UNIVERSITÉ DE NANTES

FACULTÉ DE MÉDECINE

Année 2017 N° 257

THÈSE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

Diplôme d'Études Spécialisées de Biologie Médicale

par

Elsa LLASERA

Née le 19 février 1987 à *Montpellier (34)*

Présentée et soutenue publiquement le 28 novembre 2017

HÉMOPHILIE : L'ARRIVÉE DES « LONG ACTING » VA-T-ELLE MODIFIER NOS PRATIQUES BIOLOGIQUES ?

Président :	Madame le Professeur Marie-Christine BÉNÉ
Directrice de thèse :	Madame le Docteur Catherine TERNISIEN
Membres du jury :	Monsieur le Professeur Jean-Marie BARD
	Monsieur le Docteur Yohann REPESSÉ
	Monsieur le Docteur Marc TROSSAËRT

REMERCIEMENTS

A notre Présidente de jury, Madame le Professeur Marie-Christine BÉNÉ,

Merci pour l'honneur que vous me faites en acceptant la présidence de ce jury. Je vous remercie pour votre bienveillance à chacun de mes passages dans votre service. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

A ma Directrice de thèse, Madame le Docteur Catherine TERNISIEN,

Je te suis très reconnaissante d'avoir dirigé cette thèse et de m'avoir toujours soutenue, épaulée et encouragée pour mener à bien ce travail. Merci pour les heures passées à m'aider dans la rédaction de ce manuscrit. Je te remercie pour ton investissement, ta disponibilité et tes conseils tout au long de ces années.

Aux membres du jury,

Monsieur le Professeur Jean-Marie BARD,

Merci d'avoir accepté de participer à ce jury. Vous me faites l'honneur de juger ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Monsieur le Docteur Yohann REPESSÉ,

Merci pour votre présence à ma soutenance de thèse et pour l'intérêt que vous portez à ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements.

Monsieur le Docteur Marc TROSSAËRT,

Merci d'avoir accepté de participer à l'évaluation de ce travail. Je te remercie pour tes conseils et toutes les connaissances transmises lors de chacun de mes stages en hématologie.

A toute l'équipe du laboratoire d'hématologie, biologistes et technicien(ne)s,
Merci pour l'accueil que vous m'avez toujours réservé au sein de votre équipe,
ce fût un réel plaisir d'apprendre à vos côtés.

Un grand merci tout particulier à Catherine B. et Nathalie L. pour votre disponibilité, vos conseils techniques avisés et votre aide précieuse pour mener à bien ce travail.

A Florent KRASKE, merci pour vos conseils et vos suggestions.

A mes co-internes,
Aurélie, Anne-Gaëlle, Arnaud, Damasie, Olivier, Ronan, Sophie et tous les autres,
pour toutes ces belles années d'internat passées ensemble.

A mes amis,
Amélie et Camille, dont l'amitié m'est si précieuse.
Karine, Sophie, Jean-Christophe et tous les toulousains.
Anaïs, Laurence et Lucie, mes sous-colleuses préférées.
Julie et Nico, mes piliers nantais.

A ma belle-famille,
Valérie, Eric, Charlotte et Manon,
Merci pour votre présence et vos attentions tout au long de ces années.

A ma famille,
Mes parents, mon frère Paul, Juju,
Je ne vous remercierai jamais assez pour votre soutien infaillible et indispensable tout au long de ces années d'étude. Merci d'avoir toujours été là pour moi.

Lina, Michel, Mathieu et Nathan,
Merci pour tous les bons moments passés ensemble.

A Simon, mon petit ange,
Merci pour le bonheur que me procure chaque jour passé à tes côtés.

A David,
Merci pour tout ce chemin parcouru ensemble et pour toutes les belles choses qui nous attendent. Ta présence et ton inconditionnel soutien me sont indispensables.

TABLE DES MATIÈRES

ABRÉVIATIONS **3**
LISTE DES FIGURES **5**
LISTE DES TABLEAUX **7**
1 INTRODUCTION **8**
2 REVUE BIBLIOGRAPHIQUE **10**
2.1 L'hémophilie 10
2.1.1 Définition et stades de sévérité 10
2.1.2 Mode de transmission 10
2.1.3 Épidémiologie 11
2.1.4 Les facteurs VIII et IX et leur rôle dans la coagulation 11
2.1.5 Manifestations cliniques 15
2.1.6 Complications 16
2.2 Les traitements substitutifs 18
2.2.1 Pourquoi traiter ? 18
2.2.2 Comment traiter ? 18
2.3 Les pratiques biologiques pour les dosages de FVIII et FIX 28
2.3.1 Pourquoi doser le FVIII ou le FIX ? 28
2.3.2 Comment doser les facteurs VIII et IX ? 28
2.3.3 État des lieux des pratiques de dosage 33
2.4 Quelle surveillance biologique pour les patients hémophiles substitués? 36
2.4.1 Les concentrés conventionnels en facteurs recombinants 36
2.4.2 Qu'en est-il avec les nouvelles molécules « long acting » ? 38
3 ÉVALUATION DES DOSAGES DE FVIII ET FIX PAR MÉTHODE CHROMOGÉNIQUE SUR AUTOMATE ACL TOP (WERFEN) **44**
3.1 Matériel et méthodes 44
3.1.1 Sélection des échantillons 44

3.1.2 Recueil et préparation des échantillons 45
3.1.3 Automate et réactifs utilisés 45
3.1.4 Répétabilité et reproductibilité 46
3.1.5 Comparaison de méthode 46
3.1.6 Analyse statistique 47
3.2 Résultats 47
3.2.1 Répétabilité et reproductibilité 47
3.2.2 Corrélation entre les méthodes chronométrique et chromogénique 48
4 ÉTUDE DES DISCORDANCES OSA/CSA CHEZ LES PATIENTS HÉMOPHILES SUBSTITUÉS 51
4.1 Matériel et méthodes 51
4.1.1 Sélection des échantillons 51
4.1.2 Réactifs 52
4.2 Résultats 53
4.2.1 Chez les patients substitués par rFVIII 53
4.2.2 Chez les patients substitués par rFIX 55
4.2.3 Récapitulatif des résultats 60
5 DISCUSSION 62
6 RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 67

ABRÉVIATIONS

AA	Acide(s) aminé(s)
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
APTT	*Activated partial thromboplastin time*
ARN	Acide ribonucléique
AVK	Antivitamine K
BHK	*Baby Hamster Kidney*
CHO	*Chinese Hamster Ovary*
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
C(R)TH	Centre (Régional) pour le Traitement de l'Hémophilie
CSA	Technique chromogénique (*Chromogenic substrate assay*)
CV	Coefficient de variation
Da	Dalton
DDAVP	Vasopressine 1-deamino-8-D-arginine
DO	Densité optique
ECAT	*External quality Control for Assays and Tests*
EGF	*Epidermal growth factor*
ET	Ecart-type
FcRn	Récepteur Fc néonatal
FII	Facteur II
FIX	Facteur IX
FMH	Fédération Mondiale de l'Hémophilie
FT	Facteur tissulaire
FV	Facteur V
FVII	Facteur VII
FVIII	Facteur VIII
FX	Facteur X
FXI	Facteur XI
FXII	Facteur XII
GFHT	Groupe Français d'études sur l'Hémostase et la Thrombose
HEK	*Human Embryonic Kidney*
HTLV	*Human T cell leukemia/lymphoma virus*
IgG	Immunoglobuline G

ISTH *International Society on Thrombosis and Haemostasis*

kb Kilobases

kDa KiloDaltons

LDL *Low density lipoprotein*

LRP *LDL receptor-related protein*

nm Nanomètre

OSA Dosage chronométrique en un temps (*one-stage assay*)

pb Paire de bases

PEG Polyéthylène glycol

PFC Plasma frais congelé

pNA Paranitroaniline

PPP Plasma pauvre en plaquettes

RCP Résumé des caractéristiques du produit

rFIX Facteur IX recombinant

rFVIII Facteur VIII recombinant

RIHN Référentiel des actes innovants hors nomenclature

SNC Système nerveux central

SSC *Scientific and Standardization Committee* (standard)

TCA Temps de céphaline activée

TCK Temps de céphaline kaolin

TP Temps de prothrombine

TQ Temps de Quick

UI Unité internationale

VIH Virus de l'immunodéficience humaine

VWF Facteur von Willebrand

WHO *World Health Organization*

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Le facteur VIII et ses domaines

Figure 2 : Les trois phases de la coagulation

Figure 3 : Structure des molécules de polyéthylène glycol

Figure 4 : Recyclage de l'albumine grâce au récepteur Fc néonatal

Figure 5 : Procédés allongeant la durée de vie du FIX

Figure 6 : Principe de la méthode OSA (exemple pour le dosage du FVIII)

Figure 7 : Principe de la méthode CSA pour le dosage du FVIII

Figure 8 : Principe de la méthode CSA pour le dosage du FIX

Figure 9 : Les pratiques biologiques pour le dosage des FVIII et FIX

Figure 10 : Automates de coagulation et réactifs APTT utilisés en France

Figure 11 : Comparaison FVIII OSA versus FVIII CSA de concentrés en FVIII conventionnels

Figure 12 : « Recovery » des dosages de N9-GP selon le réactif APTT (OSA) ou le kit chromogénique (CSA) utilisés

Figure 13 : Taux de FIX d'échantillons surchargés en Benefix® ou en rFIX-Fc selon l'activateur du réactif APTT

Figure 14 : Corrélation FVIII:OSA / FVIII:CSA

Figure 15 : Concordance OSA/CSA de Bland-Altman pour le FVIII

Figure 16 : Corrélation FIX:OSA / FIX:CSA

Figure 17 : Concordance OSA/CSA de Bland-Altman pour le FIX

Figure 18 : Résultats des dosages FVIII:OSA / FVIII:CSA chez des patients substitués par rFVIII conventionnels et « long acting »

Figure 19 : FVIII:OSA avec le réactif APTT Synthasil® versus FVIII:CSA selon le taux en FVIII de patients substitués par Elocta®

Figure 20 : Comparaison FIX:OSA versus FIX:CSA chez 8 patients substitués par Benefix®

Figure 21 : Echantillons surchargés in vitro en rIX-FP (Idelvion®) à 5%, 30% et 80% (moyenne +/- ET)

Figure 22 : Pourcentage de récupération par rapport à la valeur cible pour le rIX-FP Idelvion®

Figure 23 : Pourcentage de récupération par rapport à la valeur cible d'échantillons surchargés en rFIX-Fc Alprolix®

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Fréquence des différents sites de saignement chez les hémophiles

Tableau 2 : Concentrés conventionnels de FVIII d'origine recombinante ou plasmatique commercialisés en France

Tableau 3 : Concentrés conventionnels de FIX d'origine recombinante ou plasmatique commercialisés en France

Tableau 4 : Les rFVIII « long acting »

Tableau 5 : Les rFIX « long acting »

Tableau 6 : Diversité des réactifs APTT pour la méthode OSA

Tableau 7 : Méthode CSA versus méthode OSA pour le dosage du FVIII avec les « long acting »

Tableau 8 : Quelle méthode pour le dosage des rFVIII « long acting » ?

Tableau 9 : Quelle méthode pour le dosage des rFIX « long acting » ?

Tableau 10 : Résultats des moyennes et CV des dosages de FVIII et FIX par méthode CSA

Tableau 11 : Echantillons plasmatiques de patients substitués par FVIII recombinants

Tableau 12 : Caractéristiques des différents réactifs APTT utilisés

Tableau 13 : Dosages d'échantillons surchargés en rFIX-Fc Alprolix®

Tableau 14 : Quelle méthode pour le dosage des rFVIII conventionnels et à demi-vie prolongée ?

Tableau 15 : Quelle méthode pour le dosage des rFIX conventionnels et à demi-vie prolongée ?

1 INTRODUCTION

L'hémophilie constitutionnelle est une maladie hémorragique héréditaire récessive liée au chromosome X. Avec une incidence de 1/10 000 naissances dans le monde, elle se caractérise par un déficit en facteur de la coagulation, le facteur VIII (FVIII) pour l'hémophilie A et le facteur IX (FIX) pour l'hémophilie B (1). L'hémophilie est l'anomalie de la coagulation la plus fréquente d'après les chiffres parus dans le rapport annuel 2015 de la Fédération Mondiale de l'Hémophilie (FMH) (2). Le taux en facteur de la coagulation détermine la sévérité de la maladie : l'hémophilie est dite sévère si le taux est inférieur à 1% de la normale, modérée entre 1 et 5% et enfin mineure pour un taux supérieur à 5% (3). La gravité de la symptomatologie clinique est corrélée à la sévérité du déficit en facteur de la coagulation concerné.

Des traitements substitutifs prophylactiques ou à la demande sont administrés par voie intraveineuse aux patients hémophiles afin de prévenir ou traiter les complications dues à la symptomatologie hémorragique. Ces produits sont des concentrés de FVIII ou de FIX soit d'origine plasmatique et dérivés du sang humain, soit recombinants obtenus par génie génétique. De nouveaux facteurs antihémophiliques à demi-vie prolongée dits « long acting » sont actuellement développés. Ces concentrés vont dans un avenir très proche modifier le paysage de l'arsenal thérapeutique ; certains sont déjà disponibles et d'autres sont en cours d'évaluation.

L'arrivée de ces nouveaux traitements nous fait craindre des difficultés de dosage de ces molécules dans nos laboratoires. En effet, le suivi thérapeutique fait appel dans la majorité des laboratoires en France à la technique chronométrique dit « One-stage assay » (OSA). Cette méthode utilise le temps de céphaline activée (TCA) et un plasma déficient en facteur et est donc très dépendante du type de phospholipides et de l'activateur de la phase contact. Or les études réalisées chez les patients traités par FVIII recombinant montrent des discordances de 20% à 50% entre le dosage par méthode chronométrique (OSA) et le dosage par méthode chromogénique (CSA) qui est la méthode de référence (4). De même, concernant le suivi des patients substitués par FIX à demi-vie prolongée, il existe des différences significatives selon le réactif pour le TCA (APTT) utilisé. Peu de données, en revanche, sont disponibles

concernant le dosage du FIX chromogénique dans la mesure où, jusqu'à présent, cette méthode reste peu développée dans les laboratoires.

Le suivi des hémophiles traités par les facteurs à demi-vie longue dits « long acting » est un véritable défi pour les médecins prescripteurs et les biologistes et pourrait nécessiter la mise en place du dosage du FVIII ou du FIX par méthode chromogénique (CSA).

L'objectif de notre travail a été dans un premier temps de mettre en place et d'évaluer le dosage du FVIII et du FIX par méthode CSA sur l'automate ACL TOP. Dans un second temps nous avons comparé chez des patients hémophiles A ou B substitués par différents concentrés conventionnels ou « long acting », les méthodes OSA et CSA pour le dosage du FVIII ou FIX. Le but est d'ouvrir une réflexion quant à la stratégie à adopter, au laboratoire du CHU de Nantes, sur la méthode de dosage pour la surveillance de nos patients substitués par ces facteurs antihémophiliques à demi-vie prolongée.

2 REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1 L'hémophilie

2.1.1 Définition et stades de sévérité

Il existe deux types d'hémophilies constitutionnelles, l'hémophilie A et l'hémophilie B qui correspondent respectivement à un déficit en FVIII ou en FIX de la coagulation. Le taux en facteur déficitaire concerné est exprimé en pourcentage de la normale et permet de classer l'hémophilie en trois stades de sévérité. Un sujet exempt de la maladie est assimilé à 100% d'activité. L'*International Society on Thrombosis and Haemostasis* (ISTH) définit l'hémophilie comme sévère lorsque le taux de FVIII ou de FIX est inférieur à 1% (ou 1 UI/dL), modérée quand il est compris entre 1 et 5% (1-5 UI/dL) et mineure s'il est au-dessus de 5% (5 UI/dL). L'hémophilie sévère concerne 32% des hémophiles A et 28% des hémophiles B, l'hémophilie modérée 14% des hémophiles A et 28% des hémophiles B et l'hémophilie mineure concerne 54% des hémophiles A et 44% des hémophiles B (5). Au sein d'une même famille, la sévérité et l'évolution de la maladie sont identiques (6).

2.1.2 Mode de transmission

L'hémophilie est une pathologie génétique récessive et liée à l'X. Elle touche préférentiellement les sujets de sexe masculin puisqu'ils ne possèdent qu'un seul exemplaire du chromosome X. Ils seront donc obligatoirement atteints si leur mère leur transmet son chromosome muté (7). Les femmes seront, quant à elles, conductrices de la maladie mais peuvent également être hémophiles dans d'exceptionnels cas où leurs deux chromosomes X seraient mutés ou dans des situations très particulières caractérisées par l'absence partielle voire complète d'un chromosome X comme dans le syndrome de Turner.

L'hémophilie se caractérise souvent par une histoire familiale et un arbre généalogique retrouvant certains de ses membres atteints sur plusieurs générations. Si la mère est conductrice, chacune de ses filles aura 50% de risque d'être elle-même conductrice et ses garçons 50% de risque d'être hémophiles. En revanche, si c'est le père qui est atteint, ses

filles seront obligatoirement conductrices de la maladie vu qu'il leur aura transmis son chromosome X malade alors que ses garçons seront sains (7). Un sujet peut toutefois être atteint d'hémophilie de manière sporadique alors qu'il n'existe pas dans sa famille d'antécédent de cette pathologie puisqu'il a été rapporté près de 25% de mutations survenant de novo (6).

2.1.3 Épidémiologie

L'hémophilie A touche un garçon sur 5000 à 10000 naissances de sexe masculin (8) alors que l'hémophilie B est cinq fois moins fréquente avec un garçon sur 25000 à 30000 naissances (9). La Fédération Mondiale de l'Hémophilie (FMH) rapporte en 2015 un chiffre de 187183 personnes atteintes d'hémophilie à travers le monde. En France, 6848 patients sont atteints, 5581 pour l'hémophilie A (soit 81,5%) et 1267 pour l'hémophilie B (soit 18,5%) (2).

2.1.4 Les facteurs VIII et IX et leur rôle dans la coagulation

Lorsqu'une brèche vasculaire survient, de nombreux mécanismes se mettent en route afin d'arrêter le saignement, c'est l'hémostase qui se décompose en trois temps :

- L'hémostase primaire aboutit à la formation du clou plaquettaire afin d'obturer la brèche vasculaire grâce à plusieurs acteurs que sont la paroi vasculaire, les plaquettes, le facteur Willebrand et le fibrinogène. Elle regroupe les phénomènes de vasoconstriction puis d'adhésion, d'activation et d'agrégation plaquettaire.

- La coagulation permet ensuite de consolider ce thrombus plaquettaire grâce à la formation de fibrine insoluble, le tout formant un caillot et permettant d'obstruer la brèche vasculaire.

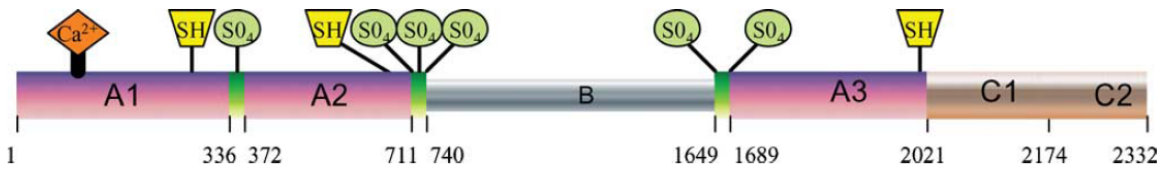
- Enfin la fibrinolyse intervient, plus tardivement, afin de garantir la reperméabilisation vasculaire en lysant le caillot de fibrine après transformation du plasminogène en plasmine.

Dans l'hémophilie, l'étape de coagulation est perturbée par défaut en FVIII ou en FIX.

- **Le facteur VIII**

Situé sur le bras long du chromosome X en position 28 (Xq28), le gène du facteur VIII est long de 186 000 paires de bases (pb). Il est réparti en 26 exons dont la taille varie de 69 à 3106 pb pour l'exon 14 qui est le plus grand et 25 introns. Sa structure complète a été identifiée depuis 1984 par Gitschier et *al.* (10). L'ARN messager produit, long de 9 kb, est traduit en une protéine précurseur composée de 2351 acides aminés (11). La synthèse du FVIII a lieu principalement au niveau des cellules endothéliales sinusoïdales du foie bien que des sources extra-hépatiques comme les monocytes/macrophages, les mégacaryocytes ou les cellules hématopoïétiques aient récemment été identifiées (12).

Sous sa forme mature, le FVIII est une glycoprotéine de 2332 acides aminés répartis en plusieurs domaines (A1, A2, B, A3, C1 et C2) reliés entre eux par des régions peptidiques (a1, a2 et a3) riches en acides aminés acides (Figure 1).



Les numéros des acides aminés encadrant les différents domaines sont représentés sur la figure. Les domaines A et C sont respectivement en rose et doré, les segments a1, a2 et a3 en vert. Le domaine B en argent n'est pas à l'échelle. La localisation approximative des résidus cystéine (SH), tyrosine sulfatée (SO_4) et du site de liaison pour le calcium (Ca^{2+}) est indiquée.

Figure 1 : Le facteur VIII et ses domaines, Fay PJ. (13).

Le rôle du domaine B est peu connu mais n'est pas indispensable au phénomène de coagulation puisque les facteurs antihémophiliques recombinants qui en sont délétés possèdent une activité coagulante normale. Lors de sa sécrétion, le FVIII est clivé et se retrouve sous forme d'un hétérodimère composé d'une chaîne légère constante (poids de 80 kDa) regroupant les domaines A3-C1-C2 et d'une chaîne lourde inconstante (poids entre 90 et 210 kDa) composée des domaines A1-A2 et d'une partie variable plus ou moins longue du domaine B reliées entre elles par un ion métallique divalent. Le FVIII se lie alors au niveau de sa chaîne légère au facteur von Willebrand (VWF) qui va jouer le rôle de protecteur vis-à-vis

de l'inactivation par la protéine C activée et de l'activation du facteur X activé. À ce stade, le FVIII est à l'état de profacteur qui ne possède pas encore d'activité fonctionnelle. Son activation par la thrombine nécessite le clivage de la chaîne lourde en position Arg 372 – Ser 373 séparant les domaines A1 et A2 et en position Arg 740 – Ser 741 permettant la séparation des domaines B et A2. La chaîne légère est également clivée en Arg 1689 – Ser 1690 au niveau de l'extrémité N-terminale du domaine A3 (14).

