

Les MicroAngiopathies Thrombotiques au laboratoire d'hémostase

Prof. S. Eeckhoudt
Biologie Hématologique
Cliniques universitaires Saint Luc

Les Jeudis de Fleurus
23 mai 2013

MAT = MicroAngiopathie Thrombotique

Microangiopathie = atteinte pathologique des petits vaisseaux

Définitions

Origine

Fragmentation des GR → Anémie hémolytique

Trapping plaquettaire → Thrombocytopénie

Anémie hémolytique

Normocytaire régénérative

LDH ↑

Haptoglobine ↓

Hémoglobinurie

Schizocytes (frottis sanguin)

CD négatif

Définitions

Thrombocytopénie

Généralement sévère ($<20000/\mu\text{L}$) surtout si ADAMTS13 très basse

TCA, TT, TP normaux

D-dimères: normaux à modérément élevé

Syndrome de Kasabach-Meritt

Anomalie endothéliale

Purpura Thrombotique Thrombocytopénique

ADAMTS13

Syndrome d'Hémolyse Urémie (HUS)

Cascade du complément

Types de MAT

Anémie Hémolytique MicroAngiopathique des greffes

GVHD, TBI

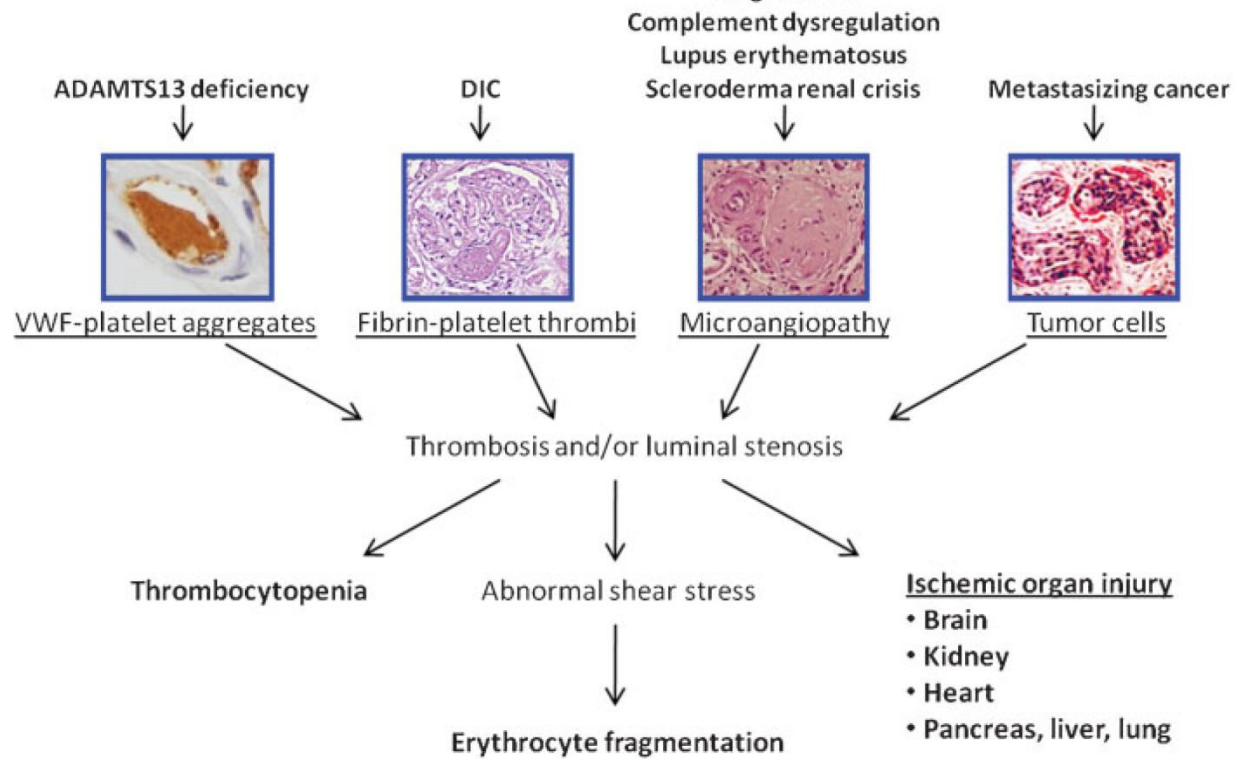
Anémie Hémolytique MicroAngiopathique des grossesses

ADAMTS13 (cascade du complément)

Anémie Hémolytique MicroAngiopathique des vasculites

ADAMTS13

Pathophysiologie des MAT



Synthèse:

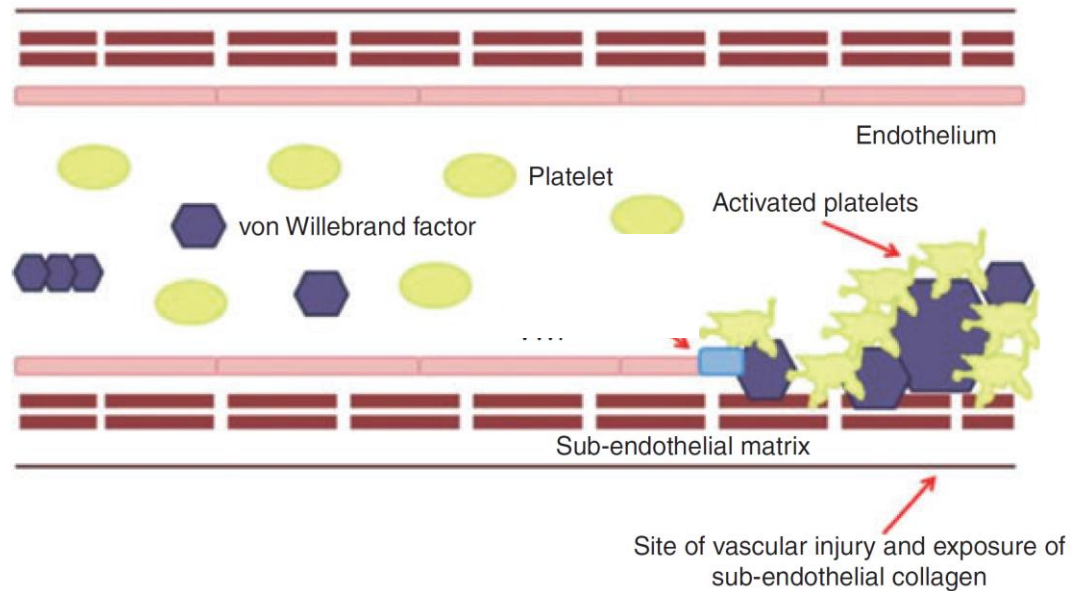
mégacaryocytes

cellules endothéliales (corps de Weibel-Palade)

Fonctions:

- hémostase primaire

Facteur von Willebrand



Interactions Collagène ss endoth-GPIbIX PLT

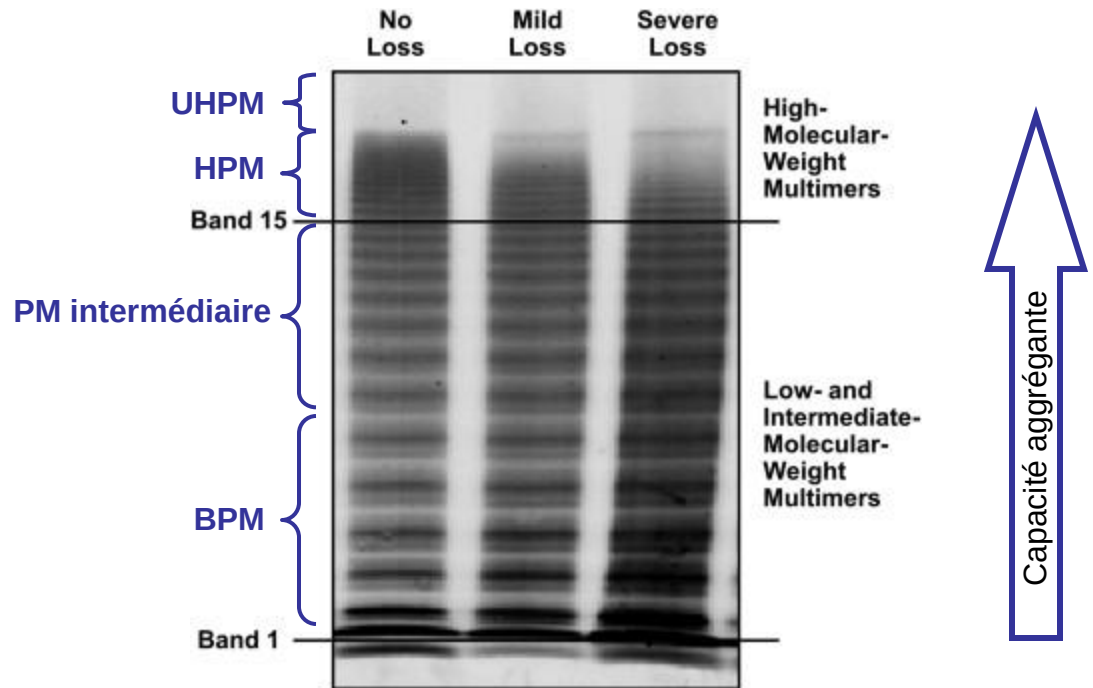
Interactions GPIIb-IIIa PLT – GP IIbIIIa PLT

