreditation.pdf.

49. Enquete_europeenne_concernant_l_accreditation_2019.pdf [Internet]. [cité 15 juill 2020]. Disponible sur: https://www.cofrac.fr/

50. SH-REF-02.pdf. Disponible sur: https://www.cofrac.fr/

51. SH-GTA-01.pdf. Disponible sur: https://www.cofrac.fr/

52. SH-REF-08.pdf. Disponible sur: https://www.cofrac.fr/

53. SH-INF-50.docx. Disponible sur: https://www.cofrac.fr/

54. SH-GTA-04.pdf. Disponible sur: https://www.cofrac.fr/

55. SH-GTA-06.pdf Disponible sur: https://www.cofrac.fr/

57. SH-FORM-43.doc. Disponible sur: https://www.cofrac.fr/

58. Polack B, Schved J-F, Boneu B. Preanalytical Recommendations of the 'Groupe d'Etude sur l'Hémostase et la Thrombose' (GEHT) for Venous Blood Testing in Hemostasis Laboratories. Pathophysiol Haemos Thromb. 2001;31(1):61‑8.

59. Christie DJ, Clinical and Laboratory Standards Institute. Platelet function testing by aggregometry: approved guideline. Wayne, PA: CLSI; 2008.

60. Platelet function testing: practice among UK National External Quality Assessment Scheme for Blood Coagulation participants, 2006 | Journal of Clinical Pathology [Internet]. [cité 1 juill 2020]. Disponible sur: https://jcp.bmj.com/content/61/8/950

61. Kunishima S, Matsushita T, Kojima T, Sako M, Kimura F, Jo E-K, et al. Immunofluorescence Analysis of Neutrophil Nonmuscle Myosin Heavy Chain-A in MYH9 Disorders: Association of Subcellular Localization with MYH9 Mutations. Laboratory Investigation. janv 2003;83(1):115‑22.

Annexes

Annexe 1 Validation de méthode SH FORM 43 : Test d'agrégation plaquettaire

Paramètres obtenus lors la validation, selon les documents COFRAC de référence SH FORM 43 - rev 01 et au tableau du § 9 du guide technique SH GTA 04 rev 01 définissant les paramètres à déterminer dans le cadre d'une vérification sur site (portée A) ou d'une validation (portée B).

PORTEE FLEXIBLE	☐	**A**	☒ **B : Technique manuelle sur agrégomètres SD Médical**

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE

IDENTIFICATION DU PARAMETRE (comme identifié dans la liste détaillée des examens)			
Agrégation plaquettaire			
PROCESSUS SIMPLE	☒ SIMPLE	☐ XE :	COMPLE

Description du processus			
PROCESSUS SIMPLE	Eléments vérifiés (argumentation)	☒	Répétabilité
		☒	Fidélité intermédiaire
		☒	Variabilité inter-opérateurs
		☐	Justesse
		☒	Exactitude
		☒	Sensibilité et spécificité analytique
		☒	Incertitudes
		☐	Etendues de mesure
		☒	Comparaison de méthodes
		☒	Interférences
		☐	Contaminations
		☒	Robustesse et fiabilité des réactifs
		☒	Intervalle de référence

Pour chaque étape, le laboratoire procèdera à la vérification / validation des items attendus, et dupliquera autant que de besoin les pages 2 à 8 (évaluation des performances de la méthode) du présent document. Si un autre élément du processus lui semble critique, il devra vérifier / valider cette étape et le préciser dans la conclusion argumentée. C'est cette vérification qui lui permettra de maitriser ce point critique.
Argumentaire (le cas échéant) : Portée B

Description de la méthode	
Analyte / Mesurande[1] :	Agrégation plaquettaire (Latence, vélocité, agrégation maximale et surface)
Principe de la Méthode :	Mesure par turbidimétrie de la latence, de la vélocité de réponse, de la surface à 4 min et de l'agrégation maximale d'un plasma riche en plaquettes (PRP) exposé à différents agonistes plaquettaires.

[1] Cf. § 2.2 SH GTA 04

Type d'échantillon primaire :	Plasma riche en plaquettes (PRP)
Type de récipient, additifs :	Tube citraté 0,109M de 2.7 ml (adultes) ou 1.8 ml (enfants)
Prétraitement de l'échantillon :	Centrifugation du sang citraté en fonction de la numération plaquettaire selon MT-PTAR-HEMA-030
Unités :	Interprétation des résultats à l'aide des données suivantes de chaque courbe : Latence en secondes, vélocité en %/min, agrégation maximale en % et surface à 4 minutes en %*s. **Rendu de résultats qualitatifs par agoniste (agrégation diminuée, retardée, etc…) avec conclusion générale d'interprétation du profil d'agrégation (agrégation normale, perturbée…)**
Intervalles de référence [2] :	Il s'agit d'une méthode qualitative avec une interprétation globale des tracés des différents agonistes aux différentes concentrations en tenant compte des résultats de l'hémogramme et des éléments cliniques. (cf valeurs de référence)
Marquage CE (Oui/Non) :	Agrégomètres et Kollagenreagens Horm® CE. Absence de marquage CE pour les autres réactifs
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	Non existant
Equipement (instrument, analyseur, etc.)	Thrombo-agrégomètres SD Medical TA-8V - Stago
Référence du réactif :	* ADP:Adenosine5'-diphosphate sodium salt-bacterial, ≥ 95% (HPLC) (SIGMA-ALDRICH®) REF: A2754, référence 807405 * Collagène:Kollagenreagens Horm® (Takeda) REF 1130630, référence 804752 * Ristocétine: Ristocetin* (STAGO) version notice : 00501 OFFRE 0034729, référence 810405 * Epinéphrine: (±)- Epinephrine hydrochloride référence E4642 * TRAP:Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-Pro-Asn-Asp-Lys-Tyr-Glu-Pro-Phe-≥97% (HPLC) (SIGMA-ALDRICH®) REF S7152, référence 812608 *TXA2:9,11-Dideoxy-11α,9α-epoxymethanoprostaglandin F2α-solution, 10mg/L in methyl acetate (SIGMA-ALDRICH®) REF D8174, référence 812606 * Acide arachidonique: Arachidonic acid sodium salt from Mortierella alpine- ≥98.5%(GC) (SIGMA-ALDRICH®)REF SML1395 référence 807418 * CRP:CRP XL, Cambridge. Il n'existe pas de notice fournisseur pour les différents réactifs, seulement des notices de sécurité.
Matériau d'étalonnage (références) :	Plasma pauvre en plaquettes (PPP) autologue pour chaque patient

[2] Indiquer les valeurs de référence si différentes en fonction de l'anticoagulant. Tenir compte du sexe, âge…

Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	0 et 100% de transmission lumineuse, établis avec respectivement le PRP et le PPP de chaque patient.

Mise en oeuvre	
Opérateur(s) qualifié(s)et reconnu(s) compétents ayant réalisé la vérification de méthode	Pierre Souleyreau (technicien de laboratoire) Cédric Garcia (ingénieur hospitalier) Céline Perrin (interne)
Procédure de validation	Validation des méthodes : PG-BIO-MS-QUAL-019
Procédure de gestion de la portée flexible	Gestion de la portée flexible : PG-BIO-MSQUAL-018
Période d'évaluation	De Mai à Août 2019
Date de 1ère mise en service	ATG 1012 (agrégomètre n°1) mis en service en Janvier 2007 N°72366 (agrégomètre n°3) mis en service en Août 2019 Technique réalisée au laboratoire depuis les années 1980 environ.
Référentiel sélectionné	Norme NF EN ISO 15189 - Laboratoires de biologie médicale DX-BIO-MS-QUAL-001 Recueil des exigences pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale norme 15189 2012 SH-REF-02

MAITRISE DES RISQUES
Voir document **DE-PTAR-MS-QUAL-034** **SH FORM 43 HCV Hémostase CardioVasculaire : Maîtrise des risques 5M**

Evaluation des performances de la méthode	
Préciser le type et référence d'échantillon :	Compte tenu des difficultés techniques en raison du type d'échantillon utilisé, qui ne peut être congelé, transporté ou conservé (nécessité d'exécution de la technique d'agrégation rapidement après prélèvement, sur des plaquettes « fraiches » avec prélèvement sanguin datant de moins de 3 heures), pour se rapprocher au mieux des conditions physiologiques, mais également du nombre important de tubes nécessaires pour chaque analyse, il n'existe pas de CIQ, simplement des EEQ d'interprétations de courbes. Ceci implique donc une évaluation des performances de la technique réalisée à l'aide des échantillons de sang prélevés chez des témoins sains avec prélèvement de tube citraté pour obtenir un PRP. Le témoin sain est un adulte, sans histoire hémorragique personnelle, qui n'a pas pris d'AINS ou inhibiteur des fonctions plaquettaires dans les 10 jours qui précèdent l'expérience.

Bibliographie et numérotation de référence :

M. CATTANEO, C. CERLETT I , et al. Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry: a consensus of the working party from the platelet physiology subcommittee of SSC/ISTH. Journal of Thrombosis and Haemostasis.2013 ;11:1183–1189*

Haute Autorité de Santé : Rapport d'évolutions technologiques. Biologie des anomalies de l'hémostase. Tome III : test photométrique d'agrégation plaquettaire Juillet 2011

Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires. agrégation plaquettaire. Standardisation méthodologique. 2009

Répétabilité

☒ **Applicable** ☐ **Non Applicable**

Chaque agoniste est étudié avec le PRP de 3 tubes différents d'un même témoin prélevés au même moment, sur chaque agrégomètre. Les principaux agonistes utilisés en pratique courante sont évalués aux concentrations usuelles, soit : ADP 5 µmol/L, ADP 10 µmol/L, Ristocétine 0,5mg/L Ristocétine 1,25mg/mL, TRAP 25 µM , Acide Arachidonique 1mmol/L, CRP, collagène 1.5µg/mL, collagène 3.3µg/mL, Epinéphrine 5 µM, et TXA2 5 µM.
Au total, chaque témoin a été prélevé de 14 tubes citratés de 2,7 ml.
Etude de 3 paramètres : vélocité, agrégation maximale et surface. Evaluation quantitative et qualitative des paramètres. Pour remarque, aucune recommandation n'est disponible concernant une variabilité quantitative acceptable, étant donnné qu'il s'agit d'une interprétation qualitative des courbes d'agrégation, mais par convention on propose de suivre les recommandations du Groupe Français d'Hemostase et de Thrombose (GFHT) concernant les analyses d'hémostase automatisée (CV<15%).