- **Le facteur IX**

Le facteur IX, synthétisé par le foie, est une protéine vitamine K-dépendante tout comme les facteurs II, VII et X ainsi que deux inhibiteurs physiologiques de la coagulation que sont les protéines C et S. À l'état physiologique, il circule sous forme inactive. Il est activé lors d'une brèche vasculaire au cours de la cascade de la coagulation. Sa synthèse au niveau de l'hépatocyte nécessite la vitamine K sous sa forme réduite. Elle est le cofacteur de la γ-carboxylase et permet la carboxylation des résidus acide glutamique du précurseur en acide γ-carboxyglutamique au niveau du réticulum endoplasmique. Cette réaction permet aux protéines vitamine K-dépendantes de pouvoir interagir à la surface des phospholipides membranaires. Plusieurs résidus acide aspartique sont ensuite ß-hydroxylés ce qui confère à la protéine la capacité de se lier au calcium et ainsi d'être activée (15). Le propeptide monocaténaire ainsi obtenu est excrété.

La structure du FIX est proche des autres protéines vitamine K-dépendantes. Il se compose de 12 résidus d'acide glutamique dans la région amino-terminale, de deux domaines analogues au facteur de croissance épidermique (EGF) et se termine par un domaine sérine protéase (SP) dans la région carboxy-terminale (16). Situé sur le bras long du chromosome X en position 27 (Xq27), le gène du facteur IX est long de 34 kb. Il est réparti en 8 exons et 7 introns. L'ARN messager produit, long de 2,8 kb, est traduit en une protéine composée de 415 acides aminés (17).

L'activation du FIX en FIXa se fait par le complexe facteur tissulaire/FVIIa, ou, en l'absence de facteur tissulaire, par le FXIa. Elle nécessite un premier clivage au niveau Arg 191 – Ala 192 pour obtenir le FIXα composé d'une chaîne légère (de l'acide aminé 47 au 191) et d'une chaîne lourde (de l'acide aminé 192 au 461). La chaîne légère comprend le domaine Gla et EGF1 qui participent à l'activation du FIX par le complexe FT/FVIIa et le domaine EGF2 site de liaison au FVIIIa. La chaîne lourde est formée du domaine catalytique

(18). Un second clivage a lieu au niveau Arg 226 – Val 227 aboutissant au FIXa à partir de la partie N-terminale de la chaîne légère et la partie C-terminale de la chaîne lourde.

- **Pourquoi les hémophiles saignent-ils ?**

Lors d'une brèche vasculaire, les trois phases de la coagulation (initiation, amplification et propagation) ont lieu à la surface de membranes cellulaires permettant ainsi au processus de rester localisé uniquement au niveau de la lésion vasculaire. Elles sont représentées de façon schématique par la figure 2.

La phase d'initiation débute lorsque la paroi vasculaire est lésée. Les cellules sous-endothéliales porteuses du facteur tissulaire (FT) vont être exposées à la circulation sanguine. La liaison FT/FVIIa active le FIX et le FX. Le Fxa se lie au Fva sur la surface cellulaire pour former le complexe prothrombinase. L'activation du FIX en FIXa peut aussi se faire par le FXIa lui-même activé par les facteurs de la phase contact.

Lors de la phase d'amplification, les premières traces de thrombine générée par le complexe Fxa/Fva permettent d'activer les facteurs VIII, V, XI et les plaquettes. Le FXIa transforme le FIX en FIXa et les plaquettes activées fixent les facteurs Va, VIIIa et IXa.

Enfin la phase de propagation va permettre la formation de grande quantité de thrombine qui transforme le fibrinogène en fibrine pour former un caillot stable. Pour cela le complexe tenase composé des FVIIIa/FIXa active le FX à la surface des plaquettes activées aboutissant également à la formation de prothrombinase. Le complexe Fxa/Fva va alors transformer de grande quantité de prothrombine en thrombine. Dans l'hémophilie, ce complexe tenase est en défaut entrainant la baisse de génération de Fxa et donc de thrombine. Il y a alors non seulement un retard dans la formation du caillot hémostatique mais ce caillot sera en plus mécaniquement fragile et détruit prématurément.

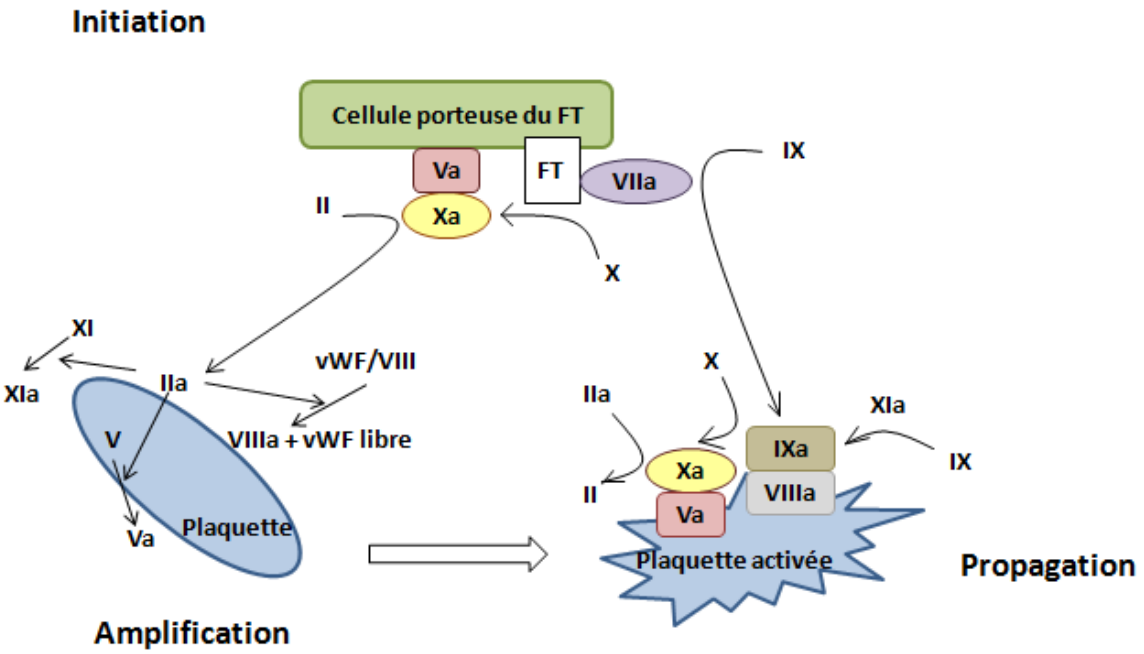


Figure 2 : Les trois phases de la coagulation, d'après Hoffman et *al.* (19,20).

2.1.5 Manifestations cliniques

Les manifestations cliniques sont dominées par les saignements spontanés dans la forme sévère de la maladie ou provoqués par des traumatismes mineurs. Le diagnostic d'hémophilie sévère se fait habituellement à l'âge de la marche. Les hémarthroses sont les manifestations les plus typiques avec une fréquence approximative de 70% à 80% (Tableau 1). Les articulations les plus touchées sont les genoux, les coudes et les chevilles, puis, moins fréquemment, les épaules, les poignets et les hanches (21,22). La répétition des saignements au niveau d'une même articulation cible peut entrainer une arthropathie chronique, très invalidante et évoluant vers la destruction articulaire si elle n'est pas correctement prise en charge. Une étude menée aux Pays-Bas et ayant inclus 171 hémophiles sévères A et B nés entre 1968 et 2002 montre que l'âge de la première hémarthrose varie de 0,2 à 5,8 ans et représente un bon marqueur prédictif pour estimer la sévérité du phénotype clinique. Plus la première atteinte articulaire sera tardive moins le patient nécessitera de traitements substitutifs (23). Les hématomes des tissus sous-cutanés ou affectant les muscles peuvent être graves de par leur volume ou leur localisation, avec un risque fonctionnel ou vital. Les hémorragies cérébrales sont rares mais parfois révélatrices chez le nouveau-né.

Tableau 1 : Fréquence des différents sites de saignement chez les hémophiles, Srivastava et *al.* (21).

Site de saignement	Fréquence (%)
Hémarthrose	70-80
Muscle	10-20
Autres saignements majeurs	5-10
Système nerveux central (SNC)	<5

Pour les patients atteints d'une forme modérée, les saignements spontanés sont occasionnels et la symptomatologie hémorragique se révèle plutôt au cours d'actes chirurgicaux ou de traumatismes plus ou moins majeurs. Pour les patients atteints d'une forme mineure le diagnostic peut être tardif voire même de découverte fortuite lors d'un premier bilan préopératoire.

2.1.6 Complications

De nombreuses complications, qu'elles soient la conséquence de manifestations hémorragiques répétées ou secondaires aux traitements utilisés, apparaissent au cours du suivi des patients hémophiles.

L'arthropathie hémophilique est la conséquence d'hémarthroses récidivantes au niveau d'une articulation. La présence de sang au sein de l'articulation va entrainer une accumulation de fer et favoriser le processus inflammatoire aboutissant à l'atteinte synoviale, la destruction cartilagineuse et le remodelage osseux (24). Les concentrés en facteurs de coagulation utilisés de manière prophylactique ont montré leur efficacité pour prévenir ces épisodes (25). L'utilisation de ces concentrés de facteurs de coagulation, qu'ils soient d'origine plasmatique ou recombinants, n'est cependant pas anodine. Elle peut conduire au développement d'inhibiteurs. Ces allo-anticorps, retrouvés chez environ 30% des patients hémophiles A sévères substitués (26) et chez 4 à 5% des hémophiles B sévères (27) vont inhiber l'activité du facteur VIII ou du facteur IX. Ils apparaissent souvent au cours des quinze premiers jours d'exposition au produit. Le risque de développer un inhibiteur est accru chez les hémophiles sévères ayant des taux d'antigène quasi indétectable. Il s'agit de la complication post-thérapeutique la plus fréquente et peut compromettre la prise en charge future des patients

touchés. Certaines caractéristiques propres à chaque individu vont fortement influencer la survenue d'un inhibiteur : le type d'anomalie génétique avec une fréquence augmentée en cas de délétions étendues de plus de 200 paires de base, de mutations non-sens ou d'inversion de l'intron 22 (28), l'origine ethnique avec un risque accru chez les sujets noirs d'origine africaine (29) et enfin en cas d'antécédents familiaux d'inhibiteurs (28). Le risque de survenue d'un inhibiteur selon le type de traitement reçu par le patient (recombinant ou d'origine plasmatique) reste toujours très controversé. Alors que certaines études ne montrent pas de différence (26,30,31), d'autres suggèrent que les facteurs VIII recombinants, en présentant une séquence et un taux en facteur Willebrand identiques seraient plus immunogènes que ceux dérivés du plasma et issus d'un pool de plusieurs donneurs (32,33).

La seconde complication de l'utilisation des traitements substitutifs est la survenue de complications infectieuses bien que de nos jours, dans les pays développés, le risque soit devenu très faible. En France l'affaire du sang contaminé dans les années 1980 a révélé la contamination de patients par le VIH après avoir reçu des transfusions de produits sanguins labiles. Aujourd'hui en France ce risque infectieux est maîtrisé même s'il ne reste pas nul concernant les principaux agents viraux tels que les virus du Sida, des hépatites B et C, HTLV-1 et 2, qui sont testés afin d'assurer la sécurité de chaque don de sang (34). Il est difficile à l'heure actuelle d'estimer les risques de transmission secondaire au cours de transfusion sanguine de certains agents émergents et peu maîtrisés comme le prion responsable de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (35) d'où le principe de précaution visant à écarter les donneurs à risque. Qu'ils soient d'origine plasmatique ou recombinante, les facteurs antihémophiliques subissent désormais plusieurs étapes de purification et d'inactivation afin de limiter au maximum ce risque de transmission d'agents infectieux.

2.2 Les traitements substitutifs

2.2.1 Pourquoi traiter ?

Plusieurs cas de figure vont amener à instaurer un traitement chez les patients. Ce traitement substitutif peut être « à la demande », c'est-à-dire mis en place lors de la survenue d'un choc, d'un saignement excessif ou lors d'une chirurgie programmée. Il peut à l'inverse être instauré de manière prophylactique. Dans les pays européens, la prise en charge de la majorité des patients hémophiles sévères repose actuellement sur l'administration de concentrés de facteurs de la coagulation VIII ou IX (d'origine plasmatique hautement purifié ou recombinant) en traitement prophylactique afin de diminuer les saignements spontanés ou pour des traumatismes mineurs. Il a été montré que l'injection prophylactique de FVIII recombinant chez des jeunes garçons atteints d'hémophilie A sévère réduisait significativement les hémarthroses et les complications articulaires à long terme (25). L'adhésion à cette prophylaxie est primordiale pour les hémophiles sévères puisque le temps passé par semaine avec un taux en facteur VIII inférieur à 1 UI/dl est directement corrélé au risque annuel de saignement (36). La supériorité de la prophylaxie débutée dès le plus jeune âge (37) avec des injections répétées comparée à un traitement à la demande est maintenant clairement admise. Les pionniers en la matière sont les Suédois qui pratiquent cette prophylaxie depuis 1958 pour les hémophiles A sévères et depuis 1972 pour les hémophiles B (38). Le rapport 2015 de la FMH sur l'utilisation des concentrés de facteurs VIII et IX montre de grandes disparités selon les pays quant à l'usage de produits d'origine plasmatique ou recombinante (2).

2.2.2 Comment traiter ?

Les thérapeutiques destinées aux patients hémophiles ont beaucoup évolué. Depuis l'arrivée sur le marché des concentrés en facteur de coagulation hautement purifiés, l'utilisation de cryoprécipités et de plasma frais congelé (PFC) qui nécessitent de grands volumes pour pouvoir atteindre les taux de facteurs souhaités n'est plus recommandée.

Trois types de traitements sont actuellement disponibles, ou le seront dans un avenir proche ; les traitements conventionnels plasmatiques, les traitements conventionnels recombinants et, plus récemment, les facteurs à demi-vie prolongée dits « long acting » :

- les concentrés conventionnels d'origine plasmatique subissent plusieurs étapes de purification et d'inactivation virale par différents procédés (cryoprécipitation, chromatographie, ultrafiltration, nanofiltration, solvant-détergent) (Tableaux 2 et 3).

- les concentrés conventionnels d'origine recombinante sont obtenus par génie génétique en utilisant l'ADNc du gène des facteurs VIII ou IX (Tableaux 2 et 3).

- les « long acting » sont des concentrés d'origine recombinante à durée d'action prolongée. Certains sont déjà disponibles et d'autres devraient arriver fin 2017 – début 2018.

- **Les concentrés conventionnels**

Les FVIII et FIX recombinants (rFVIII et rFIX) sont produits à partir de cellules dérivées d'ovaires de hamster chinois (CHO), de cellules rénales de hamster nouveau-né (BHK) ou de cellules embryonnaires rénales humaines (HEK).

Les principaux concentrés en facteurs anti-hémophiliques disponibles en France ainsi que leurs caractéristiques sont listées dans le tableau 2 pour les concentrés de FVIII et le tableau 3 pour les concentrés de FIX.

Tableau 2 : Concentrés conventionnels de FVIII d'origine recombinante ou plasmatique commercialisés en France (39,40).

Dénomination	Laboratoire fabricant/distributeur	Substance active	Origine recombinante France ou plasmatique (P)	Caractéristiques
ADVATE®	BAXTER/BAXALTA	Octocog alfa	R	FVIII recombinant entier Protéine de 2332 aa, poids moléculaire 280 kDa Produit sur cellules d'ovaire d'hamster chinois (CHO)
AFSTYLA®	CSL BEHRING	Lonoctocog alfa	R	FVIII recombinant simple chaine (rVIII-SingleChain)
FACTANE®	LFB BIOMEDICAMENTS	Facteur VIII humain	P	FVIII de coagulation humain d'origine plasmatique
HELIXATE NEXGEN®	CSL BEHRING	Octocog alfa	R	FVIII recombinant entier Protéine de 2332 aa, poids moléculaire 280 kDa Produit sur cellules rénales de jeune hamster (BHK)
KOGENATE BAYER®	BAYER HEALTHCARE	Octocog alfa	R	FVIII recombinant entier Protéine de 2332 aa, poids moléculaire 280 kDa Produit sur cellules rénales de jeune hamster (BHK)
KOVALTRY®	BAYER HEALTHCARE	Octocog alfa	R	FVIII recombinant entier Protéine de 2332 aa, poids moléculaire 280 kDa Produit sur cellules rénales de hamster nouveau-né (BHK)
NOVOEIGHT®	NOVO NORDISK	Turoctocog alfa	R	FVIII recombinant avec un domaine B tronqué Protéine de 1445 aa, poids moléculaire 166 kDa Produit sur cellules d'ovaire d'hamster chinois (CHO)
NUWIQ®	OCTAPHARMA	Simoctocog alfa	R	FVIII recombinant à domaine B tronqué Protéine de 1440 aa Produit sur cellules rénales embryonnaires humaines (HEK) 293 F
OCTANATE®	OCTAPHARMA	Facteur VIII humain	P	FVIII de coagulation humain d'origine plasmatique
REFACTO AF®	PFIZER	Moroctocog alfa	R	FVIII recombinant avec un domaine B tronqué Protéine de 1438 aa Produit sur cellules d'ovaire d'hamster chinois (CHO)

La demi-vie du FVIII recombinant ou plasmatique est de 8 à 14 heures (41) et son taux plasmatique augmente de 2 UI/dl lorsqu'on administre par voie intraveineuse une unité par kilogramme chez un sujet sans inhibiteur. Sa clairance dépend de la concentration plasmatique en facteur Willebrand car celui-ci va le protéger de la dégradation. L'élimination moyenne chez un sujet avec un taux en facteur Willebrand normal est de 3 ml/h/kg (42). L'activité des concentrés de FVIII (UI) est titrée par dosage chromogénique selon la Pharmacopée européenne.

Tableau 3 : Concentrés conventionnels de FIX d'origine recombinante ou plasmatique commercialisés en France (39,40).

Dénomination	Laboratoire fabricant/distributeur	Substance active	Origine recombinante France ou plasmatique (P)	Caractéristiques
BENEFIX®	PFIZER	Nonacog alfa	R	FIX recombinant formé d'une simple chaîne glycoprotéique, 415 aa, poids 55 kDa Produit sur cellules d'ovaire d'hamster chinois (CHO)
BETAFACT®	LFB BIOMEDICAMENTS	Facteur IX humain	P	FIX de coagulation humain d'origine plasmatique
MONONINE®	CSL BEHRING	Facteur IX humain	P	FIX de coagulation humain d'origine plasmatique
OCTAFIX®	OCTAPHARMA	Facteur IX humain	P	FIX de coagulation humain d'origine plasmatique
RIXUBIS®	BAXTER/BAXALTA	Nonacog gamma	R	FIX recombinant à chaîne glycoprotéique unique, 415 aa, poids 68 kDa Produit sur cellules d'ovaire d'hamster chinois (CHO)

Pour le FIX recombinant, la demi-vie est en moyenne de 18 à 24 heures (43) et de 15 à 33 heures pour le FIX d'origine plasmatique. Lorsqu'on administre par voie intraveineuse une unité par kilogramme chez un sujet sans inhibiteur, le taux plasmatique en FIX augmente de 1 UI/dl s'il s'agit de concentrés dérivés de plasma alors qu'il n'augmentera que de 0,8 UI/dl chez l'adulte et de 0,7 UI/dl chez l'enfant pour les produits recombinants (42). L'activité des concentrés de FIX (UI) est, contrairement au FVIII, titrée par méthode chronométrique par la Pharmacopée européenne selon un réactif APTT défini par le fournisseur.

- **Les nouvelles molécules de FVIII et FIX à demi-vie prolongée ou « long acting »**

Depuis de nombreuses années l'industrie pharmaceutique a concentré ses recherches dans le développement des nouvelles molécules de FVIII et FIX à demi-vie prolongée. Certaines de ces molécules sont soit disponibles soit en cours d'évaluation. L'amélioration de la demi-vie est significative pour le FIX par rapport au FIX natif alors qu'elle reste plus modeste pour le FVIII probablement car la clairance du FVIII dépend de celle du facteur Willebrand qui n'est, quant à elle, pas impactée. Une demi-vie prolongée permettrait des injections plus espacées lors d'une prophylaxie ou une meilleure protection anti hémorragique en gardant des intervalles d'injections similaires. En effet, la répétition d'injections douloureuses, deux à trois fois par semaine pour l'hémophile A sévère, impacte sa qualité de vie et favorise le risque d'inobservance d'autant plus qu'elles doivent être débutées dès le plus jeune âge (44). Dans ce contexte, les concentrés à demi-vie prolongée, que nous appellerons « long acting » par la suite, apparaissent comme une alternative très prometteuse puisque le temps passé avec un taux en facteur supérieur à 1% est de 4,9 jours à 6,5 jours pour le FVIII (demi-vie multipliée par 1,4 à 1,6) et jusqu'à 22 jours pour le FIX (demi-vie jusqu'à 5,8 fois plus longue). Cliniquement cela permettrait de réaliser une injection tous les 3 à 5 jours chez les hémophiles A (45,46) et une injection toutes les une à deux semaines chez les hémophiles B (47,48). Les résultats des essais cliniques de ces nouveaux concentrés « long acting » sont positifs quant à leur efficacité et leur sécurité chez les patients et aucun cas d'inhibiteur n'a été rapporté à ce jour (49). Les laboratoires de biologie médicale doivent donc s'organiser afin d'être en mesure d'en assurer le dosage biologique pour le suivi de leurs patients.