- transport et protection du facteur VIII

Caractéristiques:

- protéine multimérique
unité de base dimérique (500-30 000kDa)
bas – intermédiaire – haut poids moléculaires (1 à 20 dimères)

Facteur von Willebrand



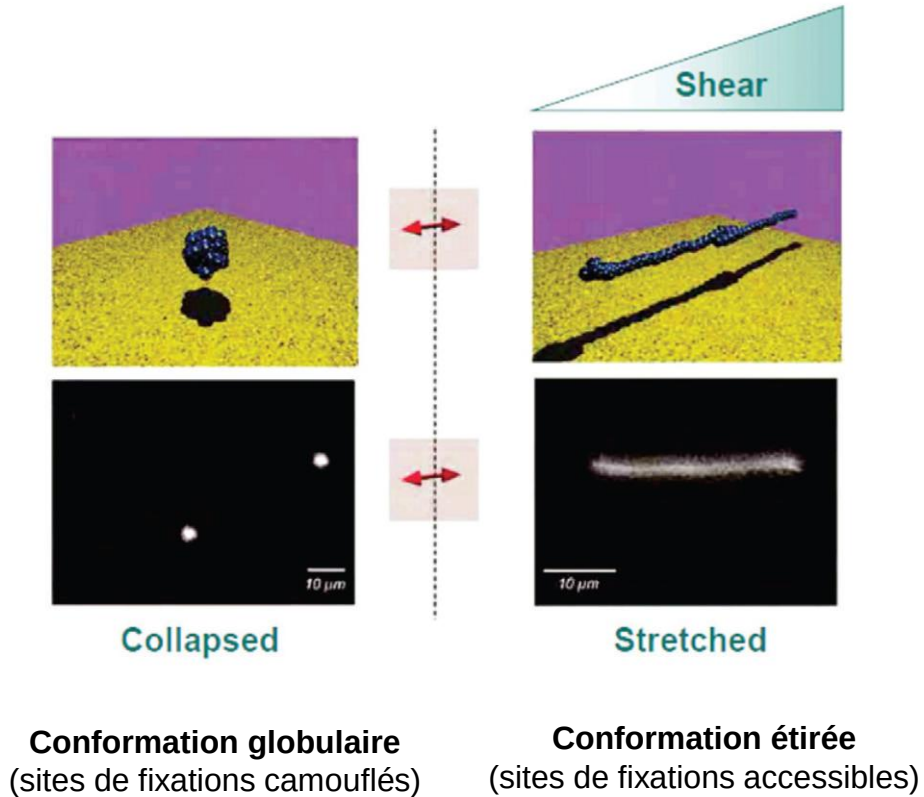
- régulation de la multimérisation:
ADAMTS13



Caractéristiques:

- Activation par haute force de cisaillement (Ristocétine in vitro)

Facteur von Willebrand



Structure:

génétique:

12p13.2

52 exons

178 Kb

pseudogène chromosome 22 (exons 23 à 34)

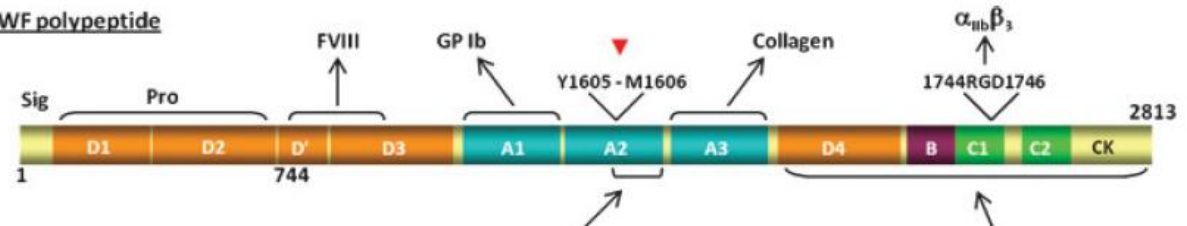
protéine:

primaire: 2813 AA = 22 signals

741 pro-peptide

2050 protéine mature

VWF polypeptide



Facteur von Willebrand

A1: initiation hémostase primaire, liaison GPIbIX plaquettaire
fixation ristocétine

A2: site de cleavage ADAMTS13
accessibilité force de cisaillement dépendante

A3: site de fixation au collagène

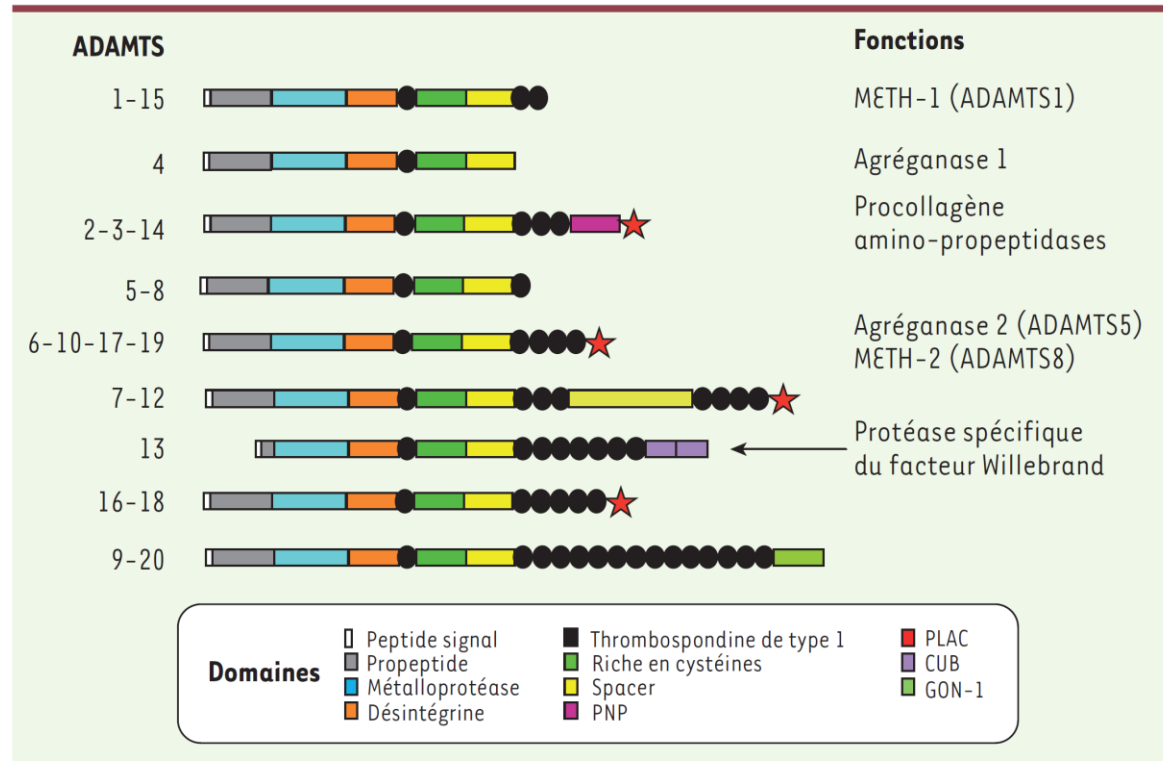
D': site de fixation du facteur VIII
accessible en conformation globulaire

CK: site de formation des dimères

D3: site de formation des multimères

Structure

Famille des métalloprotéinases 19 protéines identifiées



ADAMTS13

Chromosome 9q34

37 Kb

29 exons

Epissage alternatif avec production de plusieurs variants (?)