(cf. fichier ci-joint). Répéta Repro agrégation.pdf

AGREGOMETRE 1	Vélocité			Agrégation maximale			surface		
Agoniste	m	ET	CV	m	ET	CV	m	ET	CV
ADP 5 µM	92,38	2,573	2,78	65,34	2,110	3,23	158,33	5,453	3,44
ADP 10 µM	128,77	17,562	13,64	69,28	1,026	1,48	182,75	5,202	2,85
Ristocétine 1,25 mg/mL	114,46	12,613	11,02	81,74	6,114	7,48	228,09	14,348	6,29
Ristocétine 0,5 mg/mL	7,95	1,495	18,81	3,60	0,240	6,66	1,77	2,514	141,75
TRAP 14 25 µM	252,11	10,349	4,10	104,37	6,501	6,23	243,74	8,508	3,49
Acide Arachidonique 1 mM	230,02	41,523	18,05	100,82	11,114	11,02	231,37	15,900	6,87
CRP 0,9 µg/mL	221,67	18,150	8,19	80,96	1,679	2,07	201,03	8,969	4,46
Collagène 1,5 µg/mL	226,27	12,763	5,64	78,33	3,010	3,84	179,50	6,890	3,84
Collagène 3,3 µg/mL	152,45	13,112	8,60	77,62	1,012	1,30	175,46	14,942	8,52
Epinéphrine 5 µM	57,63	10,147	17,61	76,93	3,078	4,00	89,50	6,720	7,51
TXA2 5µM	172,38	7,152	4,15	85,33	3,010	3,53	234,56	12,368	5,27

Toutes données	**agrégomètre**	**vélocité**	**agrégation max**	**surface**
CV médian	**1**	**8,60**	**3,84**	**5,27**

AGREGOMETRE 3	Vélocité			Agrégation maximale			surface		
Agoniste	m	ET	CV	m	ET	CV	m	ET	CV
ADP 5 µM	94,09	12,530	13,32	61,57	4,974	8,08	149,75	24,932	16,65
ADP 10 µM	115,30	17,315	15,02	72,63	7,773	10,70	192,69	29,718	15,42
Ristocétine 1,25 mg/mL	108,91	17,968	16,50	80,46	9,722	12,08	227,37	31,157	13,70
Ristocétine 0,5 mg/mL	5,92	2,141	36,15	2,86	0,742	25,95	1,90	0,609	32,09
TRAP 14 25 µM	267,38	7,056	2,64	80,39	3,661	4,55	237,45	12,587	5,30
Acide Arachidonique 1 mM	225,90	35,685	15,80	83,97	4,007	4,77	226,40	10,194	4,50
CRP 0,9 µg/mL	211,21	15,601	7,39	78,11	4,584	5,87	189,60	22,356	11,79
Collagène 1,5 µg/mL	231,77	22,532	9,72	79,51	3,586	4,51	186,16	10,446	5,61
Collagène 3,3 µg/mL	175,05	37,856	21,63	79,62	2,104	2,64	177,76	12,907	7,26
Epinéphrine 5 µM	53,21	8,320	15,64	82,81	5,118	6,18	143,82	14,432	10,04
TXA2 5µM	207,11	8,035	3,88	85,69	3,070	3,58	245,07	14,812	6,04
CV médian			**3**		**15,02**		**5,87**		**10,04**

sans risto 0,5	**agrégomètre**	**vélocité**	**agrégation max**	**surface**
CV médian	**1**	**8,39**	**3,68**	**4,87**
CV médian	**3**	**14,17**	**5,32**	**8,65**

Argumentaire de la Conclusion :

Il n'y a pas de CV acceptable défini par une société savante [1, 3] ou par le fournisseur. Néanmoins, nous retrouvons dans l'ensemble une variabilité non majeure pour cette technique qualitative (CV médian estimé de 5 à 15 % selon les éléments mesurés), ce qui reste conforme au CV acceptable proposé par le GFHT pour les tests de coagulation automatisé. Pour remarque, nous retrouvons une variabilité calculée importante pour la ristocétine faible dose, du fait d'une agrégation maximale très faible. Cela n'a aucune incidence clinique, car définie qualitativement comme absence d'agglutination, ici de façon répétée, ce qui est attendu chez ces témoins sains. L'évaluation qualitative de toutes les courbes est normale.

Conclusion : conforme.

Fidélité intermédiaire

☒ **Applicable** ☐ **Non Applicable- *A JUSTIFIER***

Etude de la reproductibilité sur les 3 agrégomètres du laboratoire (N°1 et 3) et agrégomètre de prêt (N°2), avec les prélèvements de 2 à 3 témoins, en 2 à 3 jours selon les agonistes évalués et par le technicien et l'ingénieur. Les principaux agonistes utilisés en pratique courante sont évalués aux concentrations usuelles, soit : ADP 5 µmol/L, ADP 10 µmol/L, Ristocétine 0,5mg/L Ristocétine 1,25mg/mL, TRAP 25 µM , Acide Arachidonique 1mmol/L, CRP, collagène 1.5µg/mL, collagène 3.3µg/mL, Epinéphrine 5 µM, et TXA2 5 µM. Etude de 3 paramètres : vélocité, agrégation maximale et surface. Evaluation quantitative et qualitative des paramètres. Pour remarque, aucune recommandation n'est disponible concernant une variabilité quantitative acceptable, étant donnné qu'il s'agit d'une interprétation qualitative des courbes d'agrégation, mais par convention on propose de suivre les recommandations du Groupe Français d'Hemostase et de Thrombose (GFHT) concernant les analyses d'hémostase automatisée (CV<15%).

(cf. fichier ci-joint). Répéta Repro agrégation.pdf

Agoniste	nb témoins	nb agrégomètres	nb jours	M vélocité	ET vélocité	CV vélocité	M agrég max	ET agrég max	CV agrég max	M	ET surface	CV surface
ADP 5 µM/L	2	3	2	97,21	13,76	14,16 %	65,59	5,22	7,96%	167,40	10,43	6,23%
ADP 10 µM/L	2	3	2	96,03	22,44	23,36 %	69,04	0,68	0,98%	182,57	3,62	1,98%
Ristocétine 1,25 mg/mL	2	3	2	8,67	1,61	18,55 %	5,64	1,28	22,61%	13,00	6,09	46,85 %
Ristocétine 0,5 mg/mL	2	3	2	129,91	16,02	12,34 %	81,99	1,27	1,54%	233,13	5,12	2,20%
Acide Arachidonique 1 mM/L	3	3	3	132,40	40,80	30,82 %	74,53	9,95	13,35%	197,31	23,06	11,69 %
Collagène1,5 µg/mL	2	3	3	185,07	73,81	39,88 %	72,73	10,96	15,06%	170,76	37,59	22,01 %
Collagène 3,3 µg/mL	2	3	3	176,53	23,44	13,28 %	66,29	8,72	13,15%	191,74	17,70	9,23%
TRAP 14 25 µM	2	3	3	258,19	71,45	27,67 %	82,83	13,83	16,70%	229,97	12,09	5,26%
CRP 0,9 µg/mL	2	3	3	182,64	41,24	22,58 %	80,29	4,00	4,98%	206,94	14,93	7,22%
Epinéphrine 5 µM/L	2	3	3	82,19	25,66	31,23 %	77,84	3,70	4,75%	164,45	32,16	19,56 %
TXA2 5µM	2	3	3	236,07	53,18	22,53 %	85,04	8,22	9,67%	250,17	21,72	8,68%
CV MEDIAN						**22,58 %**			**9,67%**			**8,68%**

Argumentaire de la Conclusion : Il n'y a pas de CV acceptable défini par une société savante [1, 3] ou par le fournisseur. Néanmoins, nous retrouvons dans l'ensemble une variabilité non majeure pour cette technique qualitative : CV médian <10 % pour l'agrégation maximale et la surface pour tous les éléments mesurés et plus élevé pour la vélocité (en raison des valeurs élevées pour les agonistes de réponse peu intense tels que la ristocétine 0,5 mg/mL, le collagène faible dose). Cela n'a aucune incidence clinique, et l'évaluation qualitative de toutes les courbes est normale. Le laboratoire participera en 2020 à l'étude internationale PAPS sous l'égide du CRPP et de l'ISTH, étude de comparaison multicentrique dans des laboratoires référents dans l'étude et le diagnostic des pathologies plaquettes à l'issue de laquelle les données de réproductibilité seront publiées.
Conclusion : conforme.

Variabilité inter-opérateurs	
☒ **Applicable**	☐ **Non Applicable- *A JUSTIFIER***

Data Agregation.pdf

(cf. ficher joint).