Deux méthodes sont utilisées pour allonger la demi-vie des facteurs anti-hémophiliques recombinants en les modifiant par génie génétique (50).

- **La pégylation :**

Cette technique, développée il y a déjà 30 ans, est utilisée pour plusieurs traitements comme l'anti-TNFα dans la polyarthrite rhumatoïde ou l'interféron α-2a pégylé pour les patients atteints d'hépatite B ou C chronique (51). Le principe consiste à attacher une ou plusieurs chaînes d'un polymère hydrophile, dans ce cas il s'agit de polyéthylène glycol (PEG) au FVIII ou au FIX afin d'en augmenter le poids et la taille sans modifier leurs

caractéristiques fonctionnelles. Cette molécule de PEG consiste en une chaîne répétitive d'une même sous-unité représentée ci-après.

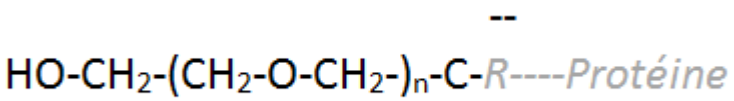


Figure 3 : Structure des molécules de polyéthylène glycol, d'après Ivens et *al.* (51).

En jouant sur le nombre de répétition « n » de l'unité CH_2-O-CH_2 on pourra obtenir différentes tailles et poids de la molécule. La demi-vie va être allongée par diminution de la filtration glomérulaire de la molécule du fait de son poids augmenté ainsi qu'au niveau des récepteurs LRP hépatiques (LDL receptor-related protein) qui ne vont pas reconnaître le FVIII pégylé. La dégradation du produit va ainsi être diminuée lui permettant de rester plus longtemps dans la circulation sanguine. L'élimination de la molécule PEG sera d'autant moins rapide que sa taille sera grande.

Ce procédé a été utilisé pour mettre en forme les facteurs suivants :

- pégylation aléatoire : c'est le cas pour l'Adynovate® (BAX 855). Il s'agit d'une molécule d'Advate® à laquelle deux molécules de PEG ont été attachées via une liaison covalente au niveau d'une cystéine libre (52).

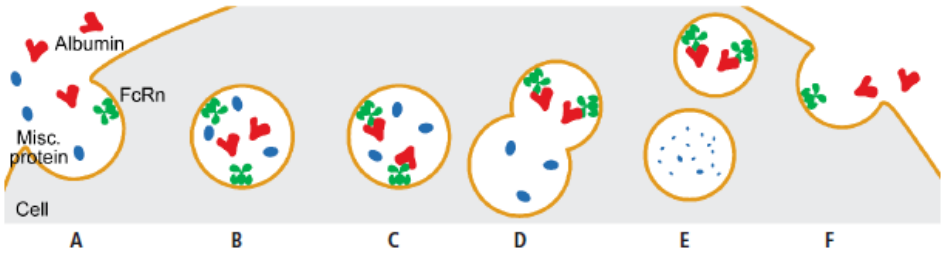
- pégylation sur site spécifique : elle est réalisée grâce à l'introduction d'une mutation faux-sens à la surface du facteur. Le but est d'y incorporer des résidus cystéine, site de conjugaison de la molécule PEG. C'est le cas pour BAY 94-9027 (Bayer). Pour le N8-GP (Novo Nordisk), il s'agit d'une glycopégylation au niveau d'un O-glycane du domaine B tronqué. Pour le N9-GP (Novo Nordisk) la molécule PEG cible un N-glycane au niveau du peptide d'activation.

- **Les protéines de fusion**

- la fusion à l'albumine :

L'albumine a une demi-vie relativement longue de l'ordre de trois semaines. Le principe repose sur le récepteur Fc néonatal (FcRn) largement exprimé par le placenta,

l'hépatocyte et les cellules endothéliales. Ce récepteur va interagir avec la protéine de fusion. Les cellules exprimant le FcRn vont pinocyter l'albumine lui permettant par cette interaction d'échapper à la dégradation lysosomale. Des vésicules golgiennes vont venir fusionner avec ces cellules permettant l'acidification du milieu nécessaire au FcRn pour lier l'albumine. L'albumine et tout ce qui lui est attaché vont être captés par le récepteur Fc néonatal pour être recyclés et ainsi rester plus longtemps dans la circulation sanguine (53). Par ce procédé, l'albumine va être extraite de la voie catabolique dans laquelle elle était engagée et être recyclée dans la circulation (Figure 4). Ce mécanisme est utilisé pour allonger la durée d'action de l'Idelvion®, rIX-FP (rIX-*fusion protein*) développé par CSL Behring.



A-B : L'albumine et diverses protéines sont internalisées dans la cellule par endocytose.
C : Le FcRn lie l'albumine lorsque le pH devient acide.
D-E : Seules les molécules liées au RcFn sont recyclées et relâchées hors de la cellule. Les protéines non liées au RcFn sont dégradées dans le lysosome.
F : L'exposition à un pH physiologique permet la libération de l'albumine dans la circulation.

Figure 4 : Recyclage de l'albumine grâce au récepteur Fc néonatal, Metzner et *al.* (54).

- la fusion au fragment Fc de l'IgG :

Les IgG ont une demi-vie de 21 jours. Exactement comme le principe de la fusion à l'albumine décrit ci-dessus, le fragment Fc interagit avec le récepteur Fc néonatal (FcRn). Cette liaison lui permet d'être internalisé (ainsi que les molécules qui lui sont attachées) et d'échapper à la dégradation lysosomale en étant recyclé dans la circulation sanguine. Le facteur de coagulation est donc fusionné avec le domaine constant des IgG, le fragment Fc. Ce procédé est utilisé pour le rFVIII-Fc (Elocta®) (55) et le rFIX-Fc (Alprolix®) développés par Sobi.

La figure 5 ci-dessous représente les différents procédés de biotechnologie mis en œuvre pour allonger la demi-vie des nouveaux concentrés anti-hémophiliques décrits.

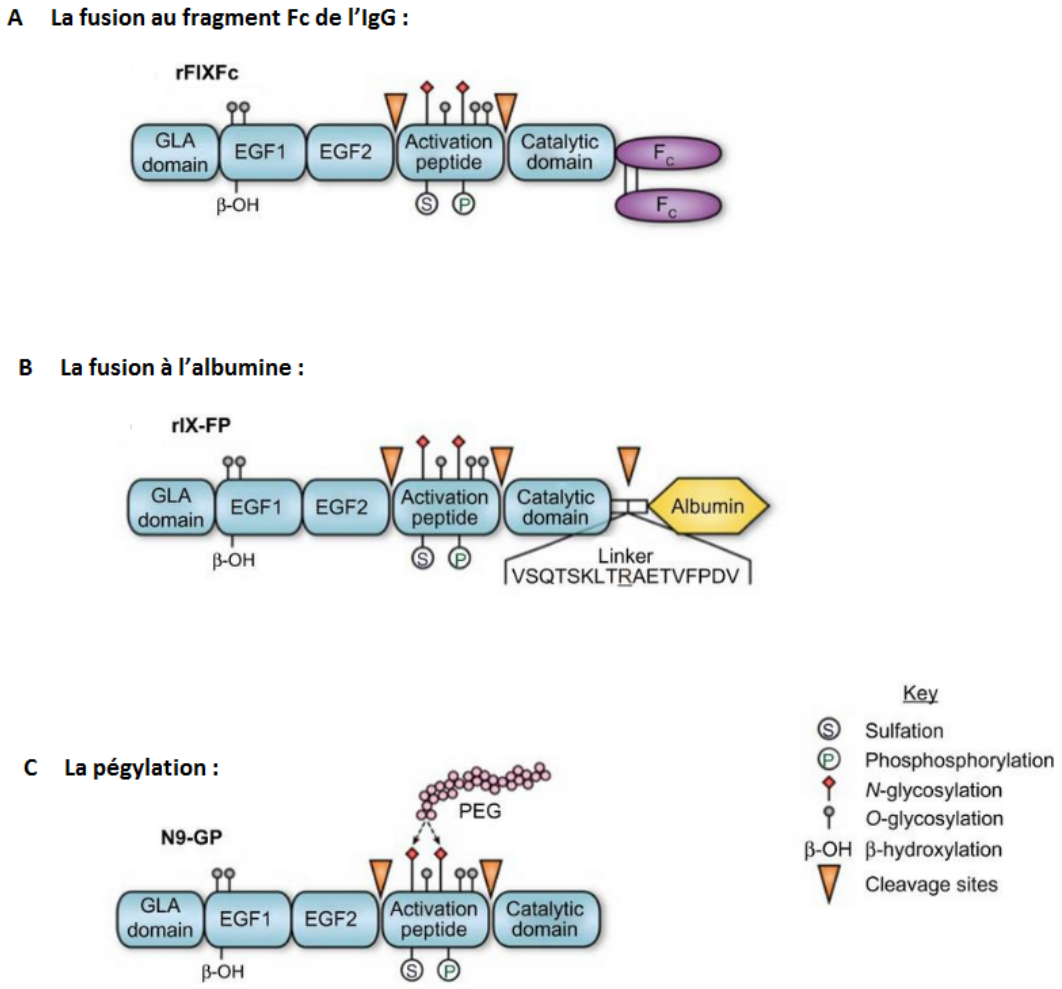


Figure 5 : Procédés allongeant la durée de vie du FIX, d'après Nazeef et *al.* (56).

Ces nouveaux produits ainsi que leurs caractéristiques sont résumées dans les tableaux 4 pour le FVIII et 5 pour le FIX (50). Seul le traitement Elocta® (Sobi) est commercialisé en France à l'heure actuelle. Les autres le seront très prochainement.

Tableau 4 : Les rFVIII « long acting », d'après (50,57,58).

Dénomination	Laboratoire / Fabricant	Substance active	Lignée cellulaire	Caractéristiques	Demi-vie (heures)	Facteur d'allongement de la demi-vie	Estimation in vivo du temps passé >1% après injection 50UI/kg
ADYNOVATE® (BAX855)	BAXALTA	Rurioctocog alfa	CHO	FVIII recombinant entier, pégylé (rFVIII pégylé). Deux molécules PEG qui se lient sur une cystéine libre (pégylation aléatoire), 20 kDa.	14,3	1,5 fois	ND
BAY94-9027	BAYER	Damoctacog alfa pegol	BHK	FVIII recombinant pégylé à domaine B tronqué (rFVIII pégylé). Une seule molécule PEG de 60 kDa reliée à un acide aminé (cystéine) sur le rFVIII (pégylation sur site spécifique).	19	1,4 fois	ND
ELOCTA®	SOBI	Efmoroctocog alfa	HEK	FVIII recombinant délété du domaine B et fusionné au fragment Fc de l'immunoglobuline G1 humaine (IgG1) monomérique (rFVIII-Fc). Premier FVIII recombinant à demi-vie prolongée disponible en France.	19	1,6 fois	4,9 jours
N8-GP	NOVO NORDISK	Turoctocog alfa pegol	CHO	FVIII recombinant, pégylé, à domaine B tronqué (21 aa) (rFVIII pégylé). La molécule PEG de 40 kDa cible un O-glycane dans le domaine B tronqué (glycopégylation)	19	1,6 fois	6,5 jours

ND, non disponible.

Tableau 5 : Les rFIX « long acting », d'après (50,57).

Dénomination	Laboratoire / Fabricant	Substance active	Lignée cellulaire	Caractéristiques	Demi-vie (heures)	Facteur d'allongement de la demi-vie	Estimation in vivo du temps passé >1% après injection 50UI/kg
ALPROLIX®	SOBI	Eftrenonacog alfa	HEK	FIX recombinant fusionné au fragment Fc d'une immunoglobuline humaine IgG1 (rFIX-Fc)	57-83	3 fois	10,1 jours
IDELVION®	CSL BEHRING	Albutrepenonacog alfa	CHO	FIX recombinant fusionné à de l'albumine (rIX-FP) (*fusion protein*)	89-96	>5 fois	2-3 semaines
N9-GP	NOVO NORDISK	Nonacog beta pegol	CHO	FIX recombinant, pégylé (rFIX pégylé). La molécule PEG de 40 kDa, cible un N-glycane avec peptide d'activation du FIX (glycopégylation sur site spécifique)	96-110	>5 fois	22 jours

2.3 Les pratiques biologiques pour les dosages de FVIII et FIX

2.3.1 Pourquoi doser le FVIII ou le FIX ?

Les indications sont multiples.

Du côté du patient, le dosage des facteurs VIII ou IX intervient pour assurer le diagnostic d'hémophilie et en déterminer le degré de sévérité. Il intervient également pour doser le taux de facteur après injection afin de vérifier que le pic de concentration est atteint, d'assurer un taux hémostatique lors d'une chirurgie ou lors de la prise en charge d'un accident hémorragique ou encore pour déterminer les taux résiduels lors d'une prophylaxie.

Du côté de l'industrie pharmaceutique, les facteurs VIII et IX sont dosés pour titrer les concentrés thérapeutiques selon les directives des organismes réglementaires. La Pharmacopée européenne et l'ISTH privilégient la méthode chromogénique (CSA) pour le titrage des concentrés en FVIII pour s'affranchir de la variabilité des résultats selon le réactif APTT utilisé avec la méthode chronométrique (OSA) (59). En revanche, pour le FIX, la méthode OSA est utilisée pour titrer les concentrés, avec en conséquence des discordances possibles selon le réactif APTT utilisé pour le titrage et celui utilisé ensuite pour le dosage. En effet, le réactif APTT Pathromtin® SL (Siemens) est utilisé pour titrer l'Idelvion® (CSL Behring) (60), le réactif Actin® (Siemens) pour titrer l'Alprolix® (Sobi) et le réactif Synthafax® (Werfen) pour titrer le N9-GP (Novo Nordisk).

2.3.2 Comment doser les facteurs VIII et IX ?

- **Le prélèvement**

Certaines conditions sont indispensables pour un dosage interprétable. Le biologiste est responsable du respect des paramètres pré-analytiques. Un bon prélèvement en hémostase doit être effectué sur un tube citraté (0,109M), transporté à température ambiante (entre 15 et 25°C) et analysé dans un délai de quatre heures. La centrifugation est réalisée à température ambiante entre 2000g et 2500g. A l'issue d'une double centrifugation le plasma peut être

congelé quinze jours à -20°C ou 18 mois à -80°C. La décongélation doit être rapide dans un bain-marie à 37°C.

- **La méthodologie**

Il existe deux grands types de méthodes pour doser l'activité fonctionnelle du FVIII ou du FIX : une méthode chronométrique dite « one stage assay » (OSA) fondée sur la mesure d'un temps de coagulation et une méthode chromogénique appelée « chromogenic substrat assay » (CSA).

- **Méthode chronométrique (OSA)**

Cette technique, développée dans les années 1950 est la plus répandue. Elle est basée sur le TCA et elle est parfois aussi appelée méthode coagulante par certains auteurs. Cette méthode simple est la plus fréquemment utilisée par les laboratoires en France. Son principe est basé sur la correction d'un plasma déficient en facteur VIII ou IX par le plasma du patient à tester. La correction de l'allongement du TCA est ainsi proportionnelle au facteur d'intérêt qui est apporté uniquement par le plasma du patient. Le résultat est exprimé en pourcentage à partir d'une droite d'étalonnage obtenue lors de l'étape de calibration grâce aux dilutions successives d'un plasma standard dont la concentration en facteur est connue et servant de calibrateur.

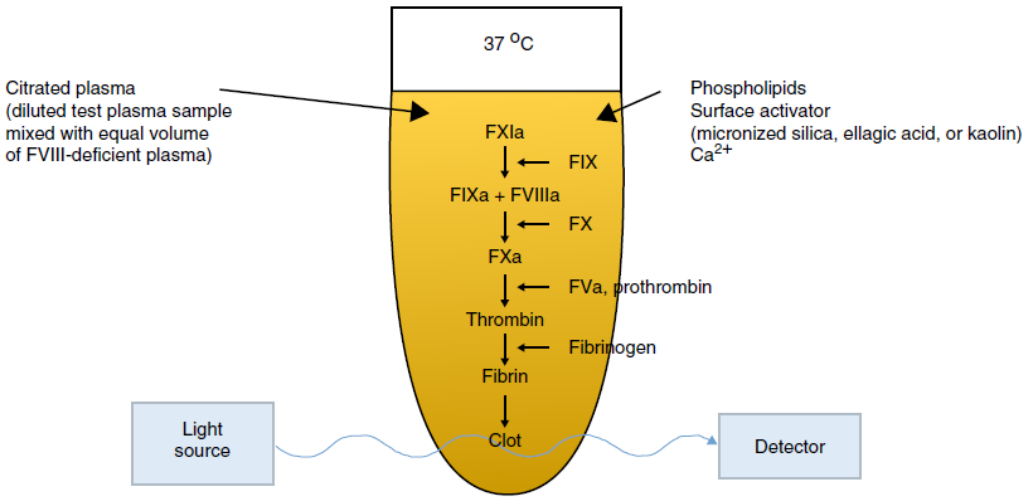


Figure 6 : Principe de la méthode OSA (exemple pour le dosage du FVIII), d'après Peyvandi et *al.* (61).

Il existe une grande variété de réactifs et d'automates disponibles pour réaliser le dosage des facteurs selon la méthode OSA ce qui peut influencer de manière significative les résultats obtenus. A ce jour Kitchen *et al.* dénombre plus d'une vingtaine de réactifs APTT (Tableau 6). Les sources de variabilité liées à cette technique sont : l'activateur de la phase contact de type particulaire ou soluble (kaolin, silice micronisée ou colloïdale, acide ellagique), la concentration et la nature en phospholipides (synthétique, animale ou végétale), le diluent pour les échantillons (tampon ou plasma d'hémophile sévère) et le déficient (selon son origine plasmatique ou lyophilisée et le fait qu'il contienne ou non du facteur Willebrand). Le choix des réactifs est donc primordial. Le plasma déficient, le plus souvent immunodéplété par des anticorps monoclonaux ou polyclonaux, doit être dépourvu du facteur à doser (FVIII ou FIX strictement inférieur à 1%) mais contenir l'ensemble des autres facteurs en excès. Le taux en facteur Willebrand contenu dans le plasma déficient en FVIII n'est également pas anodin car s'il est en quantité insuffisante cela va affecter les résultats obtenus (Barrowcliffe publié en 1993). Pour le TCA, la variabilité de phospholipides commercialisés ne facilite pas la tâche du biologiste quant au choix du réactif qu'il va utiliser. D'autant plus que peu d'études comparatives sont disponibles et que des discordances ont déjà été rapportées. La discordance est définie par certains auteurs comme une différence de taux supérieure ou inférieure à 30% par rapport à la valeur attendue (62) alors que d'autres retiennent un ratio OSA/CSA inférieur à 0,6 – 0,7 (Haemophilia 2009) ou supérieur à 1,5 (Haemophilia 2008) (63).

Tableau 6 : Diversité des réactifs APTT pour la méthode OSA, d'après Kitchen et *al*. (64).

Manufacturer	aPTT reagent	Activator	Phospholipid source
Siemens/Dade Behring[*]	Actin® FS	Ellagic acid	Soy bean
	Pathromtin® SL	Silicon dioxide	Vegetable
	Actin®	Ellagic acid	Rabbit brain
	Actin® FSL	Ellagic acid	Soy and rabbit
Diagnostica Stago[†]	STA®-C.K. Prest®	Kaolin	Rabbit brain
	STA®-aPTT Kaolin	Kaolin	Rabbit brain
	STA®-PTT Automate	Silica	Rabbit brain
	STA®-CephaScreen®	Polyphenol	Rabbit brain
IL Instrumentation Laboratory[‡]	SynthASil	Colloidal silica	Synthetic
	aPTT-SP	Silica	Synthetic
	SynthAFax	Ellagic acid	Synthetic
T-Coag/Trinity Biotech/Biomerieux[§]	TriniCLOT™ aPTT HS	Micronized silica	Porcine and chicken
	TriniCLOT™ aPTT S	Micronized silica	Porcine and chicken
	Platelin® LS	Micronized silica	Animal tissue extract
	TriniCLOT™ automated aPTT	Micronized silica	Rabbit brain
	Platelin® L	Micronized silica	Porcine and chicken
	AMAX Alexin	Ellagic acid	Rabbit brain
Other manufacturers	Grifols[¶] DG-aPTT		
	Randox[‖] aPTT	Ellagic acid	Rabbit brain
	Bio/Data[**] UPTT™ Reagent	Unsp.	Unsp.
	Aniara HYPHEN BioMed[††]	Unsp.	Unsp.
	CEPHEN	Unsp.	Unsp.
	Biopool[§] aPTT-EA	Unsp.	Unsp.
	Sysmex[‡‡] Thrombocheck aPTT-SLA	Unsp.	Unsp.
Diagen[§§]	KPS 50% glyoxaline	Kaolin	Animal brain extract
	B&A (Bell & Alton)	Kaolin	Animal brain extract
	KPS	Kaolin	Animal brain extract
Helena Biosciences[¶¶]	aPTT Si-L+	Silica	Unsp.
	aPTT-SA	Ellagic acid	Rabbit brain
	aPTT-ES	Ellagic acid	Rabbit brain
	aPTT Si-L–	Silica	Unsp.

aPTT, activated partial thromboplastin time;
Unsp., unspecified.
[‖]Randox Laboratories Limited, Crumlin, UK.
[*]Siemens Healthcare, Erlangen, Germany.
[**]Bio/Data Corporation, Horsham, PA, USA.
[†]Diagnostica Stago, Asnieres sur Seine, France.
[††]Aniara, West Chester, OH, USA.
[‡]IL Instrumentation Laboratory, Bedford, MA, USA.
[‡‡]Sysmex Corporation, Kobe, Japan.
[§]Stago Group, Asnieres sur Seine, France.
[§§]Diagnostic Reagents Ltd., Thame, UK.
[¶]Grifols International, S.A., Barcelona, Spain.
[¶¶]Helena Biosciences Europe, Gateshead, UK.