Structure

1427 AA

monocaténaire

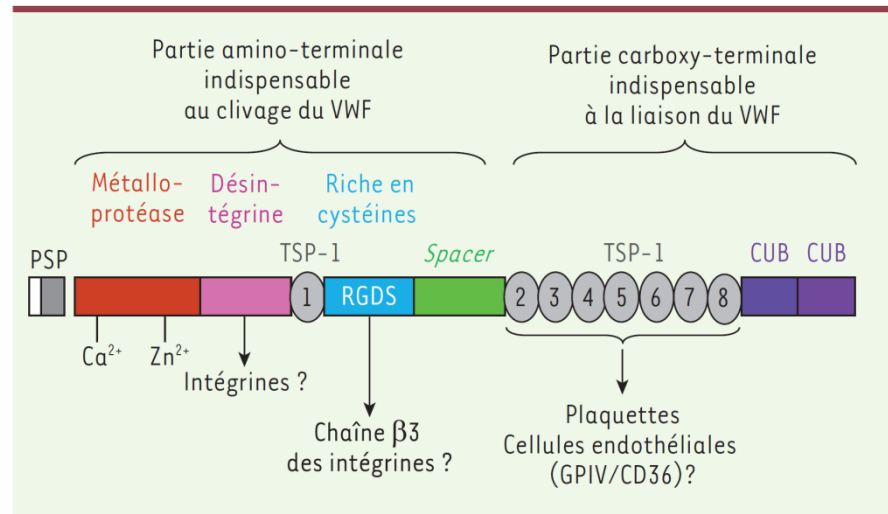
145 kDa

200 kD sur électrophorèse (glycosylation)

PS: peptide signal: 33 AA

P: propeptide: 41 AA

ADAMTS13



Synthèse:

- cellules stellaires hépatiques
- (- cellules endothéliales)
- (- mégacaryocytes)

Caractéristiques:

1. **Spécifique** (≠ protéases plasmatiques et matricielles)

- pas d'action sur fibri, albumine, collagène
- pas inhibée par inhibiteurs classiques des protéases

2. **Concentration plasmatique:** 1 µg/ml

3. **Demi-vie:** 2 à 3 j

ADAMTS13

4. **Régulation:** par accessibilité du site de clivage sur le FvW (forces de cisaillement)

5. **In vitro:**

- pH optimum de 8 à 9
- activation nécessaire par ions métalliques bivalents (Mg<Ca<Sr<Ba)
- action sur FvW en conformation ouverte (LISS, urée, guanidine)

Conséquences:

Absence de régulation de la taille du FvW

Accumulation de UHPM à action hyper-agrégante

Expansion du thrombus plaquettaire de l'hémostase primaire



Origine

Perte d'activité de
10 à 50%

Physiologique

grossesse (à partir de la 12eme semaine)
nouveau-nés, sujets âgés
ethnie (populations africaines)

Secondaire à un état pathologique

sepsis sévère
SAPL
pathologies cardiovasculaires

Perte d'activité
> 90%

PTT congénital (10 %) (syndrome d'Upshaw-Schulman)

rareté (1/1000000)
mutation génétique
autosomal récessif
naissance ou petite enfance

PTT acquis (90%) (syndrome de Moschovitz)

auto-anticorps anti-ADAMTS13

Déficit
ADAMTS13

**Exploration biologique
de l'ADAMTS-13**

```
graph LR; A[Exploration biologique de l'ADAMTS-13] --> B[Activité plasmatique]; A --> C[Antigénémie]; A --> D["Recherche d'inhibiteurs  
- activité plasmatique  
- technique Elisa"]; A --> E[Séquençage];
```

Activité plasmatique

Antigénémie

Recherche d'inhibiteurs
- activité plasmatique
- technique Elisa

Séquençage

Mutations

>50

Introns et exons

Faux-sens (70%) > codon stop, anomalie site épissage, insertions...

Pas de délétion complète décrite (létale)

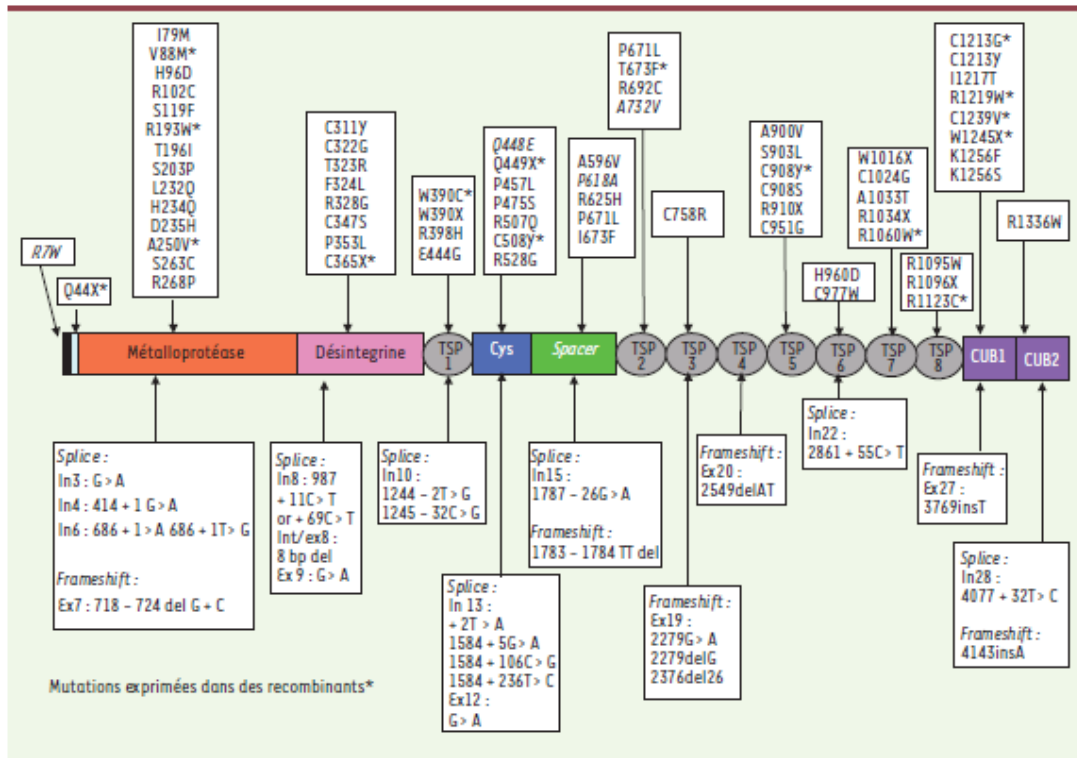
Altération synthèse, sécrétion > atteinte site enzymatique