Interprétation de 18 courbes d'agrégations plaquettaires, de 18 patients d'intérêts par 6 opérateurs différents, 1 technicien, 1 ingénieur et 4 biologistes habilités et comparaisons de la variabilité inter-opérateurs à travers un formulaire dédié. Comparaison des différentes conclusions des courbes d'agrégations plaquettaires de chaque opérateur et évaluation de la concordance inter-juges à l'aide du coefficient Kappa (de Fleiss ;κ car plusieurs juges) définit comme suit : $\kappa = \frac{\bar{P} - \bar{P}_e}{1 - \bar{P}_e}$. Avec : $\bar{P} - \bar{P}_e$ la concordance observée – la concordance attendue

Les sujets sont indexés par *i* = 1, ... *N* les catégories sont indexées par *j* = 1, ... *k*. Soit n_{ij} qui représente le nombre d'observateurs qui attribuent le *i*-ème sujet à la *j*-ème catégorie. On a $p_j = \frac{1}{Nn}\sum_{i=1}^{N} n_{ij}, \qquad 1 = \frac{1}{n}\sum_{j=1}^{k} n_{ij}$ qui représente la proportion de toutes les attributions à la *j*-ème catégorie:, $P_i = \frac{1}{n(n-1)}\sum_{j=1}^{k} n_{ij}(n_{ij}-1)$ qui représente à quel point les observateurs sont d'accord entre eux pour le *i*-ème sujet, et $\bar{P} = \frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N} P_i$ et $\bar{P}_e = \sum_{j=1}^{k} p_j^2$.

L'interprétation de κ est définie comme suit selon the measurement of observer agreement for categorical data. Landis J.R et Koch G.G.Biometrics ; 33 :159-174

κ	interprétation
<0	Désaccord
0.0 — 0.20	Accord très faible
0.21 — 0.40	Accord faible
0.41 — 0.60	Accord modéré
0.61 — 0.80	Accord fort
0.81 — 1.00	Accord presque parfait

La concordance interjuges a examiné les résultats de chaque agoniste pour les 18 patients, pour chaque patient, les conclusions de plusieurs agonistes, et la conclusion générale d'agrégométrie de chaque patient.

Etude de la concordance inter-juge sur l'interprétation des tracés de chaque agoniste

Avec *N* le nombre total de sujets ici 18, soit *n* le nombre de juges ici 6, et soit *k* le nombre de catégorie dans laquelle les attributions sont faites ici 9.

agoniste	κ
ADP 2,5 µM	0,66
ADP 5 µM	0,76
ADP10 µM	0,62
Collagène 3,3 µg/mL	0,63
Ristocétine 1,25 mg/mL	0,74
Ristocétine 0,5 mg/mL	0,90
Acide arachidonique 1 mM	0,68
Epinéphrine 5 µM	0,69
Kappa Moyen	**0,71**
Interprétation	Accord fort

Il y a dans l'ensemble une excellente concordance dans l'interprétation qualitative de chaque agoniste pour les différents patients avec un Kappa moyen estimé à κ=0,71, ce qui constitue un accord fort, montrant donc une bonne homogénéité d'interprétation des tests d'agrégométrie dans l'équipe

Pour remarque, quelques catégories avec des courbes de faible amplitude ou réversible doivent être mieux définies :
Concernant l'ADP 2,5 µM, les catégories « absente » et « très diminuée »,
Pour l'ADP 2.5, 5 et 10 µM , la catégorie « réversible »,
Les catégories « très diminuée » et « diminuée » pour l'ADP 10 µM et le collagène 3.3 µg/mL.
Pour le collagène 3.3 µg/mL, l'acide arachidonique et l'épinéphrine la catégorie « retardée ».
Pour la ristocétine 1.25 mg/mL la caractérisation d'une double vague.

Etude de la concordance inter-juge sur l'interprétation des résultats de chaque patient

Avec *N* = 18 nombre total de sujets, soit *n*= 6 le nombre de juges et soit *k* = 9 le nombre de catégorie dans laquelle les attributions sont faites

Numéro Patient	Kappa de Fleiss	Kappa moyen	0,74
1	1,00		
2	0,69	Interprétation	Accord fort
3	0,17		
4	0,81		
5	0,89		
6	0,73		
7	1,00		
8	0,63		
9	0,87		
10	1,00		
11	1,00		
12	1,00		
13	0,68		
14	0,77		
15	0,17		
16	0,84		
17	0,38		
18	0,62		

Il y a dans l'ensemble une excellente concordance dans l'interprétation qualitative des différents agonistes pour les différents patients avec un Kappa moyen estimé à κ=0,74, ce qui constitue un accord fort, montrant donc une bonne homogénéité d'interprétation des tests d'agrégométrie dans l'équipe.

Pour les patients 3, 15 et 17 les courbes de l'ADP 2.5, l'ADP 5, l'ADP 10, le collagène, l'Acide arachidonique et l'épinéphrine ont été classées dans la catégorie « ininterprétable » par deux opérateurs devant la présence d'une agrégation à la ristocétine faible dose vs « normal » pour les autres. **Cette discordance dans l'interprétation des tracés des différents agonistes n'impacte pas la conclusion générale du test d'agrégométrie.** Si une agrégation est présente à la ristocétine 0,5 mg/mL elle doit être contrôlée et systématiquement complétée par l'agrégation aux faibles doses décroissantes de ristocétine 0,4; 0,3; 0,2 et 0,1 mg/mL comme définit dans les documents qualités correspondants.
Pour le patient 8, l'ADP 2.5, 5 et l'AA ont été classé en « réversible » pour quatre d'entre eux et 2 l'ont classé en « diminué ». Pour l'ADP 10 deux l'ont classé en « normal » et 4 en « réversible ». **Cette différence d'interprétation des tracés des agonistes n'a pas impacté la conclusion générale du test d'agrégation plaquettaire**. Tous les opérateurs ont conclu à une agrégation « pertubée ».
Pour le patient 13, l'ADP 2.5 a été classé par 4 en « très diminuée », par 1 en « réversible », par 1 en « absente ». Pour le collagène 3.3, 3 l'ont classé dans « réversible » et 3 l'ont classé dans « normal ».
Tous les opérateurs ont conclu in fine à une agrégation « pertubée ».
Pour le patient 14, l'épinéphrine 5 a été classé en « réversible » par 2 opérateur et en « normal » par 4 opérateurs **sans impact dans la conclusion générale de l'agrégométrie.**
Pour le patient 18, l'ADP 2.5, 5, et 10 a été classé par 1 opérateur en « réversible » vs en « diminuée » par 5 opérateurs. Le collagène a été classé 3 fois en « diminuée » vs 3 fois en « très diminuée ». L'AA a été classé 5 fois en « absente » vs 1 fois en « normale ». L'épinéphrine a été classée une fois en « diminuée » vs 5 fois en « très diminuée » **sans impact dans la conclusion générale de l'agrégométrie.**

Etude la concordance inter-juge sur les conclusions générales de de l'agrégométrie pour chaque patient
Avec *N* le nombre total de sujets ici 18, soit *n* le nombre de juges ici 6, et soit *k* le nombre de catégorie dans laquelle les attributions sont faites ici 4.

N° patients	Nombres de Juges	Normale	Légèrement perturbée - Sensiblement normale	Perturbée - Fortement perturbée	Ininterprétable	Somme	Pi	
Patient 1	6	6	0	0	0	6	1,00	
Patient 2	5	0	4	0	1	5	0,55	
Patient 3	6	0	0	6	0	6	1,00	
Patient 4	6	0	5	1	0	6	0,67	
Patient 5	6	1	5	0	0	6	0,67	
Patient 6	6	0	0	6	0	6	1,00	
Patient 7	6	5	1	0	0	6	0,67	
Patient 8	6	0	4	2	0	6	0,47	
Patient 9	6	0	6	0	0	6	1,00	
Patient 10	6	0	0	6	0	6	1,00	
Patient 11	6	0	0	6	0	6	1,00	
Patient 12	6	0	0	6	0	6	1,00	
Patient 13	6	0	0	6	0	6	1,00	
Patient 14	6	1	5	0	0	6	0,67	
Patient 15	6	0	0	4	2	6	0,33	
Patient 16	6	6	0	0	0	6	1,00	
Patient 17	6	0	0	6	0	6	1,00	
Patient 18	5	0	0	5	0	5	1,00	
Somme		19	30	54	3	106	$\bar{P}$	**0,83**
							somme pi	**15,02**

Pj	0,18	0,28	0,51	0,03	Somme pj²	$\bar{P}_e$	**0,372**

		Intervalle de Confiance	
		-	+
Kappa de Fleiss	**0,74**	**0,44**	**1,04**
ET	**0,15**		
Interprétation	**Accord fort**		

Il y a également dans l'ensemble une excellente concordance dans l'interprétation qualitative de conclusion d'agrégométrie pour les différents patients avec un Kappa moyen estimé à κ=0,74, ce qui constitue un accord fort, montrant donc une bonne homogénéité d'interprétation des tests d'agrégométrie dans l'équipe

On effectuera quelques remarques, ne grevant pas la conclusion générale :

Pour le patient 3, les différences d'interprétations inter-opérateurs par agoniste n'ont aucun impact significatif sur la conclusion générale de l'agrégométrie car l'agrégation aux faibles doses décroissantes de ristocétine 0,4; 0,3; 0,2 et 0,1 mg/mL a été faite en sytématique confirmant l'anomalie d'agrégation chez ce patient et levant les doutes d'interprétation.

Pour le patient 8, nos catégories « légèrement pertubée-sensiblement normale » et « pertubée-fortement pertubée » sont mal distinctes. La conclusion sur le degré de sévérité de la perturbation est donc légèrement discordante car elle est sujette à la subjectivité des opérateurs mais n'a aucun retentissement sur le dépistage d'une éventuelle maladie hémorragique. Le patient 8 était sous AINS ce qui a pertubé les test d'agrégation plaquettaire.

Pour le patient 15, 4 on conclut à « fortement pertubée » et 2 à « ininterprétable ».

Conclusion générale : conforme.

On note dans l'ensemble une concordance dans l'interprétation des courbes d'agrégométries dans cette étude avec une bonne homogénéitée, constituant une variabilité interopérateur définie comme conforme pour le laboratoire.