- **Méthode chromogénique (CSA)**

Il s'agit d'une méthode en deux temps qui nécessite une première étape de génération de Fxa à partir de FIXa et de FX humains qui sera proportionnelle au taux de FVIII ou de FIX contenu dans l'échantillon à doser.

Pour le dosage du FVIII, la méthode est représentée de manière simplifiée par la figure 7. La thrombine (FIIa) va activer le FVIII en FVIIIa qui va à son tour activer le FX présent en excès en Fxa en présence de FIXa lui aussi en excès, de phospholipides et de calcium. Le FVIII à doser est donc bien le facteur limitant dont dépendra la génération de Fxa.

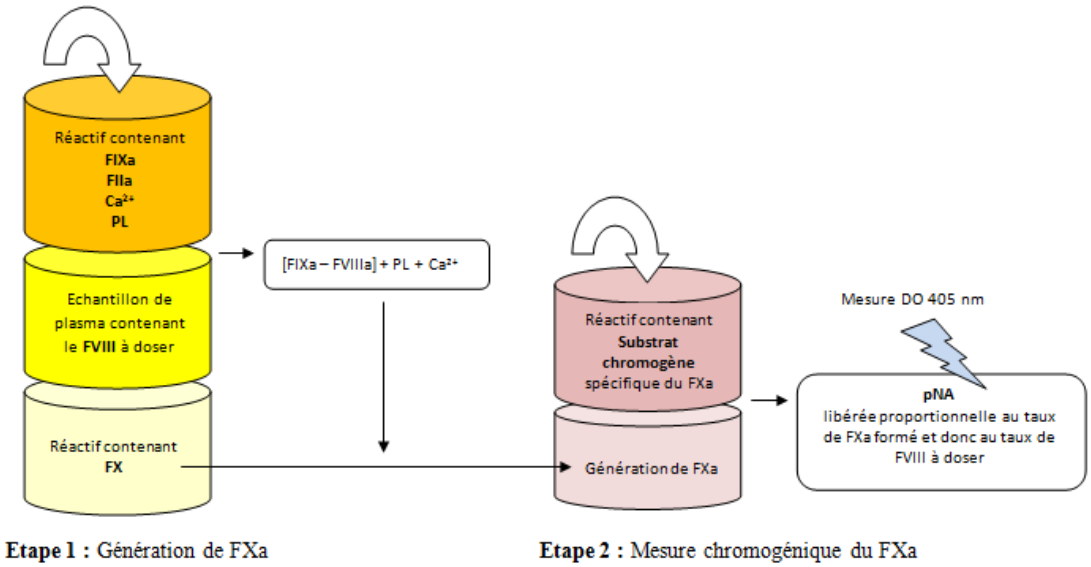


Figure 7 : Principe de la méthode CSA pour le dosage du FVIII.

Pour le dosage du FIX (Figure 8), le facteur XIa humain va activer le FIX en FIXa. Ce FIXa va à son tour activer le FX en Fxa en présence de FVIII, de phospholipides et de calcium. Le FVIII et le FV sont activés par la thrombine générée pendant l'incubation.

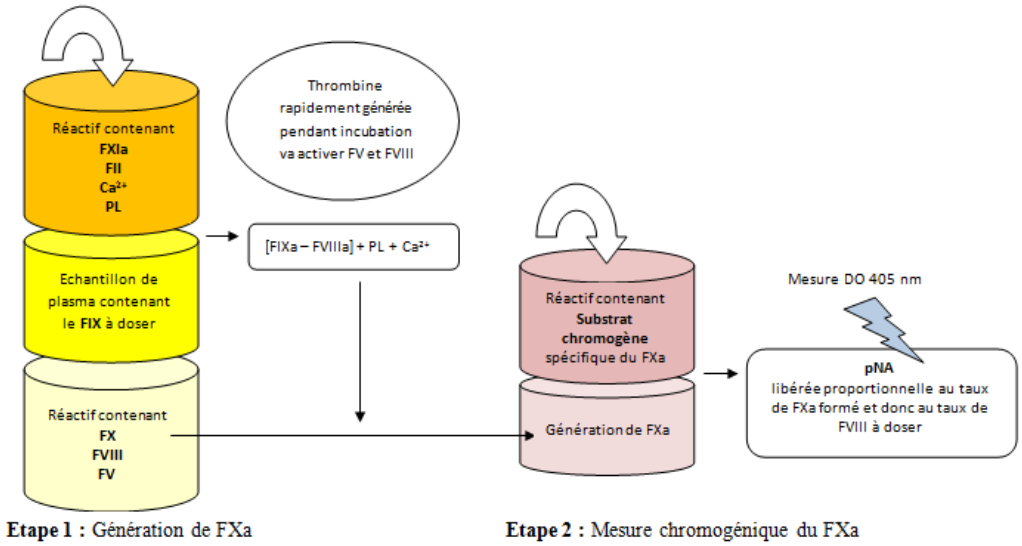


Figure 8 : Principe de la méthode CSA pour le dosage du FIX.

Qu'il s'agisse du FVIII ou du FIX, le principe de la méthode consiste à doser le Fxa formé au cours de cette première étape. Pour cela, le Fxa va hydrolyser un substrat chromogène qui lui est spécifique (le Sxa-11 par exemple) pour aboutir à la libération de paranitroaniline (pNA) (longueur d'onde d'absorbance 405 nm) proportionnelle au taux de Fxa formé et donc à l'activité de la molécule d'intérêt, à savoir le FVIII ou le FIX contenu dans l'échantillon.

Pour le dosage par méthode CSA, trois fournisseurs commercialisent des kits pour le FVIII (Hyphen BioMed, Siemens et Instrumentation Laboratory). En revanche, pour le FIX CSA il n'y a que deux seuls fournisseurs à ce jour (Hyphen BioMed et Rossix). Les avantages de la méthode CSA par rapport à la méthode OSA sont qu'elle n'est pas influencée par le plasma déficient, le type de phospholipides utilisés ou la présence d'un éventuel anticoagulant de type lupique. Elle est également meilleure dans les valeurs basses et subit moins de variations analytiques.

2.3.3 État des lieux des pratiques de dosage

Une étude a été menée fin 2011 – début 2012 dans sept pays (Etats-Unis, France, France, France, France, France et Japon) afin de documenter les pratiques des laboratoires quant au diagnostic et au suivi des hémophiles. Les résultats (Figure 9) montrent que 90% des participants utilisent la méthode OSA pour le dosage du FVIII et 88% pour le dosage du FIX.

Il existe une grande variabilité des réactifs. Pour le FVIII on note 39 réactifs APTT différents et pour le FIX 27 réactifs APTT différents. De plus, 68% des participants réalisent le dosage du FVIII par méthode CSA et 11% pour le dosage du FIX. La chronométrie est réalisée en routine ; à l'inverse, les techniques chromogéniques sont le plus souvent réalisées en séries, non en urgence. Cette étude souligne la variabilité des activateurs utilisés par les laboratoires (silice, kaolin, acide ellagique) pour le dosage OSA alors que moins de kits sont disponibles pour la méthode CSA (64). Cette variabilité des réactifs explique en partie la discordance.

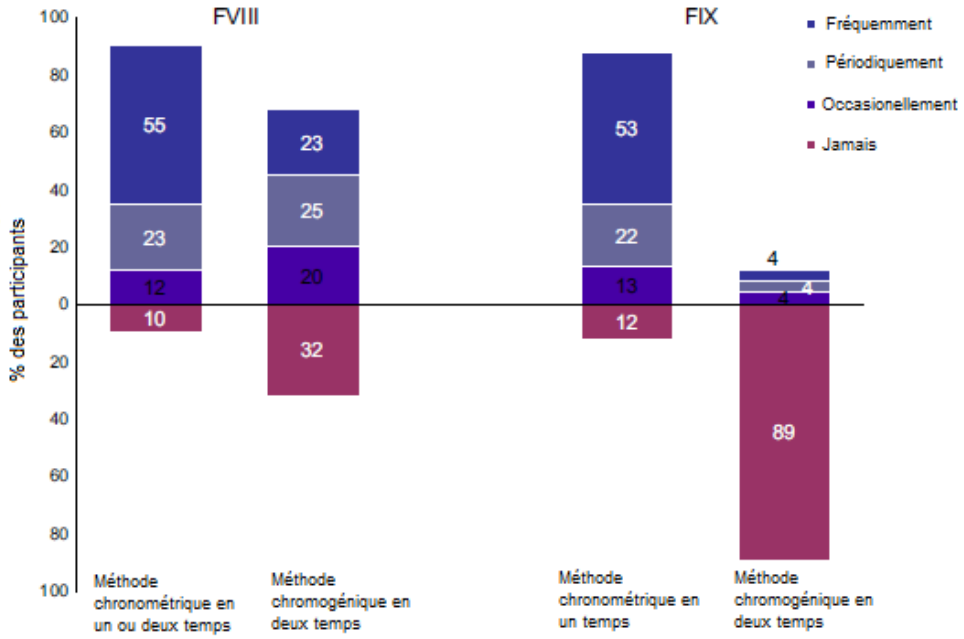


Figure 9 : Les pratiques biologiques pour le dosage des FVIII et FIX, d'après Kitchen et *al.* (64).

Concernant les pratiques en France, une enquête a été menée à ce sujet en juillet 2015 par le Club des biologistes auprès de 35 laboratoires en France travaillant en collaboration avec des Centres pour le Traitement de l'Hémophilie (CTH ou CRTH) (Figure 10).

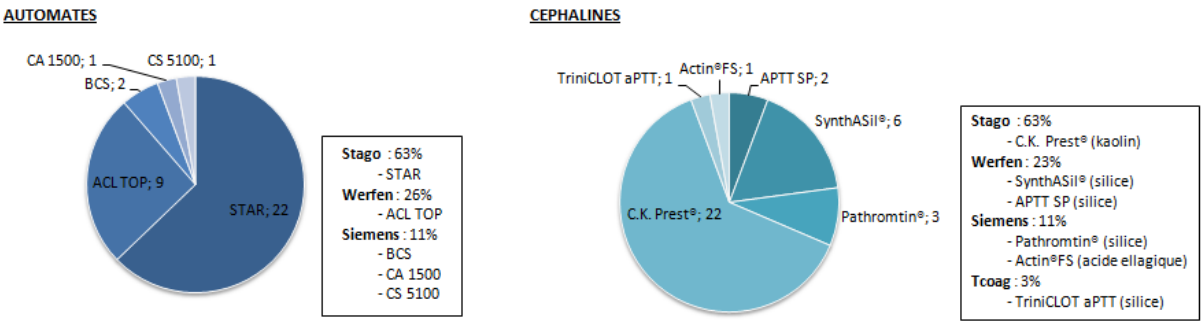


Figure 10 : Automates de coagulation et réactifs APTT utilisés en France, d'après le Club des biologistes, 2015.

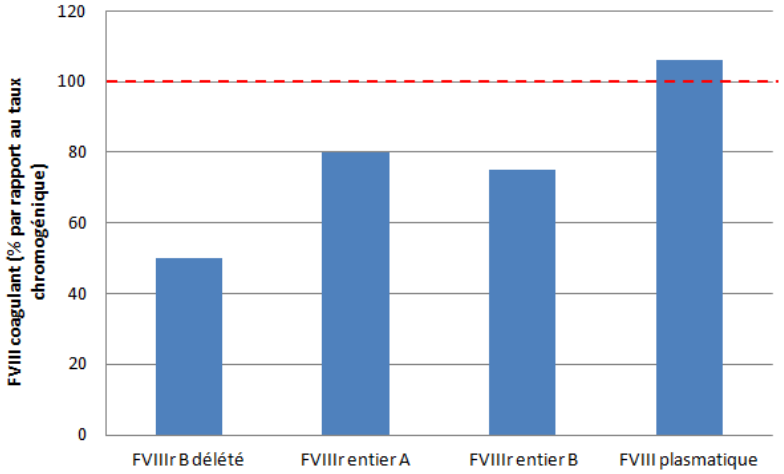
La majorité des laboratoires en France (63%) utilisent un automate STAR (Diagnostica Stago) et le CK Prest® (Diagnostica Stago) comme réactif APTT (activateur : kaolin). Une des problématiques quant à l'utilisation majoritaire du kaolin comme activateur est qu'il s'agit d'une spécificité française. Il est donc peu utilisé dans les études internationales et nous n'avons à ce jour que peu de données le concernant. La surveillance des patients hémophiles substitués se fait par méthode OSA dans la majeure partie des laboratoires ; seul un centre (le CHU de Lille) réalise le dosage CSA en première intention pour le suivi des patients hémophiles A substitués. En revanche, 66% des sondés utilisent de façon ponctuelle la technique CSA pour le dosage du FVIII. En 2015 aucun laboratoire en France ne réalisait le dosage du FIX par méthode CSA ce que confirment les résultats de l'ECAT (*External quality Control for Assays and Tests*). En effet, les résultats de l'ECAT rapportent que sur les 217 laboratoires ayant répondu au sondage numéro *2015-4*, 98% utilisent une technique OSA avec un très large choix de réactifs APTT. Seul un participant du contrôle ECAT disposait d'une méthode CSA pour doser le FIX (Rossix).

2.4 Quelle surveillance biologique pour les patients hémophiles substitués ?

2.4.1 Les concentrés conventionnels en facteurs recombinants

- **Les FVIII recombinants (rFVIII)**

Pour situer le rationnel du problème, en 1998 Mikaelsson *et al* rapportaient déjà des discordances pour le dosage du FVIII mesuré par méthodes OSA et CSA. Les taux obtenus avec la méthode chronométrique (OSA) étaient de 20% à 50% plus bas qu'avec la méthode chromogénique (CSA) avec les produis recombinants et plus particulièrement le FVIII recombinant B délété (65). En revanche aucune différence n'était retrouvée entre les deux méthodes de dosage avec les concentrés d'origine plasmatique (Figure 11). Une explication à cette différence pourrait être la composition et la concentration en phospholipides du réactif utilisé pour le TCA dans la méthode OSA car il existe une sensibilité accrue du dosage du rFVIII B délété aux phospholipides présents dans les réactifs APTT du commerce. Cette influence de la composition et de la concentration en phospholipides a bien été démontrée par Mikaelsson puisque lorsqu'il dilue les phospholipides ou lorsqu'il travaille avec des concentrations en phospholipides dites physiologiques c'est-à-dire avec des concentrations en phosphatidylserine inférieures à 10% (faible ratio phosphatidylserine/phosphatidylcholine), les discordances OSA/CSA se gomment. Les phospholipides dans le réactif apparaitraient comme un déterminant de la variabilité du test mais probablement pas le seul.



Moyenne du taux de FVIII obtenu par méthode OSA (à partir de 12 réactifs APTT différents) en pourcentage de l'activité obtenue par méthode CSA.

Figure 11 : Comparaison FVIII OSA versus FVIII CSA de concentrés en FVIII conventionnels, d'après Mikaelsson et *al.* (65).

Deux solutions ont été apportées par le fabricant à cette discordance pour doser le FVIII chez les patients substitués par ReFacto AF® (66,67) :

- soit calibrer avec un standard spécifique, le standard ReFacto RLS-AF (ReFacto Laboratory Standard®) pour la méthode OSA dans le but de minimiser les écarts OSA/CSA

- soit doser le FVIII par la méthode CSA qui est la méthode de référence.

Bien que ces différences apparaissent plus prononcées pour le ReFacto® AF, elles existent probablement aussi pour les autres FVIII recombinants avec des discordances allant de 9% pour l'Advate et Factane à 18% pour le Kogenate et Helixate (68). Ces discordances restent négligeables et sans incidence clinique.

- **Les FIX recombinants (rFIX)**

Les concentrés en facteurs IX recombinants n'échappent pas à cette problématique d'autant plus qu'ils sont titrés par méthode OSA avec un réactif APTT bien spécifique choisi par le fabricant. Bien que moins de données soient disponibles à ce sujet, des discordances avaient déjà été rapportées par Kitchen (69) et Sommer (70). Ces différences étaient gommées par l'utilisation d'un standard spécifique pour la calibration (71) et n'étaient pas pertinentes pour la clinique.

2.4.2 Qu'en est-il avec les nouvelles molécules « long acting » ?

- **Les rFVIII « long acting »**

Cette problématique de dosage, déjà connue avec les traitements conventionnels, se pose d'autant plus pour les « long acting » car des variations importantes des taux de FVIII ou FIX ont été constatées selon le réactif APTT utilisé (Tableau 7).

Tableau 7 : Méthode CSA versus méthode OSA pour le dosage du FVIII avec les « long acting », d'après Peyvandi et *al*. (61).

Produit	Produit comparé	Type d'étude	Réactifs APTT utilisés	Résultat
rFVIII-Fc (Elocta®)	Advate®	Comparaison d'échantillons surchargés	Plusieurs activateurs (acide ellagique, silice, kaolin et polyphénol)	- Pas de discordance
rFVIII pegylé (N8-GP)	Advate® Haemate® NovoEight®	Comparaison d'échantillons surchargés	Plusieurs activateurs (acide ellagique et silice)	- Sous-estimation avec la silice (interaction silice-PEG) - Pas de discordance avec CSA - Standard N8-GP permet dosage OSA avec tous les réactifs
rFVIII pégylé (BAY94-9027)	Standard (WHO-8)	Comparaison d'échantillons surchargés	Plusieurs activateurs : - Acide ellagique (SynthAFax®, Dade Actin®) - Polyphénol (Cephascreen®) - Silice (APTT-SP, STA PTT 5)	- Sous-estimation avec la silice (par défaut d'activation du FXII à la surface de la silice)
BAX 855 (Adynovate®)	Aucun	Comparaison d'échantillons surchargés	Plusieurs activateurs (acide ellagique, silice, kaolin)	- Surestimation des concentrations (OSA et CSA) attendues avec le standard local, gommée avec l'utilisation d'un standard spécifique
	Advate	Comparaison d'échantillons surchargés	Plusieurs activateurs (acide ellagique, silice, kaolin, polyphénol)	- Pas de discordances

○ **rFVIII-Fc (Elocta®) :** une étude multicentrique menée dans 30 laboratoires dosant des échantillons surchargés en Elocta® et en Advate® à trois concentrations différentes montre qu'il n'y a pas d'impact significatif selon le choix du réactif APTT pour le dosage OSA et que

les patients substitués par rFVIII-Fc peuvent être suivis aussi bien par méthode OSA ou CSA (72).

○ **rFVIII pégylé (N8-GP) :** une étude monocentrique menée par Pickering et *al*. (73) avec le Novoeight® comme comparateur montre que le dosage du FVIII CSA n'est pas affecté par la pégylation quel que soit le kit chromogénique utilisé (6 kits chromogéniques testés). En revanche, une étude menée dans deux centres (France et Suède) sur des échantillons surchargés *in vitro* montre que le dosage par méthode OSA varie en fonction du réactif APTT utilisé. Dans cette étude il est clairement montré que le réactif APTT utilisant la silice sous-estime de manière significative les résultats de 30% à 50% (74). Une interaction entre le PEG et la silice serait à l'origine de cette sous-estimation. L'utilisation d'un standard N8-GP permet de gommer cette discordance. En revanche, les dosages réalisés avec l'acide ellagique comme activateur sont corrects. En conclusion de cette étude les auteurs recommandent de ne pas utiliser de silice pour le dosage du N8-GP par méthode OSA ou bien de réaliser le dosage avec un standard spécifique. La méthode CSA est à privilégier.

○ **rFVIII pégylé (BAY94-9027) :** les auteurs de cette étude multicentrique avec pour comparateur le standard international (WHO-8) concluent que les réactifs à base d'acide ellagique (SynthAFax, Dade Actin) sont à privilégier pour le suivi des patients substitués par BAY94-9027. Certains réactifs à base de silice (APTT-SP, STA PTT 5) sous-estiment les taux en facteur VIII et sont à éviter (probable interférence *in vitro* du groupement PEG de 60 kDa avec la surface d'activation produite par la silice). La méthode CSA peut être utilisée (75).

○ **BAX 855 (Adynovate®) :** deux études s'opposent : une étude menée dans 8 laboratoires suisses (76) a testé des échantillons surchargés *in vitro* à cinq concentrations différentes selon les méthodes OSA et CSA, successivement avec un standard local puis avec un standard spécifique. Les résultats montraient une surestimation des concentrations cibles attendues à la fois avec la méthode OSA (activateurs utilisés : silice, kaolin et acide ellagique) et CSA lorsque le standard local était utilisé. L'utilisation d'un standard spécifique permettait une meilleure précision du taux de FVIII chez les patients substitués par BAX 855, notamment avec la méthode CSA. A l'inverse, une étude multicentrique internationale publiée par Turecek et *al*. (77) utilisant l'Advate® comme comparateur ne retrouvait pas les mêmes résultats. Des échantillons surchargés *in vitro* à trois concentrations différentes ont été dosés

par méthodes OSA avec plusieurs réactifs APTT et par méthode CSA. Les auteurs validaient l'utilisation aussi bien de la méthode OSA que de la méthode CSA.

- **Les rFIX « long acting »**

Différentes études ont déjà été menées :

○ **rFIX pégylé (N9-GP) :** une étude réalisée dans deux centres a testé des plasmas d'hémophiles B surchargés *in vitro* par méthode OSA (huit réactifs APTT) et par méthode CSA (deux kits Rossix et Biophen). Les comparateurs étaient les traitements recombinant Benefix® et plasmatique Mononine®. En conclusion, les résultats (Figure 12) de l'étude (78) montraient :

- une surestimation avec certains réactifs APTT ayant pour activateur la silice (surestimation de plus de 300% avec l'APTT SP et de plus de 500% avec le Pathromtin® SL).

- une sous-estimation de 28% à 69% avec les réactifs SynthASil® (activateur silice) et Actin® FS (activateur acide ellagique).

- une bonne précision avec le SynthAFax et avec la méthode chromogénique aussi bien avec le kit Hyphen ou Rossix.

