

UNIVERSITE DE NANTES
Faculté de Médecine de Nantes

**Etude phénotypique et génotypique
de patients hémophiles A modérés ou atténués
avec anomalie qualitative :
rapports structure / fonction du facteur VIII**

THESE DE DOCTORAT
Ecole doctorale CHIMIE BIOLOGIE
Discipline : Biologie Médecine - Santé
Spécialité : Hématologie Biologique

Présentée et soutenue publiquement par

Marc TROSSAËRT

Le 11 juin 2008 à Nantes
devant le jury ci dessous :

Président : Pr Jenny GOUDEMAND

Rapporteurs : Pr Jenny GOUDEMAND
Pr Thomas LECOMPTE
Dr Roseline d'OIRON

Examineur : Pr Bernard PLANCHON

Directeur : Dr Edith FRESSINAUD

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
A. Etude bibliographique	
A.I Le facteur VIII	
- A.I.1 Le gène	6
- A.I.2 Synthèse, sécrétion et structure protéique	6
- A.I.3 Interactions facteur VIII / facteur Willebrand	14
- A.I.4 Activation / inactivation du facteur VIII	16
- A.I.5 Activité cofacteur dans le complexe tenase	19
- A.I.6 Clairance	22
A.II Aspects biologiques et moléculaires de l'hémophilie A	
- A.II.1 Tests globaux	26
- A.II.2 Dosages du facteur VIII	
▪ A.II.2.1 Dosages de l'activité du facteur VIII (FVIII:C)	
- A.II.2.1.1 Méthode en 1 temps (FVIII:C 1 temps)	26
- A.II.2.1.2 Méthodes en 2 temps (FVIII:C 2 temps)	28
- A.II.2.1.3 Méthodes chromogéniques	29
▪ A.II.2.2 Dosages antigéniques du facteur VIII (FVIII:Ag)	30
- A.II.3 Intérêt de l'étude du rapport FVIII:C/FVIII:Ag	30
- A.II.4 Intérêt de l'étude du rapport FVIII:C/facteur Willebrand antigène (VWF:Ag)	31
- A.II.5 Aspects moléculaires	31
▪ A.II.5.1 Remaniements géniques	32
▪ A.II.5.2 Mutations ponctuelles	32
▪ A.II.5.3 Délétions	34
▪ A.II.5.4 insertions / duplications	35
▪ A.II.5.5 Génétique et risque d'inhibiteur	35
- A.II.6 La thrombinographie	
▪ A.II.6.1 Principes	36
▪ A.II.6.2 Corrélations clinico-biologiques	39
A.III Discordances entre le résultat du dosage du FVIII:C 1 temps et 2 temps	40
- A.III.1 Discordance avec taux de FVIII:C 1 temps supérieur au taux de FVIII:C 2 temps	41
- A.III.2 Discordance avec taux de FVIII:C 1 temps inférieur au taux de FVIII:C 2 temps	46

B. Méthodologie et résultats

B.I Chapitre I :

Phénotype et génotype dans l'hémophilie A modérée/atténuée : prévalence des discordances FVIII:C 1 temps / Chromo et 29 nouvelles mutations

- B.I.1 Choix des méthodes de dosage du FVIII:C
 - B.I.1.1 Méthode chromométrique en 1 temps 50
 - B.I.1.2 Méthodes chromogéniques 51
- B.I.2 Analyse génétique
 - B.I.2.1 DHPLC 53
 - B.I.2.2 Séquençage direct 55

Phenotype and genotype in moderate/mild hemophilia A: prevalence of discrepancy between one-stage and chromogenic Factor VIII activity and twenty-nine novel mutations

Soumis pour publication 58

B.II Chapitre II :

Intérêt de la thrombinographie dans l'évaluation du risque hémorragique chez les patients hémophiles A mineurs avec discordance de dosage de l'activité du FVIII. 85

Mild haemophilia A with factor VIII assay discrepancy: using thrombin generation assay to assess the bleeding phenotype.

J Thromb Haemost, Volume 6 Issue 3 Page 486-493, March 2008 94

C. Discussion générale et conclusion 103

D. Bibliographie 109

E. Annexes 124

ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BiP	<i>immunoglobulin-Binding Protein</i>
COP I et II	<i>COatomer Protein I et II</i>
DHPLC	<i>Denaturing High Performance Liquid Chromatography</i>
ERGIC	<i>Endoplasmic Reticulum Golgi Intermediate Compartment</i>
ETP	<i>Endogenous Thrombin Potential</i>
FIX	Facteur IX
FT	Facteur Tissulaire
FV	Facteur V
FVa	Facteur V activé
FVIII	Facteur VIII
FVIII:Ag	Facteur VIII antigène
FVIII:C	Activité coagulante du facteur VIII
FVIII:C 1 temps	Activité coagulante du facteur VIII évalué par technique chronométrique en 1 temps
FVIII:C 2 temps	Activité coagulante du facteur VIII évalué par technique chronométrique en 2 temps
FVIII:C Chromo	Activité coagulante du facteur VIII évalué par technique chromogénique
FVIIIa	Facteur VIII activé
FIX	Facteur IX
FIXa	Facteur IX activé
FX	Facteur X
FXa	Facteur X activé
GRP78	<i>Glucose-Regulated Proteins 78</i>
ISTH	<i>International Society of Thrombosis and Haemostasis</i>
LMAN	<i>Lectin MANnose binding 1</i>
LRP1	<i>Low-density-lipoprotein Receptor-related Protein 1</i>
MVP	Microvésicules plaquettaires
pb	paire de bases
PCa	Protéine C activée
PCR	Polymerase Chain Reaction
Plasma + PM	Plasma + <i>Platelet Membrane</i>
PPP	Plasma Pauvre en Plaquettes
PRP	Plasma Riche en Plaquettes
MCFD2	<i>Multiple Coagulation Factor Deficiency 2</i>
SSC	<i>Scientific SubCommittee</i>
TCA	Temps de Céphaline avec Activateur
TP	Taux de Prothrombine
VP	Vésicules Phospholipidiques
VWF	<i>Von Willebrand Factor</i>
VWF:Ag	<i>Von Willebrand Factor Antigen</i>
VWF:RCo	Activité cofacteur de la ristocétine du facteur Willebrand
WFH	<i>World Federation of Haemophilia</i>

Introduction

L'hémophilie est une maladie génétique liée au chromosome X dont l'incidence est de 1/10 000 naissances ou 1/5 000 naissances de garçons. A ce titre, elle peut être qualifiée comme « maladie rare ». Ainsi, sur le site du « portail des maladies rares et des médicaments orphelins », c'est à dire *orphanet* (www.orpha.net), l'hémophilie est définie par le Pr Y. Sultan comme : « *Une maladie hétérogène liée à l'absence de protéine du système de coagulation. Deux facteurs de coagulation sont concernés : le facteur VIII (FVIII), pour l'hémophilie A ; le facteur IX (FIX) pour l'hémophilie B. L'autre élément d'hétérogénéité est lié à l'activité du facteur en cause. L'activité biologique de ces facteurs s'évalue en pourcentage de la normale. L'individu normal étant considéré comme ayant 100% d'activité. Si l'activité est indétectable (<1% - soit < 1 UI/dL), il s'agit d'hémophilie sévère ; si l'activité est comprise entre 1 et 5%, l'hémophilie est dite modérée ; au delà et jusqu'à 30% l'hémophilie est mineure (ou atténuée)* » (Sultan 2002). L'hémophilie A est 6 fois plus fréquente que l'hémophilie B. Classiquement, les manifestations cliniques de ce trouble de la coagulation sont similaires qu'il s'agisse d'un déficit en FVIII ou FIX. Il s'agit essentiellement d'hémorragies et de leurs conséquences. Leur gravité est directement proportionnelle à l'importance du déficit du facteur de coagulation concerné. La localisation de ces hémorragies est très caractéristique de l'hémophilie :

- Les hémarthroses ou hémorragies intra-articulaires :

Elles représentent 70% des accidents hémorragiques et atteignent toutes les articulations mais avec une préférence pour les genoux, les chevilles, les coudes et les hanches. Chez l'hémophile sévère, le traumatisme déclenchant est parfois si discret qu'il peut passer inaperçu. Chez l'hémophile modéré ou mineure, les hémarthroses sont le plus souvent post-traumatiques.

- Les hématomes ou hémorragies intra-musculaires :

Ils représentent 10 à 20% des hémorragies et peuvent se manifester dans tous les muscles spontanément ou à l'occasion de traumatismes minimes.

Toutes les autres localisations sont néanmoins possibles : hématuries, hémorragies nasales ou digestives. Les hémorragies du système nerveux central font suite à un traumatisme qui peut être passé inaperçu, surtout chez l'enfant.

Peu ou pas traitée, la répétition des hémarthroses et des hématomes aboutit à un handicap moteur très invalidant avec destruction articulaire (arthropathie hémophilique)

associant raideur, déformation articulaires et parfois paralysies. Il est démontré que l'évolution est d'autant plus favorable que le patient reçoit une thérapeutique adaptée et précoce. Ce traitement repose essentiellement sur l'administration intraveineuse de concentrés de FVIII ou FIX selon l'hémophilie ; plusieurs produits antihémophiliques sont disponibles sur le marché français. Ils sont soit purifiés à partir du plasma humain, soit fabriqués par génie génétique (médicaments recombinants) (Goudemand 1997, Sultan 2002).

Grâce au clonage complet du gène du FVIII en 1984 par Gitschier *et al* (Gitschier, *et al* 1984), la possibilité d'une approche génétique dans l'exploration de l'hémophilie A a permis une amélioration considérable de notre compréhension de cette pathologie, aussi bien en terme moléculaire, nucléotidique que protéique. Il était bien entendu possible de diagnostiquer l'hémophilie A par les dosages fonctionnels et antigéniques de la protéine du FVIII, et de différencier ainsi déficits qualitatifs et quantitatifs. Le clonage du gène du FVIII et le développement des techniques de biologie moléculaire ont permis de déterminer les mutations faux-sens ou non-sens, les insertions/délétions et les autres anomalies génétiques qui permettent maintenant une meilleure définition des anomalies moléculaires chez une grande majorité des patients.

L'histoire d'Alain :

Il s'agit d'un patient de 27 ans adressé début 1999 au Centre Régional de Traitement de l'Hémophilie de Nantes pour « troubles de la coagulation ». Son histoire médicale révèle des antécédents hémorragiques :

- Vers l'âge de 6 ans : apparition d'hématomes multiples ; a eu une procédure invasive du genou droit (probablement ponction évacuatrice) pour hémarthrose. Nombreuses épistaxis dans l'enfance.
- 14 Juillet 1998 : Hémarthrose très importante du genou droit à l'occasion d'un tournoi de football. Cette hémarthrose est initialement traitée par immobilisation. Devant l'absence d'amélioration, une ponction évacuatrice est effectuée qui retrouve un épanchement sanguin. Malgré ce traitement la récupération est incomplète.
- 17 Août 1998 : Une arthroscopie diagnostique est pratiquée. Celle-ci s'avère normale mais une très importante hémarthrose post opératoire vient compliquer cette intervention et une ponction évacuatrice est nécessaire 2 jours après l'intervention. Le bilan de coagulation préopératoire (Taux de Prothrombine (TP) normal (78%) et Temps de Céphaline avec Activateur (TCA) normal

(Patient = 35 sec pour un témoin à 30 sec, rapport malade/témoin = 1,18). Un nouveau bilan est effectué et confirme la normalité de ce bilan. Devant l'absence d'amélioration, une nouvelle intervention est effectuée pour « évacuer les caillots ». Devant les récurrences hémorragiques qualifiées comme « incontrôlables » par le chirurgien, deux nouvelles reprises chirurgicales pour évacuation de l'épanchement sont nécessaires et finalement le patient peut sortir à domicile le 23 septembre 1998. Les séquelles orthopédiques sont importantes et un mi-temps thérapeutique est envisagé...

Un bilan complet d'hémostase est effectué et retrouve les résultats suivants :

TP	93%
TCA Malade	34 sec
TCA Témoin	32 sec
Fibrinogène	1,95 g/L
FVIII	66%
FIX	89%
Facteur XI	73%

Ces résultats sont considérés comme normaux et le patient est adressé à notre consultation pour exploration complémentaire.

Une maladie de Willebrand et une thrombopathie sont éliminées. Devant le profil clinique évocateur d'une hémophilie mineure et malgré la normalité des dosages de FVIII et FIX, d'autres techniques de dosages de ces facteurs sont demandées. En effet, dans l'immense majorité des laboratoires, le dosage de l'activité de FVIII (FVIII:C) est dosé par technique chronométrique en 1 temps. Cependant, cette même année, Keeling *et al* avaient décrit un patient hémophile A mineur présentant des complications hémorragiques importantes, dont le dosage de FVIII:C était strictement normal en technique chronométrique en 1 temps mais pour lequel le diagnostic avait pu être posé grâce à d'autres techniques de dosage : méthode chronométrique en 2 temps et méthode chromogénique (Keeling, *et al* 1999).

L'exploration de l'hémostase est poursuivie avec un nouveau prélèvement à deux reprises et retrouve les résultats suivants :

	Mars 1999	Juin 1999
FVIII:C (chronométrique 1 temps)	87%	66%
FVIII:C (chromogénique)	37%	26%
Facteur Willebrand Antigène (VWF:Ag)	130%	110%

Le diagnostic d'hémophilie est alors fortement suspecté et une étude génétique du gène du FVIII est donc réalisée montrant une mutation au niveau l'exon 15, dans le domaine A3 : p.Arg1749His. Le diagnostic d'hémophilie A mineure est alors définitivement retenu.

Ce cas clinique est présenté sous forme d'un poster à la XXIV^e réunion de la World Federation of Haemophilia (WFH) à Montréal en 2000 (Fressinaud, *et al* 2000).

Il nous a alors naturellement semblé intéressant de mieux caractériser notre population d'hémophiles A modérés ou mineurs/atténués, aussi bien au niveau phénotypique que génotypique pour mieux appréhender les mécanismes moléculaires responsables de ces anomalies du FVIII.