Hétérozygote composite > Homozygote

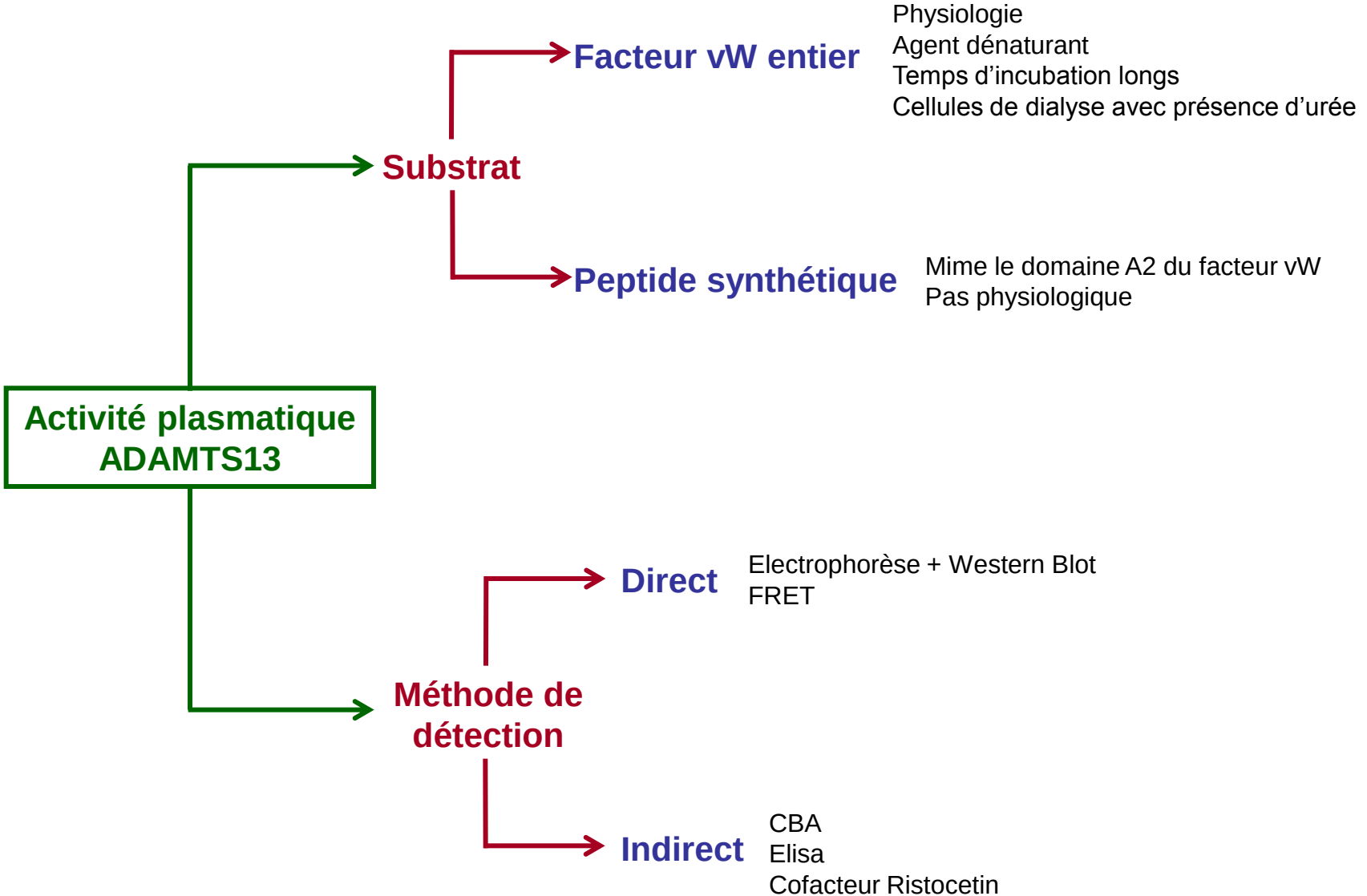
Pas de cluster de mutation

Répartition géographique

Séquençage



SNP's identifiés mais non associés à TTP individuellement
Combinaison de SNP's pourrait induire TTP



1. Facteur Von Willebrand/CBA

Gold standard

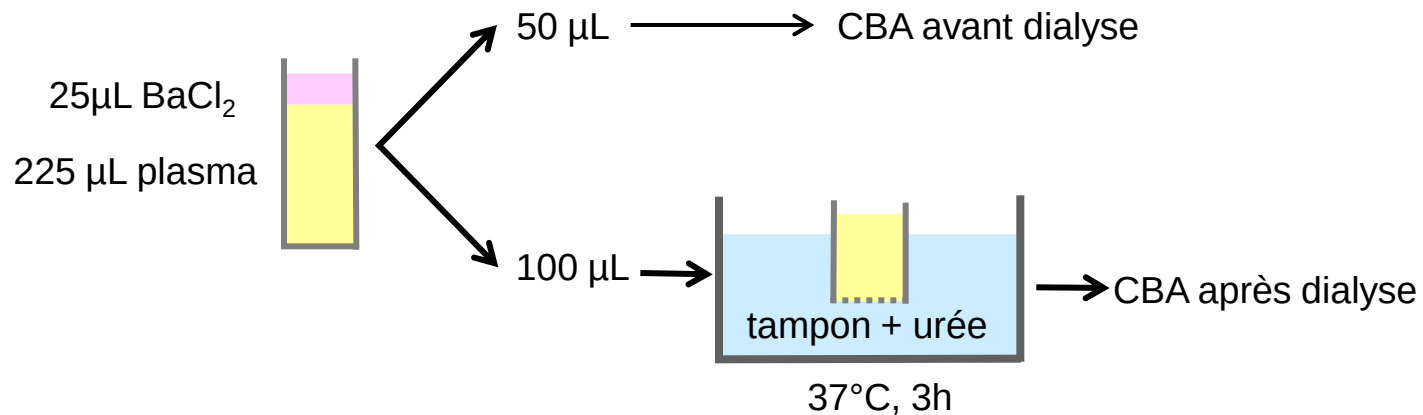
Facteur von Willebrand entier

Dialyse

Long, home-made (variabilité)

CBA donne un résultat chiffré (>< électrophorèse)

**Activité
ADAMTS13**



$$\frac{\text{CBA après dialyse}}{\text{CBA avant dialyse}} \times 100 = \text{activité ADAMTS13}$$

< 33%: *activité ADAMTS13 normal*

> 33%: *activité ADAMTS13 abaissée*

Nombreuses variantes du test:

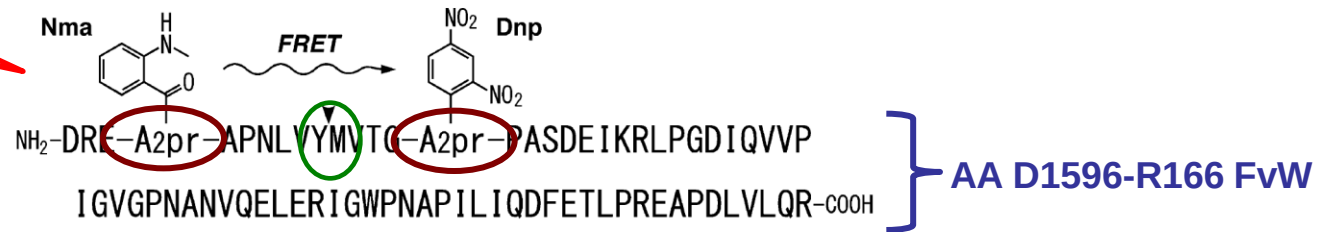
source de FvW

activation ADAMTS13

dialyse

2. Peptide synthétique/FRET

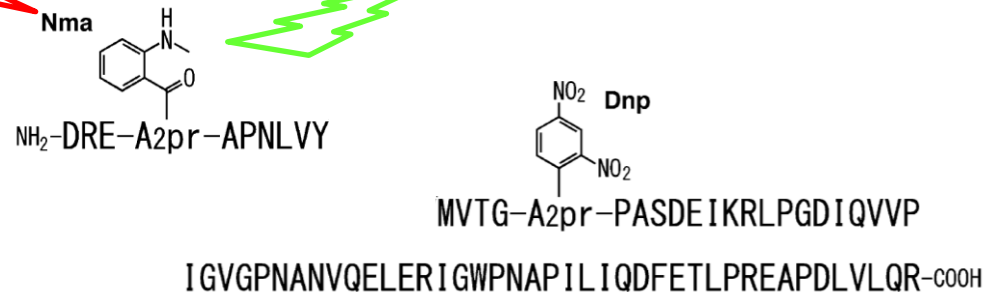
340 nm
excitation



Plasma
CaCl₂, 37°C

340 nm
excitation

410 nm
emission



Activité
ADAMTS13

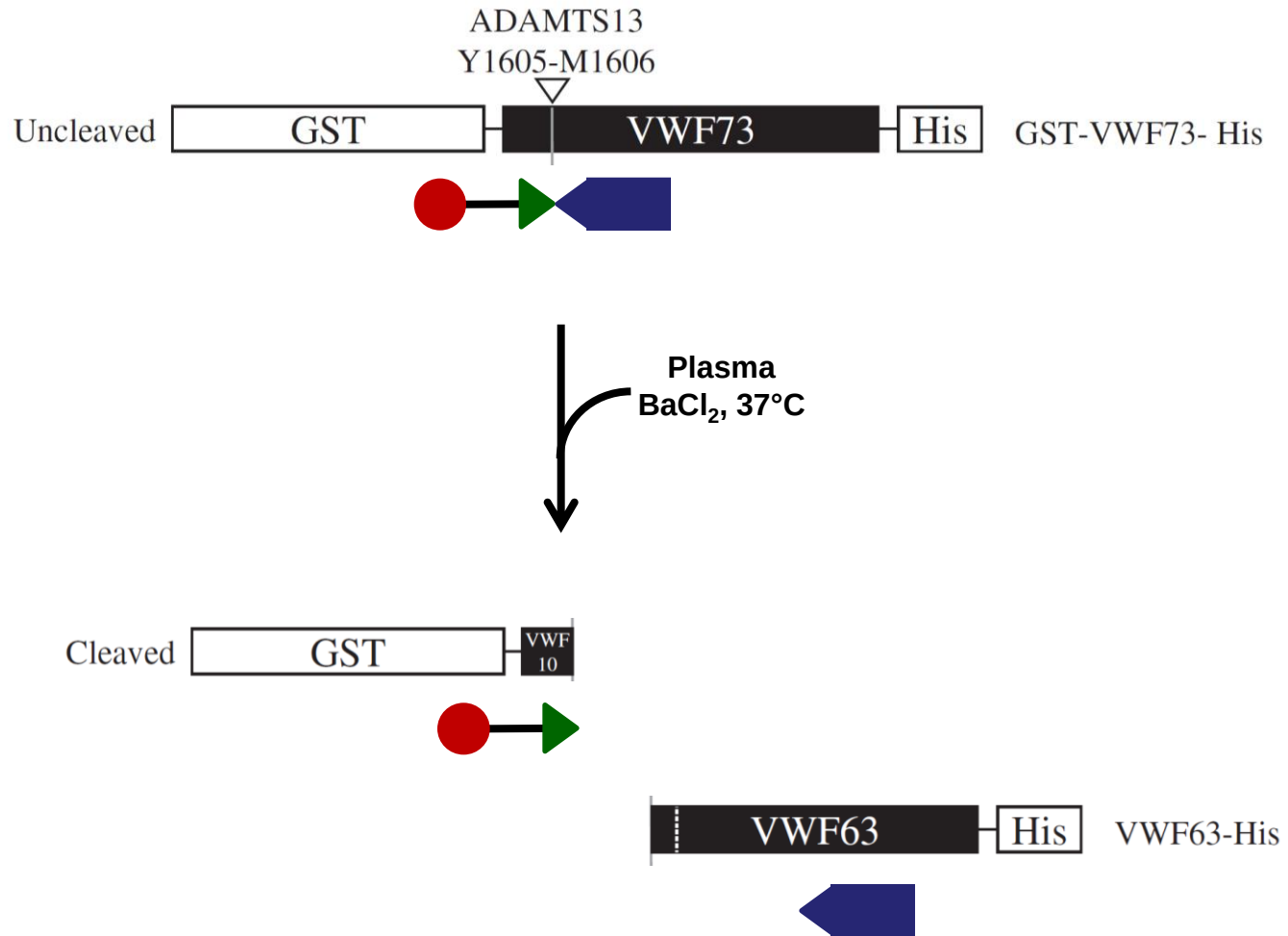
Lecteur microplaque fluorescence, filtres spécifiques

FRET-VWF73 Home-made

FRET-VWF86 (Actifluor Assay, American Diagnostica)

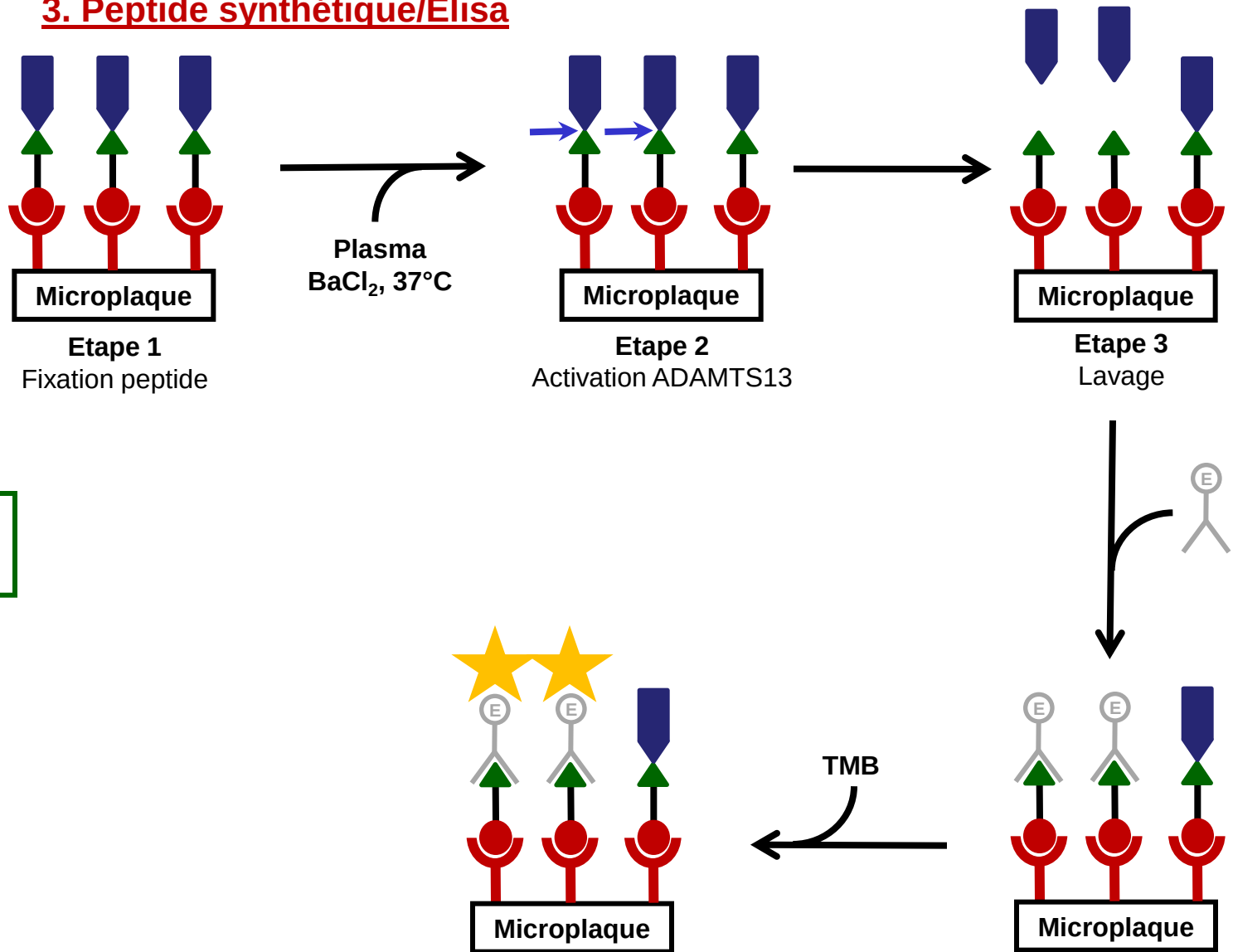
FRET-VWF73 (ATS-73, GTI Diagnostics)

3. Peptide synthétique/Elisa



Activité
ADAMTS13

3. Peptide synthétique/Elisa



Activité
ADAMTS13

Discrepancies between ADAMTS13 activity assay in patients with thrombotic microangiopathies

Mackie I., Langley K., Chitolie A., Liesner R., Scully M., Machin S., Peyvandi F.
Thrombosis and Haemostasis 109, 2013

Méthodes

Home-made { CBA home-made (gold standard)
FRET-VWF73 home-made

Calibrant / Contrôles

PPN congelé / N et Ab congelés

Kits commerciaux { FRET-VWF86 (Actifluor Assay, American Diagnostica)
Chr-VWF73 (Technozym Activity, Technoclone)
FRET-VWF73 (ATS-73, GTI Diagnostics)

Cal kit / N et Ab congelés

Quelle mesure d'activité?

Populations étudiées

159 Samples	38 Healthy normal subjects	
	7 Congenital TTP patients	
	7 Family Members	
	76 TMA patients	40 TMA – at presentation (probable TTP)
		4 TTP – Treated (according to local practice; i.e. plasma exchange and immunosuppression).
		19 TTP – Remission
		13 aHUS
	31 Further samples from 17 of the TMA patients above	

Discrepancies between ADAMTS13 activity assay in patients with thrombotic microangiopathies

Mackie I., Langley K., Chitolie A., Liesner R., Scully M., Machin S., Peyvandi F.
Thrombosis and Haemostasis 109, 2013

Résultats

Calibrations/QC

Calibrant commerciaux sont lyophilisés

PNP congelé

100% du PNP dans home-made fixé de façon arbitraire (96% Ag)

PNP sur commerciaux: valeurs légèrement supérieures

Calibrant commerciaux sur CBA (gold standard)

Précision QC bonne sur NI (4 à 7,5%), variable sur ABN (6,1 à 18%)

Effet HEPES sur test CBA-full lenght von Willebrand (activité diminue avec augmentation de concentration de l'HEPES). Pas d'effet sur FRET-VWF73 Home Made

Quelle mesure d'activité?