Ces résultats retrouvés sur des échantillons surchargés *in vitro* ont été confirmés *in vivo* sur des plasmas de patients substitués (79).

Une étude publiée par Rosen et *al*. (80) explique les raisons de cette surestimation pour les réactifs APTT contenant de la silice : le groupement PEG interfère avec la surface d'activation produite par la silice et entraîne l'activation prématurée du N9-GP par le FXI activé et la kallicréine. Il en résulte une accumulation prématurée de FIX activé au cours de la phase contact.

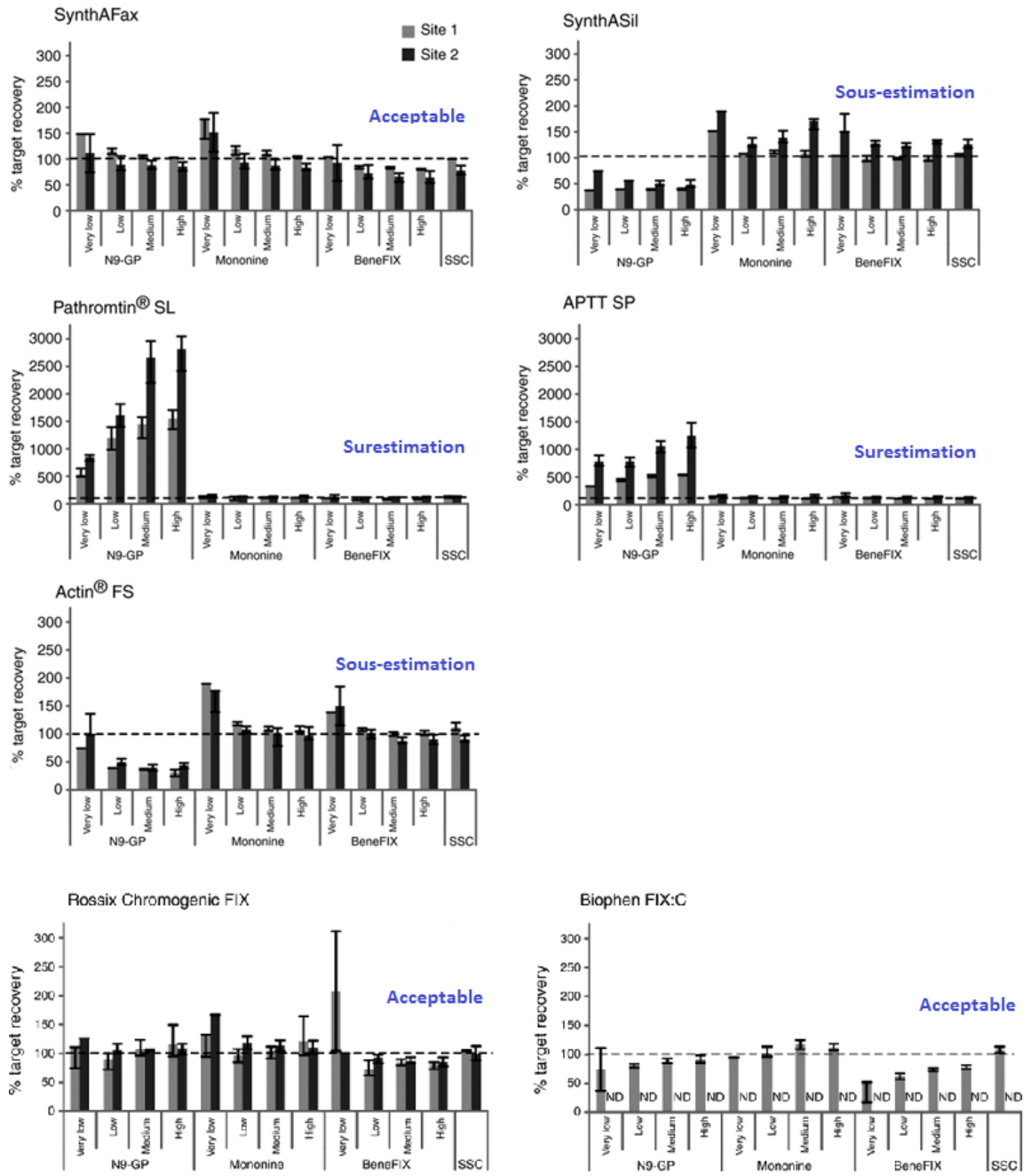


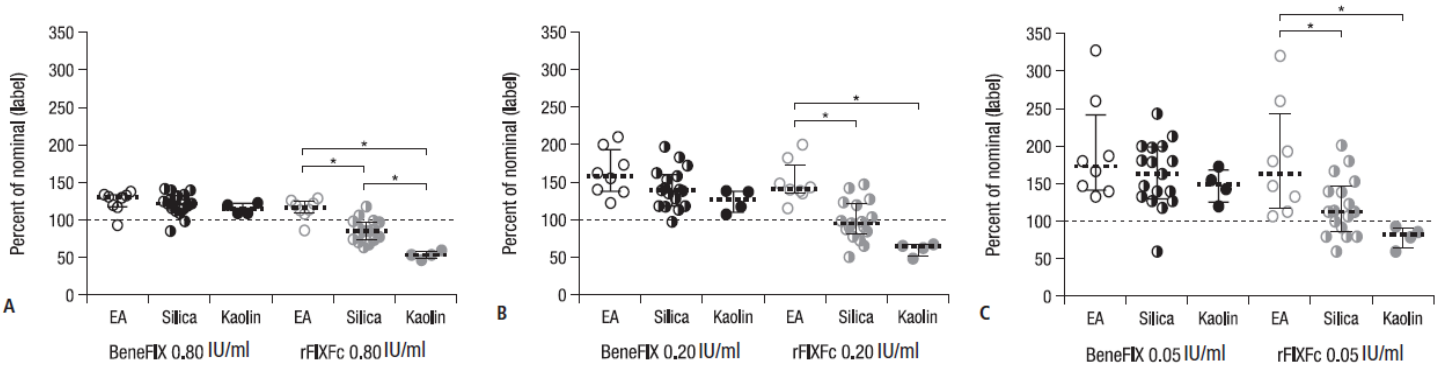
Figure 12 : « Recovery » des dosages de N9-GP selon le réactif APTT (OSA) ou le kit chromogénique (CSA) utilisés, d'après Bowyer et *al.*(78)

○ **rFIX-Fc (Alprolix®) :** une étude multicentrique a été réalisée dans 30 laboratoires de sept pays (70) sur des échantillons surchargés *in vitro* avec comme comparateur le traitement Benefix®. On observe (Figure 13) que l'activité du rFIX-Fc était dépendante du réactif utilisé avec :

- une nette sous-estimation de près de 50% par rapport à la valeur attendue lors de l'utilisation du kaolin comme activateur.

- des résultats acceptables avec les réactifs APTT contenant d'autres activateurs (acide ellagique et silice).

- des résultats acceptables avec la méthode CSA.



EA, ellagic acid
*p<0,05

Figure 13 : Taux de FIX d'échantillons surchargés en Benefix® ou en rFIX-Fc selon l'activateur du réactif APTT, Sommer et *al.* (70).

Les auteurs concluent que les réactifs APTT à base de kaolin comme activateur sont à éviter.

○ **rIX-FP (Idelvion®) :** la seule étude multicentrique réalisée a fait l'objet d'un poster présenté à l'EAHAD (*European Association for Haemophilia and Allied Disorders*) en 2016 par St Ledger et *al*. Elle montrait une sous-estimation d'environ 50% lorsque le dosage par méthode OSA était réalisé avec le réactif Actin® FS ou avec un réactif APTT utilisant le kaolin comme activateur. Les autres réactifs APTT peuvent être utilisés par méthode OSA. La méthode CSA n'a, en revanche, pas été évaluée.

➢ **Problématique : les « long acting » vont-elles modifier nos pratiques ?**

La problématique des dosages des « long acting » est bien résumée par Kitchen et *al.* (81) en 2017 (Tableaux 8 et 9). La technique CSA apparait acceptable pour l'ensemble des rFVIII ainsi que pour les rFIX à l'exception du rFIX-FP qui n'a pas été évalué. Concernant la technique OSA, certains réactifs APTT montrent des discordances importantes et ne sont pas conseillés pour le suivi des patients.

Tableau 8 : Quelle méthode pour le dosage des rFVIII « long acting » ? Kitchen et *al.* (81).

	« long acting »		
	N8-GP	**BAY 94-9027**	**rFVIII-Fc**
FVIII chromogénique	Oui	Oui	Oui
Réactifs TCA :			
STA-PTT A	Non	Non	Oui
STA-C.K. Prest	Oui	?	Oui
Actin FS	Oui	?	Oui
Actin FSL	Oui	?	Oui
Pathromtin SL	?	?	Oui
SynthASil	?	?	Oui
SynthAFax	Non	Oui	?
DG Synth	Oui	?	?
Cephascreen	Oui	Oui	Oui
APTT SP	Non	Non	?

« Non » signifie que les résultats présentent une discordance supérieure à 30% par rapport à la valeur attendue.

Tableau 9 : Quelle méthode pour le dosage des rFIX « long acting » ? Kitchen et *al.* (81).

	« long acting »		
	N9-GP	**rFIX-Fc**	**rIX-FP**
FIX chromogénique	Oui	Oui	?
Réactifs TCA :			
STA-PTT A	Non	Oui	Oui
STA-C.K. Prest	Non	Non	Non
Actin	Non	?	?
Actin FS	Non	Oui	Non
Actin FSL	Non	Oui	?
Pathromtin SL	Non	Oui	Oui
SynthASil	Non	Oui	Oui
SynthAFax	Oui	?	?
DG Synth	Oui	?	?
Cephascreen	Oui	Oui	?
APTT SP	Non	?	?
Auto APTT	?	Oui	?
Platelin L	?	Oui	?
DAPTIN	Oui	?	?

« Non » signifie que les résultats présentent une discordance supérieure à 30% par rapport à la valeur attendue.

A la lumière des données actuelles, aucun réactif APTT n'apparaît universel. Il est nécessaire d'évaluer les performances de nos méthodes de dosages et de nos réactifs afin de pouvoir assurer le suivi des patients substitués avec ces nouvelles molécules. L'objectif de notre travail s'inscrit dans cette démarche.

3 ÉVALUATION DES DOSAGES DE FVIII ET FIX PAR MÉTHODE CHROMOGÉNIQUE SUR AUTOMATE ACL TOP (WERFEN)

3.1 Matériel et méthodes

3.1.1 Sélection des échantillons

Des échantillons de plasma recueillis de janvier 2015 à mars 2017 au laboratoire d'hémostase du CHU de Nantes ont été sélectionnés. Des informations cliniques étaient récoltées concernant l'âge, le sexe, le groupe sanguin, la notion de troubles de l'hémostase, les traitements anticoagulants ou antihémophiliques ainsi que la mutation génétique en cas d'hémophilie. Ces plasmas recueillis contenaient des concentrations de FVIII et de FIX couvrant l'ensemble du domaine de mesure.

Pour les concentrations plasmatiques en FVIII abaissées (<70%), les échantillons analysés appartenaient à 29 patients atteints d'hémophilie A (19 hémophiles mineurs, 5 sévères, 5 modérés), 4 patientes conductrices d'hémophilie A, 15 patients avec une maladie de Willebrand, un patient avec suspicion de thrombopathie et un patient de groupe sanguin O sans trouble de l'hémostase rapporté.

Les échantillons en FIX bas correspondaient à 38 patients hémophiles B (13 hémophiles mineurs, 12 modérés et 13 sévères), une patiente conductrice d'hémophilie B, 25 patients sous antivitamine K (AVK), deux patients présentant une insuffisance hépatocellulaire et les deux derniers patients sans antécédents particuliers.

Pour les concentrations plasmatiques en FVIII et FIX normales à hautes (≥70%), les échantillons provenaient de patients « témoins » non connus pour des troubles de l'hémostase, prélevés dans le cadre d'un bilan préopératoire qui comprenait un temps de prothrombine (TP), un temps de céphaline kaolin (TCK) et le dosage du fibrinogène. Le TP devait être supérieur ou égal à 70%, le ratio du TCK strictement inférieur à 1,2 et le fibrinogène compris entre 2 g/L et 4 g/L pour que l'échantillon soit retenu.

Au total, 100 échantillons ont été testés pour le FVIII et 90 échantillons pour le FIX.

3.1.2 Recueil et préparation des échantillons

Les échantillons ont été recueillis sur des tubes CTAD (citrate trisodique à 0,109M, théophylline, adénosine, dipyridamole, Vacuette®). Ils ont subi une première centrifugation à 3500 tours/min pendant 15 minutes à une température comprise entre 15°C et 20°C. Les plasmas obtenus ont été décantés dans un tube secondaire avant d'être à nouveau centrifugés dans les mêmes conditions pour obtenir un plasma pauvre en plaquettes (ou PPP). Ce PPP a été aliquoté en fractions de 500 µL et congelé à -80°C dans les quatre heures suivant le prélèvement pour être analysés secondairement au sein de différentes séries.

Le jour du dosage, les plasmas conservés à -80°C ont été décongelés dans un bain-marie à 37°C pendant 10 minutes. Chaque échantillon était ensuite homogénéisé délicatement par retournement simple avant d'être analysé.

3.1.3 Automate et réactifs utilisés

- **Automate**

L'ensemble des analyses ont été effectuées sur un automate ACL TOP Family dont le module permettant la lecture optique des échantillons est composé de diodes électroluminescentes émettant deux sources lumineuses : une à 671 nm (pour les dosages par méthode chronométrique OSA) et l'autre à 405 nm (pour les dosages par méthode chromogénique CSA).

- **Réactifs pour la méthode chronométrique (OSA)**

Le dosage OSA a été réalisé avec le réactif APTT SynthASil® (HemosIL®, Instrumentation Laboratory). Les déficients CRYOcheck® Factor VIII Deficient Plasma et CRYOcheck® Factor IX Deficient Plasma (PrecisionBioLogic) totalement dépourvus du facteur à doser (<1%) par immuno-adsorption ont été utilisés après décongélation 4 minutes au bain-marie à 37°C. Pour la calibration l'étalon était le Biophen® Plasma Calibrator (Hyphen BioMed) étalonné avec les standards internationaux du NIBSC (*National Institute for Biological Standards and Controls*). Une seule gamme de calibration a été effectuée pour

chaque facteur (domaine de mesure entre <1% et 136% pour le FVIII, entre <1% et 150% pour le FIX). Un contrôle haut (Normal Control Assayed®, Instrumentation Laboratory) et un contrôle bas (Low Abnormal Control Assayed®, Instrumentation Laboratory) ont été dosés en début et en fin de série. Une dilution du contrôle bas au tiers et au dixième était effectuée dans le diluant HemosIL® Factor Diluent (Instrumentation Laboratory) pour valider les valeurs basses.

- **Réactifs pour la méthode chromogénique (CSA)**

Pour le FVIII, le coffret Biophen® FVIII :C (Hyphen BioMed) a été utilisé avec deux gammes de mesures réalisées avec l'étalon Biophen® Plasma Calibrator (Hyphen Biomed) : une gamme dite normale pour des activités supérieures à 20% (entre 20% et 172%) et une gamme fine pour des activités inférieures à 25% (entre <1% et 25%). Pour le FIX, le coffret Rox Factor IX® (Rossix) a été utilisé avec une seule gamme de calibration couvrant un domaine de mesure descendant jusqu'à 0,5% avec le Plasma standard humain (Siemens). Les contrôles Biophen Normal Control Plasma et Biophen Abnormal Control Plasma (Hyphen BioMed®) ont été passés en début et en fin de série. Le contrôle bas était également dilué au tiers et au dixième dans le diluant fourni dans chaque coffret pour valider les valeurs basses.

3.1.4 Répétabilité et reproductibilité

Pour la répétabilité, les deux niveaux de contrôle (normal et bas) ainsi que le contrôle bas dilué au tiers ont été analysés 20 fois consécutives, dans des conditions identiques, par le même opérateur au sein de la même série.

Pour la reproductibilité, les résultats des contrôles internes de chaque série réalisés sur plusieurs jours et sur trois niveaux (un pour les valeurs hautes, deux pour les valeurs basses) ont été utilisés (n=15).

3.1.5 Comparaison de méthode

Chaque échantillon a été analysé sur l'automate ACL TOP successivement selon les deux méthodes OSA et CSA le même jour, sur le même aliquote et dans la même série. Deux dilutions ont été réalisées afin de confirmer notre résultat et s'affranchir d'un éventuel

anticoagulant de type lupique, la valeur retenue correspondant à la moyenne des résultats des deux dilutions.

3.1.6 Analyse statistique

Les données ont été analysées avec le logiciel XLSTAT 2017. L'analyse statistique des résultats a été réalisée en utilisant les tests non paramétriques de Spearman et de Wilcoxon avec un seuil de signification p retenu de 0,05. Les résultats ont également été comparés selon Bland-Altman.

3.2 Résultats

3.2.1 Répétabilité et reproductibilité

Les résultats sont satisfaisants avec des coefficients de variation (CV) conformes aux limites acceptables fixées au préalable d'après les normes d'acceptabilité en hémostase du GFHT 2014. Les CV de la répétabilité étaient inférieurs à 0,75 fois les CV maximums recommandés (90ème percentile) et les CV de la reproductibilité inférieurs aux CV maximums recommandés (90ème percentile) aussi bien pour le FVIII que pour le FIX (Tableau 10). A noter tout de même des CV un peu plus élevés pour le FIX par rapport au FVIII.

Tableau 10 : Résultats des moyennes et CV des dosages de FVIII et FIX par méthode CSA.

		Biophen® FVIII:C (Hyphen)			**Rox Factor IX® (Rossix)**		
		Contrôle normal	Contrôle moyen	Contrôle bas	Contrôle normal	Contrôle moyen	Contrôle bas
Répétabilité	Moyenne (%)	92,4	38,8	10,0	79,7	39,1	12,9
	ET	1,9	1,2	0,2	2,3	2,4	0,7
	CV (%)	3,1	3,2	2,0	2,9	6,1	5,8
Reproductibilité	Moyenne (%)	84,8	36,8	3,9	84,2	35,9	4,1
	ET	2,8	2,1	0,1	4,0	3,0	0,3
	CV (%)	3,4	5,6	2,4	4,8	8,2	7,7

3.2.2 Corrélation entre les méthodes chronométrique et chromogénique

➢ **Pour le FVIII**

Les deux méthodes sont bien corrélées (Figure 14) avec un coefficient de corrélation r^2 à 0,997 ($p< 0,0001$ selon le test de Spearman).

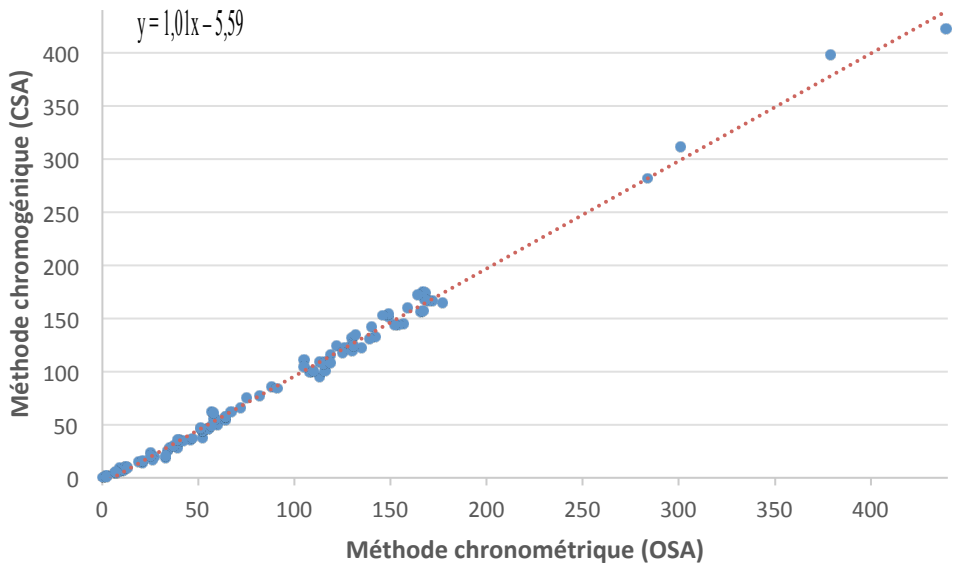


Figure 14 : Corrélation FVIII :OSA / FVIII :CSA.

Les résultats sont également présentés en utilisant les limites d'agrément selon la méthode de Bland-Altman en calculant la moyenne des différences (ou biais D) et l'écart-type des différences (ET). Cette représentation montre un biais moyen de FVIII OSA-FVIII CSA de +4,51% (Figure 15). Seules six valeurs sont en dehors des limites d'agrément représentées par la valeur du biais plus ou moins deux écarts types, sans incidence pour l'interprétation clinique puisque cela concerne des valeurs hautes voire très hautes supérieures à 150%.

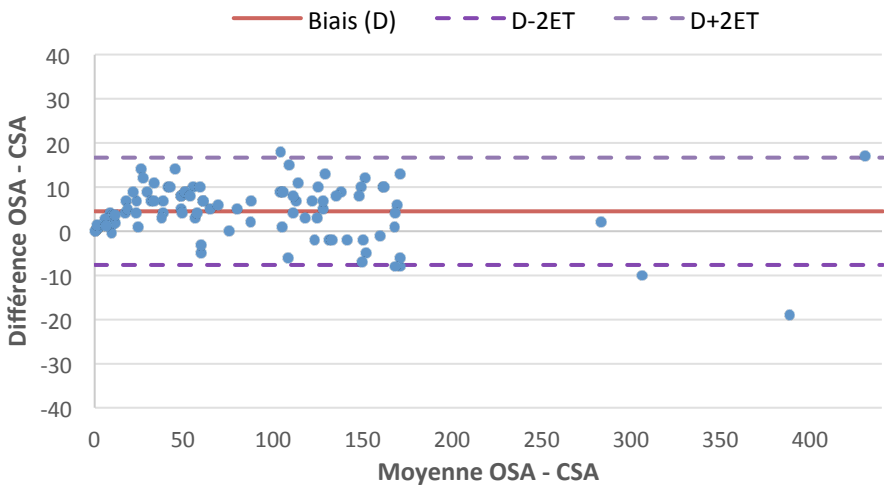


Figure 15 : Concordance OSA/CSA de Bland-Altman pour le FVIII.