A.

ETAT DES LIEUX

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

ETAT DES LIEUX - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

A.I - Le facteur VIII

A.I.1 - Le gène du facteur VIII

Le gène du FVIII est localisé sur le bras long du chromosome X (Xq28). Il a été cloné entre 1982 et 1984 par Gitschier *et al* (Gitschier 2004, Gitschier 2006, Gitschier, *et al* 1984) (figure 1). Il est constitué de 26 exons et 25 introns non codants (Al Dieri, *et al* 2002). L'ensemble du gène représente environ 0,1% du chromosome.

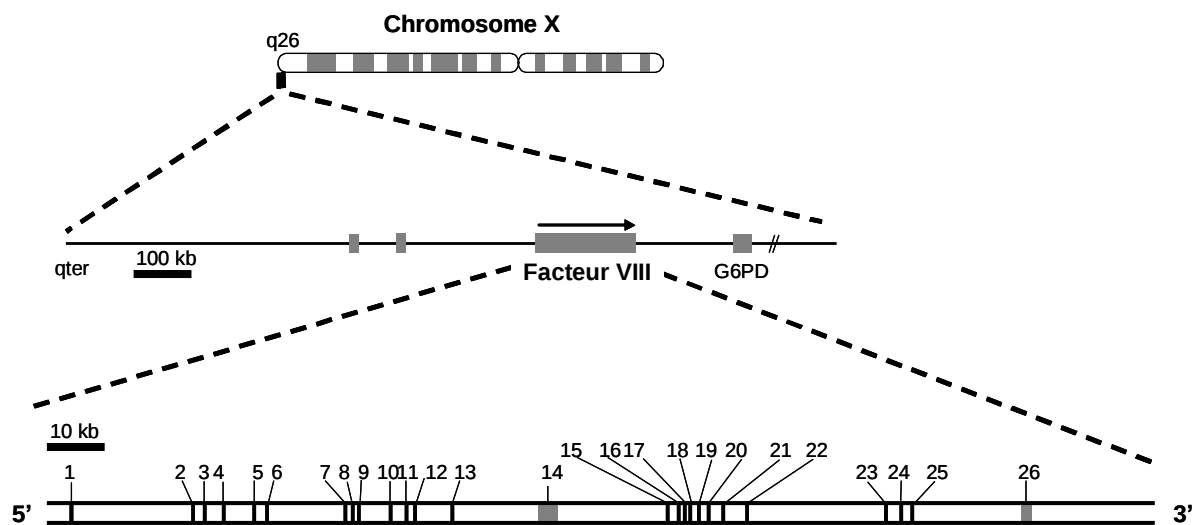


Figure 1 : représentation schématique de la localisation chromosomique et de la structure du gène du facteur VIII (Kemball-Cook, *et al* 1998).

L'analyse des gènes montre que 24 exons ont une longueur qui varie de 69 à 262 paires de base (pb) et que les deux autres (exons 14 et 26) sont particulièrement étendus, contenant respectivement 3106 et 1958 pb. L'ARN messager (ARNm) a une longueur d'environ 9 kb et conduit à une protéine précurseur de 2351 acides aminés.

A.I.2 - Synthèse, sécrétion et structure du facteur VIII

Le site de synthèse du FVIII est resté incertain pendant longtemps mais, même si de l'ARNm de FVIII a été détecté dans d'autres types cellulaires, la localisation majoritaire la plus probable semble être l'hépatocyte (Wion, *et al* 1985, Zelechowska, *et al* 1985). De plus, les effets bénéfiques de la transplantation hépatique chez un hémophile A

sévère affirment le rôle majeur du foie dans la production du FVIII (Bontempo, *et al* 1987).

La protéine comporte 2332 acides aminés précédés par 19 résidus hydrophobes qui constituent le peptide signal indispensable et éliminé au niveau du réticulum endoplasmique lors de la sécrétion (Kaufman, *et al* 1988).

Le FVIII contient 3 domaines (figure 2) : un domaine A répété 3 fois, un domaine B central et un domaine C répété 2 fois (Toole, *et al* 1992, Vehar, *et al* 1984). Il existe également de petites régions peptidiques (a1, a2 et a3), riches en acides aminés acides, qui réunissent les domaines les uns aux autres.

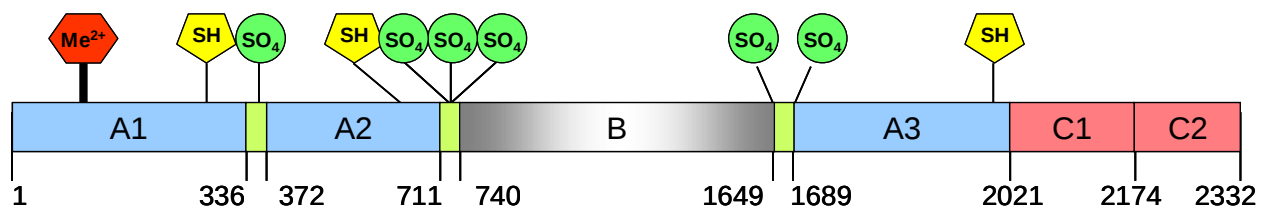


Figure 2 : structure du facteur VIII

Les nombres associés aux résidus représentent des acides aminés délimitant les domaines. Les domaines A sont représentés en bleu et les domaines C en rose, les inter-régions a1, a2 et a3 en vert. La localisation approximative des résidus cystéine (SH) ou tyrosine sulfatée (SO₄) ainsi que le site de fixation supposé pour les ions métalliques sont identifiés. D'après Fay (Fay 2004).

Ensuite, le sort du FVIII à partir de ce moment n'est, à ce jour, pas complètement élucidé : outre l'addition de glycosylations sur les résidus asparagine, une proportion non négligeable de la molécule synthétisée est associée étroitement à une protéine « chaperonne » appelée BiP (pour *immunoglobulin-Binding Protein*) ou GRP78 (pour *Glucose-Regulated Proteins 78*), issue du réticulum endoplasmique et le FVIII pourrait ne pas être exprimé complètement (Dorner, *et al* 1987, Munro and Pelham 1986). Cette liaison à la protéine BiP apparaît comme médiée par la partie C-terminale du domaine A1 du FVIII (Marquette, *et al* 1995).

A partir de cette étape, la sécrétion du FVIII nécessite un mécanisme de transport intracellulaire du réticulum endoplasmique vers le système de Golgi par l'intermédiaire d'une protéine appelée LMAN1 (*Lectin MANnose binding 1*), connue également sous le nom de ERGIC-53 (*Endoplasmic Reticulum Golgi Intermediate Compartment* de

53 kDa) (Miao, *et al* 2004). LMAN1 est une protéine transmembranaire ayant la capacité de former des hexamères, et chez laquelle on retrouve donc de nombreuses caractéristiques propres aux récepteurs de transport de glycoprotéines. Il a été démontré que cette sécrétion est totalement associée à la synthèse du facteur V (FV) de la coagulation. Grâce à l'étude génétique de patients présentant un déficit combiné constitutionnel en FV et FVIII, une seconde protéine a été identifiée comme essentielle dans ce processus de sécrétion : la MCFD2 (pour *multiple coagulation factor deficiency 2*) (Zhang, *et al* 2003). MCFD2 possède dans son extrémité C-terminale deux domaines « EF-hand » (domaine *helix-turn-helix* connu pour induire des liaisons protéine-protéine calcium dépendante) suggérant une association possible dans un complexe avec LMAN1 (Vinciguerra, *et al* 2007).

Depuis la découverte de ces 2 protéines (LMAN1 et MCFD2), on considère aujourd'hui que la co-sécrétion de FV et FVIII est médiée selon un phénomène complexe illustré dans la figure 3 :

- LMAN1 se présente sous forme d'un hexamère dans le compartiment ERGIC;
- LMAN1 et MCFD2 forment un complexe équimolaire ;
- LMAN1 reconnaît les protéines contenant des résidus mannose à la surface et le complexe LMAN1–MCFD2 prend donc en charge les FV et FVIII ;
- LMAN1 interagit avec des protéines de transport COP II (COatomer Protein II) recouvrant des vésicules du secteur ERGIC et prenant en charge le complexe LMAN1–MCFD2-facteur V/VIII pour son transport vers l'appareil de Golgi (Vinciguerra, *et al* 2007) ;
- à son arrivée dans l'appareil de Golgi, le complexe LMAN1–MCFD2-facteur V/VIII se dissocie des COP II pour libérer les FV et FVIII dans l'appareil de Golgi et le complexe LMAN1–MCFD2 va alors se fixer sur d'autres protéines de surface des vésicules de transport rétrograde : les protéines COP I, qui vont recycler ce complexe vers le réticulum endoplasmique, permettant sa réutilisation pour transporter d'autres molécules FV/FVIII.

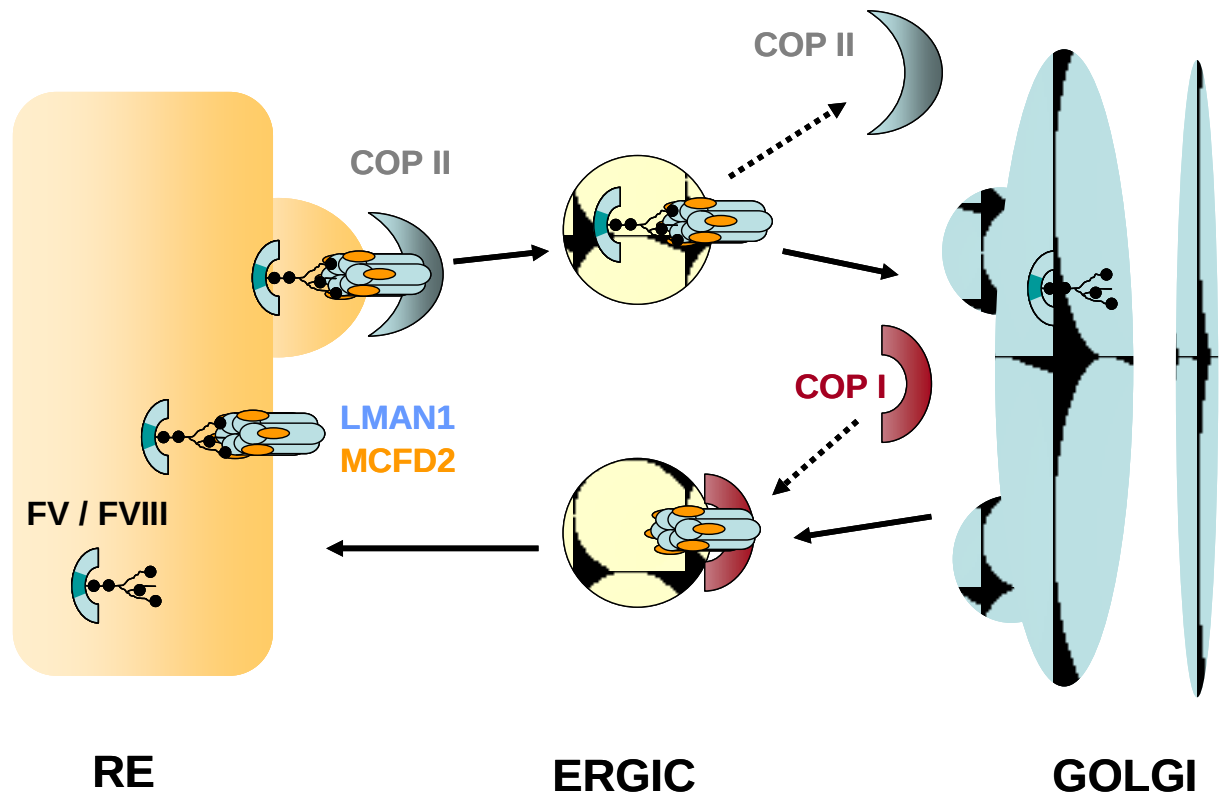


Figure 3 : Modèle de transport des facteurs V et VIII entre le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi, selon Zhang et Ginsburg (Zhang and Ginsburg 2004). LMAN1 = *lectin mannose binding 1*), MCFD2 = *multiple coagulation factor deficiency 2*, COPI et COPII = *Coatomer proteins I et II*), ERGIC = *endoplasmic reticulum Golgi intermediate compartment*.

Ce mode de transport des FV et FVIII n'est probablement pas le seul existant, puisqu'en cas d'anomalie de LMAN-1 ou MCFD2, le déficit en FV et FVIII n'est que partiel. D'autres voies de sécrétion de ces facteurs de la coagulation existeraient donc, mais celle impliquant le complexe LMAN1–MCFD2 semble être majoritaire (Vinciguerra, *et al* 2007).

Dans l'appareil de Golgi, les molécules synthétisées, en particulier celles de FVIII, subissent de nouvelles glycosylations, des sulfatations de tyrosines et de nombreux clivages protéolytiques au niveau du domaine B de la protéine (Kaufman, *et al* 1988, Pittman, *et al* 1992). Les parties médianes et carboxyterminales du domaine B contiennent en effet un motif (Arg-X-X-Arg) qui est identique aux motifs reconnus par les protéases intracellulaires de la famille des « *subtilisine-like* ». Ce motif se localise en Arg1313-X-X-Arg1648 et induit un clivage enzymatique de la protéine dans le domaine B ou au niveau de la jonction B-A3 au moment de sa sécrétion (Fay, *et al*

1986). Un hétérodimère est donc sécrété constitué de 2 chaînes : une chaîne lourde de taille variable (A1-a1-A2-a2-B) de 90 kDa quand seuls les domaines A1-A2 sont présents jusqu'à 220 kDa (quand le domaine B est présent intégralement) et une chaîne légère (a3-A3-C1-C2) de 76 kDa (figure 4).