Home-made

Commerciaux

	CBA	Fret-VWF73	Fret-VWF86	Chr-VWF73
Calibrant plasmas				
Frozen PNP calibrant				
Mean	100.0	100.0	104.8	119.1
SD	na	na	12.1	10.4
Chr-VWF73 calibrant				
Mean	58.0	110.0	na	102.4
SD	11.5	7.8	na	na
Fret-VWF86 calibrant				
Mean	67.5	96.8	105.0	na
SD	21.6	11.1	na	na
QC plasmas				
Normal QC				
Mean	99.2	105.0	111.0	102.5
SD	4.0	6.5	5.7	7.7
Abnormal QC				
Mean	31.9	39.3	29.7	38.2
SD	4.7	2.4	5.3	2.8

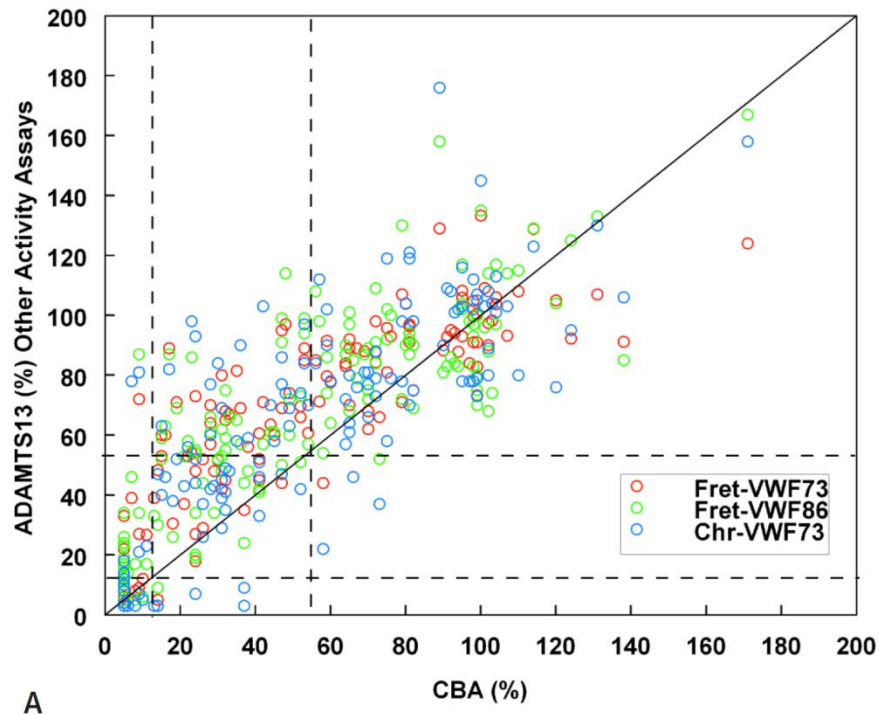
Discrepancies between ADAMTS13 activity assay in patients with thrombotic microangiopathies

Mackie I., Langley K., Chitolie A., Liesner R., Scully M., Machin S., Peyvandi F.
Thrombosis and Haemostasis 109, 2013

Résultats

Corrélations globales

Quelle mesure
d'activité?



Trois zones: <10%, 11-55%, >55%

Corrélation *raisonnable* entre CBA (full length vW) et autres tests (peptides synthétiques)

$r = 0.84-0.94$

CBA donne des valeurs plus basses

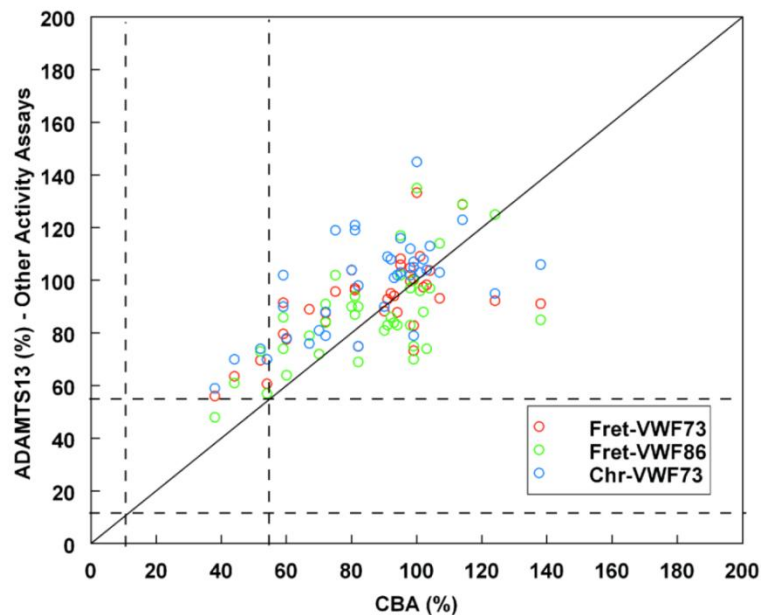
Pas d'intérêt de la normalisation par un ratio

Discrepancies between ADAMTS13 activity assay in patients with thrombotic microangiopathies

Mackie I., Langley K., Chitolie A., Liesner R., Scully M., Machin S., Peyvandi F.
Thrombosis and Haemostasis 109, 2013

Résultats

Sujets normaux



	ADAMTS13		
	Mean	SD	Range
CBA (%)	85.9	21.7	38–138
Fret-VWF73 (%)	91.3	16.2	56–133
Fret-VWF86 (%)	87.5	19.1	48–135
Chr-VWF73 (%)	98.3	18.0	59–145
Antigen (ng/ml)	602	110	428–784
Antigen (%)	100	18.3	71–130

Corrélation *raisonnable* entre CBA et autres tests ($r = 0,62-0,88$)
Valeurs significativement plus élevées avec Chr-VWF73 (intervalle de ref plus large)

Quelle mesure
d'activité?

Discrepancies between ADAMTS13 activity assay in patients with thrombotic microangiopathies

Mackie I., Langley K., Chitolie A., Liesner R., Scully M., Machin S., Peyvandi F.
Thrombosis and Haemostasis 109, 2013

Résultats

PTT congénitaux

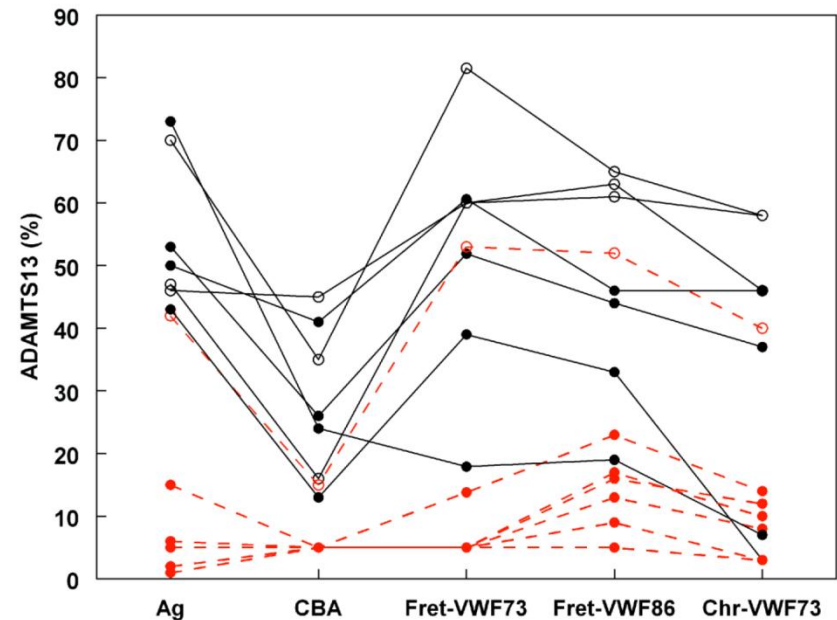
Mutation dans ADAMTS13

Pas d'IgG

— Pas de PTT clinique

- - - PTT clinique

Quelle mesure
d'activité?



C

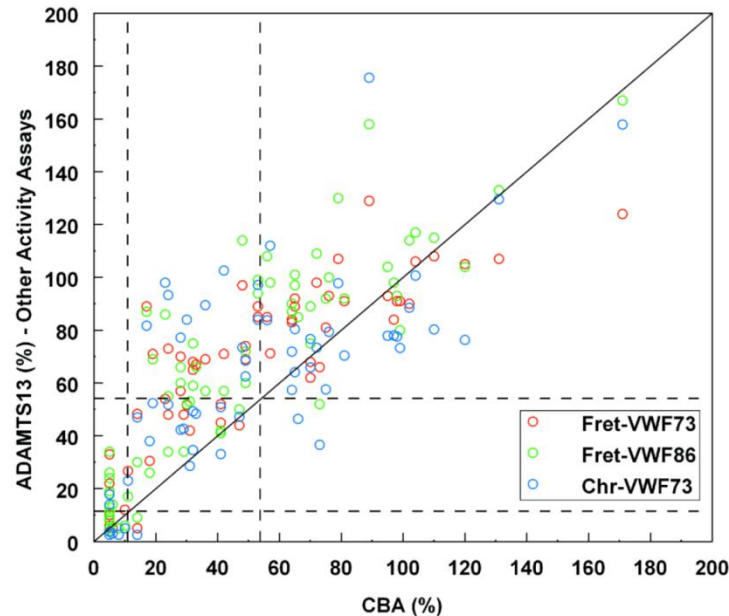
Risque de rater des PTT congénitaux avec méthodologie des peptides synthétiques
Importance d'adaptation des VN en fonction du test utilisé

Discrepancies between ADAMTS13 activity assay in patients with thrombotic microangiopathies

Mackie I., Langley K., Chitolie A., Liesner R., Scully M., Machin S., Peyvandi F.
Thrombosis and Haemostasis 109, 2013

Résultats

MAT



	Median	IQR	Range
CBA (%)	31.0	57	<5 – 171
Fret-VWF73 (%)	53.0	73	<5 – 129
Fret-VWF86 (%)	54.0	69	<5 – 167
Chr-VWF73 (%)	47.2	75	<2.5 – 176

Quelle mesure
d'activité?