En conclusion, les résultats obtenus avec le réactif Biophen® FVIII :C (Hyphen BioMed) pour les plasmas des patients et des témoins testés, dans notre étude, sont corrélés avec ceux des tests chronométriques (r^2 = 0,997). Ces performances permettent d'envisager son utilisation en routine pour le dosage du FVIII chez les patients hémophiles ou non.

- **Pour le FIX**

Les deux méthodes sont bien corrélées (Figure 16) avec un coefficient de corrélation r^2 à 0,984 ($p < 0,0001$ selon le test de Spearman).

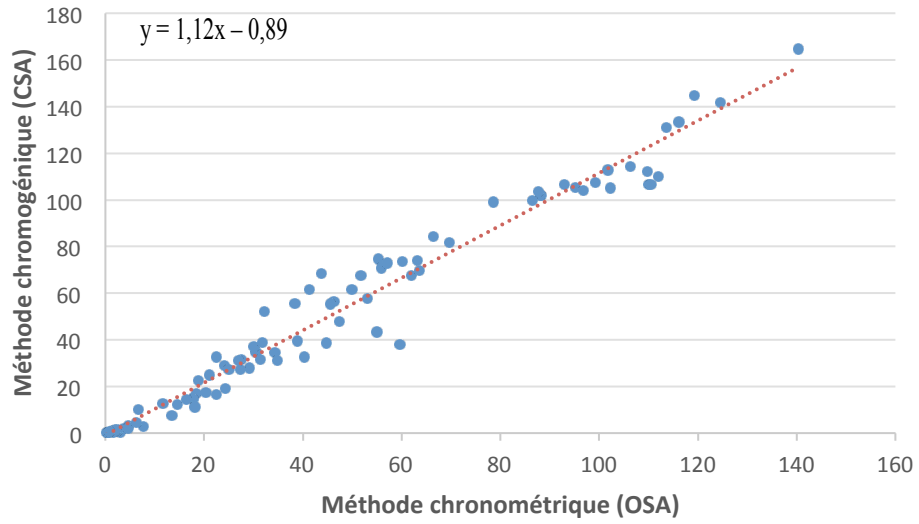


Figure 16 : Corrélation FIX :OSA / FIX :CSA.

La représentation graphique de Bland-Altman montre un biais moyen de FIX OSA-FIX CSA de -4,76% (Figure 17). Quatre valeurs sont en dehors des limites d'agrément représentées par la valeur du biais plus ou moins deux écarts types. Deux d'entre elles concernent des hémophiles B mineurs. Des discordances ont déjà été décrites selon la source en phospholipides du réactif OSA utilisé (82). Le premier présente la mutation p.Arg75Gln au niveau de l'exon 2 et appartient à une famille d'hémophiles B mineurs suivie au CRTH de Nantes et connue pour des discordances de dosage selon le réactif utilisé en OSA. Les résultats trouvés et contrôlés étaient un taux de FIX OSA de 58,5% et de FIX CSA de 38,1%. Le second est un hémophile B mineur qui possède la mutation p.Arg449Trp au niveau de l'exon 8. Les taux mesurés étaient de 44,5% pour la méthode OSA et de 68,6% pour la méthode CSA. Nous avons constaté cette même discordance chez un autre patient hémophile B mineur présentant cette même mutation p.Arg449Trp au niveau de l'exon 8 et n'appartenant pas à la même famille sans que cette mutation n'ait été décrite dans la littérature (83). Pour les deux autres points, ils concernent des valeurs hautes et sont donc sans incidence pour l'interprétation clinique.

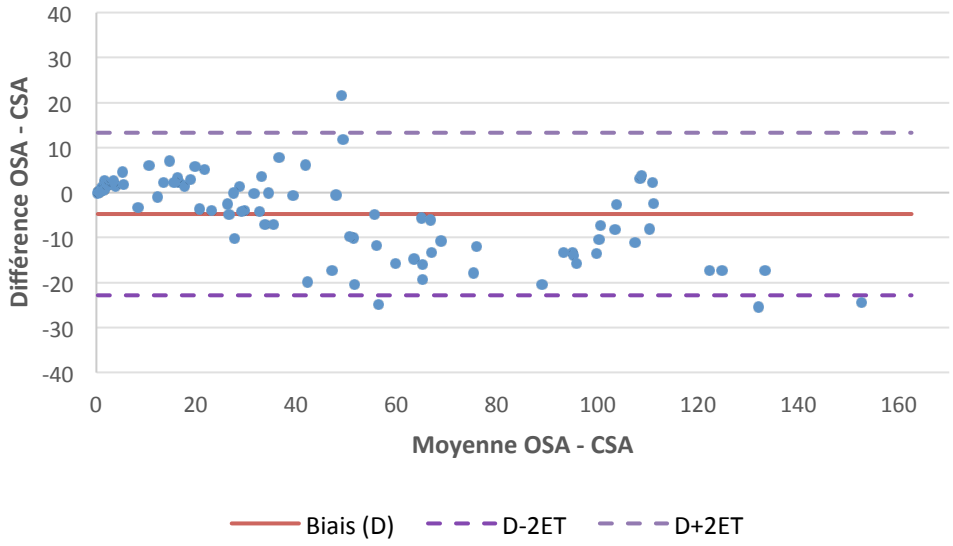


Figure 17 : Concordance OSA/CSA de Bland-Altman pour le FIX.

En conclusion, les résultats obtenus avec le réactif Rox Factor IX® (Rossix) pour des plasmas de patients et de témoins sont bien corrélés avec ceux des tests chronométriques (r^2 = 0,984) et permettent d'envisager son utilisation en routine pour le dosage du FIX chez les patients hémophiles ou non.

4 ÉTUDE DES DISCORDANCES OSA/CSA CHEZ LES PATIENTS HÉMOPHILES SUBSTITUÉS

4.1 Matériel et méthodes

4.1.1 Sélection des échantillons

Nous avons travaillé soit sur des « fonds de tubes » correspondant à des plasmas de patients hémophiles A ou B substitués suivis à Nantes et congelés à -80°C soit sur des plasmas d'hémophilies B sévères surchargés *in vitro* par le produit à doser et préparés par l'industrie pharmaceutique.

Pour le FVIII, 68 plasmas d'intérêt correspondant à des patients substitués par des FVIII conventionnels d'origine recombinante (Advate®, Afstyla®, Helixate Nexgen®, Novoeight®, Nuwiq®, ReFacto AF®) ou par « long acting » (Elocta® et N8-GP) ont été sélectionnés (Tableau 11).

Tableau 11 : Echantillons plasmatiques de patients substitués par FVIII recombinants.

Traitement	Caractéristiques	Nombre d'échantillons/patients
Advate® (Baxter/Baxalta)	rFVIII (entier)	8
Afstyla® (CSL Behring)	rVIII single chain	4
Helixate Nexgen® (CSL Behring)	rFVIII (entier)	6
Nuwiq® (Octapharma)	rFVIII (B tronqué)	12
Novoeight® (Novo Nordisk)	rFVIII (B tronqué)	7
ReFacto® (Pfizer)	rFVIII (B tronqué)	7
Elocta® (Sobi)	rFVIII-Fc (« long acting »)	15
N8-GP (Novo Nordisk)	rFVIII pegylé (« long acting »)	9

Pour le FIX, les dosages ont été réalisés chez 8 patients traités par FIX recombinant conventionnel Benefix® (Pfizer). Dans la mesure où les « long acting » pour le FIX n'étaient pas encore disponibles en France, 9 échantillons fournis par l'industrie pharmaceutique surchargés en rIX-FP Idelvion® (CSL Behring) à 3 concentrations différentes (80%, 30% et 5%) ont été dosés trois jours de suite. Pour le rFIX-Fc Alprolix® (Sobi), 3 échantillons surchargés à 80%, 20% et 5% ont été utilisés.

Une fois décongelé au bain-marie à 37°C pendant 10 minutes, chaque échantillon était inséré sur l'automate ACL TOP Family et analysé successivement selon les deux techniques, OSA avec les différents réactifs APTT décrits précédemment et CSA.

4.1.2 Réactifs

- **Pour le dosage OSA**

- FVIII : deux réactifs APTT ont été testés, l'APTT SynthASil® (HemosIL®, Instrumentation Laboratory) et le CK Prest® (Stago).

- **FIX** : trois réactifs APTT ont été testés : l'APTT SynthASil® (HemosIL®, Instrumentation Laboratory), le CK Prest® (Stago) et l'Actin® FS (Siemens).

Ces réactifs APTT ont des activateurs et une composition en phospholipides différents (Tableau 12).

Tableau 12 : Caractéristiques des différents réactifs APTT utilisés.

Réactif	Fabricant	Activateur	Origine/Nature des phospholipides
SynthASil®	Instrumentation Laboratory	Silice micronisée	Phospholipides synthétiques
STA® - CK Prest®	Stago	Kaolin	Tissu cérébral de lapin
Dade® Actin® FS	Siemens	Acide ellagique	Phosphatides de soja purifiés (origine végétale)

- **Pour le dosage CSA**

- FVIII : le kit Biophen® FVIII :C (Hyphen Biomed) a été utilisé. La calibration a été réalisée avec le calibrateur Biophen® Plasma Calibrator (Hyphen Biomed).

- **FIX** : le kit Rox Factor IX® (Rossix) a été utilisé. La calibration a été effectuée à l'aide du plasma humain commercialisé par Siemens.

4.2 Résultats

4.2.1 Chez les patients substitués par rFVIII

La figure 18 représente, pour les deux réactifs APTT testés, les résultats des dosages obtenus avec les traitements recombinants conventionnels (Advate®, Afstyla®, Helixate®, Novoeight®, Nuwiq®, ReFacto®) et avec les « long acting » (Elocta®, N8-GP). Les résultats sont exprimés en pourcentage de récupération (« recovery ») de la valeur obtenue avec le dosage chromogénique qui est pris comme référence : (FVIII :OSA/FVIII :CSA) x 100%. Les discordances OSA/CSA correspondent à une différence de plus ou moins 30% entre les deux méthodes et sont représentées par des valeurs en dehors de la zone grisée (100% +/-30%).

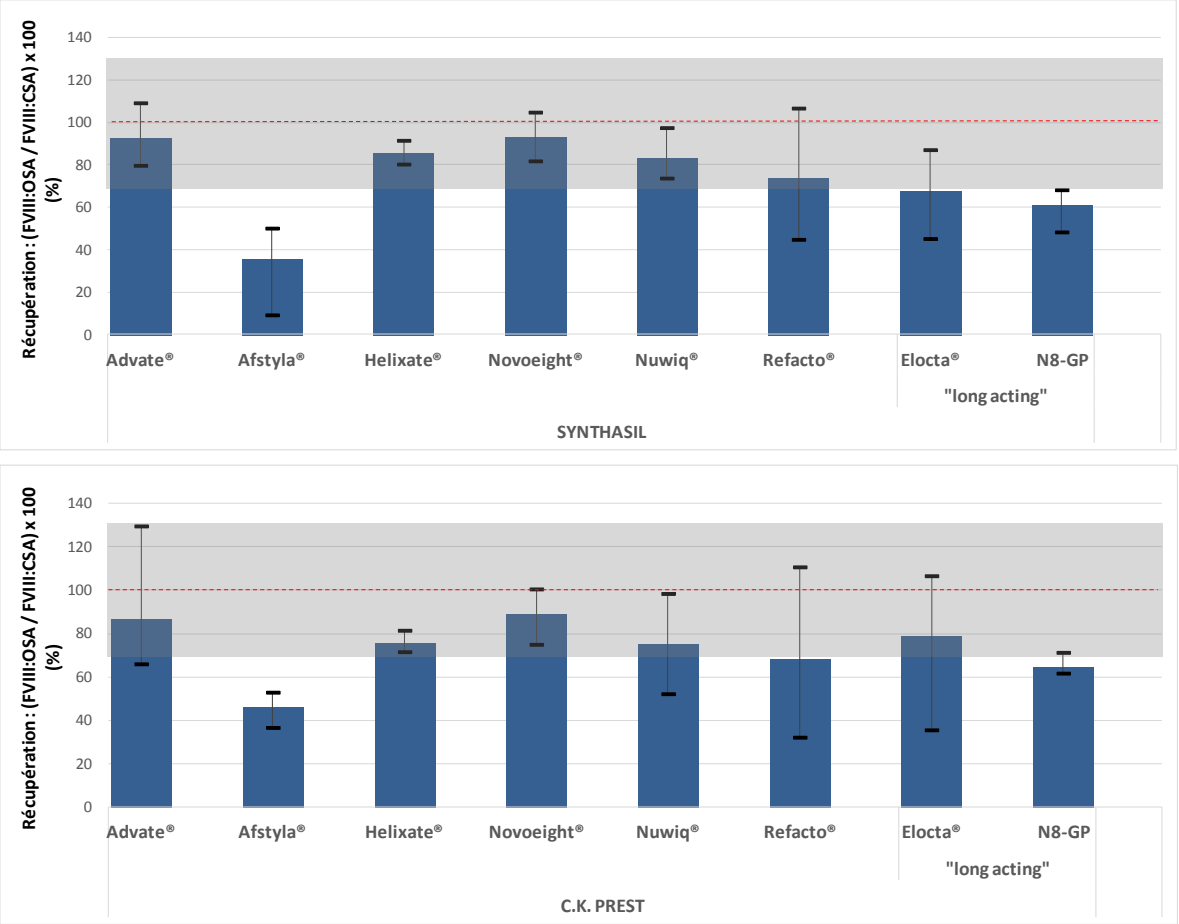


Figure 18 : Résultats des dosages FVIII:OSA / FVIII:CSA chez des patients substitués par rFVIII conventionnels et « long acting ».

Concernant les FVIII conventionnels :

Pour le réactif APTT Synthasil® il n'y a pas de discordance avec le dosage CSA pour les traitements conventionnels Advate®, Helixate®, Novoeight®, Nuwiq® et ReFacto®. Les différences moyennes sont inférieures à 30%, respectivement de 7,6%, 14,5%, 7,3%, 16,6% et 26,1%. Seul l'Afstyla® présente des taux de FVIII sous-estimés de presque 65% par rapport à la méthode CSA.

Avec le réactif APTT CK Prest®, il n'y a pas de discordance OSA/CSA pour les traitements conventionnels Advate®, Helixate®, Novoeight® et Nuwiq® qui présentent des différences moyennes respectives de 13,4%, 24,3%, 17,8% et 24,7%. En revanche, l'Afstyla® et le ReFacto® montrent des discordances, respectivement de 54% et 32%.

Concernant les deux « long acting » testés :

Les taux de FVIII par la méthode OSA sont sous-estimés de manière significative pour l'ensemble des patients substitués par rFVIII pégylé (N8-GP) avec des discordances observées supérieures à 30% quel que soit le réactif APTT utilisé (39,4% avec le réactif Synthasil® et 35,7% avec le réactif CK Prest®).

Pour le traitement rFVIII-Fc (Elocta®), il n'y a pas de discordance OSA/CSA avec le réactif APTT CK Prest®. En revanche, les résultats sont légèrement sous-estimés avec le réactif Synthasil® avec une discordance moyenne de 32,4%, à la limite du seuil de significativité. Afin de mieux comprendre cette discordance avec le Synthasil® qui n'était pas rapportée dans la littérature, trois groupes ont été différenciés selon le taux : taux < 5%, taux aux environs de 10-30% et taux > 70% (Figure 19). Cette ré-analyse montre que les discordances pour le traitement rFVIII-Fc (Elocta®) avec le réactifs APTT Synthasil® ne concernent en fait que les taux très bas (<5%). Nous avons par exemple retrouvé un taux de FVIII de 2,3% par méthode OSA avec le Synthasil® versus 5,1% par méthode CSA. Cette différence est liée au CV important de la méthode aux faibles concentrations et n'est pas pertinente cliniquement pour le suivi.

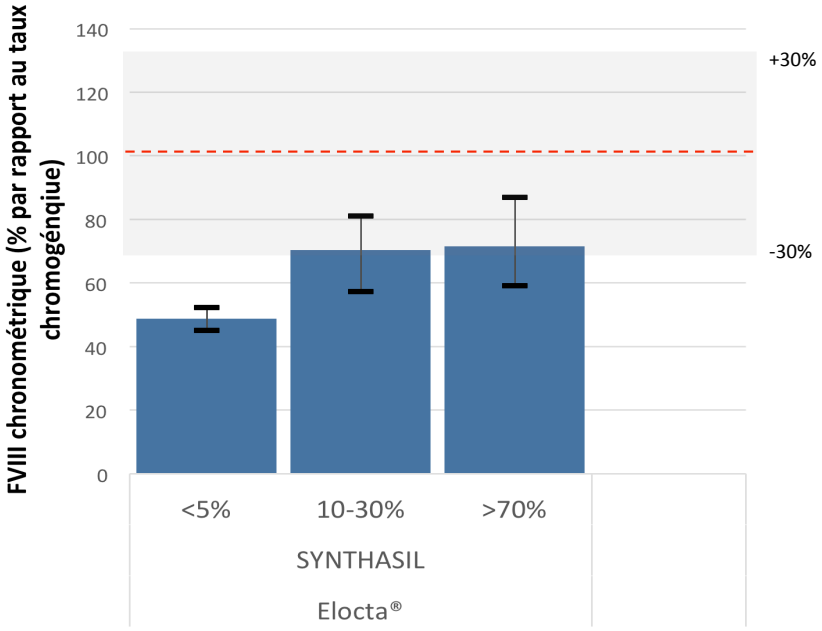


Figure 19 : FVIII:OSA avec le réactif APTT Synthasil® versus FVIII:CSA selon le taux en FVIII de patients substitués par Elocta®.

4.2.2 Chez les patients substitués par rFIX

Concernant les FIX conventionnels :

Les résultats obtenus avec la méthode OSA des 8 hémophiles B substitués par rFIX Benefix® ont été exprimés en pourcentage des taux de FIX obtenus par la méthode CSA : (FIX :OSA/FIX :CSA) x 100%. La discordance reste définie par une différence supérieure ou égale à 30% (Figure 20).

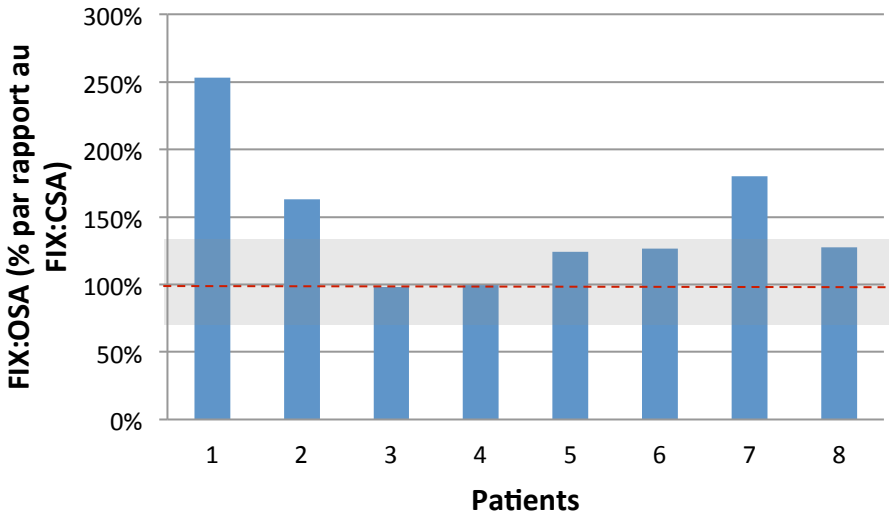
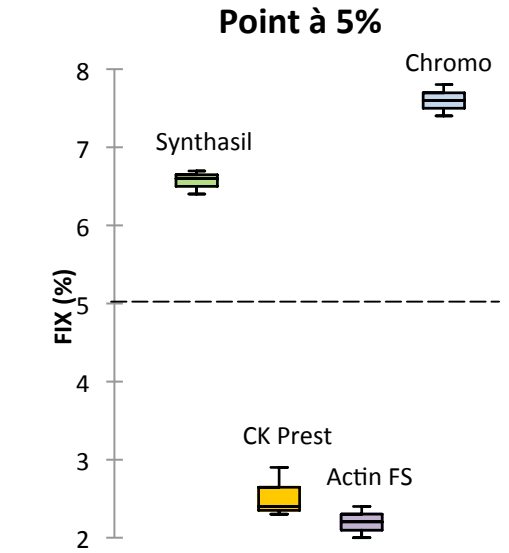


Figure 20 : Comparaison FIX:OSA versus FIX:CSA chez 8 patients substitués par Benefix®.

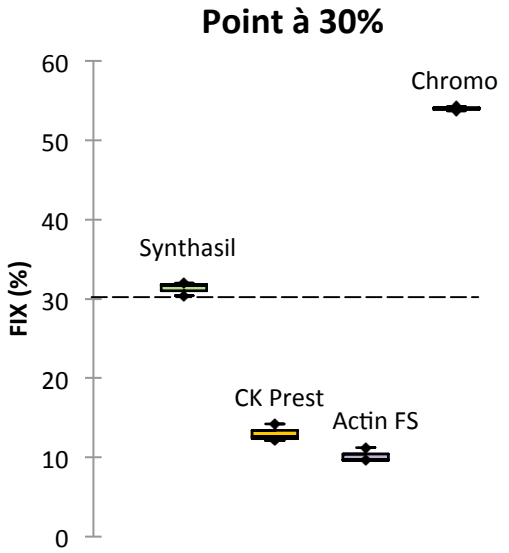
Il n'y a pas de discordance OSA/CSA chez les patients substitués par Benefix® hormis pour les concentrations très basses comme le patient 1 (Figure 20) pour lequel il a été retrouvé un taux de FIX de 7,6% par méthode OSA avec le Synthasil® versus 3,0% par méthode CSA. Cette différence est liée au CV important de la méthode aux faibles concentrations et n'est pas pertinente cliniquement pour le suivi.