Justesse

☐ **Applicable** ☒ **Non Applicable- *A JUSTIFIER***

A partir des CIQ et / ou CIQ *externalisés*.

Echantillons	**Nb Valeur N**	**Valeurs Labo**	**Cible** Groupe de pairs	**Biais /groupe de pairs %**	**Moyenne générale** toutes techniques	**Biais /Moyenne générale %**	**Biais limite %** [6]	**Conclusion**[7]
Echantillon CIQ niveau 1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Echantillon CIQ niveau 2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Echantillon CIQ niveau 3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Argumentaire de la Conclusion : **Il n'existe pas de CQI disponible externalisé car le type d'échantillon utilisé ne le permet pas et il est impossible d'utiliser un même patient témoin dans chaque série car la conservation des plaquettes par congélation n'est pas possible.**

Exactitude

☐ Contrôles quantitatifs ☒ Contrôles qualitatifs

Il n'existe pas d'EEQ analytique pour l'agrégation plaquettaire mais des EEQ interprétatifs à partir d'études de cas de patients : histoire clinique et résultats biologiques (hémogramme plaquettes, agrégation plaquettaire, bilan d'hémostase tels que dosage de Willebrand et agrégation plaquettaire, sécrétion plaquettaire d'ATP). Les résultats demandés sont les suivants : analyse des conditions préanalytiques, interprétation des résultats proposés, et proposition d'explorations complémentaires. L'évaluation est effectuée individuellement par au moins 5 personnes dont l'ingénieur hospitalier et le technicien du secteur, au minimum 3 des 4 biologistes habilités, 1 ou 2 PU-PH du laboratoire, puis la conclusion est donnée lors d'une réunion commune.

10	**Nb participants**	**N° Cas**	**Conformité du Résultat (%)**	**N° cas**	**Conformité du Résultat (%)**	**N° Cas**	**Conformité du Résultat (%)**	**N° cas**	**Conformité du Résultat (%)**	**Moyenne exercice (%)**	**CONCLUSION**
2014-1	122	1	100	2	88,9	3	100	4	100	**97,23**	**CONFORME**
2014-2	122	5	100	6	100	7	100	8	100	**100**	**CONFORME**
2016-1	110	1	100	2	100	3	100	4	100	**100**	**CONFORME**
2016-2	110	5	85	6	80	7	84	8	100	**87,25**	**CONFORME**
2018-1	103	1	100	2	100	3	85,7	4	100	**96,**	**CONFORME**
2018-2	111	5	100	6	100	7	100	8	100	**100**	**CONFORME**
2019-1	110	1	100	2	100	3	100	4	100	**100**	**CONFORME**

Argumentaire de la Conclusion : En raison des particularités des échantillons biologiques – plaquettes sanguines (délai d'utilisation 3 heures après prélèvement), aucun contrôle analytique n'est proposé. Des difficultés organisationnelles ont été rencontrées, par exemple, l'accès aux 2 exercices 2017 n'a pas été envoyé par NASCOLA au laboratoire. **Conclusion générale : conforme.**

Sensibilité et spécificité analytiques

☒ **Applicable** ☐ **Non Applicable- *A JUSTIFIER***

Etude de la sensibilité et spécificité diagnostique avec sélection de 18 courbes d'agrégations plaquettaires provenant de 18 patients d'intérêt dont le diagnostic est orienté par l'histoire clinique, les résultats biologiques (agrégation plaquettaire, phénotypage des glycoprotéines de membrane plaquettaire en CMF, étude d'activation - sécrétion plaquettaire, dosage de VWF, étude d'hémostase primaire et secondaire, hémogramme plaquettes, génétique éventuelle).
Anonymisation des courbes d'agrégation, puis lecture par 6 personnes différentes (le technicien, l'ingénieur hospitalier et 4 biologistes) et comparaison de la variabilité d'interprétation à travers un formulaire dédié.
Evaluation qualitative des conclusions des courbes d'agrégations plaquettaires et orientation diagnostique si possible.
Etude de la sensibilité et spécificité diagnostique des cas de thrombopathie majeure : syndrome de Bernard et Soulier (BSS), et Thrombasthénie de Glanzmann (TG).

Etude de la sensibilité, spécificité, VPP et VPN des patients atteints de thrombasthénie de Glanzmann

	Patients TG	Patients non TG	**Total**
Diagnostic TG évoqué par les juges sur les différentes courbes d'agrégation	**VP 12**	**FN 0**	**12**
Autres orientations/pas d'orientation évoquées par les juges sur les différentes courbes d'agrégation	**FP 0**	**VN 95**	**95**
Total	**12**	**95**	**107**

Etude de la sensibilité, spécificité, VPP et VPN des patients atteints de syndrome de Bernard et Soulier

	Patients BSS	Patients non BSS	**Total**
Diagnostic BSS évoqué par les juges sur les différentes courbes d'agrégation	**VP 6**	**FN 0**	**6**
Autres orientations/pas d'orientation évoquées par les juges sur les différentes courbes d'agrégation	**FP 0**	**VN 101**	**101**
Total	**6**	**101**	**107**

	Diagnostic de TG	Diagnostic de BSS
Spécificité	100%	100%
Sensibilité	100%	100%
Valeur prédictive négative	100%	100%
Valeur prédictive positive	100%	100%

Argumentaire de la Conclusion : Notre méthode est conforme pour le diagnostic des Thrombasthénie de Glanzmann, et syndrome de Bernard Soulier avec une très bonne sensibilité, spécificité, VPP et VPN évaluée à 100% dans cette étude expérimentale. Néanmoins, il est nécessaire de s'appuyer sur un ensemble de données cliniques et biologiques (CMF, génétique, etc…) pour aboutir à ce type de diagnostic, l'agrégation plaquettaire seule étant un élément important du diagnostic mais non exclusif.
Conclusion générale : conforme.

Incertitude de mesure

Méthodologie sélectionnée : ☐ **Calculs** ☒ **Analyse de risques**

	Incertitudes calculées	**Exigences de Performances** [3] *Par niveau*
Mode de calcul - *Formule utilisée Cf. SH GTA 14*	NA	NA
Quantification de l'incertitude [4] Niveau 1	NA	NA
Quantification de l'incertitude [9] Niveau 2	NA	NA
Quantification de l'incertitude [9] Niveau 3	NA	NA

Argumentaire de la Conclusion : CIQ et EEQ quantitatifs indisponibles, Incertitude de mesure non calculable.
Analyse de risques : Voir document **DE-PTAR-MS-QUAL-034 HCV Hémostase CardioVasculaire : Maîtrise des risques 5M.**

[3] Exigences en fidélité, justesse et incertitude
[4] Niveau X en valeur absolue ± U ou Niveau X en valeur absolue ± U%

Comparaison de méthodes	
☐ **Applicable**	☒ **Non Applicable**
Données bibliographiques	*M. CATTANEO,* C. CERLETT I., et al. Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry: a consensus of the working party from the platelet physiology subcommittee of SSC/ISTH. Journal of Thrombosis and Haemostasis.2013 ;11:1183–1189* *Haute Autorité de Santé : Rapport d'évolutions technologiques. Biologie des anomalies de l'hémostase. Tome III : test photométrique d'agrégation plaquettaire Juillet 2011* *Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires. agrégation plaquettaire. Standardisation méthodologique. 2009*
Méthode précédente - Autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareil en miroir- back up EBMD :	NA.
Nombre de mesures	NA.
Intervalle de comparaison adaptée à l'étendue des mesures du laboratoire	NA.
Méthode d'exploitation des résultats	NA.
Equation de la droite de régression :	NA.
Diagramme des différences et/ou des rapports *Indiquer le nombre de déviants après les avoir vérifiés et documentés*	NA.

Argumentaire de la Conclusion : L'agrégométrie est une technique unique qui ne peut être comparée à aucune autre méthode. Cf bibliographie.

Etendue de mesure

☐ **Applicable** ☒ **Non Applicable-**

	Etude Bibliographique	**Etudes expérimentales**
Limite de détection	NA	NA
Limite de quantification	NA	**NA**
Limite supérieure de linéarité	NA	**NA**

Argumentaire de la Conclusion :
L'étendue de mesure est définie préalablement pour chaque patient entre 0% et 100%. Il n'est pas possible de définir une limite de détection. Les 0% et 100% sont établis avec respectivement le PRP et le PPP du patient. Le résultat est un résultat fonctionnel dont l'interprétation ne requiert pas une analyse au % près.

Interférences

☒ **APPLICABLE** ☐ **NON APPLICABLE- A JUSTIFIER**

Etude expérimentale indispensable en portée B. Possible si pertinente en portée A : Hémolyse, turbidité, bilirubine, médicaments - à prendre en compte dans les facteurs de variabilité - à évaluer si besoin).