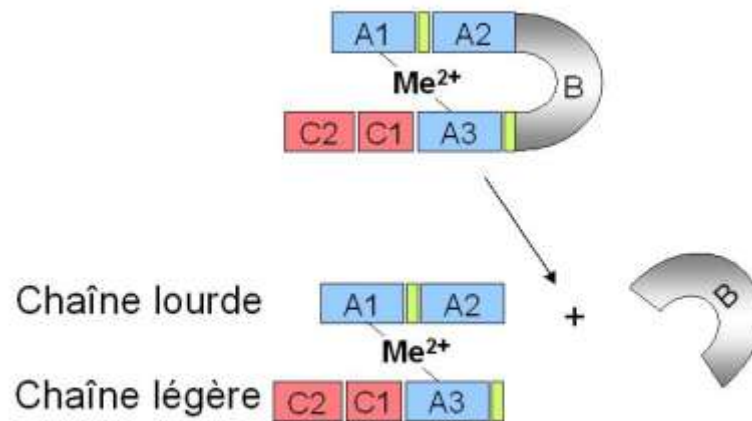


Figure 4 : Synthèse du facteur VIII sous forme d'un hétérodimère (chaîne lourde de 90 à 220 kDa + chaîne légère de 76 kDa) après clivage enzymatique du domaine B.

Enfin, le FVIII contient également des ponts di-sulfures dans les domaines A et C ainsi que de nombreuses tyrosines, qualifiées d'essentiels pour une bonne fonctionnalité du FVIII (Pittman, *et al* 1992).

Les études par cristallographie ont permis de mieux comprendre la structure de la protéine et en particulier les interactions entre les différents domaines.

Dans un premier temps, une méthode en cristallisation 2D sur des monocouches procoagulantes de phospholipides a été effectuée pour résoudre la structure du FVIII lorsqu'il est lié aux phospholipides (Brisson, *et al* 1994, Stoylova, *et al* 1999). Secondairement, en 2002, Stoylova-McPhie propose une modélisation électronique avec une structure en 3D du FVIII lié à la membrane phospholipidique (figure 5) (Stoylova-McPhie, *et al* 2002). Ce travail a permis de construire un modèle de complexe FVIII/FIXa et de préciser les sites de liaison avec les autres protéines (voir plus loin). Très récemment, Shen *et al* ont rapporté les résultats d'une étude cristallographique complète du FVIIIa d'origine recombinante (Shen, *et al* 2008). Ces résultats sont relativement comparables pour ce qui concerne la structure des 3 domaines A mais

discordants pour les domaines C (rotation d'environ 90° du domaine C1 entre le modèle de Stoilova-McPhie et celui de Shen). A ce jour, la configuration définitive n'est donc pas disponible.

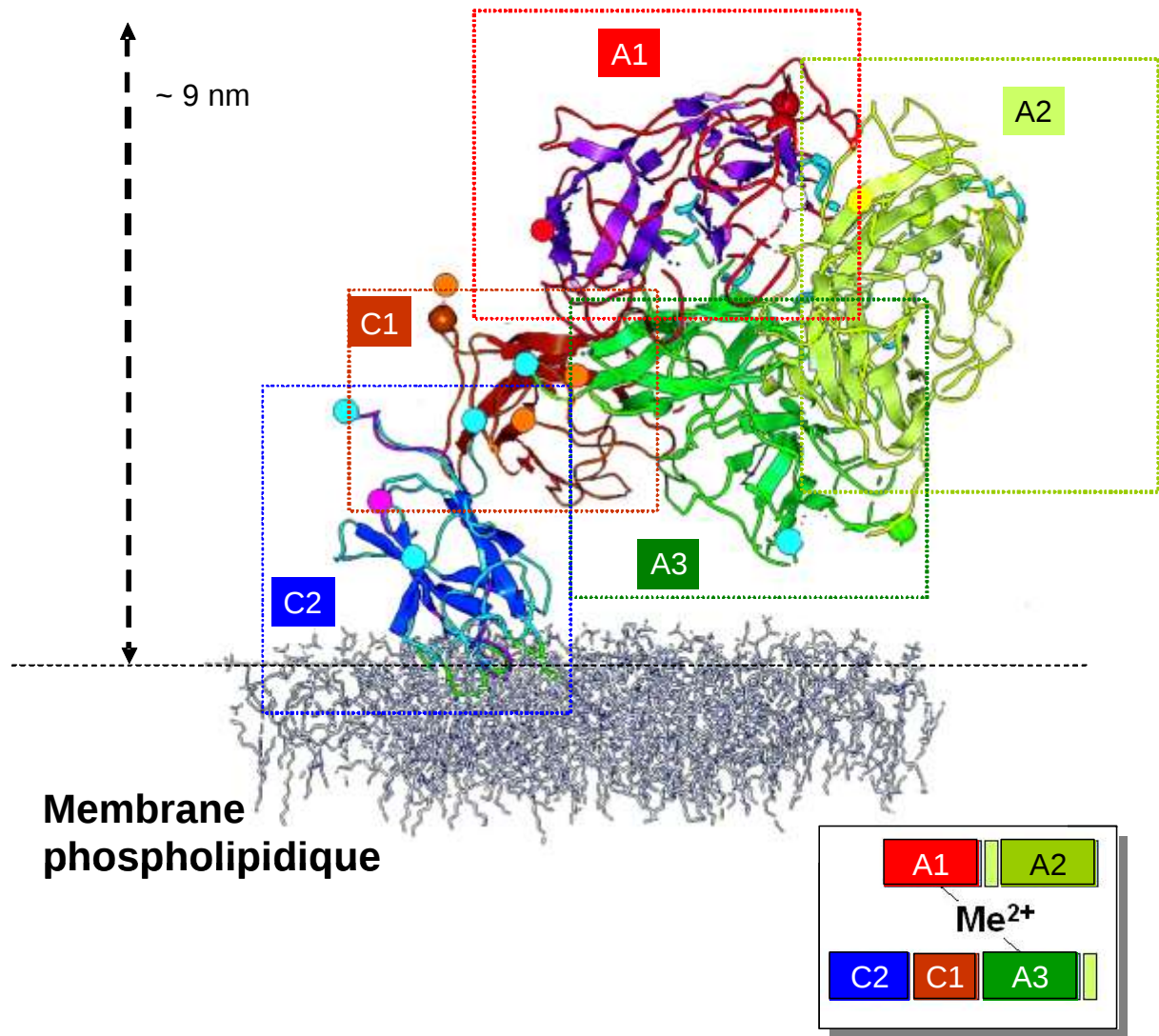


Figure 5 : ce modèle montre une protéine de facteur VIII ancrée dans la membrane phospholipidique. Le domaine A1 (résidus 1-336) est en rouge, le domaine A2 (résidus 373-711) est en jaune et le domaine A3 (résidus 1690-2020) est en vert. Les domaines C1 (résidus 2021-2173) et C2 (résidus 2174-2332) sont respectivement en orange et en bleu (d'après Stoilova-McPhie *et al* (Stoilova-McPhie, *et al* 2002)).

La structure globale a une forte homologie avec le facteur V. Cette homologie est cependant moindre pour le domaine B. Les domaines A partagent 30 à 40% de leur séquence avec celle des domaines A de la céruléoplasmine et les domaines C sont semblables à ceux des protéines qui fixent les phospholipides chargés négativement. Ces similitudes laissent penser que les régions concernées sont essentielles (Ortel, *et al* 1984, Stubbs, *et al* 1990). Des études cristallographiques ont pu illustrer ces homologies entre le FVIII, le FV et la céruléoplasmine à partir de l'étude cristallographique de FVIII recombinant (figure 6).

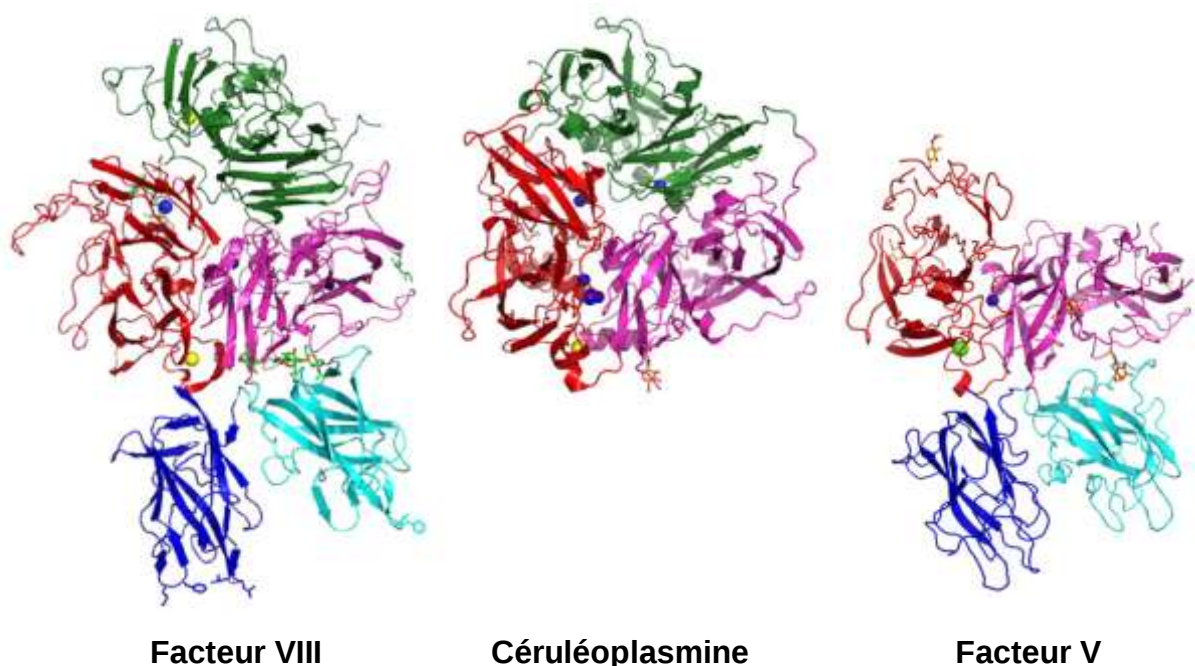


Figure 6 : Représentation par cristallographie des molécules de FVIII, céruléoplasmine et FV d'après Shen *et al* (Shen, *et al* 2008).

Les homologies des domaines A avec ceux de la céruléoplasmine suggèrent fortement que le FVIII est une protéine contenant une liaison non-covalente, dépendante d'un ion métallique bivalent qui relierait ces 2 chaînes entre A1 et A3. Le rôle de cette liaison, la nature du métal et les acides aminés impliqués dans cette liaison ne sont pas à ce jour complètement confirmés. Il a été démontré pour le FV et plus récemment pour le FVIII que ces deux molécules contiennent environ une mole de cuivre par mole de protéine (Bihoreau, *et al* 1994, Tagliavacca, *et al* 1997). La nature de cette fixation au cuivre, définie comme « de type-1 », apparaît être en relation avec les « blue copper-containing oxydases » retrouvées chez les bactéries, les plantes et dans les

mitochondries des mammifères (Malkin and Malmstrom 1970, Ryden and Hunt 1993). Quel est le rôle de ce cuivre ? L'ion Cu^{2+} paraît fixer le domaine A1, probablement au niveau des résidus His267, Cys310, His315 et Met320, mais la coordination exacte et la valence de cet ion Cu^{2+} est encore l'objet d'incertitude (Kaufman, *et al* 1997, Pemberton, *et al* 1997). Un ion cuivre unique (Cu^{2+}) a pu être identifié dans une molécule de FVIII et différents sites de liaison ont d'abord été proposés dans les domaines A1 et A3 (Fay 2004). En effet, en se basant sur des études utilisant des chaînes isolées du FVIII *in vitro*, un seul ion cuivre s'avère insuffisant pour générer du FVIII fonctionnel. En revanche, l'utilisation isolée d'ions calcium ou manganèse permettrait l'acquisition d'un FVIII actif (Fay 1988). En fait, ces liaisons métalliques ne contribueraient pas seulement à une meilleure affinité entre les chaînes protéiques mais plutôt, en modulant la conformation de l'hétérodimère, à une potentialisation de l'activité cofacteur du FVIII. Les sites de fixation pour l'ion métallique se situeraient dans le domaine A1 (résidus 108 à 124) par analogie au site proposé pour le FV.

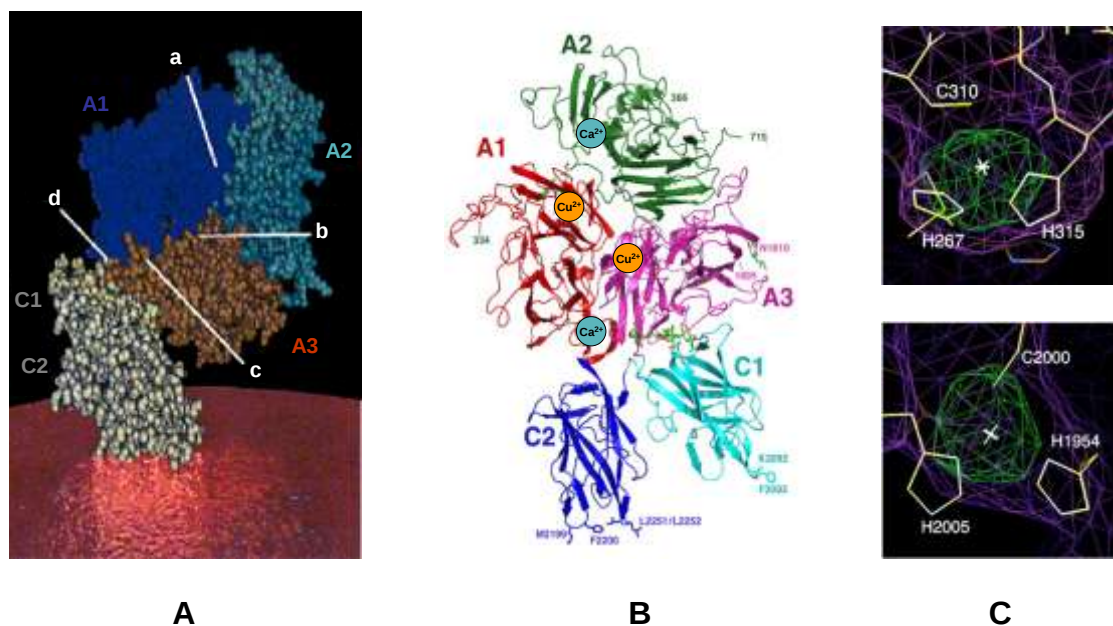


Figure 7 : Sites de liaisons potentiels pour les ions Cu^{2+} , Ca^{2+} et Mn^{2+} .