Concernant les échantillons surchargés *in vitro* par les rFIX « long acting » :

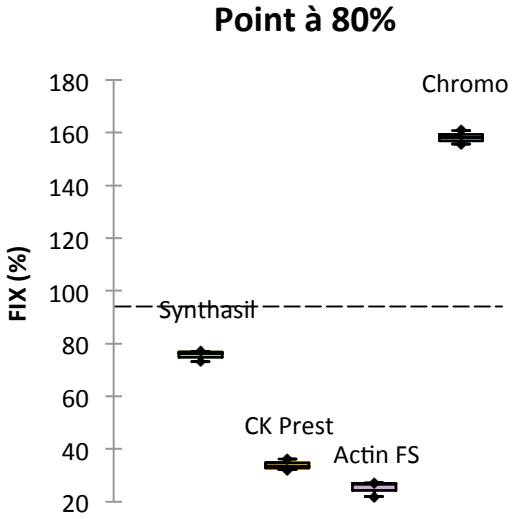
Pour le rIX-FP (Idelvion®), des échantillons surchargés *in vitro* à trois concentrations différentes (80%, 30% et 5%) ont été analysés trois jours de suite par méthodes OSA et CSA. Pour ces trois dosages la moyenne et les CV ont été calculés. Les données brutes sont reportées dans les tableaux de la figure 21.



	Synthasil	CK Prest	Actin FS	Chromo Rossix
Min (%)	6,4	2,3	2,0	7,4
Max (%)	6,7	2,9	2,4	7,8
Moyenne (%)	6,6	2,5	2,2	7,6
ET	0,2	0,3	0,2	0,3
CV (%)	2,3	12,9	9,1	3,7



	Synthasil	CK Prest	Actin FS	Chromo Rossix
Min (%)	30,4	12,1	9,6	53,7
Max (%)	32,0	14,2	11,2	54,3
Moyenne (%)	31,4	13,0	10,2	54,0
ET	0,9	1,1	0,9	0,4
CV (%)	2,7	8,4	8,8	0,8



	Synthasil	CK Prest	Actin FS	Chromo Rossix
Min (%)	73,1	32,2	22,0	155,6
Max (%)	77,1	36,2	27,3	160,7
Moyenne (%)	75,5	33,9	25,4	158,2
ET	2,1	2,1	2,9	3,6
CV (%)	2,8	6,1	11,5	2,3

Figure 21 : Echantillons surchargés *in vitro* en rIX-FP (Idelvion®) à 5%, 30% et 80% (moyenne +/- ET).

Ces résultats ont également été exprimés en pourcentage de récupération (« recovery ») par rapport à la valeur cible attendue donnée par l'industriel (Figure 22).

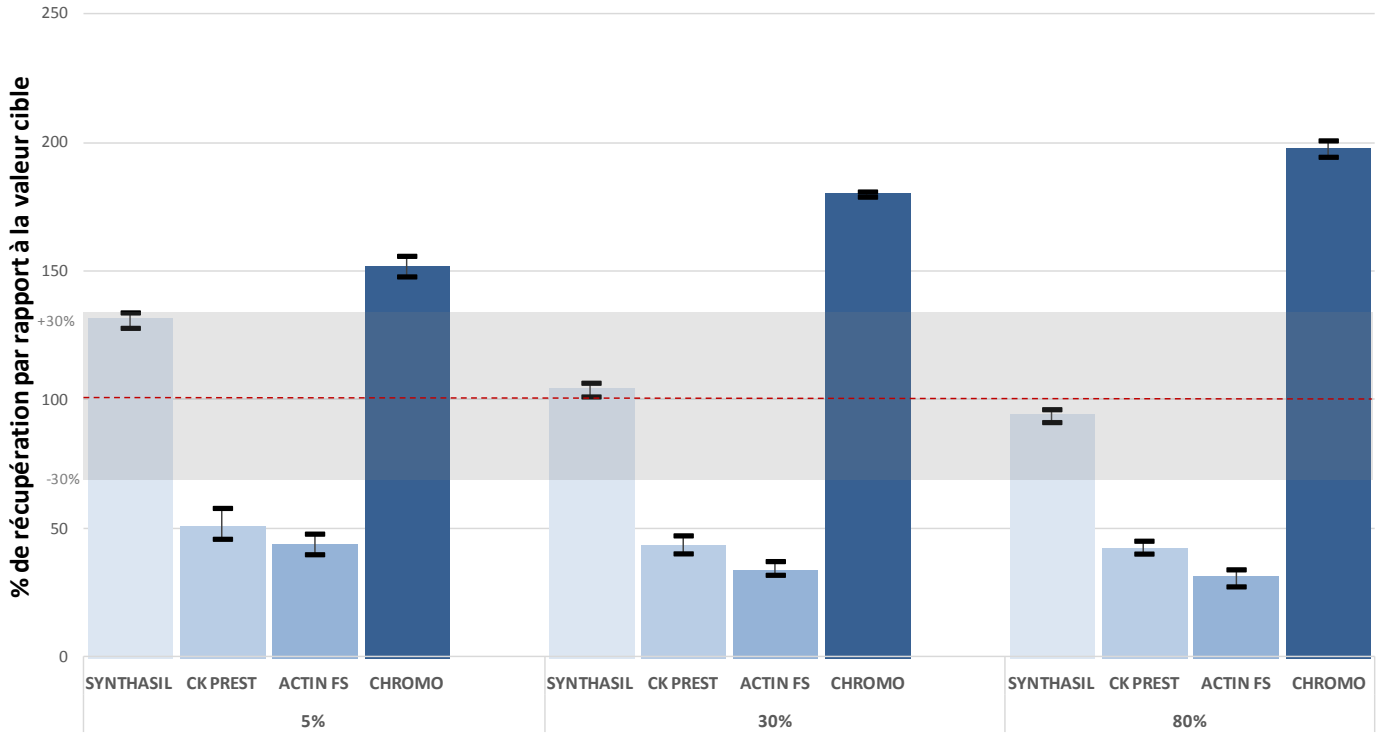


Figure 22 : Pourcentage de récupération par rapport à la valeur cible pour le rIX-FP Idelvion®.

Dans notre étude seul le réactif APTT Synthasil® donne des résultats concordants avec la valeur cible donnée par le fournisseur. Clairement le CK Prest®et l'Actin FS® sous-estiment les résultats de plus de 50%, respectivement de 54,6% et 63,5% alors que la méthode CSA les surestiment en moyenne de 177%.

Pour le rFIX-Fc (Alprolix®), trois échantillons surchargés à 5%, 20% et 80% ont été dosés dans les mêmes conditions que pour l'Idelvion®. Les résultats bruts obtenus sont présentés tableau 13.

Tableau 13 : Dosages d'échantillons surchargés en rFIX-Fc Alprolix®.

	Réactifs testés			
Valeur cible	**Synthasil**	**CK Prest**	**Actin FS**	**Chromo (Rossix)**
5%	7,8%	3,1%	6,0%	5,3%
20%	25,5%	13,7%	24,1%	23,6%
80%	77,8%	50,2%	87,6%	104,5%

Les résultats ont également été exprimés (Figure 23) en pourcentage de la valeur cible donnée par le fabricant.

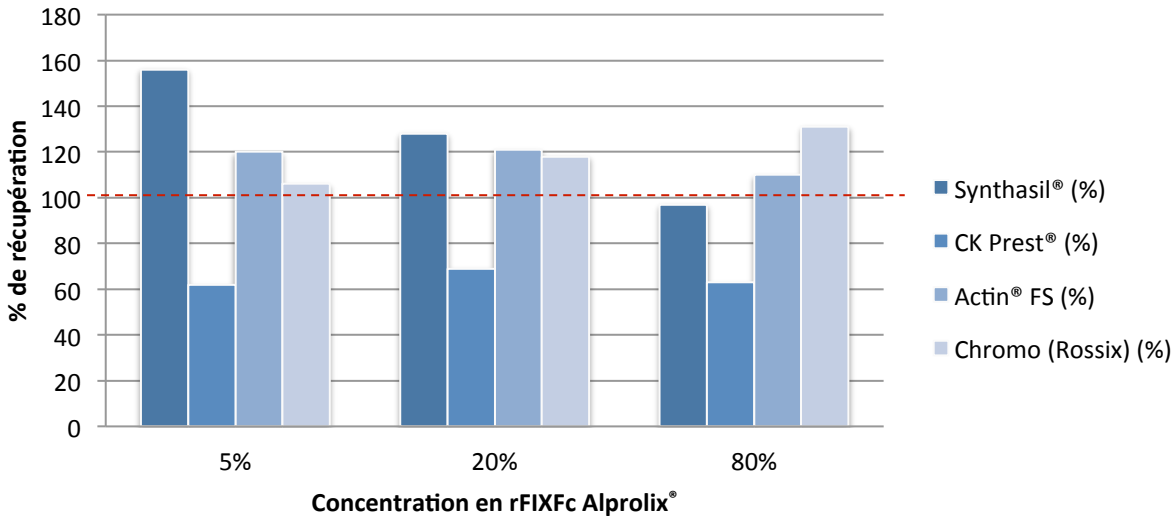


Figure 23 : Pourcentage de récupération d'échantillons surchargés en rFIX-Fc Alprolix®.

Les résultats sont acceptables pour la méthode OSA avec les réactifs APTT Synthasil® et Actin® FS ainsi qu'avec la méthode CSA (kit Rossix). En revanche, il ressort que le CK Prest® sous-estime les résultats de près de 40%. Ces résultats sont à interpréter avec prudence dans la mesure où un seul échantillon pour chaque concentration a été analysé.

4.2.3 Récapitulatif des résultats

Dans notre étude, concernant les **« long acting » :**

- le rFVIII-Fc Elocta® peut être dosé par la méthode OSA avec les réactifs Synthasil® et CK Prest®, et par méthode CSA avec le kit Hyphen Biophen.

- le FVIII pegylé N8-GP ne peut être dosé que par méthode CSA. La technique OSA avec les réactifs APTT Synthasil® et CK Prest® ne peut pas être utilisée.

- le rIX-FP Idelvion® peut être dosé avec le Synthasil® alors que les autres réactifs APTT CK Prest®, Actin® FS et la méthode CSA ne sont pas adaptés.

- le rFIX-Fc Alprolix® ne peut pas être dosé avec le réactif APTT CK Prest®. Le Synthasil®, l'Actin® FS et la méthode CSA peuvent être utilisés.

Pour les **traitements conventionnels,** à l'exception du ReFacto® et de l'Afstyla®, la méthode OSA avec les réactifs APTT Synthasil® et CK Prest® ainsi que la méthode CSA (kit Hyphen Biophen) peuvent être utilisées.

Ces résultats sont résumés dans les tableaux 14 et 15.

Tableau 14 : Quelle méthode pour le dosage des rFVIII conventionnels et à demi-vie prolongée ?

	rFVIII conventionnels						« long acting »	
Réactifs APTT :	**Advate®**	**Afstyla®**	**Helixate®**	**Novoeight®**	**Nuwiq®**	**ReFacto®**	**Elocta®**	**N8-GP**
Synthasil	oui	non	oui	oui	oui	oui	oui	non
CK Prest	oui	non	oui	oui	oui	non	oui	non

« Non » signifie que les résultats présentent une discordance supérieure ou inférieure à 30% par rapport à la méthode chromogénique.

Tableau 15 : Quelle méthode pour le dosage des rFIX à demi-vie prolongée ?

	« long acting »	
	Idelvion®	**Alprolix®**
FIX chromogénique Rossix	non	oui
Réactifs APTT :		
Synthasil	oui	oui
CK Prest	non	non
Actin FS	non	oui

« Non » signifie que les résultats présentent une discordance supérieure ou inférieure à 30% par rapport à la valeur attendue.

5 DISCUSSION

Les nouveaux traitements antihémophiliques à demi-vie prolongée dits « long acting » offrent une perspective prometteuse pour les patients et créent un véritable challenge pour les laboratoires d'analyses médicales qui vont devoir en assurer le suivi biologique. La plupart d'entre eux en France utilisent la technique chronométrique OSA pour le dosage des facteurs VIII et IX. Or, côté industriel, les concentrés sont titrés selon la méthode CSA pour le FVIII et OSA pour le FIX mais avec un réactif APTT spécifique pour chaque produit et choisi par le fabricant. L'intérêt pour le dosage des FVIII et FIX par méthode CSA a été relancé par l'arrivée de ces molécules à demi-vie prolongée pour lesquelles des discordances sont attendues selon les réactifs APTT utilisés dans les laboratoires. Les laboratoires doivent donc s'assurer que les méthodes de dosage qu'ils utilisent en routine sont adaptées et permettent de rendre des résultats fiables chez les patients substitués avec ces nouveaux produits.

Dans la première partie de l'étude nous avons mis au point la méthode CSA (kit Hyphen Biomed pour le FVIII et Rossix pour le FIX) sur automate ACL TOP. Nos résultats couvraient l'ensemble du domaine de mesure. Ils montraient une très bonne corrélation avec la méthode OSA utilisant le réactif APTT Synthasil® avec des CV pour la répétabilité et la reproductibilité acceptables aussi bien pour le FVIII que pour le FIX. Les performances satisfaisantes de cette validation de méthode nous a permis d'envisager la deuxième partie de l'étude. Celle-ci a consisté à comparer différents réactifs APTT pour le dosage des FVIII ou FIX chez des patients traités par facteurs recombinants conventionnels ou par facteurs recombinants « long acting ». La méthode était jugée discordante lorsqu'une différence de plus ou moins 30% était retrouvée. Ce seuil avait déjà été utilisé par Kitchen et *al* (62,81).

Nos résultats sont en accord avec les données de la littérature en ce qui concerne les FVIII recombinants dits conventionnels qui peuvent en effet être dosés à la fois selon la méthode OSA ou la méthode CSA sauf pour le ReFacto® et l'Afstyla®. Cette discordance pour le ReFacto® avait déjà été rapportée par Mikaelsson et *al*. (65) qui retrouvait des taux de FVIII avec la méthode OSA 20% à 50% plus bas qu'avec la méthode CSA. De ce fait le fabricant avait proposé une calibration avec un standard spécifique ou un dosage par méthode CSA. Pour l'Afstyla® cette discordance entre les méthodes OSA et CSA avait également été retrouvée (84) puisque l'industriel a précisé dans le résumé des caractéristiques du produit (RCP) que l'activité du FVIII chez ces patients doit être surveillée soit par méthode CSA soit

si la méthode OSA est utilisée de multiplier le résultat obtenu par un facteur de correction de 2.

Concernant les « long acting », l'Elocta® peut être dosé à la fois par méthode CSA et par méthode OSA avec les réactifs Synthasil® et CK Prest®. Nos résultats confirment ceux publiés par Sommer et *al*. (72). En revanche, pour le traitement par N8-GP, la méthode CSA est à privilégier puisque nos résultats n'étaient valides ni avec le réactif OSA Synthasil® ni avec le CK Prest®. Des discordances plus marquées pour le N8-GP avec la méthode OSA avaient été rapportées par Dodt et *al*. (84) sans plus de précision sur les réactifs. En revanche, Kitchen et *al*. (81) annonçait des valeurs acceptables avec le CK Prest® mais n'avait pas testé le Synthasil® dans son étude.

Concernant le FIX, les patients substitués par Benefix® peuvent être suivis par méthode OSA avec le réactif APTT Synthasil® ou par méthode CSA. Nos résultats ne confirment pas l'étude publiée par Kitchen et *al*. (69) qui retrouvait une sous-estimation des taux de FIX par méthode CSA par rapport à la méthode OSA pour des échantillons surchargés *in vitro* en rFIX Benefix®.

Pour le rFIX-Fc (Alprolix®), nos résultats sont en accord avec ceux présentés par Kitchen et *al.* (81) avec des valeurs acceptables pour les réactifs Synthasil®, Actin® FS et la méthode chromogénique alors que le CK® Prest est à déconseiller. Pour le rIX-FP (Idelvion®), seul le Synthasil® peut être utilisé puisque le CK Prest® et l'Actin® FS sous-estiment les taux et que la méthode CSA (kit Rossix) les surestime. Ces résultats sont en accord avec ceux présentés lors d'une communication orale au congrès 2017 de l'ISTH à Berlin. Lors de cette présentation, Kitchen avait également conclu que la méthode CSA avec le kit Rossix ne pouvait pas être utilisée pour le dosage du rIX-FP (Idelvion®). Il serait intéressant d'évaluer le deuxième kit chromogénique disponible (Hyphen Biomed) afin de voir s'il pourrait, quant à lui, être utilisé. Par ailleurs les résultats obtenus sur les plasmas surchargés *in vitro* sont à interpréter avec prudence et il sera intéressant de s'assurer qu'ils sont bien extrapolables chez les patients substitués.

Ces résultats sont à modérer car notre étude n'a porté que sur un petit effectif d'où un possible biais.

Plusieurs perspectives sont possibles pour donner suite à ce travail. Afin d'augmenter la robustesse de l'étude, il serait souhaitable d'augmenter les effectifs grâce notamment à

l'inclusion de patients de manière prospective. Tous les « long acting » devront également être testés dès qu'ils seront disponibles.

Concernant ces discordances retrouvées, des alternatives ont été proposées par Dodt et *al*. (84) avec les avantages et les inconvénients de chacune. La première d'entre elle serait d'utiliser un standard spécifique à chaque produit comme cela a déjà été fait pour le ReFacto® (66,67) et par Bulla et *al*. dans une étude suisse pour le BAX 855 (Adynovate®) (76). L'utilisation de tels standards implique un dialogue clinico-biologique de qualité afin de connaître exactement le traitement reçu par le patient ce qui n'est pas toujours chose facile. De plus, cela oblige le laboratoire à jongler avec plusieurs réactifs et gammes de calibration différentes et ne peut s'adresser qu'à des laboratoires spécialisés. La seconde solution serait d'appliquer un facteur de correction défini au préalable en fonction du traitement substitutif reçu et du réactif utilisé. L'avantage évident est que chaque laboratoire pourrait conserver son propre réactif. Cette proposition nécessite en amont des études approfondies pour valider ce facteur de correction pour chaque traitement et pour chaque réactif et soulève plusieurs interrogations. Ce facteur reste-t-il constant au changement de lot de réactif ? Est-il unique quel que soit le niveau de concentration en facteurs ? Cette option, bien que très attractive, présente de nombreuses sources d'erreurs. Enfin une dernière solution serait d'harmoniser la méthode utilisée pour titrer les concentrés thérapeutiques par l'industrie pharmaceutique et celle utilisée par les laboratoires pour doser le FVIII ou le FIX chez les patients substitués. Pour cela il faudrait donc utiliser non seulement la même méthode et encore mieux le même réactif à la fois pour le titrage et pour le dosage. Bowyer et *al*.(78) ont ainsi obtenu des résultats acceptables pour le dosage d'échantillons surchargés en N9-GP avec le réactif Synthafax® qui était également utilisé pour le titrage des concentrés. Dans ce cadre nous pourrions tester pour chaque rFIX « long acting » le même réactif APTT utilisé par le fabricant pour titrer ses concentrés : Pathromtin® SL pour Idelvion®, Actin® pour Alprolix® et Synthafax® pour N9-GP. En pratique courante, cette solution semble peu envisageable pour les laboratoires car elle impliquerait l'utilisation d'un trop grand nombre de réactifs et donc un surcoût non négligeable. Dans l'idéal, il faudrait que la Pharmacopée Européenne décide d'une méthode unique pour le titrage des facteurs, pourquoi pas chromogénique. C'est déjà le cas pour le FVIII mais cela reste à faire pour le FIX. En attendant, les industriels ont la responsabilité de fournir au laboratoire les informations nécessaires quant à la méthode adéquate pour doser leur produit.

Pour l'instant, aucune de ces approches n'est totalement satisfaisante.

L'avenir pour le dosage des « long acting » semble tourné vers la méthode chromogénique. Or, cette méthode, bien que de plus en plus utilisée, n'est pas encore implantée en routine car elle est plus coûteuse que la méthode chronométrique. Une étude économique auprès de plusieurs CHU de France menée en octobre 2013 par C. Pouplard pour le club des biologistes rapportait un coût de 10 à 25 fois supérieur pour un dosage de FVIII par méthode CSA versus un dosage par méthode OSA. La principale raison de ce surcoût est la réalisation des dosages au coup par coup du fait d'un faible nombre de demande avec cette méthode. Ce coût pourrait pourtant être diminué par 5 si l'on réalise des séries de 6 dosages plutôt que des dosages unitaires selon une étude réalisée au centre de Necker. Pour diminuer encore ce coût, l'aliquotage et la congélation des réactifs pourraient être envisagés mais nécessitent au préalable une étude pour valider et vérifier la bonne conservation. Une analyse économique récente publiée par Kitchen et *al*. (85) montre des coûts similaires entre le FVIII OSA (réactif Hemosil APTT SP) et le FVIII CSA (kit Biophen) sur ACL TOP. Le plasma déficient était la principale source de dépense dans la méthode OSA. En revanche la méthode CSA reste 4 à 5 fois plus chère pour le FIX (kit Rossix) à cause d'une stabilité plus courte sur automate (8 heures versus 24 heures pour le FVIII) et d'un nombre de dosages réalisés moins important puisque l'hémophilie B est moins fréquente. Une autre donnée à prendre en compte est le temps technique également augmenté avec la méthode CSA car les temps d'incubation sont plus longs. Un réaménagement des postes techniques et du temps de travail doit être envisagé.