	Etude Bibliographique - Fournisseurs (sources & valeurs)	**Etudes expérimentales** (Essais de surcharge *(module LIH)*)
Hémolyse	Relargage d'ADP qui peut activer et désensibiliser les plaquettes et elle peut gêner la détection de la variation d'intensité lumineuse. Les prélèvements hémolysés sont à rejeter ou à interpréter avec précaution.	Non réalisée
turbidimétrie	Eviter les repas riches en graisses car la présence de chylomicrons dans le prélèvement peut gêner la détection de la variation d'intensité lumineuse. Prélèvement à rejeter ou à interpréter avec précaution.	Non réalisée
Bilirubine ictère	Il n'existe pas de bibliographie sur l'impact de la bilirubine sur l'agrégation plaquettaire. Ajustement du 100% d'agrégation par l'utilisation du PPP du patient, ce qui permet de s'affranchir de l'effet matrice propre au patient.	Non réalisée
Médicaments antiplaquettaires (antiagrégants,	Les antiagrégants plaquettaires de façon générale (évaluation du retentissement sur demande pour l'aspirine et thiénopyridine type clopidogrel). Tout médicament ayant un retentissement sur la fonction plaquettaire, recherché ou effet indésirable.	Vérification préalable des prises d'antiagrégants par inhibition de la réponse à l'acide arachidonique et ou ADP.
Nb des plaquettes dans le PRP	Adaptation de la centrifugation en fonction de la numération plaquettaire et du VMP (selon MT-PTAR-HEMA-030)	Non réalisée
Taille des plaquettes	Les plaquettes de grand taille risquent d'être perdues à la centrifugation . La connaissance de ce critère doit induire une réduction de la vitesse de centrifugation voire une sédimentation (selon MT-PTAR-HEMA-030)	Non réalisée
Effet effort physique	L'adrénaline produite lors d'un effort peut provoquer une activation des plaquettes.	Repos du patient 15 -20 mn avant prélèvement sanguin

Argumentaire de la Conclusion : *Cf. bibliographie : M. CATTANEO,* C. CERLETT I , et al. Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry: a consensus of the working party from the platelet physiology subcommittee of SSC/ISTH. Journal of Thrombosis and Haemostasis.2013 ;11:1183–1189*
Conclusion : Conforme.

Contamination

☐ **APPLICABLE** ☒ **NON APPLICABLE- A JUSTIFIER**

Etude expérimentale indispensable en portée B, possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles.

	Données fournisseurs ou essais sur site
Inter échantillon pour les paramètres sensibles (ex : Ag HBS, βHCG, **…)** *: Essai de surcharge*	**NA**
Inter réactif si nécessaire (ex : LDH et ALAT, cholestérol et phosphate, lipase et triglycérides, …) *: Essai site*	NA

Argumentaire de la Conclusion : Sur l'agrégomètre, utilisation de tube en verre à usage unique et embouts de pipettes jetables pour chaque patient et pour chaque réactif évitant la contamination inter-echantillons. Changement de l'embout de pipette entre chaque réactif évitant la contamination entre réactifs.

Robustesse et stabilité des réactifs

☐ **APPLICABLE** ☒ **NON APPLICABLE- A JUSTIFIER**

Vérification de la stabilité des réactifs du collagène, de l'épinéphrine et du thromboxane A2 5 jours après leur reconstitution. Tous les réactifs sont jetés le vendredi soir donc ils ne sont jamais utilisés au-delà de 5 jours (cf. MT-PTAR-HEMA-035). Le témoin utilisé lors de la répétabilité de ces trois réactifs (effectué un lundi) est reprélevé le vendredi en utilisant les même réactifs. Un témoin est passé dans la série si l'ensemble des échantillons a des résultats perturbés, afin de valider la qualité du réactif utilisé.

	Données fournisseurs ou essais sur site
Paramètres sensibles testés :.	NA
Stabilité des réactifs après ouverture, embarqués ...	NA

Argumentaire de la Conclusion : Vérification de la stabilité des réactifs du collagène, de l'épinéphrine et du thromboxane A2 5 jours après leur reconstitution. Tous les réactifs sont jetés le vendredi soir donc ils ne sont jamais utilisés au-delà de 5 jours (cf. MT-PTAR-HEMA-035). Le témoin utilisé lors de la répétabilité de ces trois réactifs (effectuée un lundi) est reprélevé le vendredi en utilisant les même réactifs. Un témoin est passé dans la série si l'ensemble des échantillons a des résultats perturbé, afin de valider la qualité du réactif utilisé.

Intervalles de références et /ou valeurs seuil en fonction des données démographiques

☒ **APPLICABLE** ☐ **NON APPLICABLE - *A JUSTIFIER***

Recueil des valeurs de vélocité, surface et agrégation 6 min pour 52 témoins sains dont l'agrégation plaquettaire a été rendue normale au cours de l'utilisation de l'agrégomètre. Calcul de la moyenne géométrique et exclusion des valeurs aberrantes puis définition des intervalles de référence d'après la formule [moyenne géométrique +/-2 ET]. (cf. fichier joint).

valeurs normales 2.pdf

	Données fournisseur ou essai sur site			
Valeurs de référence	Agonistes	IR Vélocité	IR Surface	IR Agrégation 6 minutes
	ADP 2,5 µM	[53,58 - 119,17	[53,30 - 226,09]	[-0,20 - 90,63]
	ADP 5 µM	[43,90 - 176,00	[135,46 - 234,11	[54,30 - 84,96]
	ADP 10 µM	[64,10 - 197,20	[166,08 - 253,51	[63,03 - 85,35]
	Collagène 3,3µg/mL	[73,39 - 253,94	[150,98 - 244,04	[68,25 - 89,84]
	Ristocétine 1,25mg/mL	[67,19 - 202,47	[186,23 - 290,06	[71,55 - 95,33]
	Ristocétine 0,5mg/mL	[-20,06 - 38,56]	[-12,33 - 18,61]	[-3,85 - 6,35]
	Acide Arachidonique	[49,73 - 337,95	[162,26 - 301,94	[59,22 - 97,23]
	Epinephrine 5µM	[15,76 - 138,85	[-4,70 - 172,99]	[52,81 - 86,44]
	TRAP	[74,53 - 236,45	[195,99 - 253,13	[66,88 - 83,41]
	TXA2	[-11,52 - 301,89	[121,94 - 310,75	[53,43 - 97,09]

Argumentaire de la Conclusion :
Bibliographie références 1 et 3 + étude expérimentale ci-dessus.

Conclusion : conforme.

---

déclaration d'aptitude	
Conclusion :	METHODE DECLAREE CONFORME LE 14/10/2019, UTILISEE AU LABORATOIRE DEPUIS PLUSIEURS ANNEES.
autorisée par :	
BIOLOGISTE REFERENT ANALYSE / SPECIALITE : DR SOPHIE VOISIN DR VINCENT MEMIER	**RESPONSABLE SECTEUR / PLATEAU :** **DR SOPHIE VOISIN**

REVISION PERIODIQUE DE LA METHODE

DATE DE REVISION :

	RESULTATS		COMMENTAIRES / IMPACT / ACTIONS
Fidélité intermediaire	☐ Conforme	☐ Non Conforme	
Exactitude	☐ Conforme	☐ Non Conforme	
Incertitude de mesure	☐ Conforme	☐ Non Conforme	
Veille Documentaire : *Modification Fiche technique, courrier fournisseur, BITS, MT / IT*	☐ Oui	☐ Non	
Vérification Viskali : Modification	☐ Oui	☐ Non	
Veille scientifique	…		

Conlusion : Maintien des performances	☐ Oui	☐ Non	
Méthode à révalider	☐ Oui	☐ Non	

Date de révision : Biologiste referent analyse :	Cliquez ou appuyez ici pour entrer une date. …

Annexe 2 Maitrise des risques

MAITRISE DES RISQUES

Les analyses de risque des processus transversaux de réalisation, support et management sont consultables dans les documents DE-BIO-MS-QUAL-044 à 048 et 050 à 063.

5M	Points critiques	Criticité [5]	Eléments à maîtriser	Moyens de maitrise	Dispositions LBM	Dispositions spécifiques HCV [6]
PHASE PRE-ANALYTIQUE : Analyse processus et gestion des risques DE-BIO-MS-QUAL-050						
Matière *échantillons*	Identitovigilance	C 3	Détectabililé, formation et information du personnel	Procédure identitovigilance Gestion des NC Molis au pré analytique Instruction de gestion des erreurs d'identité Utilisation de Convergence/Tango	PG-BIO-MS-QUAL-036 PG-PERI-MS-PREA-003 IT -PERI -MS - PREA -029 MT-PERI-MS-INFO-002	
	Préparation du patient	C 2	Information des patients et préleveurs	Catalogue de Biologie et manuel de prélèvement Organisation générale des étapes préanalytiques	Viskali PG-PERI-MS-PREL-001	

[5] Echelle de criticité : A définir par plateau, selon PG-BIO-MS-QUAL-030 : 1 : pas d'impact sur les résultats - 2 : impact exceptionnel sur résultats - 3 : fort impact sur résultats patients

[6] Si dispositions spécifiques Plateau Technique – NA si application des dispositions LBM

5M	Points critiques	Criticité [5]	Eléments à maîtriser	Moyens de maitrise	Dispositions LBM	Dispositions spécifiques HCV [6]
	Type de contenants	C 2	Formation des préleveurs	E-learning sur INTRANET pour les IDE	PG-PERI-MS-PREA-001	
	Nature et volume de l'échantillon	C 2	Contrôle à réception	Mode Opératoire d'acquittement des échantillons	IT-PERI-MS-PREA-015	
	Délai et température avant traitement analytique	C 2	Gestion logistique (navettes, enceintes de transport)	Catalogue de Biologie et manuel de prélèvement	Viskali	
				Acheminement des échantillons :	PG-PERI-MS-PREA-002	
				Molis -Etiquetage et workflow des échantillons	MT-PERI-MS-PREA-025	
				Réception des prélèvements	PG-PTS-PREA-020	
				Contrat avec prestataire interne et externe	DE-BIO-MS-QUAL-011	
	Prétraitement : centrifugation, …	C 2	Conditions de centrifugation et tolérances métrologiques	Centrifugation des tubes primaires	MT-PERI-MS-PREA-003	Suivi métrologique centrifugeuses MT-BIO-MS-METR-008 Programmes des centrifugeuses disponibles sur Kalilab + étiquetage programmes sur centrifugeuses
				Aliquotage des échantillons	/	Réalisation des aliquots de congélation MT-PTAR-MS-HEMA-001

5M	Points critiques	Criticité [5]	Eléments à maîtriser	Moyens de maitrise	Dispositions LBM	Dispositions spécifiques HCV [6]
				Biothèque	PG-BIO-MS-QUAL-031	Réalisation des aliquots de congélation MT-PTAR-MS-HEMA-001
	Interférences	C 2	Formation des préleveurs Contrôle à réception	Catalogue de Biologie et manuel de prélèvement Gestion des NC Molis au pré analytique	Viskali PG-PERI-MS-PREA-003	