- A :** Site de type 1 pour le cuivre dans A1 ; b = site de type 2 pour le cuivre entre A1 et A3 ; c = site de type 1 dans A3 et sites pour le calcium et le manganèse en A1 (d'après Fay, 2005) (Fay and Jenkins 2005)
- B :** Localisation des 2 ions Cu^{2+} (orange) et Ca^{2+} (bleu) sur la structure représenté par Shen *et al* .
- C :** Gros plan sur les acides aminés impliqués dans l'organisation des sites de localisation des ions Cu^{2+} . Dans le domaine A1 (en haut) et dans le domaine A3 (en bas)

Globalement, comme l'avait suggéré Fay en 2005 (Fay and Jenkins 2005) (figure 7A) et comme les études cristallographiques publiées par Shen *et al* (Shen, *et al* 2008) (Figure 7B) l'ont confirmé, 4 ions métalliques peuvent être identifiés : un ion Ca^{2+} dans le domaine A1 (coordonné par Glu110, Asp116, Asp125 et Glu126), un second ion Ca^{2+} dans le domaine A2 (Asp538 et Asp542), un ion Cu^{2+} dans le domaine A3 (coordonné par His1954 et His2005 et Cys2000) et un second Cu^{2+} dans le domaine A1 (His267 et His315 et Cys310) comme illustré dans la figure 7C (Shen, *et al* 2008). Ces localisations sont conformes à ce qui est observé dans la céruléoplasmine. Seules les trois premières sont identifiées dans le FV.

A.I.3 - Interactions facteur VIII / facteur Willebrand

Le facteur Willebrand (VWF) joue un rôle important dans l'augmentation de la concentration de FVIII au niveau de la lésion vasculaire puisque, dès sa sécrétion, le FVIII se lie à cette protéine (Meyer, *et al* 1991, Ruggeri 1999). Il s'agit d'une liaison de forte affinité (K_d aux alentours de 0,3 nM) essentiellement médiée par des acides aminés situés au niveau de la chaîne légère du FVIII (figure 8). Le FVIII lié au VWF ne peut se lier aux surfaces phospholipidiques de la plaquette activée et, ainsi, ne peut s'intégrer dans le complexe tenase. Sa liaison au VWF le protège aussi de l'effet inactivateur de la protéine C activée (PCa) et de l'effet activateur du facteur X (FX) activé (FXa). En revanche, l'action de la thrombine est conservée. Ces effets sont probablement liés à la nécessité d'une surface phospholipidique pour l'action du FXa et de la PCa alors que la thrombine n'en a pas besoin.

La région acide a3 (séquence N-terminale du domaine A3) contient un site essentiel pour la liaison au VWF (résidus 1649 à 1689) (Leyte, *et al* 1991, Saenko and Scandella 1997, Vlot, *et al* 1995). Ces sites chevauchent ceux qui sont nécessaires à la liaison du FVIII avec les phospholipides anioniques ou les plaquettes activées. La liaison du FVIII avec le VWF pourrait donc permettre d'éviter une association prématurée au niveau de la surface thrombogène. Cette liaison permet également une meilleure demi-vie, une stabilité protéique accrue et une protection du FVIII contre la protéolyse (Fay 2004, Saenko, *et al* 1999a). Certaines études ont suggéré un rôle important des résidus 2170 à 2312 du domaine C2. Des travaux récents suggèrent plutôt que la chaîne a3-C1-C2, peut-être dans sa quasi-totalité, constitue une surface étendue d'interaction avec le VWF (Stoilova-McPhie, *et al* 2002), certaines régions restant néanmoins stratégiques

telles les 2 tyrosines sulfatées en positions 1664 et 1680, comme l'ont confirmé des études de mutagenèse dirigée (Higuchi, *et al* 1990).

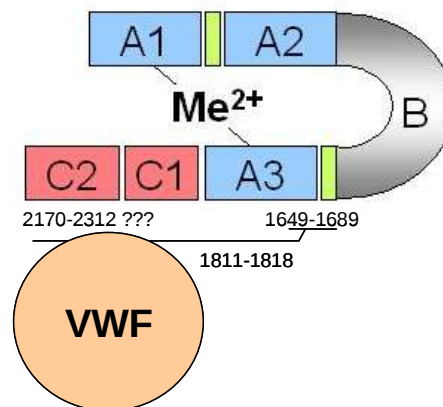


Figure : 8 : Schéma de l'interaction du facteur VIII et du facteur Willebrand

Dans le domaine C1, les résidus Ile2098, Ser2119 et surtout Arg2150 sont impliqués dans l'interaction avec le VWF (Jacquemin, *et al* 2000a, Jacquemin, *et al* 2000b, Peerlinck, *et al* 1999). Des mutations des acides aminés Arg2116, Ser2119 et Tyr 2105 induisent d'ailleurs une hémophilie A et ces résidus semblent donc en relation directe ou indirecte avec le VWF. Il existe 2 groupes de résidus hydrophobes sur le domaine C1, situés sur partie opposée aux domaines A : Ile2080, Leu2171, Ile2145 et Leu2107 dans le premier secteur et Leu2123, Val2125, Met2124, Ile2102, Phe2068 et Phe2127 dans le second secteur. De tels groupes hydrophobes sont souvent des sites de reconnaissance protéique (Stoilova-McPhie, *et al* 2002). Le second secteur pourrait intéresser la liaison au VWF puisqu'il est proche de l'Arg2150.

La présence d'un site de fixation pour le VWF dans le domaine C2 est discutée mais Stoilova-McPhie *et al* (Stoilova-McPhie, *et al* 2002) suggèrent que la séquence C-terminale 2303-2332 pourrait former un site d'interaction pour les phospholipides et le VWF comme le suggérait Foster *et al* (Foster, *et al* 1990). Son modèle de cristallographie montre que les extrémités 2303 et 2332 de cette séquence sont exposées à distance de la membrane phospholipidique mais les résidus 2313-2315 sont insérés dans la bi-couche phospholipidique. Il y a de fortes présomptions pour penser que les sites pour les phospholipides et pour le VWF soient identiques avec une forte implication de la région 2303-2332. La mutation Arg2307Gln induit d'ailleurs une hémophilie A atténuée liée avec anomalie de liaison du FVIII au VWF (Liu, *et al* 2000).

Les modèles cristallographiques sont donc particulièrement utiles car ils confirment que le domaine a3 et les résidus du domaine C1 associés à la liaison VWF sont tous exposés à la surface et donc disponibles dans une région proche de la membrane. Comme l'avaient suggéré les études de la liaison du FV activé (FVa) à la membrane phospholipidique, il paraît donc aujourd'hui démontré que la liaison du FVIII au VWF *via* les régions a3, C1 et C2 interfèrent grossièrement avec la fixation du FVIII (qui s'effectue *via* le domaine C2), jusqu'à ce que l'activation du FVIII par le clivage en Arg1689 par la thrombine élimine le peptide a3 et la liaison au VWF (figure 9).

A.I.4 – Activation / inactivation du FVIII

Le FVIII est activé par la thrombine par des clivages protéolytiques au niveau des 2 chaînes, légère et lourde (figure 9) :

- dans la chaîne lourde, les clivages surviennent au niveau de l'arginine Arg372 pour séparer le domaine A1 et A2 et au niveau de l'arginine Arg740 à la jonction entre le domaine A2 et le domaine B, aboutissant à la libération du domaine B ;
- dans la chaîne légère, il existe également un clivage sur Arg1689 (spécifique de la thrombine) dans la région N-terminale du domaine A3, permettant la création d'une nouvelle extrémité N-terminale.

Les clivages en Arg740, Arg372 et Arg1689 sont nécessaires à une activation complète du FVIII. Il en résulte un hétérotrimère (fragment A1 de 50 kDa lié par une liaison cuivre à la chaîne légère de 73 kDa et sous unité A2 libre lié à A1 par une faible liaison ionique). Le rôle essentiel de 2 de ces résidus Arginine est également démontré par l'étude moléculaire de deux hémophiles sévères qui n'ont aucun FVIII:C mesurable mais un dosage de FVIII:Ag normal et qui présentent des mutations faux-sens de ces résidus. Le FVIII peut également être clivé par le FXa avec des clivages survenant en Arg372.

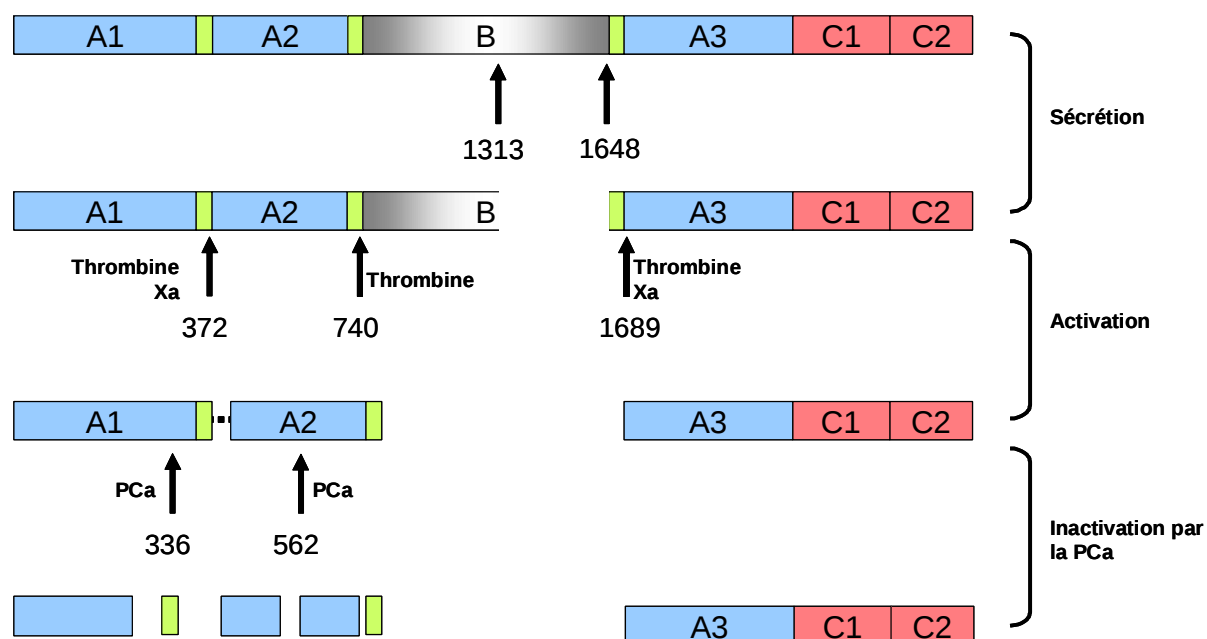


Figure 9 : Représentation linéaire du facteur VIII avec localisation des sites de clivage.

Au niveau intracellulaire, le facteur VIII est clivé à l'intérieur du domaine B (Arg1313 et Arg1648) pour aboutir à une chaîne lourde d'environ 200 kDa et une chaîne légère de 76 kDa. Les sites d'activation du facteur VIII par la Thrombine ou le FXa et d'inactivation par la PCa sont indiqués, d'après Lenting *et al* (Lenting, *et al* 1998)

Après ces clivages et l'activation du FVIII, le domaine B et le VWF seront libérés et les sites de liaison du FVIII pour les phospholipides procoagulants de la plaquette sont exposés facilitant ainsi la formation du complexe tenase sur la surface des plaquettes activées.

L'activation du FVIII induit une augmentation rapide mais très transitoire de l'activité procoagulante (multipliée par 50). L'inactivation du FVIIIa résulte de 2 processus différents : la dégradation protéolytique et la dissociation spontanée :

- La dégradation protéolytique est modulée par le système de la protéine C. La PCa clive le FVIIIa au niveau de Arg336 dans la sous-unité A1 puis en Arg562 dans la sous-unité A2. Le résidu Arg562 appartient également au site de liaison au FIXa (voir plus loin). Les interactions au sein du complexe tenase montrent donc que les capacités d'inactivation sont complexes : ainsi, le FIXa protège le FVIIIa du clivage en Arg562 par la PCa et le FX protège le FVIIIa du clivage en Arg336. Cependant, la protéine S abolit l'effet protecteur du FX et, en l'absence de FIXa, stimule le clivage en Arg562 (O'Brien, *et al* 2000).

- La dissociation spontanée résulte de la grande instabilité du FVIIIa et peut être attribuée à la faiblesse de l'association entre le domaine A2 et le dimère A1/A3-C1-C2 dont le Kd (0,2 $\mu\text{mol/l}$) favorise la forme dissociée.

On ne peut affirmer aujourd'hui quelle part revient à chacun des 2 phénomènes pour l'inactivation du FVIIIa. Cependant, il semble que la dissociation spontanée soit prédominante.

Il a été suggéré que la région *a1* (résidus 337-372), riche en acides aminés acides et adjacente à l'extrémité C terminale du domaine A1, interagisse avec les résidus chargés positivement de la sous-unité A2 et retienne la configuration hétérotrimérique de la protéine (Fay, *et al* 1993). La disparition de cette zone par le clivage de la PCa conduit à une dissociation de la sous-unité A2 plus rapide. Toutes ces constatations résultent d'études *in vitro*. On ne sait actuellement si ce phénomène survient *in vivo*.