Zone 1 (0-10 %):

83 % concordance CBA et Fret-VW73/Chr-VW73

45% concordance CBA et Fret-VW86

Zone 2 (11-55%):

41 % concordance CBA et Fret-VW73

52% concordance CBA et Chr-VW73

Zone 3 (>55%):

> 90% concordance

Discrepancies between ADAMTS13 activity assay in patients with thrombotic microangiopathies

Mackie I., Langley K., Chitolie A., Liesner R., Scully M., Machin S., Peyvandi F.
Thrombosis and Haemostasis 109, 2013

Conclusions

TTP: diagnostic clinique

Importance du labo dans les cas douteux ou difficiles

ADAMTS13 < 10%: TTP

ADAMTS13 nl: HUS

Méthodes actuellement disponibles

Ne mime pas la situation physiologique

Dénaturation si substrat naturel / substrats peptidiques (impact longueur peptide?)

Interactions FVW-ADAMTS13 in vivo

Impact des autres protéines interagissant avec le Willebrand (facteur VIII)

Liaison de l'ADAMTS13 au FVW par site spécifique (non présent sur peptide)

Stabilité de l'ADAMTS13 vis-à-vis des autres protéases

Prudence dans les PTT congénitaux

Risque de résultat > 10% avec méthodologies peptides synthétiques

Bonne corrélation dans PTT acquis

Surtout si <10% ou >55%

Méfiance zone intermédiaire, conserver la même méthode pendant le suivi

**Quelle mesure
d'activité?**

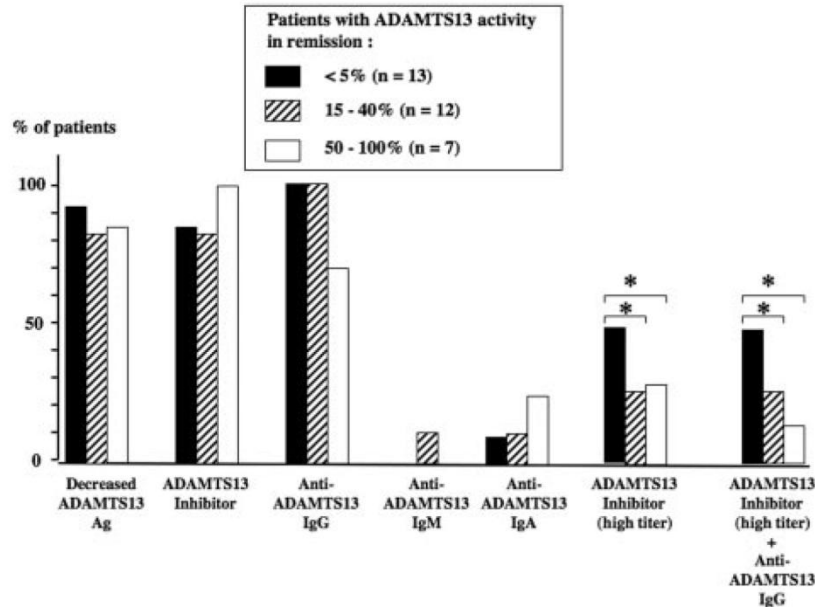
Caractéristiques:

IgG dans 80% des cas (IgA, IgM mais tjrs associés à fraction IgG)

Neutralisants par fixation sur site catalytique (IgG)

Non neutralisants par complexation et accélération élimination (IgM, IgG, autres)

Co-existence dans le TTP



Inhibiteurs

Activité ADAMTS-13 non détectable au diagnostic +

- IgG à titre élevé = mauvaise récupération activité ADAMTS13 à la rémission et risque très élevé de rechute à 18 mois
- association IgG + autre isotype (surtout IgA) = risque élevé de décès
- auto-Ac > 2 UB: risque de mortalité élevé

Détection – Titrage

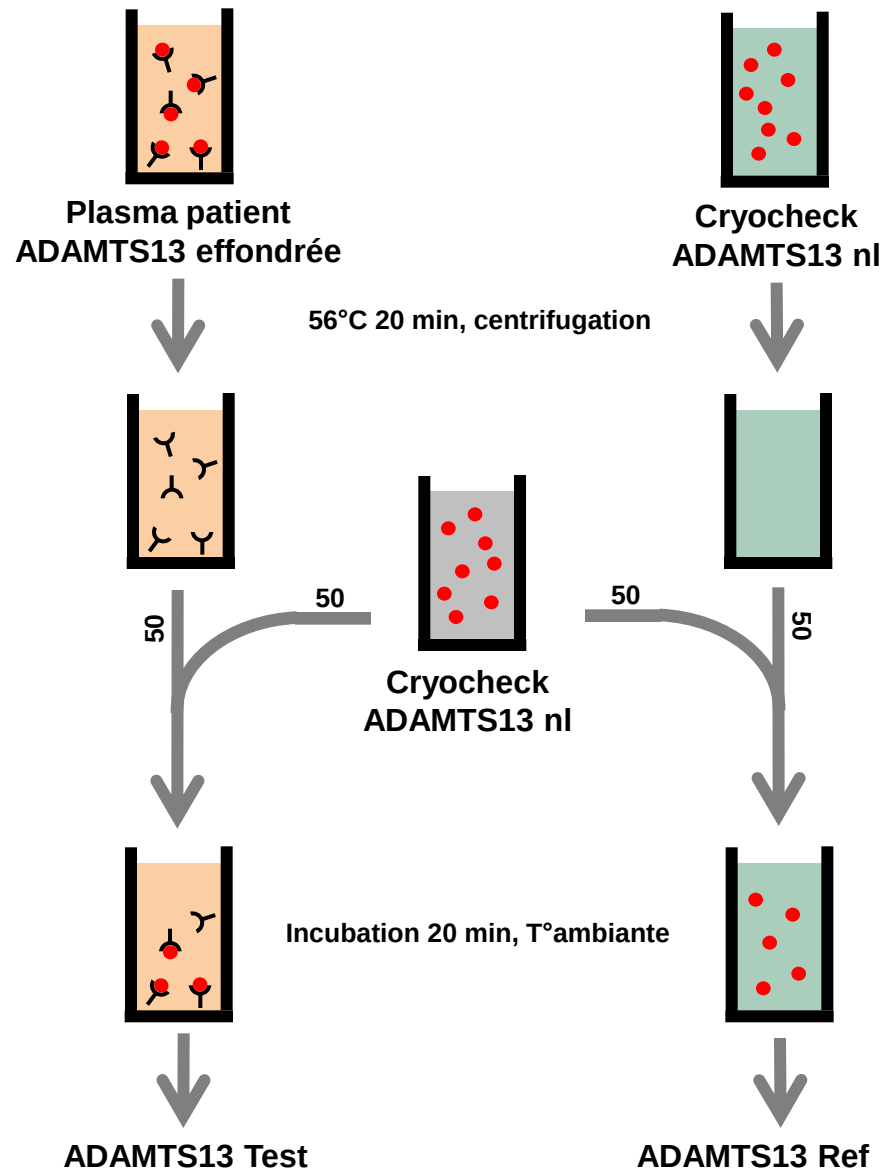
Essai « Bethesda »-like (détection IgG à action inhibitrice): **ACTIVITE**

Méthode immunologique (détection IgG/IgM à action non inhibitrice):