Milieu	Conservation des échantillons (T°,...)	C 2	Respect des conditions Métrologie/suivi des enceintes	Organisation générale des étapes préanalytiques	PG-PERI-MS-PREA-001	Organisation du pré-analytique PTA Rangueil PG-PTAR-PREA-001
				Surveillance métrologique :	PG-BIO-MS-METR-001	PTA : Métrologie MT-PTAP-MS-METR-001
	Exigences environnementales pour le matériel : température ambiante entre 15 et 30 °C	C 2	Suivi des conditions environnementales	Hygiène	PG-BIO-MS-HYGS-001	
				Sécurité	PG-BIO-MS-HYGS-002	
				Gestion des conditions environnementales	PG-BIO-MS-QUAL-008	PTA : Métrologie MT-PTAP-MS-METR-001
				Gestion du matériel	PG-BIO-MS-QUAL-015	

5M	Points critiques	Criticité [5]	Eléments à maîtriser	Moyens de maitrise	Dispositions LBM	Dispositions spécifiques HCV [6]
Matériel *équipements et consommables*	Acheminement	C 2	Conformité du matériel	Qualification des pneumatiques	DE-PERI-TOUS-002	Agrégation plaquettaire et TOP ADP :échantillons non acceptés si transfert par pneumatique
				Transport par coursier pédestres et voitures	PG-PERI-MS-PREA-002	
	Contamination	C 2	Respect des conditions opératoires du fournisseur	Qualification des trieurs aliquoteurs	DE-PERI-MS-PREA-006	
				Tests de contamination	IT-PERI-MS-QUAL-001	
	Gestion des stocks	C 2		Approvisionnement et gestion des stocks	PG-BIO-MS-QUAL-014	

Méthode	Organisation	C 2	Respect des exigences des plateaux techniques	Organisation générale des étapes préanalytiques	PG-PERI-MS-PREA-001	Acquittement des tubes :consignes spécifiques PTA Rangueil : IT-PTAR-PREA-013 Molis : Devenir des tubes selon destinations d'acquittement IT-PTAR-PREA-002
				Revue de prescription		Consignes de validation biologique en Hématologie IT-PTH-MS-HEMA-028

5M	Points critiques	Criticité [5]	Eléments à maîtriser	Moyens de maitrise	Dispositions LBM	Dispositions spécifiques HCV [6]
Main d'œuvre *Personnel*	Compétence et maintien de compétence du personnel	**C 2**	Procédure formation/habilitation du personnel, plan de formation	Gestion des compétences du personnel	PG-BIO-MS-QUAL-010	
				Fiche de qualification : Agent préleveur du CDP Agent Préanalytique IFB Agent Préanalytique hors IFB	 DE-PERI-QUAL-002 DE-PERI-QUAL-009 DE-PERI-MS-QUAL-006	

PHASE ANALYTIQUE :

Matière *échantillons*	Prétraitement spécifique analyse	C 2	Conditions de prétraitement	Instructions au poste		NA
	Interférences spécifique analyse	C 2	Contrôle à réception	Mode opératoires adaptés des Fiches techniques / Bibiographie		Selon les analyses, détail dans VM

Milieu	Conditions de conservation des échantillons et des réactifs (T°, …) : Conservation des échantillons et des réactifs au congélateur (-16 à -30 °C) Conservation des échantillons et des réactifs au congélateur (-25 à -35 °C) Conservation des échantillons et des réactifs au congélateur (-65 à -85 °C) Conservation et utilisation des réactifs aux réfrigérateurs (+2 à +8 °C)	C 2	Métrologie/suivi des enceintes	Surveillance métrologique	PG-BIO-MS-METR-001	PTA : Métrologie MT-PTAP-MS-METR-001
		C 2	Respect des exigences	Mode opératoires adaptés des Fiches techniques /Bibiographie		Voir MOP de chaque technique
	Exigences environnementales pour le matériel ou opérateur : température ambiante entre 18°C et 25°C	C 2	Suivi des conditions environnementales	Hygiène Sécurité Gestion des conditions environnementales	PG-BIO-MS-HYGS-001 PG-BIO-MS-HYGS-002 PG-BIO-MS-QUAL-008	PTA : Métrologie MT-PTAP-MS-METR-001

Matériel *équipements*	Qualité de l'eau (osmoseur)	C 2	Mesure de la résistivité / stérilité	Contrat engagement EHL GBM Biologie	DE-BIO-MS-QUAL-010	
	Etuve 36-38°C	C 2	Métrologie/ suivi des enceintes	Surveillance métrologique	PG-BIO-MS-METR-001	PTA : Métrologie MT-PTAP-MS-METR-001 Entretien du petit matériel IT-PTAR-MS-QUAL-027 Entretiens, maintenances et surveillances métrologiques programmées sur kalilab Utilisation de l'agrégomètre MT-PTAR-HEMA-031
	Bains-marie 36-38°C et 56-58°C	C 2	Métrologie/suivi des températures	Surveillance métrologique	MT-BIO-MS-METR-007	
	pipettes	C 2	Métrologie	Surveillance métrologique	MT-BIO-MS-METR-001	
	agrégomètre	C 2	Maintenance/métrologie des équipements	Surveillance métrologique Gestion du matériel	PG-BIO-MS-QUAL-015	
	Chronomètres (temps d'incubation et de reconstitution des réactifs)	C 2	métrologie	Surveillance métrologique	MT-BIO-MS-METR-003	
	Lecteur de microplaques	C 2	métrologie	Surveillance métrologique	MT-BIO-MS-METR-014	
	Laveur de microplaques	C 2	Maintenance de l'équipement	Gestion du matériel	PG-BIO-MS-QUAL-015	Entretien du petit matériel IT-PTAR-MS-QUAL-027 Entretiens, maintenances programmées sur kalilab Utilisation du laveur de Microplaques en HCV : IT-PTAR-HEMA-006

	Balance de précision	C2		Surveillance métrologique	MT-BIO-MS-METR-009	PTA : Métrologie MT-PTAP-MS-METR-001 Entretien du petit matériel IT-PTAR-MS-QUAL-027
	pH-mètre	C2		Surveillance métrologique	MT-BIO-MS-METR-015	Entretiens, maintenances et surveillances métrologiques programmées sur kalilab Utilisation du pH mètre en HCV : IT-PTAR-HEMA-005
	Surveillance des dérives	C2	Gestion des CIQ Gestion des EEQ Maintenance/métrologie des équipements	Gestion des Contrôles Internes de Qualité Comparaisons interlaboratoires Gestion du matériel Surveillance métrologique Traçabilité	PG-BIO-MS-QUAL-022 PG-BIO-MS-QUAL-023 PG-BIO-MS-QUAL-015 *PG-BIO-MS-METR-001* Kalilab & Middleware	Entretien du petit matériel IT-PTAR-MS-QUAL-027 PTA : Métrologie MT-PTAP-MS-METR-001
	Contamination	C2	Respect des conditions opératoires du fournisseur	Bibliographie Enregistrements		Voir MOP + Validations de méthode
	Informatique embarquée	C2	Paramétrage, connexions, archivage des données, ...	Intégrité des données	PG-BIO-MS-INFO-013	Traçabilité des données Techniques manuelles en HCV IT-PTAR-HEMA-010
				Test de Traçabilité / Sauvegardes		DE-PTS-MS-QUAL-002

Matériel *réactifs*	Reconstitution des réactifs, étalons, contrôles (MT,IT,Fiche technique…)	C 2	Métrologie des pipettes Instructions de préparation	Suivi métrologique des micropipettes	MT-BIO-MS-METR-001	PTA : Métrologie MT-PTAP-MS-METR-001
		C 2	Respect des exigences	Modes opératoires adaptés des Fiches techniques		Voir MOP de chaque technique Préparation des réactifs MT-PTAR-HEMA-035
	Conditions d'utilisation	C 2	Mise en œuvre des tests	Modes opératoires adaptés des Fiches techniques		Voir MOP de chaque technique
	Gestion des stocks	C 2	Gestion des stocks	Approvisionnement et gestion des stocks	PG-BIO-MS-QUAL-014	Réception des commandes IT-PTAR-TOUS-026

Méthode	Limites de la méthode (détection, quantification, linéarité, interférences, …)	C 2	Bibliographie et/ou essai sur site	Fiches techniques : Réf - version - date		Voir Validations de méthode
	Causes d'incertitude de mesure	C 2	Calculs Non quantifiables en méthode qualitative	Estimation de l'incertitude de mesure	PG-BIO-MS-QUAL-020	
				Enregistrement de l'essai sur site (cf. SH GTA 14) Bibliographie		

Main d'œuvre *Personnel*	Compétence et maintien de compétence du personnel	**C 2**	Procédure formation/habilitation du personnel, plan de formation	Gestion des compétences du personnel	PG-BIO-MS-QUAL-010	PTA Hématologie : Intégration et formation technique IT-PTAP-MS-HEMA-005
				Fiche de qualification		Qualification des techniciens d'HCV DE-PTAR-HEMA-034 Fiches de poste – HCV DE-PTAR-HEMA-031 Qualification des biologistes d'hématologie sur le PTA DE-PTAP-MS-QUAL-126 Utilisation du matériel par les stagiaires : sans impact car n'interviennent pas dans le rendu de résultat