Pour ce qui concerne la position des sites de clivages en 372, 740 et 1689, on peut constater que ces résidus arginines sont situés sur la partie carboxy-terminale des 3 régions « inter-domaines » *a1*, *a2* et *a3*. Ces régions contiennent également plusieurs résidus tyrosines susceptibles d'être sulfatés et qui pourraient jouer un rôle dans différents processus tels que les interactions protéiques (Michnick, *et al* 1994). La nature acide de ces inter-régions paraît essentielle. Curieusement, une délétion de *a2* conduit à une molécule qui reste activable mais nécessite plus de thrombine que la protéine sauvage sans nuire à l'activité cofacteur du FVIII. Dans ce cas, la diminution de l'activation par la thrombine est induite par une diminution de l'efficacité du clivage en Arg372 et Arg1689 (donc en dehors de l'inter-domaine *a2*), suggérant que la région *a2* influence le clivage dans des régions distantes au sein du FVIII (Lenting, *et al* 1998). L'inter-région *a1* est également impliquée dans la stabilisation de l'hétérotrimère FVIII et dans la liaison au FX (Fay 1993). En effet, si le FVIII est exclusivement clivé en Arg1689, il perd environ 75% de son activité cofacteur.

L'importance de la qualité de l'activation du FVIII pour une coagulation normale est largement démontrée par la constatation de mutations dans des hémophilies de toute sévérité. Ces mécanismes physiopathologiques seront donc revus plus loin (chapitre A.II.5.2).

A.I.5 - Activité cofacteur du FVIIIa dans le complexe tenase.

Comme le FVa dans le complexe prothrombinase, le FVIIIa a une activité cofacteur essentielle dans l'activation du FX par le FIX activé (FIXa) au sein du complexe tenase (figure 10).

In vivo, ce processus survient initialement sur la surface des plaquettes activées accumulées sur le site de la lésion vasculaire. Ces plaquettes activées exposent en effet des phospholipides procoagulants, tels que la phosphatidylsérine, sites de fixation pour les domaines Gla des facteurs vitamine K-dépendants.

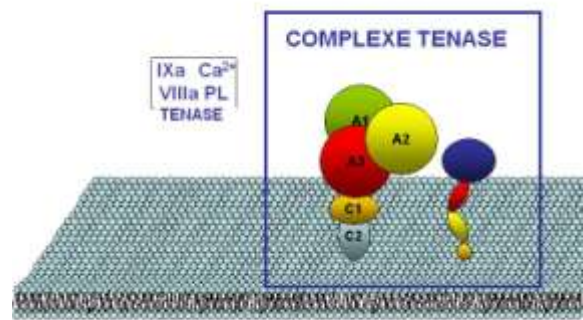


Figure 10 : Représentation schématisique
« classique » du complexe tenase.

Le clivage de la chaîne légère du FVIII et la séparation du VWF permet l'acquisition par le FVIII d'une affinité beaucoup plus importante pour la membrane plaquettaire. Lors de la formation du complexe tenase, le FX augmente d'environ 10 fois l'affinité du FIXa pour le FVIIIa. L'efficacité catalytique du FIXa est augmentée par un facteur d'environ 1000 en présence de FVIIIa comparée à celle du FIXa isolé.

Ceci est associé à une très forte augmentation de l'affinité du FX pour le FIXa en présence de phospholipides procoagulants. L'ensemble permet une protéolyse très efficace même à des concentrations très faibles de facteurs de coagulation (van Dieijen, *et al* 1981).

Au niveau moléculaire, ces interactions protéiques ont été largement étudiées. Différentes études ont montré que le domaine A3 du FVIII interagit avec la chaîne légère du FIXa et que le domaine A2 se lie à son domaine protéolytique (Lenting, *et al* 1994, O'Brien, *et al* 1995). En présence de phospholipides, cette liaison induit un changement conformationnel du FIXa, en particulier dans le domaine « protéase ». L'utilisation de peptides synthétiques a montré que la liaison du FVIII au FIXa peut être attribuée à deux séquences spécifiques (résidus 511-530 et 558-565) situées dans le domaine A2 (Fay, *et al* 1994). D'autres régions paraissent également essentielles à cette liaison : les résidus 698 à 710, au niveau de la chaîne lourde, dans la région carboxy-terminale du domaine A2 et la séquence 1811-1818 dans le domaine A3 (Lenting, *et al* 1996, Lenting, *et al* 1998). Au total, 4 séquences paraissent donc essentielles à l'interaction FVIIIa/FIXa : 511-530, 558-565, 698-710 et 1811-1818. Ces sites d'interaction entre le FVIIIa et le FIXa ont pu être précisés grâce aux travaux de modélisation de Stoilova-McPhie *et al* (Stoilovka-McPhie, *et al* 2002) qui démontrent que ces sites de fixation du FVIII sur le FIXa (511-530, 558-565 et 707-712 du domaine A2 et 1811-1818 du domaine A3) sont également exposés à la surface à une hauteur compatible avec une bonne interaction pour le domaine correspondant de la protéase FIXa et les domaines EGF (epidermal growth factor) (figure 11). Ces résultats confirment ceux de Celie *et al* qui démontrent qu'une mutation en Arg527 réduit la liaison au FIXa (Celie, *et al* 1999).

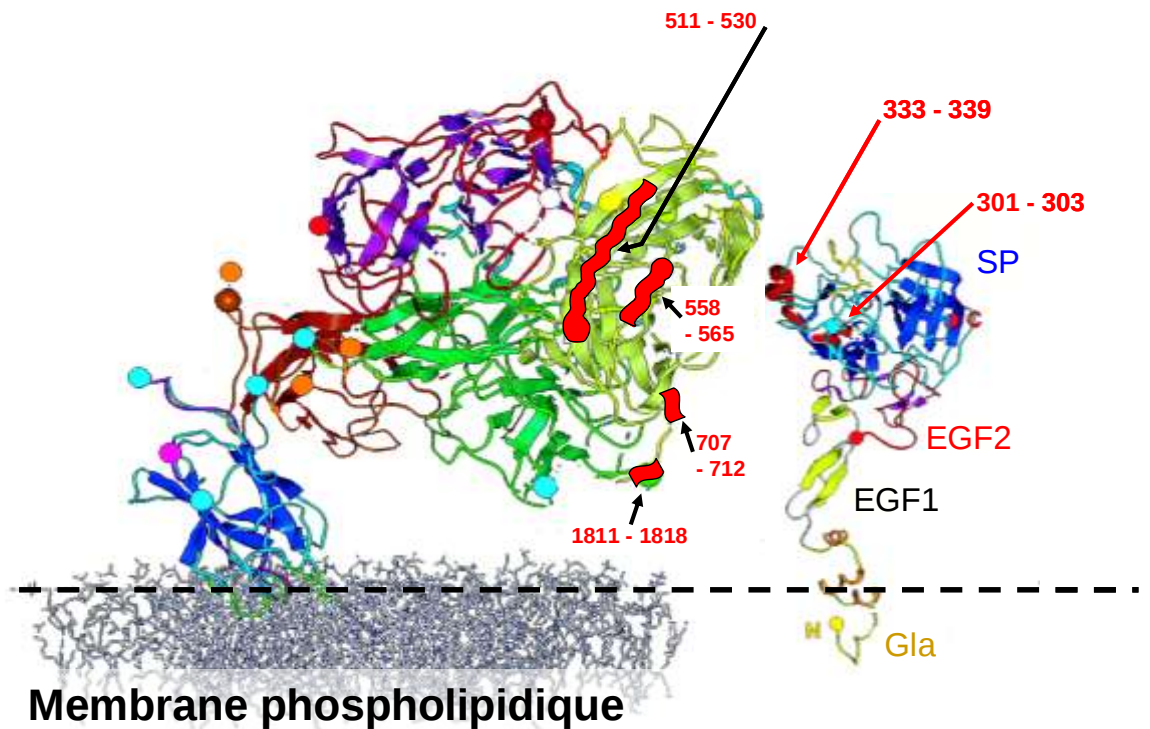


Figure 11 : Modèle du complexe facteur VIII / facteur IX activé ancré dans la membrane phospholipidique.

Les régions du FVIII impliquées dans la liaison avec le FIXa (484-509, 511-530, 558-565, 707-712, et 1811-1818) sont indiquées en rouge. A droite, la structure cristallographique du FIXa porcin est ajoutée informatiquement sur la membrane phospholipidique. Les séquences du FIXa impliquées dans la liaison au FVIII sont indiquées par des zones rouges (Stoilova-McPhie, *et al* 2002).

Plus récemment, une autre séquence du domaine A2 (482-493) a été proposée comme site de reconnaissance du FIXa (Fay and Scandella 1999, Koszelak, *et al* 2000). Les études de cristallographie n'ont pu confirmer cette hypothèse (Bajaj, *et al* 2001, Stoilova-McPhie, *et al* 2002). A ce sujet, Fay *et al* suggèrent que de discrètes différences dans les arrangements des domaines pourraient exister comme cela avait été retrouvé pour la séquence 558-565 (Fay, *et al* 2001).

Le domaine C2 a également été rapporté comme pouvant interagir avec le FXa et la thrombine. Les résidus de la séquence 2253-2270 semblent particulièrement impliqués dans l'interaction avec le FXa (Nogami, *et al* 2002). Le site d'interaction de C2 avec la thrombine pour le clivage en Arg1689, n'est pas actuellement localisé. Le modèle proposé par Stoilova-McPhie *et al* confirme l'implication de la portion C-terminale du domaine C2 (résidus 2303-2332) dans la fixation à la membrane phospholipidique et le rôle important de deux régions hydrophobes à l'intérieur de la portion N-terminale de

C2 (résidus 2199/2220 et 2251/2252) (Saenko, *et al* 2002, Stoilova-McPhie, *et al* 2002). Les résidus du domaine C2 incriminés dans l'interaction FVIII – Phospholipides restent à identifier.

L'ensemble des sites de clivage et des sites de liaison du FVIII est rappelé dans la figure 12.

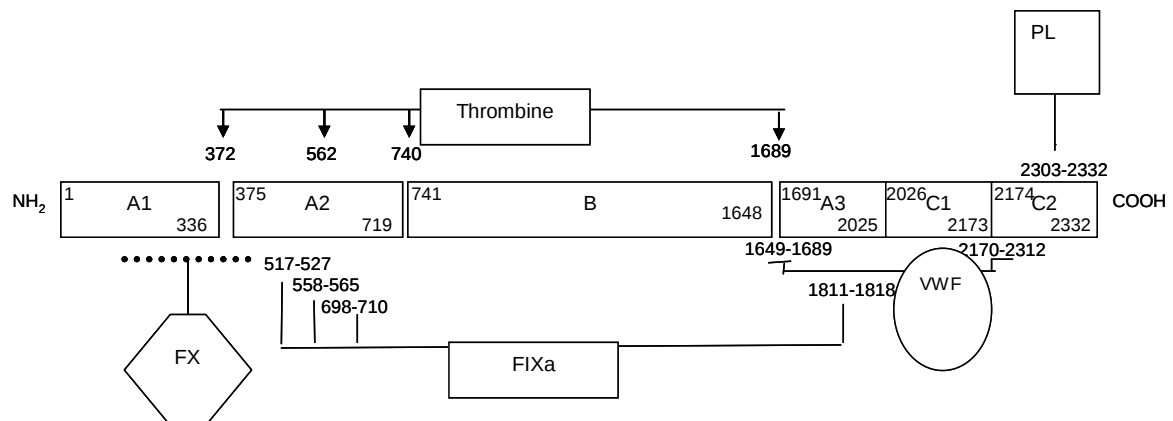


Figure 12 : Facteur VIII - sites de clivage par la thrombine et sites de liaison probable du FX, du FIXa du VWF ou des Phospholipide (PL), (d'après Oldenburg (Oldenburg, *et al* 2002)).

A.I.6 - Clairance

C'est à la fin des années 1990 que des travaux ont permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui contribuent à l'élimination du FVIII de la circulation, c'est à dire sa clairance (Lenting, *et al* 2007).

Deux équipes ont simultanément identifié la LRP1 (Low-density-lipoprotein Receptor-related Protein) comme le récepteur permettant la clairance du FVIII (Lenting, *et al* 1999, Saenko, *et al* 1999b). Curieusement, malgré l'efficacité avec laquelle la LRP1 fixe le FVIII et permet son transport vers les voies de dégradation intracellulaire, l'absence de LRP1 ne montre qu'une inhibition partielle de la dégradation du FVIII dans des modèles cellulaires (Lenting, *et al* 1999, Saenko, *et al* 1999b). Il paraît donc exister des systèmes indépendants de la LRP1 pouvant contribuer au catabolisme du FVIII. L'étude de souris génétiquement modifiées (déficit complet en LRP1 induit) a montré qu'elles présentent une demi-vie prolongée du FVIII plasmatique. De même, des études chez l'homme ont démontré que certains polymorphismes de la LRP1 (LRP1/D2080 N et

LRP1/A217 V) étaient associés à des taux augmentés de FVIII plasmatique (Cunningham, *et al* 2005, Vormittag, *et al* 2007). Parallèlement, aux récepteurs LRP1, Bovenschen *et al* ont montré que les récepteurs aux LDL interagissent avec le FVIII et modulent le taux de FVIII en association avec LRP1 (Bovenschen, *et al* 2005a).

Les protéoglycanes de type heparan-sulfates paraissent également être un élément nécessaire à la séquestration du FVIII à la surface cellulaire pour faciliter sa fixation efficace à la molécule LRP1 (Sarafanov, *et al* 2001). Parce que ces protéines sont également capables d'internaliser le FVIII, elles pourraient également constituer un mode d'endocytose du FVIII (MacArthur, *et al* 2007). De même, des études récentes ont montré que le récepteur pour l'asialoglycoprotéine est capable de fixer le FVIII. *In vitro*, cette fixation est médiée par le domaine B du FVIII (Bovenschen, *et al* 2005b). À ce jour, un intérêt physiologique de ce phénomène reste à démontrer (Lenting, *et al* 2007).