QUANTIFICATION

Détection et titrage

1. Essai « Bethesda »-like (détection IgG à action inhibitrice)



Inhibiteurs

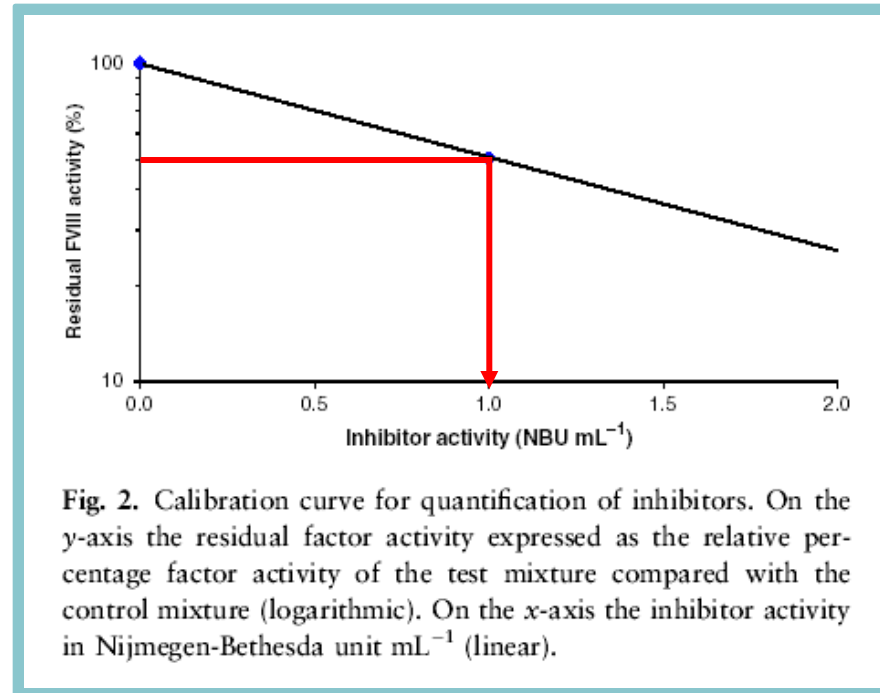
Détection et titrage

1. Essai « Bethesda »-like (détection IgG à action inhibitrice)

ADAMTS13 Test

ADAMTS13 Ref

$\times 100 = \text{Activité ADAMTS13 résiduelle}$ $VN > 75\%$



Inhibiteurs

Protocoles de dilution pour retrouver 50% d'activité résiduelle
Plasma du patient HI dilué dans du Cryocheck HI
Anticorps température indépendants

2. Elisa

Plaques coatées avec ADAMTS13 recombinantes
Détection anticorps inhibiteurs et non-inhibiteurs
Deuxième anticorps anti-IgG/IgA/IgM
Immubind ADAMTS13 Autoanticorps (American Diagnostica) (IgG)

Measurement of anti-ADAMTS13 neutralizing autoantibodies: a comparison between CBA and FRET assays

Mancini I., Valsecchi C., Palla R., Lotta A., Peyvandi F.
Journal of Thrombosis and Haemostasis 10, 2012

Méthodes

30 patients PTT acquis (IgG à l'Elisa):

- 23 en phase de rémission
- 7 en phase aigüe
- pas de traitement en cours au moment du prélèvement

Inhibiteurs

Titration inhibiteurs:

- Bethesda CBA based
- Bethesda FRET based (25 et 37°C)

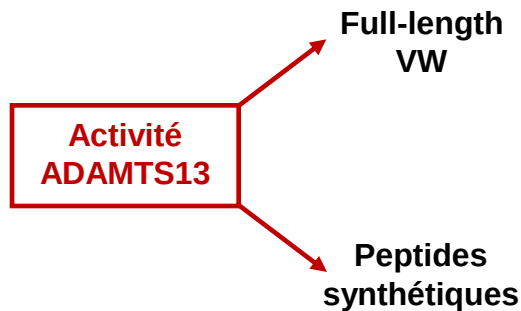
Measurement of anti-ADAMTS13 neutralizing autoantibodies: a comparison between CBA and FRET assays

Mancini I., Valsecchi C., Palla R., Lotta A., Peyvandi F.

Journal of Thrombosis and Haemostasis 10, 2012

Sample	Anti-ADAMTS13 inhibitor (BU mL ⁻¹)			Anti-ADAMTS13 IgG (%)	ADAMTS13 antigen (%)	ADAMTS13 activity (%)
	CBA 37 °C	FRET 37 °C	FRET 25 °C			
	≥0.4 ^a	≥0.4 ^a	≥0.4 ^a	> 1.18 ^a	40–155 ^b	50–158 ^b
1	2	1.8	2	6	49	< 6
2	2	2.2	3.9	12	25	< 6
3	12.5	14	22	117	52	< 6
4	16	11	12.5	130	72	< 6
5	2.5	3	2.2	14	43	< 6
6	2.7	4	3.3	21	41	< 6
7	6	5.8	10.5	75	40	< 6
8	1.4	1.5	1.9	16	18	< 6
9	1	2.3	2.2	15	47	< 6
10	1	0.8	0.6	2.8	95	< 6
11	13	25	17	285	29	< 6
12	3	3.5	7	15	40	9
13	10	13	12	65	63	< 6
14	5.5	5	4	15	176	< 6
15	6	5.8	10	38	55	< 6
16	12.5	12.5	12.5	128	36	< 6
17	0.6	1.1	1.2	18	< 1	10
18	1.1	3.8	3	10	68	< 6
19	2.5	5.2	6	20	20	< 6
20	4	8.3	11	60	102	< 6
21	< 0.4	1.6	1.2	2	70	27
22	1	0.7	1	4.8	53	55
23	18	20	27	35	14	< 6
24	4.5	5	6	31	52	< 6
25	2	2	2.3	6	82	< 6
26	3	3	4.1	38	59	< 6
27	2	2.5	2.7	18	33	< 6
28	3.7	3.3	3.1	21	33	< 6
29	20	20	28	135	38	< 6
30	3	3.6	4.1	28	97	< 6
Median	3	3.7	4.1	20.5	48	3
Min	0.2	0.7	0.6	2	0.5	3
Max	20	25.0	28.0	285	176	55
All samples (n = 30)	R _s * Slope* y-intercept*	0.92 1.04 0.72	0.94 1.26 0.63			
CBA Inhibitor ≤5 BU mL ⁻¹ (n = 20)	R _s * Slope* y-intercept*	0.78 1.16 0.46	0.85 1.61 -0.04			

Peu d'intérêt pour les mesures Elisa (ADAMTS13 et Auto-Ac anti-ADAMTS13)



Sensible, relativement reproductible
« Physiologique » mais agents dénaturants
Complexe, time consuming

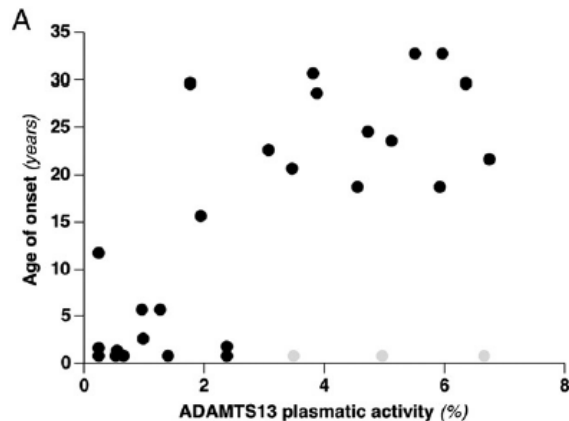
Très sensible, reproductible, facile, rapide
Pas d'agents dénaturants
Substrat synthétique (interaction FvW-ADAMTS13)

Valeur pronostic des tests actuels???

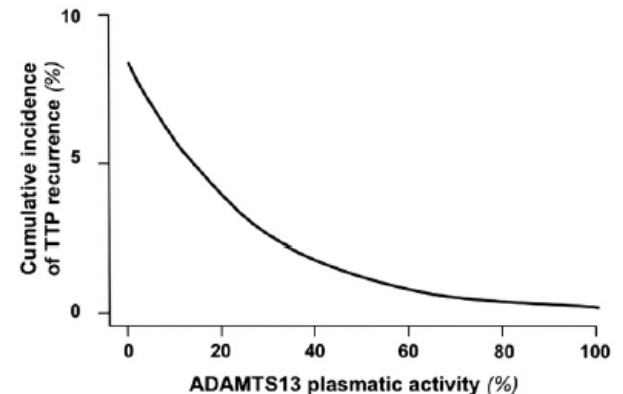
Variabilité entre les méthodes de routine actuellement disponibles

Importance des taux < 10% en fonction déficit congénital – déficit acquis

Conclusions



TTP congénitaux



TTP acquis

Seuil de sensibilité à 1%