PHASE POST-ANALYTIQUE : Analyse processus gestion des risques DE-BIO-MS-QUAL-053

Matiere *échantillons*	Traitement post analytique de l'échantillon	**C 2**	Conservation après analyse	Biothèques	PG-BIO-MS-QUAL-031	Archivage en Hématologie IT-PTAP-MS-HEMA-036 HCV : Gestion de la plasmathèque IT-PTAR-HEMA-028
Méthode	Validation biologique	**C 2**	Harmonisation des pratiques / Habilitation et maintien des compétences	Validation biologique	PG-BIO-MS-QUAL-024	Consignes validation biologique en Hématologie IT-PTH-MS-HEMA-028
	Diffusion des résultats	**C 2**	Libération des examens Urgents	Liste des examens libérables avant validation biologique	DE-BIO-MS-QUAL-040	
	Prestation de conseils	**C 2**	Interprétation des résultats biologiques dans contexte clinique	Discussions de dossiers avec cliniciens, participation aux Réunions de Concertation Pluridisciplinaire	PG-BIO-MS-QUAL-017	Consignes validation biologique en Hématologie IT-PTH-MS-HEMA-028

Annexe 3 Formulaire d'interprétation de courbes d'agrégation plaquettaire

PATIENT 1

ADP 2.5µM	ADP 5µM	ADP 10µM	Collagène 3.3
☐ Normale ☐ Diminuée ☐ Très Diminuée ☐ Absence ☐ Retardée ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre	☐ Normale ☐ Diminuée ☐ Très Diminuée ☐ Absence ☐ Retardée ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre	☐ Normale ☐ Diminuée ☐ Très Diminuée ☐ Absence ☐ Retardée ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre	☐ Normale ☐ Diminuée ☐ Très Diminuée ☐ Absence ☐ Retardée ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre

Risto 1.25	Risto 0.5	Ac Arachid.	Epinéphrine 5
☐ Normale ☐ Diminuée ☐ Très Diminuée ☐ Absence ☐ Retardée ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre	☐ Absence ☐ Présente ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre	☐ Normale ☐ Diminuée ☐ Très Diminuée ☐ Absence ☐ Retardée ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre	☐ Normale ☐ Diminuée ☐ Très Diminuée ☐ Absence ☐ Retardée ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre

CONCLUSION	ORIENTATION
☐ Normale ☐ Sensiblement normale ☐ Légèrement perturbée ☐ Perturbée ☐ Fortement perturbée ☐ Autre : Précisez	☐ Thrombasthénie de Glanzmann ☐ Anomalie VWF- GpIb (VWF, B.&S. pseudoVWF) ☐ Autre : Précisez

PATIENT 2

ADP 2.5µM	ADP 5µM	ADP 10µM	Collagène 3.3
☐ Normale ☐ Diminuée ☐ Très Diminuée ☐ Absence ☐ Retardée ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre	☐ Normale ☐ Diminuée ☐ Très Diminuée ☐ Absence ☐ Retardée ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre	☐ Normale ☐ Diminuée ☐ Très Diminuée ☐ Absence ☐ Retardée ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre	☐ Normale ☐ Diminuée ☐ Très Diminuée ☐ Absence ☐ Retardée ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre

Risto 1.25	Risto 0.5	Ac Arachid.	Epinéphrine 5
☐ Normale ☐ Diminuée ☐ Très Diminuée ☐ Absence ☐ Retardée ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre	☐ Absence ☐ Présente ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre	☐ Normale ☐ Diminuée ☐ Très Diminuée ☐ Absence ☐ Retardée ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre	☐ Normale ☐ Diminuée ☐ Très Diminuée ☐ Absence ☐ Retardée ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre

CONCLUSION	ORIENTATION
☐ Normale ☐ Sensiblement normale ☐ Légèrement perturbée ☐ Perturbée ☐ Fortement perturbée ☐ Autre : Précisez	☐ Thrombasthénie de Glanzmann ☐ Anomalie VWF- GpIb (VWF, B.&S. pseudoVWF) ☐ Autre : Précisez

PATIENT 3

ADP 2.5µM	ADP 5µM	ADP 10µM	Collagène 3.3
☐ Normale ☐ Diminuée ☐ Très Diminuée ☐ Absence ☐ Retardée ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre	☐ Normale ☐ Diminuée ☐ Très Diminuée ☐ Absence ☐ Retardée ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre	☐ Normale ☐ Diminuée ☐ Très Diminuée ☐ Absence ☐ Retardée ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre	☐ Normale ☐ Diminuée ☐ Très Diminuée ☐ Absence ☐ Retardée ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre

Risto 1.25	Risto 0.5	Ac Arachid.	Epinéphrine 5
☐ Normale ☐ Diminuée ☐ Très Diminuée ☐ Absence ☐ Retardée ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre	☐ Absence ☐ Présente ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre	☐ Normale ☐ Diminuée ☐ Très Diminuée ☐ Absence ☐ Retardée ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre	☐ Normale ☐ Diminuée ☐ Très Diminuée ☐ Absence ☐ Retardée ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre

CONCLUSION	ORIENTATION
☐ Normale ☐ Sensiblement normale ☐ Légèrement perturbée ☐ Perturbée ☐ Fortement perturbée ☐ Autre : Précisez	☐ Thrombasthénie de Glanzmann ☐ Anomalie VWF- GpIb (VWF, B.&S. pseudoVWF) ☐ Autre : Précisez

PATIENT 4

ADP 2.5µM	ADP 5µM	ADP 10µM	Collagène 3.3
☐ Normale ☐ Diminuée ☐ Très Diminuée ☐ Absence ☐ Retardée ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre	☐ Normale ☐ Diminuée ☐ Très Diminuée ☐ Absence ☐ Retardée ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre	☐ Normale ☐ Diminuée ☐ Très Diminuée ☐ Absence ☐ Retardée ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre	☐ Normale ☐ Diminuée ☐ Très Diminuée ☐ Absence ☐ Retardée ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre

Risto 1.25	Risto 0.5	Ac Arachid.	Epinéphrine 5
☐ Normale ☐ Diminuée ☐ Très Diminuée ☐ Absence ☐ Retardée ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre	☐ Absence ☐ Présente ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre	☐ Normale ☐ Diminuée ☐ Très Diminuée ☐ Absence ☐ Retardée ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre	☐ Normale ☐ Diminuée ☐ Très Diminuée ☐ Absence ☐ Retardée ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre

CONCLUSION	ORIENTATION
☐ Normale ☐ Sensiblement normale ☐ Légèrement perturbée ☐ Perturbée ☐ Fortement perturbée ☐ Autre : Précisez	☐ Thrombasthénie de Glanzmann ☐ Anomalie VWF- GpIb (VWF, B.&S. pseudoVWF) ☐ Autre : Précisez

PATIENT 5

ADP 2.5µM	ADP 5µM	ADP 10µM	Collagène 3.3
☐ Normale ☐ Diminuée ☐ Très Diminuée ☐ Absence ☐ Retardée ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre	☐ Normale ☐ Diminuée ☐ Très Diminuée ☐ Absence ☐ Retardée ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre	☐ Normale ☐ Diminuée ☐ Très Diminuée ☐ Absence ☐ Retardée ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre	☐ Normale ☐ Diminuée ☐ Très Diminuée ☐ Absence ☐ Retardée ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre

Risto 1.25	Risto 0.5	Ac Arachid.	Epinéphrine 5
☐ Normale ☐ Diminuée ☐ Très Diminuée ☐ Absence ☐ Retardée ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre	☐ Absence ☐ Présente ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre	☐ Normale ☐ Diminuée ☐ Très Diminuée ☐ Absence ☐ Retardée ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre	☐ Normale ☐ Diminuée ☐ Très Diminuée ☐ Absence ☐ Retardée ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre

CONCLUSION	ORIENTATION
☐ Normale ☐ Sensiblement normale ☐ Légèrement perturbée ☐ Perturbée ☐ Fortement perturbée ☐ Autre : Précisez	☐ Thrombasthénie de Glanzmann ☐ Anomalie VWF- GpIb (VWF, B.&S. pseudoVWF) ☐ Autre : Précisez

PATIENT 6

ADP 2.5µM	ADP 5µM	ADP 10µM	Collagène 3.3
☐ Normale ☐ Diminuée ☐ Très Diminuée ☐ Absence ☐ Retardée ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre	☐ Normale ☐ Diminuée ☐ Très Diminuée ☐ Absence ☐ Retardée ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre	☐ Normale ☐ Diminuée ☐ Très Diminuée ☐ Absence ☐ Retardée ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre	☐ Normale ☐ Diminuée ☐ Très Diminuée ☐ Absence ☐ Retardée ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre

Risto 1.25	Risto 0.5	Ac Arachid.	Epinéphrine 5
☐ Normale ☐ Diminuée ☐ Très Diminuée ☐ Absence ☐ Retardée ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre	☐ Absence ☐ Présente ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre	☐ Normale ☐ Diminuée ☐ Très Diminuée ☐ Absence ☐ Retardée ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre	☐ Normale ☐ Diminuée ☐ Très Diminuée ☐ Absence ☐ Retardée ☐ Réversible ☐ Double vague ☐ Autre

CONCLUSION	ORIENTATION
☐ Normale ☐ Sensiblement normale ☐ Légèrement perturbée ☐ Perturbée ☐ Fortement perturbée ☐ Autre : Précisez	☐ Thrombasthénie de Glanzmann ☐ Anomalie VWF- GpIb (VWF, B.&S. pseudoVWF) ☐ Autre : Précisez

Annexe 4 Formulaire destiné aux patients avant prélèvement pour évaluer la répétabilité et la reproductibilité

Formulaire pour prélèvement pour test d'agrégation plaquettaire

NOM

Prénom

DDN

Groupe sanguin

Traitement AINS dans les 10 jours qui précèdent ?

Traitements autre ?

Etes-vous à jeun (2H sans prise de café, 30 min sans tabac et activité physique) ?

Ce formulaire est strictement confidentiel.