Au niveau du FVIII, plusieurs régions sont suspectes d'être des sites d'interaction avec la LRP1. Un site de faible affinité a ainsi été proposé au niveau du domaine C2 et un site de haute affinité a été localisé au niveau des résidus Arg484-Phe509 (domaine A2) et Glu1811-Lys1818 (domaine A3) (Bovenschen, *et al* 2003a, Lenting, *et al* 1999, Saenko, *et al* 1999b, Sarafanov, *et al* 2006). Ces régions ne sont pas seulement connues comme étant en étroite relation avec les sites d'interaction pour le FIX et les phospholipides, mais elles contiennent également des épitopes très largement reconnus par les inhibiteurs anti-FVIII. Il semble que le site d'interaction pour la LRP1 du domaine A2 du FVIII ne soit exposé qu'après protéolyse de la chaîne lourde (Bovenschen, *et al* 2006). Ceci suggère que l'interaction LRP1 / domaine A2 du FVIII constitue un mode de régulation qui permettrait l'inactivation et/ou l'élimination du FVIIIa sur la surface cellulaire (Lenting, *et al* 2007). En revanche, l'exposition des sites de fixation pour la LRP1 sur la chaîne légère du FVIII est indépendante de la protéolyse. A ce niveau, il existe une régulation qui s'effectue essentiellement par le biais du VWF qui interagit avec les deux extrémités de la chaîne légère du FVIII (Saenko, *et al* 2002). Cette régulation pourrait facilement s'expliquer par le fait que l'interaction FVIII/VWF est reconnue comme inhibant la fixation de la chaîne légère du FVIII aux phospholipides et au FIXa ; étant donné qu'il y a un chevauchement entre les sites de fixation pour la LRP1 et ces derniers sites de liaison, il n'est pas surprenant que le VWF interfère dans la fixation FVIII/LRP1 (Lenting, *et al* 2007). Comme nous l'avons déjà vu, lors de

l'activation du FVIII, la liaison de haute affinité avec le VWF est perdue et les sites de fixation du FVIIIa pour la LRP1 deviennent exposés.

En se basant sur les mécanismes décrits ci-dessus, il est tentant de conclure que la pharmacocinétique du FVIII n'est pas dépendante de LRP1 dans la circulation normale où le FVIII circule essentiellement sous une forme complexée au VWF, avec une chaîne lourde qui est complètement intacte (ainsi, le site de fixation pour la LRP1 dans le domaine A2 est crypté). Cependant, cette hypothèse s'oppose aux observations *in vivo* chez la souris avec taux de VWF normal où la délétion ou l'inhibition de la molécule LRP1 conduit à une élévation du taux de FVIII et à une augmentation de sa demi-vie. En effet, comment la molécule LRP1 pourrait-elle contribuer à la clairance du FVIII alors que le FVIII est solidement fixé au VWF ?

Le complexe de FVIII/VWF peut-il être éliminé *in vivo* spécifiquement par un mécanisme dépendant de la LRP1 ? Mais, le VWF n'interagit pas spécifiquement avec la LRP1 sinon celle-ci affecterait indirectement la clairance du VWF. Un tel mécanisme pourrait expliquer pourquoi le taux de VWF est modérément mais significativement augmenté chez les souris génétiquement déficitaires en LRP1 (Bovenschen, *et al* 2003b). Des études complémentaires sont nécessaires pour conclure.

Sarafanov *et al* ont proposé un autre mécanisme où le complexe FVIII/VWF serait fixé au protéoglycanes heparan-sulfates au niveau de la membrane cellulaire conduisant à une dissociation du complexe (Sarafanov, *et al* 2001). Une fois dissocié, le FVIII est transféré sur la LRP1 alors que le VWF est rendu à la circulation. Ce mécanisme pourrait être limité à certains types cellulaires (Lenting, *et al* 2007).

L'ensemble de ces mécanismes est repris dans la figure 13.

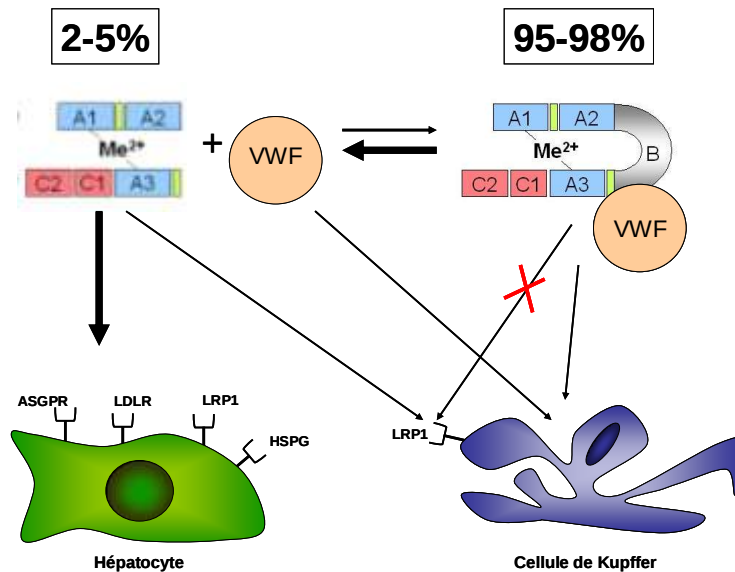


Figure 13 : élimination du facteur VIII dans le foie, d'après Lenting et al (Lenting, et al 2007)

Le facteur Willebrand (VWF) circulant est en quantité supérieure à celle du facteur VIII (FVIII). La majorité des molécules de FVIII (environ 95-98%) se trouve complexée avec le VWF. Lorsque le FVIII est complexé au VWF, il existe une inhibition de la liaison du FVIII à la LRP1. Les molécules libres de FVIII sont rapidement éliminées par l'intermédiaire de la LRP1. Il existe également une élimination médiée par les heparan-sulfates membranaires (HSPG) et les récepteurs pour les LDL (LDLR) qui peuvent également internaliser le FVIII de façon indépendante. Un autre récepteur potentiel pour le FVIII est le « asialoglycoprotein receptor (ASGPR) ». Chacun de ces récepteurs est exprimé sur l'hépatocyte alors qu'ils ne le sont que partiellement sur le macrophage. Le VWF est éliminé par une voie impliquant les cellules de Kupffer sans que les récepteurs qui en sont responsables soient aujourd'hui identifiés.

Une troisième mécanisme repose sur l'étude de l'équilibre du complexe FVIII/VWF et l'importance des constantes d'association et de dissociation (Leyte, et al 1989). Ainsi, une petite mais significative proportion de molécules de FVIII (5-8%) circule en tant que protéine libre (Noe 1996). Ainsi, la chaîne légère du FVIII (et donc le site spécifique du domaine A2 pour LRP1) qui n'est plus protégée par le VWF peut être accessible à la clairance par LRP1. Étant donné que le FVIII libre est éliminé 4 à 6 fois plus rapidement que le FVIII lié au VWF (Morfini, et al 1993), la disparition du FVIII libre est compensée par un flux continu d'association/dissociation au VWF. Il est probable que le FVIII lié au VWF (92-95%) est éliminé en même temps que ce dernier (Lenting, et al 2007).

A.II - Diagnostic biologique de l'hémophilie A

A.II.1 - Tests globaux

En tant que facteur de la coagulation appartenant à la voie endogène, un FVIII quantitativement ou qualitativement anormal induit naturellement un allongement du Temps de Céphaline avec Activateur (TCA) par diminution de l'activité cofacteur du FVIIIa. Ce test est donc le test de choix pour le dépistage de l'hémophilie A. Malheureusement, le TCA est un test extrêmement réactif-dépendant et les nombreux réactifs présents sur le marché contiennent des phospholipides de nature et de concentration variées et des activateurs différents selon les fabricants. La sensibilité de ces réactifs pour l'hémophilie A sera donc différente selon le produit utilisé (Peake, *et al* 1995).

Les réactifs utilisant le kaolin comme activateur sont particulièrement sensibles aux déficits en facteurs et donc à privilégier pour le dépistage de l'hémophilie A. Ce type de réactif reste d'ailleurs très utilisé en France dans le bilan préopératoire (26% des utilisateurs) comme le montrent les résultats des Annales du Contrôle National de Qualité des Analyses de Biologie Médicale (<http://agmed.sante.gouv.fr>).

A.II.2 - Dosages du FVIII

A.II.2.1 – Dosage de l'activité du FVIII (FVIII:C)

A.II.2.1.1 - Méthode en 1 temps (FVIII:C 1 temps) :

Cette technique est de loin la plus utilisée (figure 14). Elle est basée sur le TCA et utilise un plasma déficient en FVIII, soit issu d'un patient hémophile A sévère, soit artificiellement déplété (immunodéplétion ou destruction chimique). Selon la technique utilisée, la protéine est soit totalement absente, soit présente mais inactive.

Cette méthode a été développée dans les années 1950 et est basée sur la capacité d'un échantillon de plasma à raccourcir l'allongement du TCA d'un plasma déficient en FVIII. La correction du TCA est proportionnelle à l'activité du FVIII (FVIII:C) de l'échantillon. Dans ce test, les phospholipides sont ajoutés au plasma citraté avec un activateur (traditionnellement le kaolin) qui, en activant la membrane phospholipidique chargée négativement, permet l'activation des facteurs de la phase contact et la génération de FXa.

Avec l'addition de calcium, le FIX est activé par le facteur XI activé (FXIa) et le FXa est alors produit dans le complexe tenase de la voie endogène, dans lequel le FVIIIa sert de cofacteur. Le temps de formation du caillot de fibrine par clivage du fibrinogène par la thrombine est mesuré. Une calibration à partir de différentes dilutions d'un plasma de référence avec un taux de FVIII connu permet de calculer le dosage de FVIII:C de l'échantillon. Ce plasma de référence est dosé par rapport à un Standard International (Barrowcliffe and Kirkwood 1978). Le plus souvent, la courbe de calibration est établie en échelle double logarithmique (log) : log FVIII:C (% ou UI/dL) vs log temps de coagulation.

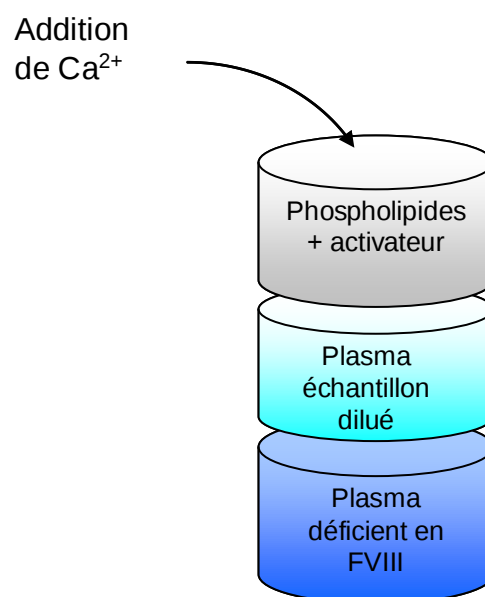


Figure 14 : Méthode en 1 temps
Schéma représentatif du dosage de FVIII:C par technique chronométrique en 1 temps.

La méthode en 1 temps présente l'avantage d'être rapide et simple à réaliser. Cependant, de nombreuses variables peuvent influencer sur les résultats : la nature des phospholipides utilisés (d'origine végétale (soja), d'origine animale (lapin), ou synthétiques) (Mikaelsson, *et al* 1998), le choix du tampon de dilution et en particulier de l'addition d'albumine (Barrowcliffe 1993), la présence de VWF dans le plasma déficient (Dawson, *et al* 1989) et le choix de l'activateur (kaolin, acide ellagique ou silice micronisée ou sous forme colloïdale) (Cinotti, *et al* 2006). Les variables préanalytiques sont également extrêmement importantes car il s'agit d'une technique très sensible à l'activation préanalytique qui peut conduire à une surestimation du FVIII:C. De plus, les anticoagulants circulants de type lupique peuvent interférer avec cette technique. Enfin, la qualité du plasma déficient intervient : il s'agit aujourd'hui de plasma déficient humain immunodéplété.

A.II.2.1.2 - Méthode en 2 temps (FVIII:C 2 temps) :

Cette méthode a également été développée dans les années 1950 et est basée sur un premier temps où on génère du FV et du FX de façon proportionnelle à l'activité de FVIII:C de l'échantillon (figure 15). Dans un second temps, on ajoute de la prothrombine et du fibrinogène, ce qui permet l'aboutissement de la coagulation. Ce temps de coagulation est mesuré pour le comparer à ceux d'une gamme de calibration établie à partir d'un plasma de référence.

Cette méthode n'utilise pas de plasma déficient en FVIII. Elle est réputée avoir une meilleure précision et une meilleure sensibilité que la méthode en 1 temps. Elle est également moins sensible aux interférences des facteurs pré-activés. Ces propriétés ont fait que la technique en 2 temps est considérée comme la technique de référence en particulier pour l'évaluation des concentrés de FVIII utilisés dans le traitement de l'hémophilie.

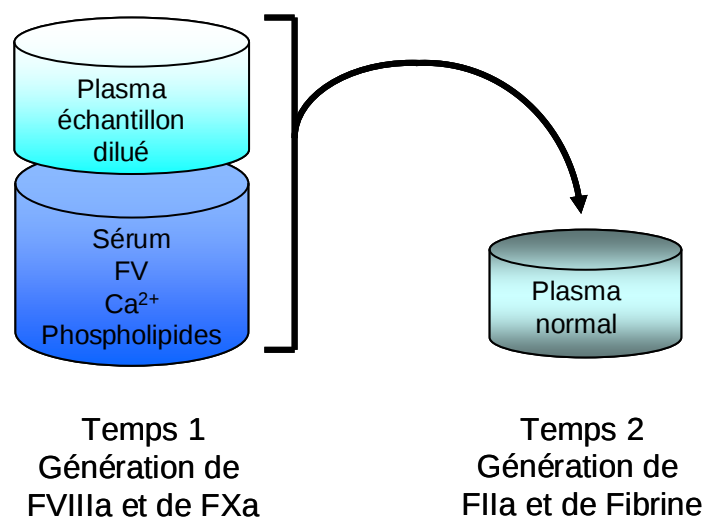


Figure 15 : Méthode chronométrique en 2 temps

Schéma représentatif du dosage de FVIII:C par technique chronométrique en 2 temps.