En conclusion, l'arrivée sur le marché des « long acting » nourrit l'espoir d'une avancée bénéfique dans la prise en charge actuelle des patients hémophiles. Une évolution de nos pratiques de surveillance biologique est en marche et pourrait engendrer des dépenses conséquentes si elle n'est pas anticipée. Il est primordial d'encadrer et définir les cas qui vont nécessiter un dosage chromogénique plutôt que chronométrique. Il n'est bien évidemment pas question pour le moment de doser toutes les demandes de facteurs VIII et IX selon cette méthode. En pratique, la méthode CSA pourrait être utilisée pour le diagnostic et le suivi des patients hémophiles A substitués. Dans ce cadre, la question se pose quant à leur éligibilité au référentiel des actes innovants hors nomenclature de biologie (RIHN). Pour le dosage du FIX, la méthode CSA est disponible depuis peu ; elle reste encore peu développée dans nos laboratoires et n'est pas utilisée par les fabricants pour titrer leurs concentrés. Dans l'attente d'une révision des monographies de la Pharmacopée Européenne qui imposerait aux fournisseurs de titrer leurs concentrés par une méthode CSA de référence, il est important

d’identifier les réactifs APTT valides pour chaque rFIX à demi-vie prolongée. La méthode chromogénique mériterait d’être développée dans nos laboratoires car son utilisation simplifierait le « casse-tête » dû à la diversité des réactifs APTT.

6 RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. HAS. Hémophilies et affections constitutionnelles de l'hémostase graves. Protocole national de diagnostic et de soins pour une maladie rare. 2007.

2. World Federation of Hemophilia. Report on the annual global survey 2015. 2016.

3. White GC, Rosendaal F, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild C, Ingerslev J, et al. Definitions in hemophilia. Recommendation of the scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Thromb Haemost. 2001;85(3):560.

4. Mikaelsson M, Oswaldsson U. Assaying the circulating factor VIII activity in hemophilia A patients treated with recombinant factor VIII products. Semin Thromb Hemost. 2002;28(3):257‑64.

5. Données démographiques : Hémophilies A et B [Internet]. Réseau Francecoag - Assistance Publique - Hôpitaux de Marseille. 2017 [cité 20 déc 2016]. Disponible sur: https://www.francecoag.org/SiteWebPublic/public/stats/stats_page.jsp?stat2=on&stat3=on

6. Sébahoun G. Hématologie clinique et biologique. 2e édition. Rueil-Malmaison: Arnette; 2005. 578 p.

7. Sampol J, Arnoux D, Boutière B. Manuel d'hémostase. Paris: Editions scientifiques et médicales Elsevier; 1995. 772 p.

8. Stonebraker JS, Bolton-Maggs PHB, Soucie JM, Walker I, Brooker M. A study of variations in the reported haemophilia A prevalence around the world. Haemophilia. 2010;16(1):20‑32.

9. Stonebraker JS, Bolton-Maggs PHB, Michael Soucie J, Walker I, Brooker M. A study of variations in the reported haemophilia B prevalence around the world. Haemophilia. 2012;18(3):e91-94.

10. Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, et al. Characterization of the human factor VIII gene. Nature. 1984;312(5992):326‑30.

11. Peake I. The molecular basis of haemophilia A. Haemophilia. 1998;4(4):346‑9.

12. Zanolini D, Merlin S, Feola M, Ranaldo G, Amoruso A, Gaidano G, et al. Extrahepatic sources of factor VIII potentially contribute to the coagulation cascade correcting the bleeding phenotype of mice with hemophilia A. Haematologica. 2015;100(7):881‑92.

13. Fay PJ. Activation of factor VIII and mechanisms of cofactor action. Blood Rev. 2004;18(1):1‑15.

14. Tuddenham EG, Cooper DN, Gitschier J, Higuchi M, Hoyer LW, Yoshioka A, et al. Haemophilia A: database of nucleotide substitutions, deletions, insertions and rearrangements of the factor VIII gene. Nucleic Acids Res. 1991;19(18):4821‑33.

15. Suttie JW. Synthesis of vitamin K-dependent proteins. FASEB J. 1993;7(5):445‑52.

16. Schmidt AE, Bajaj SP. Structure-function relationships in factor IX and factor IXa. Trends Cardiovasc Med. 2003;13(1):39‑45.

17. Lillicrap D. The molecular basis of haemophilia B. Haemophilia. 1998;4(4):350‑7.

18. Rallapalli PM, Kemball-Cook G, Tuddenham EG, Gomez K, Perkins SJ. An interactive mutation database for human coagulation factor IX provides novel insights into the phenotypes and genetics of hemophilia B. J Thromb Haemost. 2013;11(7):1329‑40.

19. Hoffman M, Monroe DM. A Cell-based Model of Hemostasis. Thromb Haemost. 2001;85(6):958‑65.

20. Hoffman M. Remodeling the blood coagulation cascade. J Thromb Thrombolysis. 2003;16(1‑2):17‑20.

21. Srivastava A, Brewer AK, Mauser-Bunschoten EP, Key NS, Kitchen S, Llinas A, et al. Guidelines for the management of hemophilia. Haemophilia. 2013;19(1):e1-47.

22. Aronstam A, Rainsford SG, Painter MJ. Patterns of bleeding in adolescents with severe haemophilia A. Br Med J. 1979;1:469‑70.

23. van Dijk K, Fischer K, van der Bom JG, Grobbee DE, van den Berg HM. Variability in clinical phenotype of severe haemophilia: the role of the first joint bleed. Haemophilia. 2005;11(5):438‑43.

24. Pulles AE, Mastbergen SC, Schutgens REG, Lafeber FPJG, van Vulpen LFD. Pathophysiology of hemophilic arthropathy and potential targets for therapy. Pharmacol Res. 2016;192‑9.

25. Manco-Johnson MJ, Abshire TC, Shapiro AD, Riske B, Hacker MR, Kilcoyne R, et al. Prophylaxis versus Episodic Treatment to Prevent Joint Disease in Boys with Severe Hemophilia. N Engl J Med. 2007;357(6):535‑44.

26. Gouw SC, van der Bom JG, Ljung R, Escuriola C, Cid AR, Claeyssens-Donadel S, et al. Factor VIII products and inhibitor development in severe hemophilia A. N Engl J Med. 2013;368(3):231‑9.

27. Key NS. Inhibitors in congenital coagulation disorders. Br J Haematol. 2004;127(4):379‑91.

28. Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé. Développement des inhibiteurs et prise en charge chez les patients hémophiles traités par Facteur VIII ou IX d'origine plasmatique ou recombinante. Saint-Denis; 2006 p. 1‑69.

29. Scharrer I, Bray GL, Neutzling O. Incidence of inhibitors in haemophilia A patients--a review of recent studies of recombinant and plasma-derived factor VIII concentrates. Haemophilia. 1999;5(3):145‑54.

30. Gouw SC, van der Bom JG, Auerswald G, Ettinghausen CE, Tedgård U, van den Berg HM. Recombinant versus plasma-derived factor VIII products and the development of inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A: the CANAL cohort study. Blood. 2007;109(11):4693‑7.

31. Fischer K, Lassila R, Peyvandi F, Calizzani G, Gatt A, Lambert T, et al. Inhibitor development in haemophilia according to concentrate. Four-year results from the European HAemophilia Safety Surveillance (EUHASS) project. Thromb Haemost. 2015;113(5):968‑75.

32. Goudemand J, Rothschild C, Demiguel V, Vinciguerrat C, Lambert T, Chambost H, et al. Influence of the type of factor VIII concentrate on the incidence of factor VIII inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A. Blood. 2006;107(1):46‑51.

33. Iorio A, Halimeh S, Holzhauer S, Goldenberg N, Marchesini E, Marcucci M, et al. Rate of inhibitor development in previously untreated hemophilia A patients treated with plasma-derived or recombinant factor VIII concentrates: a systematic review. J Thromb Haemost. 2010;8(6):1256‑65.

34. Sécurité transfusionnelle [Internet]. Institut national de la transfusion sanguine. [cité 20 déc 2016]. Disponible sur: http://www.ints.fr/SangTransfSecurite.aspx

35. Urwin PJM, Mackenzie JM, Llewelyn CA, Will RG, Hewitt PE. Creutzfeldt-Jakob disease and blood transfusion: updated results of the UK Transfusion Medicine Epidemiology Review Study. Vox Sang. 2016;110(4):310‑6.

36. Collins PW, Blanchette VS, Fischer K, Björkman S, Oh M, Fritsch S, et al. Break-through bleeding in relation to predicted factor VIII levels in patients receiving prophylactic treatment for severe hemophilia A. J Thromb Haemost. 2009;7(3):413‑20.

37. Fischer K, van der Bom JG, Mauser-Bunschoten EP, Roosendaal G, Prejs R, de Kleijn P, et al. The effects of postponing prophylactic treatment on long-term outcome in patients with severe hemophilia. Blood. 2002;99(7):2337‑41.

38. Nilsson IM, Berntorp E, Löfqvist T, Pettersson H. Twenty-five years' experience of prophylactic treatment in severe haemophilia A and B. J Intern Med. 1992;232(1):25‑32.

39. VIDAL : La Base de données en ligne des prescripteurs libéraux [Internet]. [cité 12 janv 2017]. Disponible sur: https://www.vidal.fr/

40. European Medicines Agency [Internet]. [cité 12 janv 2017]. Disponible sur: http://www.ema.europa.eu/ema/

41. Björkman S, Oh M, Spotts G, Schroth P, Fritsch S, Ewenstein BM, et al. Population pharmacokinetics of recombinant factor VIII: the relationships of pharmacokinetics to age and body weight. Blood. 2012;119(2):612‑8.

42. Björkman S, Berntorp E. Pharmacokinetics of coagulation factors: clinical relevance for patients with haemophilia. Clin Pharmacokinet. 2001;40(11):815‐32.

43. Björkman S. Pharmacokinetics of plasma-derived and recombinant factor IX - implications for prophylaxis and on-demand therapy. Haemophilia. 2013;19(6):808‐13.

44. Hacker MR, Geraghty S, Manco-Johnson M. Barriers to compliance with prophylaxis therapy in haemophilia. Haemophilia. 2001;7(4):392‐6.

45. Mahlangu J, Powell JS, Ragni MV, Chowdary P, Josephson NC, Pabinger I, et al. Phase 3 study of recombinant factor VIII Fc fusion protein in severe hemophilia A. Blood. 2014;123(3):317‐25.

46. Mullins ES, Stasyshyn O, Alvarez-Román MT, Osman D, Liesner R, Engl W, et al. Extended half-life pegylated, full-length recombinant factor VIII for prophylaxis in children with severe haemophilia A. Haemophilia. 2017;23(2):238‐46.

47. Pasi KJ, Fischer K, Ragni M, Nolan B, Perry D, Kulkarni R, et al. Long-term safety and efficacy of extended-interval prophylaxis with recombinant factor IX Fc fusion protein (rFIXFc) in subjects with haemophilia B. Thromb Haemost. 2017;117(3):508‐18.

48. Young G, Collins PW, Colberg T, Chuansumrit A, Hanabusa H, Lentz SR, et al. Nonacog beta pegol (N9-GP) in haemophilia B: A multinational phase III safety and efficacy extension trial (paradigm^{TM}4). Thromb Res. 2016;141:69‐76.

49. Young G, Mahlangu JN. Extended half-life clotting factor concentrates: results from published clinical trials. Haemophilia. 2016;22 Suppl 5:25‐30.

50. Pipe SW. New therapies for hemophilia. Hematol Am Soc Hematol Educ Program. 2016;2016(1):650‐6.

51. Ivens IA, Baumann A, McDonald TA, Humphries TJ, Michaels LA, Mathew P. PEGylated therapeutic proteins for haemophilia treatment: a review for haemophilia caregivers. Haemophilia. 2013;19(1):11‐20.

52. Stidl R, Fuchs S, Bossard M, Siekmann J, Turecek PL, Putz M. Safety of PEGylated recombinant human full-length coagulation factor VIII (BAX 855) in the overall context of PEG and PEG conjugates. Haemophilia. 2016;22(1):54‐64.

53. Magdelaine-Beuzelin C, Ohresser M, Watier H. Neonatal Fc receptor, key control of immunoglobulins biodistribution. Med Sci MS. 2009;25(12):1053‐6.

54. Metzner HJ, Pipe SW, Weimer T, Schulte S. Extending the pharmacokinetic half-life of coagulation factors by fusion to recombinant albumin. Thromb Haemost. 2013;110(5):931‐9.

55. Dumont JA, Liu T, Low SC, Zhang X, Kamphaus G, Sakorafas P, et al. Prolonged activity of a recombinant factor VIII-Fc fusion protein in hemophilia A mice and dogs. Blood. 2012;119(13):3024‐30.

56. Nazeef M, Sheehan JP. New developments in the management of moderate-to-severe hemophilia B. J Blood Med. 2016;7:27‑38.

57. Carcao M. Changing paradigm of prophylaxis with longer acting factor concentrates. Haemophilia. 2014;20 Suppl 4:99‑105.

58. Konkle BA, Stasyshyn O, Chowdary P, Bevan DH, Mant T, Shima M, et al. Pegylated, full-length, recombinant factor VIII for prophylactic and on-demand treatment of severe hemophilia A. Blood. 2015;126(9):1078‑85.

59. EMA. Workshop report: Characterisation of new clotting factor concentrates (FVIII, FIX) with respect to potency assays used for labelling and testing of post infusion samples [Internet]. 2014 [cité 1 mars 2017]. Disponible sur: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news_and_events/ events/2013/09/event_detail_000777.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c3

60. Santagostino E, Negrier C, Klamroth R, Tiede A, Pabinger-Fasching I, Voigt C, et al. Safety and pharmacokinetics of a novel recombinant fusion protein linking coagulation factor IX with albumin (rIX-FP) in hemophilia B patients. Blood. 2012;120(12):2405‑11.

61. Peyvandi F, Oldenburg J, Friedman KD. A critical appraisal of one-stage and chromogenic assays of factor VIII activity. J Thromb Haemost. 2016;14(2):248‑61.

62. Kitchen S, Jennings I, Makris M, Kitchen DP, Woods TL, Walker ID. Factor VIII assay variability in postinfusion samples containing full length and B-domain deleted FVIII. Haemophilia. 2016;22(5):806‑12.

63. Cid AR, Calabuig M, Cortina V, Casaña P, Haya S, Moret A, et al. One-stage and chromogenic FVIII:C assay discrepancy in mild haemophilia A and the relationship with the mutation and bleeding phenotype. Haemophilia. 2008;14(5):1049‑54.

64. Kitchen S, Signer-Romero K, Key NS. Current laboratory practices in the diagnosis and management of haemophilia: a global assessment. Haemophilia. 2015;21(4):550‑7.

65. Mikaelsson M, Oswaldsson U, Sandberg H. Influence of phospholipids on the assessment of factor VIII activity. Haemophilia. 1998;4(4):646‑50.

66. Ingerslev J, Jankowski MA, Weston SB, Charles LA, ReFacto Field Study Participants. Collaborative field study on the utility of a BDD factor VIII concentrate standard in the estimation of BDDr Factor VIII:C activity in hemophilic plasma using one-stage clotting assays. J Thromb Haemost. 2004;2(4):623‑8.

67. Pouplard C, Caron C, Aillaud MF, Ternisien C, Desconclois C, Dubanchet A, et al. The use of the new ReFacto AF Laboratory Standard allows reliable measurement of FVIII:C levels in ReFacto AF mock plasma samples by a one-stage clotting assay. Haemophilia. 2011;17(5):e958-962.

68. Pouplard C, Ternisien C, Desconclois C, Lasne D, Aillaud MF, Caron C. Discrepancies between one stage assay and chromogenic substrate assay in patients treated with recombinant or plasma-derived FVIII and usefulness of a specific standard in ReFacto AF(®) -treated patients. Haemophilia. 2016;

69. Kitchen S, Gray E, Mertens K. Monitoring of modified factor VIII and IX products. Haemophilia. 2014;20 Suppl 4:36‐42.

70. Sommer JM, Buyue Y, Bardan S, Peters RT, Jiang H, Kamphaus GD, et al. Comparative field study: impact of laboratory assay variability on the assessment of recombinant factor IX Fc fusion protein (rFIXFc) activity. Thromb Haemost. 2014;112(5):932‐40.

71. Wilmot HV, Hogwood J, Gray E. Recombinant factor IX: discrepancies between one-stage clotting and chromogenic assays. Haemophilia. 2014;20(6):891‐7.

72. Sommer JM, Moore N, McGuffie-Valentine B, Bardan S, Buyue Y, Kamphaus GD, et al. Comparative field study evaluating the activity of recombinant factor VIII Fc fusion protein in plasma samples at clinical haemostasis laboratories. Haemophilia. 2014;20(2):294‐300.

73. Pickering W, Hansen M, Kjalke M, Ezban M. Factor VIII chromogenic assays can be used for potency labeling and postadministration monitoring of N8-GP. J Thromb Haemost. 2016;14(8):1579‐87.

74. Hillarp A, Bowyer A, Ezban M, Persson P, Kitchen S. Measuring FVIII activity of glycopegylated recombinant factor VIII, N8-GP, with commercially available one-stage clotting and chromogenic assay kits: a two-centre study. Haemophilia. 2017;

75. Gu JM, Ramsey P, Evans V, Tang L, Apeler H, Leong L, et al. Evaluation of the activated partial thromboplastin time assay for clinical monitoring of PEGylated recombinant factor VIII (BAY 94-9027) for haemophilia A. Haemophilia. 2014;20(4):593‐600.

76. Bulla O, Poncet A, Alberio L, Asmis LM, Gähler A, Graf L, et al. Impact of a product-specific reference standard for the measurement of a PEGylated rFVIII activity: the Swiss Multicentre Field Study. Haemophilia. 2017;

77. Turecek PL, Romeder-Finger S, Apostol C, Bauer A, Crocker-Buqué A, Burger DA, et al. A world-wide survey and field study in clinical haemostasis laboratories to evaluate FVIII:C activity assay variability of ADYNOVATE and OBIZUR in comparison with ADVATE. Haemophilia. 2016;22(6):957‐65.

78. Bowyer AE, Hillarp A, Ezban M, Persson P, Kitchen S. Measuring factor IX activity of nonacog beta pegol with commercially available one-stage clotting and chromogenic assay kits: a two-center study. J Thromb Haemost. 2016;14(7):1428‐35.

79. Sørensen MH, Andersen S, Ezban M. Factor IX-deficient plasma spiked with N9-GP behaves similarly to N9-GP post-administration clinical samples in N9-GP ELISA and FIX activity assays. Haemophilia. 2015;21(6):832‐6.

80. Rosén P, Rosén S, Ezban M, Persson E. Overestimation of N-glycoPEGylated factor IX activity in a one-stage factor IX clotting assay owing to silica-mediated premature conversion to activated factor IX. J Thromb Haemost. 2016;14(7):1420‐7.

81. Kitchen S, Tiefenbacher S, Gosselin R. Factor Activity Assays for Monitoring Extended Half-Life FVIII and Factor IX Replacement Therapies. Semin Thromb Hemost. 2017;43(3):331‑7.

82. Pouplard C, Trossaert M, Le Querrec A, Delahousse B, Giraudeau B, Gruel Y. Influence of source of phospholipids for APTT-based factor IX assays and potential consequences for the diagnosis of mild haemophilia B. Haemophilia. 2009;15(1):365‑8.

83. Kihlberg K, Strandberg K, Rosén S, Ljung R, Astermark J. Discrepancies between the one-stage clotting assay and the chromogenic assay in haemophilia B. Haemophilia. 2017;23(4):620‑7.

84. Dodt J, Hubbard AR, Wicks SJ, Gray E, Neugebauer B, Charton E, et al. Potency determination of factor VIII and factor IX for new product labelling and postinfusion testing: challenges for caregivers and regulators. Haemophilia. 2015;21(4):543‑9.

85. Kitchen S, Blakemore J, Friedman KD, Hart DP, Ko RH, Perry D, et al. A computer-based model to assess costs associated with the use of factor VIII and factor IX one-stage and chromogenic activity assays. J Thromb Haemost. 2016;14(4):757‑64.

Vu, le Président du Jury,
(tampon et signature)

Vu, le Directeur de Thèse,
(tampon et signature)

Vu, le Doyen de la Faculté,

NOM : LLASERA **PRÉNOM : Elsa**

Titre de Thèse :

Hémophilie : l'arrivée des « long acting » va-t-elle modifier nos pratiques biologiques ?

RÉSUMÉ

Actuellement, les dosages des facteurs VIII (FVIII) et IX (FIX) sont majoritairement réalisés par une méthode chronométrique (OSA) basée sur le temps de céphaline activée (APTT). L'intérêt pour leurs dosages par méthode chromogénique (CSA) est renforcé par les résultats discordants observés depuis l'arrivée de nouveaux traitements à demi-vie prolongée, les « long acting », qui peuvent se comporter différemment des FVIII et FIX conventionnels plasmatiques ou recombinants. Les performances des réactifs chromogéniques Biophen® FVIII:C (Hyphen) et Rox Factor IX® (Rossix) sur ACL TOP sont satisfaisantes et permettent d'envisager leur utilisation en pratique courante pour le dosage du FVIII ou FIX chez les hémophiles substitués. Concernant les « long acting », nous confirmons les discordances selon le réactif APTT utilisé et selon la méthode OSA ou CSA employée. Du fait de ces discordances retrouvées nous proposons que la méthode CSA soit privilégiée pour le suivi des patients substitués par rFVIII. Concernant le suivi des patients traités par rFIX « long acting », dans l'attente d'une solution optimale qui pourrait être le développement de la méthode CSA, il est important pour chaque laboratoire de valider son réactif APTT.

MOTS-CLÉS

HÉMOPHILIE – MÉTHODE CHROMOGÉNIQUE – METHODE CHRONOMETRIQUE-REACTIFS APTT – FVIII – FIX - LONG ACTING – DISCORDANCES