Merci

Annexe 5 Préparation des réactifs

Inducteur	Fournisseur et référence	Conditionnement, stockage	Mode de préparation des solutions stock	Conservation, localisation et durée de conservation	Mode de préparation des solutions intermédiaires	Conservation localisation et durée de conservation	Mode de préparation des solutions intermédiaires	
ADP	SIGMA ALDRICH REF A2754-1G	Poudre de 1g à -20°C Congélateur HCV 2 Tiroir 5	**Solutions stocks annuels (500 mM)** : Peser 100 mg de poudre d'ADP et suspendre dans 468µL d'eau physiologique. Puis aliquoter en cônes de 20 µl.	à -80°C Pendant 1 an Congélateur HCV3 Casier 1	**Solution stocks mensuels (10 mM)** : décongeler 1 cône de Solution stock annuel et ajouter 980 µl de sérum physiologique solution à 10 mM. Puis aliquoter en cônes de 50µL.	à -20°C pendant 1 mois Congélateur HCV1 Etagère 1	**Solution de travail (STT) (1 mM)** à reconstituer tous les deux jours à conserver au réfrigérateur HCV1 Ajouter dans le **cône de stock mensuel,** 450µl de sérum physiologique.	**Pour ADP 10 µmol/L** ajouter 100µl de STT ADP à 900µl de sérum physiologique **Pour ADP 5 µmol/L** ajouter 50 µl de STT ADP à 950µL de sérum physiologique **Pour ADP 2.5 µmol/L** ajouter 25 µl de STT ADP à 975µL de sérum physiologique Stables 48h.
COLLAGENE	TAKEDA REF 1130630	Liquide à 4°C Réfrigérateur HCV1 Etagère 1	**Solution stocks de collagène** flacon de 1 mg/mL **Solution de Tampon HORM** en flacon de 10 ml	/	**Solution de travail (STT) (33µg/ml mM)** à reconstituer tous les semaines à conserver au réfrigérateur HCV1 **10µl de collagène pur (1mg/ml) dans 290 µl de tampon Horm**	à 4°C jusqu'à péremption Réfrigérateur HCV1 Etagère 1	**Solution de travail (33 µg/ml)** à reconstituer toutes les semaines à conserver au réfrigérateur HCV1 270µl de PRP + 12 µl correspond à 1,5µg/ml 270µl de PRP + 30 µl correspond à 3,3µg/ml	

Inducteur	Fournisseur et référence	Conditionnement, stockage	Mode de préparation des solutions stock	Conservation, localisation et durée de conservation	Mode de préparation des solutions intermédiaires	Conservation, localisation et durée de conservation	Mode de préparation des solutions intermédiaires
RISTOCETINE	STAGO (100MG) REF 00501	Flacon de 100 mg à +4°C Réfrigérateur HCV1 Etagère 1	Solution stock (12,5mg/ml). Reconstituer le flacon avec 8000 µL de sérum physiologique. Aliquoter en cônes de 150 µl	/	/	à -20°C pendant 3 mois Congélateur HCV1 Etagère 1	**Solution stock à 12,5 mg/mL** à utiliser directement pour 1,25 mg/mL final. Stable 4 heures à RT **Solution à 5 mg/mL** : 50 µl solution stock + 75 µl de sérum physiologique pour 0,5mg/mL final. Stable 4 heures à RT
EPINEPHRINE	SIGMA ALDRICH E 4642-5G	Flacon de 5 g à 4°C Réfrigérateur HCV1 Etagère 1	Solution stock (36 mM). Peser 10mg dissous dans 1,268 ml de sérum physiologique. Aliquoter en cônes de 30µl	/	/	à -20°C pendant 1 an Congélateur HCV1 Etagère 1	**Solution de travail (50µM) :** 1µl de solution stock + 700µl de sérum physiologique. Utilisable durant une semaine. à conserver au réfrigérateur
TRAP 14 mer	SIGMA ALDRICH REF S7152-1MG	Falcon de 5mg à -20°C Congélateur HCV 2 Tiroir 5	Solution stocks (500µM). Reconstituer le flacon avec 1500 µL de sérum physiologique. Puis aliquoter en cônes de 50 µL.	/	/	à -20°C pendant 1 an Congélateur HCV1 Etagère 1	**Solution de travail (500µM) :** Prêt à l'emploi Décongeler un aliquot pour chaque demande, usage unique. 270µl de PRP + 13,5µl correspond à 25µM 270µl de PRP + 30µl correspond à 50µM

Inducteur	Fournisseur et référence	Conditionnement, stockage	Mode de préparation des solutions stock	Conservation, localisation et durée de conservation	Mode de préparation des solutions intermédiaires	Conservation, localisation et durée de conservation	Mode de préparation des solutions intermédiaires
U46619 (TXA2)	SIGMA ALDRICH REF D8174-5MG	Flacon de 10mg en Méthyle acétate à-20°C Congélateur HCV 2 Tiroir 5	Evaporation du méthyle acétate sous azote gazeux à flux doux. Resuspendre le lyophilisat dans 1427µl de l'éthanol absolu (solution stock : 10mM)	/	/	Flacon conservé à -20°C pendant 1 an Congélateur HCV1 Etagère 1	Solution de travail (100µM): 2µl de solution stock + 198µl d'eau physiologique Durée de conservation : 1 semaine 270µl de PRP + 2,7µl correspond à 1µM 270µl de PRP + 8,1µl correspond à 3µM 270µl de PRP + 13,5µl correspond à 5µM 270µl de PRP + 30µl correspond à 10µM
CRP XL	Cambrigde UK	Liquide à 4°C Réfrigérateur HCV1 Etagère 1	Solution stocks (1mg/ml)	/	/	à + 4°C Réfrigérateur HCV1 Etagère 1	Reconstituer au fur et à mesure. Diluer au 1/100 en PBS/acide acétique à 1%. à usage unique
ADP + épinéphrine	Voir refc de chaque réactif	à -20°C pendant 1 an Congélateur HCV1 Etagère 1	Solution de travail APE 1µl de solution stock EPI + 70µl de la solution de travail STT ADP dilué dans 630 µl de sérum physiologique. Puis aliquoter en cônes de 40µl.	/	/	à -20°C pendant 1 an Congélateur HCV1 Etagère 1	Prêt à l'emploi Décongeler un aliquot pour chaque demande, usage unique.
Ac. Arachidonique	SIGMA ALDRICH REF SML1395-5MG	Falcon de 5mg à -20°C Congélateur HCV 2 Tiroir 5	Solution stocks (10mM). Reconstituer le flacon avec 1500 µL de sérum physiologique. Puis aliquoter en cônes de 40 µL.	/	/	à -20°C pendant 1 an Congélateur HCV1 Etagère 1	Solution de travail (10 mM): Prêt à l'emploi Décongeler un aliquot pour chaque demande, usage unique. 270µl de PRP + 13,5µl correspond à 0.5mM 270µl de PRP + 30µl correspond à 1mM

TITLE : METHOD VALIDATION OF PHOTOMETRIC PLATELET AGGREGATION TEST IN THE PLATELET FUNCTIONAL ANOMALIES' DIAGNOSIS.

SUMMARY :

LTA is indicated in the exploration of a hemorrhagic syndrome suggestive of platelet function abnormalities. In this study, we validated this technique according to the quality requirements of the NF EN ISO 15189:2012 standard for this indication. The Toulouse University Hospital is part of the CRPP and as such is an expert centre. Each analytical parameter was explored. In addition, each risk and constraint of the analytical process has been evaluated in order to ensure its control. We justified the need for specialized hemostasis sites, with dedicated staff, to implement this technique. We have confirmed the analytical performance of our technique. Finally, we concluded on the acceptability of its diagnostic relevance in bleeding syndromes.

KEYWORDS: hematology, hemostasis, specialized hemostasis, platelet aggregation, method validation, quality, cofrac, platelet aggregation test, photometric platelet aggregation test, rare hemorrhagic diseases, hereditary hemorrhagic diseases, platelet functional anomalies, Glanzmann, Bernard et Soulier, Willebrand

AUTEUR : PERRIN Céline

TITRE : VALIDATION DE METHODE DU TEST PHOTOMETRIQUE D'AGREGATION PLAQUETTAIRE DANS LE DIAGNOSTIC DES ANOMALIES FONCTIONNELLES PLAQUETTAIRES

DIRECTEUR DE THÈSE : Dr RIBES Agnès

RESUME : Le LTA est indiqué dans l'exploration d'un syndrome hémorragique évocateur d'anomalies des fonctions plaquettaires. Le principe repose sur la mesure de l'agrégation d'un PRP et permet d'évaluer la fonctionnalité plaquettaire in vitro. Dans cette étude, nous avons validé cette technique selon les exigences qualités de la norme NF EN ISO 15189:2012, pour cette indication. Le CHU de Toulouse fait partie du CRPP et est à ce titre centre expert. Chaque paramètre analytique a été exploré. Également, chaque risque et contrainte du processus analytique a été évalué afin d'en assurer la maîtrise. Nous avons justifié la nécessité de sites d'hémostase spécialisés, avec un personnel dédié, pour mettre en oeuvre conformément cette technique. Nous avons confirmé la performance analytique de notre technique. Enfin, nous avons conclu quant à l'acceptabilité de sa pertinence diagnostique dans les syndromes hémorragiques.

MOTS-CLES : hématologie, hémostase, hémostase spécialisée, agrégation plaquettaire, validation de méthode, qualité, cofrac, test d'agrégométrie plaquettaire, test photométrique d'agrégométrie plaquettaire, maladies hémorragiques rares, maladies hémorragiques héréditaires, anomalies fonctionnelles plaquettaires, Glanzmann, Bernard et Soulier, Willebrand

---

DISCIPLINE administrative : Pharmacie-Biologie médicale

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE : Université Toulouse III- Paul Sabatier- Faculté des Sciences Pharmaceutiques 35 Chemin des maraîchers 31062 Toulouse Cedex 9