Autres méthodes chronométriques en 2 temps

D'autres techniques de dosages ont été proposées. Elles varient de l'utilisation d'une recalcification directe du plasma (Seghatchian and Miller-Andersson 1978) à des techniques plus sophistiquées mais anciennes utilisant des facteurs purifiés

partiellement activés et/ou utilisant parfois la mesure de la génération de thrombine (Johnson and Seegers 1954, Pudlak and E 1966).

A.II.2.1.3 - Méthodes chromogéniques (FVIII:C Chromo):

Le développement des substrats chromogéniques a permis le développement de nouvelles techniques de dosages (figure 16). Les substrats (par exemple le S2222 Benzoyl-Ile-Glu-Gly-Arg-pNA) ou S-2765) pour le FXa varient d'une équipe à l'autre (Aurell, *et al* 1977, Friberger 1983, Rosen 1984). Le principe est semblable à celui de la technique en 2 temps, basé sur une étape d'incubation pour générer du FXa en utilisant du FIXa bovin purifié et du FX.

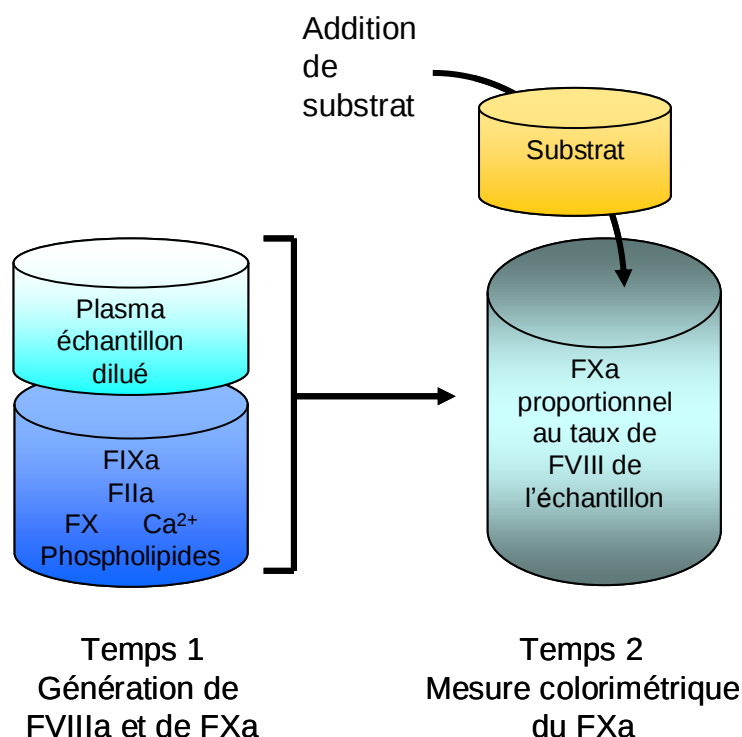


Figure 16 : Methode chromogénique

Schéma représentatif du dosage de FVIII:C par technique chromogénique.

Comme précédemment, la quantité de FXa générée est proportionnelle au taux de FVIII:C. Enfin, la quantité de FXa générée est évaluée par l'hydrolyse induite du substrat. Cette technique est insensible à la pré-activation des facteurs par la thrombine. Certaines techniques utilisent du FX ou du FIXa d'origine humaine ou

ajoutent de la thrombine pour permettre une activation immédiate du FVIII et un temps d'incubation plus court.

Quelle que soit la technique utilisée, chronométrique ou chromogénique, les valeurs normales habituellement admises sont comprises entre 50 à 150 UI/dL.

A.II.2.2 - Dosage antigénique du FVIII (FVIII:Ag) :

Ce dosage est indispensable pour évaluer la nature qualitative ou quantitative de l'hémophilie A. Depuis 1978, différentes techniques immunoradiométriques (IRMA pour *ImmunoRadioMetric Assay*) avaient été développées pour mesurer le taux de FVIII:Ag. Du fait de l'absence de FVIII purifié, le recours à des anticorps issus de patients polytransfusés ou de maladies auto-immunes était nécessaire, mais leur obtention était délicate ce qui rendait le test peu accessible (Girma, *et al* 1981, Lazarchick and Hoyer 1978). Au début des années 1990, le développement des anticorps monoclonaux anti-FVIII a permis rapidement le développement de techniques ELISA, qui ont pu être ensuite commercialisées (Girma, *et al* 1998). Les normales habituellement admises sont superposables à celles du FVIII:C : 50 à 150 UI/dL.

A.II.3 – Intérêt de l'étude du de rapport FVIII:C/FVIII:Ag

Initialement, les hémophilies A dites « classiques », c'est-à-dire résultant d'un déficit quantitatif en FVIII, étaient qualifiées de CRM- (pour Cross-Reacting Material négatif) car la protéine de FVIII est indétectable par techniques immunologiques. Cependant, les plasmas de certains patients hémophiles A contiennent des taux détectables par techniques immunologiques malgré un dosage d'activité réduit ; ces patients étaient qualifiés de CRM+. Le développement de techniques plus précises permet aujourd'hui d'évaluer le rapport FVIII:C/FVIII:Ag pour déterminer la nature qualitative ou quantitative de l'anomalie du FVIII. Contrairement à la maladie de Willebrand où cette donnée est évaluée quasi systématiquement (normales habituelles du rapport activité/antigène > 0,7), aucune recommandation n'a été élaborée pour le diagnostic de l'hémophilie A modérée ou atténuée. Seule une étude évaluant les performances d'une nouvelle technique de FVIII:Ag s'autorise à définir les patients CRM+ lorsque le rapport FVIII:C/FVIII:Ag est < 0,5 chez des hémophiles A atténués (Girma, *et al* 1998).

A.II.4 – Intérêt de l'étude du rapport FVIII:C/VWF:Ag

Conformément à l'association physiologique majeure qui existe entre le FVIII et le VWF, les valeurs normales de ces deux protéines dans la circulation sont étroitement liées. Ainsi, le rapport FVIII:C/VWF:Ag doit rester proche de 1,0 et toute valeur anormale ($< 0,7$) de ce rapport doit donc faire évoquer une anomalie du FVIII ou du VWF (Lillicrap, *et al* 1988).

Ainsi un rapport FVIII:C/VWF:Ag abaissé fait évoquer :

- soit une anomalie de synthèse du FVIII (hémophilie A constitutionnelle ou statut de conductrice d'hémophilie A, déficit constitutionnel combiné en FV et FVIII),
- soit une clairance accélérée du FVIII dans la circulation (hémophilie A acquise le plus souvent, hémophilie A constitutionnelle plus rarement),
- soit un transport anormal du FVIII par le VWF (maladie de Willebrand de type 2N).

A noter que, selon cette définition, une anomalie du FVIII peut être évoquée même en cas de valeurs normales de FVIII:C plasmatique (classiquement 50 à 150 UI/dL).

A.II.5 - Aspects moléculaires

Les anomalies génétiques responsables de l'hémophilie A peuvent être globalement divisées en différentes catégories :

- a) les grands remaniements,
- b) les substitutions d'un seul nucléotide aboutissant soit au remplacement d'un acide aminé (mutation faux-sens), soit à la création d'un codon stop aboutissant à la synthèse d'une protéine tronquée (mutations non-sens) ou à des anomalies d'épissage de l'ARNm,
- c) les délétions d'une séquence génique qui aboutit généralement à un décalage du cadre de lecture (*frameshift*), et/ou à un codon stop et donc à une protéine tronquée,
- d) les insertions ou duplications d'ADN de taille variable avec les mêmes conséquences que les délétions.

Il existe une base de données informatique (HAMSTeRS pour *Haemophilia A Mutation, Structure, Test and Resource Site*) qui recense l'ensemble des mutations génétiques

retrouvées dans l'hémophilie A (Kemball-Cook, *et al* 1998). Ce site est ouvert à tous et consultable sur : <http://europium.csc.mrc.ac.uk>.

A.II.5.1 - Remaniements géniques

Dans l'hémophilie A, les grands remaniements géniques consistent essentiellement en une inversion unique qui a été identifiée relativement récemment et qui est considérée aujourd'hui comme responsable d'environ 40% de l'ensemble des mutations responsables d'hémophilie A sévère. En effet, au début des années 1990, il a été confirmé que chez un certain nombre de patients, aucune amplification n'était possible entre les exons 22 et 23 du gène du FVIII (Lakich, *et al* 1993) ; il existait chez ces patients une large inversion des exons 1 à 22 à distance des exons 23 à 26 (pour plus de détails voir Lakich *et al* (Lakich, *et al* 1993), Naylor *et al* (Naylor, *et al* 1992, Naylor, *et al* 1993) et Antonarakis *et al* (Antonarakis, *et al* 1995)). Plus récemment, un mécanisme similaire a été décrit au niveau de l'intron 1 et pourrait être responsable d'environ 2 à 5% des hémophilies A sévères (Bagnall, *et al* 2002). Certains auteurs classent les grandes délétions ou insertions (concernant les grandes régions géniques de plusieurs exons) dans cette catégorie.

A.II.5.2 - Mutations ponctuelles

A ce jour (mars 2008), 1944 mutations ponctuelles (substitutions d'un seul nucléotide) sont rapportées dans la base de données HAMSTeRS. Environ 75% d'entre elles induisent une mutation faux-sens tandis que 15% d'entre elles conduisent à la création d'un codon stop et sont donc responsables d'une chaîne protéique anormalement courte. Les 10% restants sont responsables d'altération ou d'absence de sites d'épissage. Ces mutations peuvent être retrouvées dans tous les types d'hémophilie (sévère, modérée ou atténuée).

Deux grands groupes peuvent être identifiés :

1. celui où la mutation est responsable d'un déficit quantitatif où le taux de FVIII:Ag est similaire à celui du dosage d'activité (FVIII:C). Cette anomalie est parfois identifiée comme « CRM négative ». Il s'agit alors le plus souvent d'une protéine structurellement normale mais dont la synthèse est réduite ou dont la demi-vie est réduite du fait d'une clairance accélérée. Ainsi, des sécrétions anormales du FVIII peuvent être dues à des mutations non-sens. Fréquemment, elles ont été rapportées sur le codon 2307, aboutissant à la substitution d'un Arg2307 en Gly ou Leu (Gitschier, *et al* 1986, Kemball-Cook, *et al* 1998). Ces 2 mutations aboutissent à des protéines fonctionnellement normales mais de sécrétion diminuée induisant une hémophilie A atténuée.
2. celui où la mutation est responsable d'un déficit qualitatif où le taux de FVIII:Ag est normal avec un dosage d'activité abaissé. Cette anomalie est identifiée comme « CRM positive ». Ce dernier groupe est particulièrement intéressant car l'étude des mutations faux-sens a largement contribué à l'évolution des connaissances sur les rapports structure/fonction du FVIII et sur la physiopathologie du phénotype de l'hémophilie A, même si à ce jour seul un petit nombre de ces mutations permet une explication physiopathologique précise...

Les mutations touchant les sites d'activation du FVIII peuvent induire une pathologie hémorragique. En effet, des mutations faux-sens des Arg372, Ser373, Arg1689 sont associées à des hémophilies A (Arai, *et al* 1990, Gitschier, *et al* 1988, Johnson, *et al* 1994, O'Brien, *et al* 1990, O'Brien and Tuddenham 1989, Pattinson, *et al* 1990). Des travaux de mutagenèse dirigée ont pu montrer que pour les variants de l'Arg1689, le FVIII muté est résistant à l'action de la thrombine et l'activité résiduelle peut être la moitié de celle du FVIII normal. Les mutations touchant l'Arg372 altèrent également environ 60% de l'activité totale. Cependant, les activités résiduelles en FVIII des hémophiles porteurs de ces mutations ont des taux variant de <1% à environ 12% de la normale et donc plus bas que ceux attendus (Kemball-Cook, *et al* 1998). Plusieurs hypothèses ont été avancées:

- suite à la substitution de Arg1689, le site de liaison au VWF incluant Tyr1680 n'est pas clivé à partir de la chaîne légère. Le complexe FVIII/VWF pourrait donc ne plus se dissocier après l'action de la thrombine. Le FVIIIa serait alors

incapable d'interagir avec le FIXa et les phospholipides dans le complexe tenase ;

- dans les mutations touchant Arg1689, celle-ci est le plus souvent remplacée par une cystéine. Cette dernière pourrait former un pont S-S dans la chaîne légère du FVIII et les propriétés biologiques de ce variant moléculaire pourraient être considérablement modifiées ;
- enfin, le type d'acide aminé substitué pourrait être important : quand l'Arg372 est remplacé par une proline, la mutation induit toujours une hémophilie A sévère. En revanche, une substitution par une histidine induit une hémophilie A modérée ou mineure.

Environ 40% des patients porteurs d'une anomalie qualitative du FVIII présentent des mutations dans le domaine A2 (McGinniss, *et al* 1993). Etant donné que ce domaine ne représente seulement que 10% du gène du FVIII, cette donnée semble lui conférer un rôle fonctionnel essentiel. Sur le plan phénotypique, ces anomalies moléculaires du domaine A2 entraînent des anomalies de l'interaction FVIIIa/FIXa (Aly, *et al* 1992, Aly and Hoyer 1992) ou des anomalies de dissociation spontanée de la sous-unité A2 (Pipe, *et al* 1999) induisant une inactivation spontanée du FVIIIa.

A.II.5.3 - Délétions

Les délétions peuvent être considérées comme grande (en général >50 pb) ou petites (<50 pb). Les grandes délétions sont responsables d'environ 5% des hémophilies A sévères. En effet, la protéine qui résulte de cette anomalie génétique est le plus souvent tronquée et le FVIII est, soit non synthétisé, soit le plus souvent inactif. Il existe néanmoins quelque cas décrits d'hémophilie A cliniquement modérée avec ce type de délétions, le plus souvent dans les exons terminaux (22 à 24) (Lavergne, *et al* 1992, Wehnert, *et al* 1989, Youssoufian, *et al* 1987). Les petites délétions sont distribuées de façon homogène sur tous les exons et sont également le plus souvent associées à des hémophilies A sévères.

A.II.5.4 - Insertions/duplications

Les insertions peuvent varier considérablement. Le plus souvent, il s'agit d'une duplication d'une adénine (A) dans une série de A. La grande majorité des insertions est associée à une hémophilie A sévère.

Les anomalies moléculaires peuvent être complexes, associant délétions et insertions/duplications, telles que « *del G ins TT (GT>TTT at codon 103) nt 358-9* » (Habart, et al 2003) ou « *del C / ins TT at codon 2013 (c.6094)* » (Ahmed, et al 2005). Selon la base de données HAMSTeRS, ces anomalies sont très majoritairement associées à des hémophilies A sévères (Kemball-Cook, et al 1998).

A.II.5.5 – Génétique et risque d'inhibiteur dans l'hémophilie A

Durant ces 15 dernières années, certains facteurs génétiques ont été rapportés comme facteur de risque important pour l'apparition d'un anticorps inhibiteur anti-FVIII. Une revue complète a été récemment publiée par Oldenburg et Pavlova (Oldenburg and Pavlova 2006). L'analyse de cette complication de l'hémophilie ne fait pas l'objet de notre travail et nous nous contenterons d'énumérer les principaux facteurs de risque :

- la sévérité de l'hémophilie : 15-30% des hémophiles A sévères développent un inhibiteur alors que cette complication ne concerne que 3-5% des hémophiles A modérés ou mineurs. Il existe un registre français des hémophilies A modérées/mineures avec inhibiteur (d'Oiron, et al 2006).
- les antécédents familiaux d'inhibiteur ;
- l'origine ethnique ;
- le génotype :
 - les mutations induisant une absence totale de synthèse de FVIII (inversion de l'intron 1 ou 22, grandes délétions, codons stop...), associées à des hémophilies A sévères sont à fort risque d'inhibiteur ;
 - les mutations faux-sens qui conduisent à un FVIII présent mais anormal, souvent associées à des hémophilies modérées ou mineures, sont à faible risque d'inhibiteur. Cependant, pour les mutations situées dans les domaines A2 et C2, le risque d'inhibiteur pourrait être multiplié par 4 (Oldenburg and Pavlova 2006).

Certaines mutations sont considérées comme particulièrement à risque : Arg593Cys, Tyr2105Cys, Arg2150His, Pro2300Leu et Tyr2229Cys (Hay 1998).

NB : A noter que des déficits constitutionnels en FVIII peuvent ne pas être liés à des anomalies moléculaires du gène du FVIII ; par exemple dans la maladie de Willebrand de type 2N) ou ne pas être isolés et résulter d'une mutation située à l'extérieur du gène du FVIII, comme par exemple dans les déficits combinés en FV et en FVIII où les gènes impliqués peuvent être MCFD2 ou LMAN-1 (ERGIC-53) situés respectivement sur le chromosome 2 et 18 (Zhang, *et al* 2006).

A.II.6 - Thrombinographie

L'étude de la génération de thrombine *in vitro* (ou thrombinographie) a en fait près d'un demi-siècle d'existence puisqu'elle avait déjà été utilisée dans les années 1950 dans l'étude des maladies hémorragiques telles que l'hémophilie ou la thrombocytopénie (Macfarlane and Biggs 1953, Membre, *et al* 2007b). Cette technique a été ensuite supplantée par les méthodes analytiques de la coagulation permettant à un diagnostic plus précis de la pathologie étudiée. Ces dernières années, les innovations technologiques aussi bien au niveau de la fluorométrie que du traitement informatique des données ont permis à certaines équipes de faire reconsidérer l'intérêt de la thrombinographie dans l'ensemble des pathologies de l'hémostase (Hemker and Beguin 2000, Hemker, *et al* 2003). Ce test est maintenant surtout développé grâce surtout aux travaux de HC Hemker. Ce dernier a récemment publié dans le *Journal of Thrombosis and Haemostasis* un historique complet de ce développement (Hemker 2008).

A.II.6.1 - Principes

Le but de la thrombinographie est de suivre quantitativement la concentration de thrombine active dans un l'échantillon sanguin en fonction du temps en réponse à un stimulus donné (Membre, *et al* 2007b). La concentration de thrombine mesurée est, à tout moment, le résultat de la génération et de l'inhibition de sa synthèse. Même si certaines étapes de l'hémostase ne sont pas explorées (adhésion plaquettaire au sous-endothélium, réactivité plaquettaire au collagène ou fibrinolyse), ce test a l'avantage d'être sensible à tous les inhibiteurs de la coagulation actifs dans le sang circulant.

A ce jour, il existe essentiellement deux systèmes :

- Un système développé par l'équipe de H.C. Hemker et commercialisé par la société Stago (Asnières, France) où la détection de la thrombine est assurée par mesure de la fluorescence induite sur un substrat fluorigène spécifique de la thrombine (Z-Gly-Gly-Arg-AMC). Dans ce système, la coagulation est déclenchée par recalcification en présence d'une faible concentration de facteur tissulaire (FT). Les mesures sont effectuées dans un fluorimètre (Fluoroskan Ascent, Stago, France) à l'aide d'un logiciel spécifique. La fluorescence est enregistrée avec une longueur d'onde d'excitation à 390 nm, à une longueur d'onde d'émission à 460 nm et avec un intervalle de mesure de 15 secondes. Les réactions sont réalisées dans une microplaque 96 puits en polypropylène. Un calibrant (mélange d'un complexe α_2 -macroglobuline / thrombine humaine) est ajouté au plasma étudié pour corriger les effets de consommation du substrat et les éventuelles influences liées à l'appareillage (Hemker 2005).
- Un système développé par l'équipe de K. Varadi sur le même principe, utilisant également de faibles concentrations de FT et le même substrat pour la thrombine. Le type de fluorimètre est différent (Bio-TEK Instruments, Winooski, Etats-Unis) ainsi que l'onde d'excitation (360 nm). Aucune calibration n'est proposée dans ce système (Varadi, *et al* 2003).

Quel que soit le système utilisé, la cinétique de la réaction comporte schématiquement trois phases :

- une phase d'initiation aboutissant à la formation des premières traces de thrombine ;
- une phase de génération rapide de thrombine ;
- une phase d'extinction, où l'effet des inhibiteurs physiologiques, principalement l'antithrombine, devient exclusif.

Différentes données sont mesurées (figure 17):

- le temps de latence (durée de la phase d'initiation en minutes), nous l'identifierons par LT (pour « *Lag Time* »)
- le pic de thrombine qui correspond à la quantité maximale de thrombine formée (mesurée en nM),
- le temps nécessaire pour l'obtention de ce pic à partir de l'initiation de la génération de thrombine (durée calculée en minutes), identifié par TTP (pour « *Time to Peak* »)

Ces mesures permettent le calcul de deux données essentielles :

- le potentiel thrombinique (identifié comme ETP pour « *Endogenous Thrombin Potential* ») correspondant à l'aire sous la courbe de la concentration de thrombine. Il est exprimé en nM.min.
- la vélocité correspondant au rapport pic de thrombine / (temps nécessaire au pic – temps de latence)

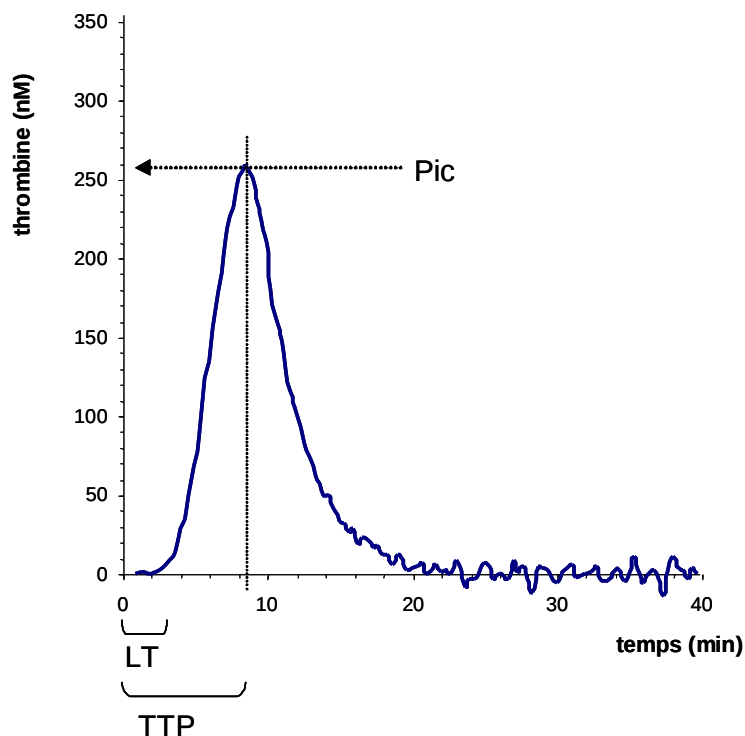


Figure 17 : Exemple de Thrombinographie.

Dans cet exemple, le temps de latence (LT) est mesuré à 4,25 min, le pic de thrombine est mesuré à 258 nM, le temps nécessaire au pic (TTP) est mesuré à 8,6 min, le potentiel thrombinique (ETP) est calculé à 1621,5 nM.min et la vélocité est calculée à 59,3 nM/min

Dans ces conditions expérimentales, la boucle de Josso, impliquant le complexe tenase, est sollicitée (Brummel, *et al* 2002, Cawthern, *et al* 1998). En présence de plaquettes dans l'échantillon, celles-ci sont activées par les premières molécules de thrombine, avant extinction du FT par le tissue factor pathway inhibitor (TFPI) (Beguin, *et al* 1989). Idéalement, l'activation de la phase contact doit être évitée, car le facteur XII, la prékallicréine et le kininogène de haut poids moléculaire peuvent induire une activation de l'hémostase non impliquée *in vivo*. Ainsi, dans deux études, l'inhibition de la phase contact par le Corn Trypsin Inhibitor (CTI) a été suggérée comme nécessaire à l'utilisation du CAT[®] system en faibles concentrations de FT permettant l'amélioration des conditions méthodologiques ou préanalytiques lors de l'utilisation de plasma pauvre en plaquettes (PPP) ou de plasma riche en plaquettes (PRP) (Dargaud, *et al* 2006, Luddington and Baglin 2004). En revanche, la pertinence clinique de l'utilisation du CTI n'est pas, à ce jour, clairement démontrée. Par exemple, les paramètres de la thrombinographie restent significativement altérés chez les hémophiles comparés à la population normale, qu'il y ait ou non addition de CTI (Luddington and Baglin 2004).

A.II.6.2 - Corrélations clinico-biologiques

Depuis quelques années, l'hypothèse que les résultats de l'étude de génération de thrombine par thrombinographie reflètent, mieux que l'ensemble des tests de l'hémostase jusqu'ici disponibles, le phénotype hémorragique ou thrombotique d'un patient a séduit de nombreuses équipes et a conduit à de nombreuses études. Ainsi, ce test paraît être un bon reflet de l'hémostase globale d'un individu (Hemker, *et al* 2006), un bon reflet du risque thrombotique en cas de thrombophilie (Brummel-Ziedins, *et al* 2005, Hezard, *et al* 2006a, Hron, *et al* 2006) ou du risque hémorragique en cas de déficit en facteur procoagulant (Al Dieri, *et al* 2002, Giansily-Blaizot, *et al* 2003), en particulier dans l'hémophilie (Beltran-Miranda, *et al* 2005, Dargaud, *et al* 2005, Dargaud, *et al* 2007, Siegemund, *et al* 2003). En effet, dans cette pathologie (en particulier dans sa forme sévère) des phénotypes cliniques différents peuvent être observés pour un taux de FVIII:C identique (van den Berg, *et al* 2007). En étudiant la génération de thrombine chez des patients hémophiles sévères, modérés ou atténués, deux équipes ont démontré que les résultats de la thrombinographie corrèlent avec les taux de FVIII:C, pour ce qui concerne l'ETP et le pic de thrombine (Beltran-Miranda, *et al* 2005, Dargaud, *et al* 2005) mais pas pour le LT qui peut être strictement normal chez les hémophiles (Dargaud, *et al* 2007). De façon beaucoup plus intéressante, les

paramètres de la thrombinographie pourraient corrélérer avec le phénotype clinique permettant un meilleur reflet du risque hémorragique du patient hémophile (Beltran-Miranda, *et al* 2005, Dargaud, *et al* 2005).

A.III - Discordances entre le résultat du dosage du FVIII:C 1 temps et 2 temps Dans la littérature, il est classique de considérer que le dosage du FVIII:C 2 temps représente la technique de référence. A ce titre, il est utilisé préférentiellement pour définir les unités internationales de FVIII:C dans les concentrés thérapeutiques. Dans cette utilisation, il a été régulièrement rapporté que les taux de FVIII:C 2 temps sont supérieurs à ceux obtenus par technique en 1 temps. La raison de cette discordance est globalement restée floue bien que l'adsorption sur hydroxyde d'alumine, qui est classiquement utilisée pour les dosages en 2 temps, ait été incriminée dans cette discordance. Dans tous les cas, la discordance moyenne reste, selon certains auteurs, « seulement » d'une augmentation de 26% pour le dosage 2 temps (Barrowcliffe and Kirkwood 1978, Kirkwood and Barrowcliffe 1978). D'autres auteurs ont suggéré que le choix du tampon, l'éventuelle activation préanalytique des échantillons, les contaminations non spécifiques par les lipides ou l'influence de la présence de VWF pourraient expliquer cette discordance (Barrowcliffe 1984).

Dans la grande majorité des cas, le diagnostic d'hémophilie A est assuré par un dosage de FVIII:C effectué par technique chronométrique en 1 temps, les équipes effectuant le dosage de FVIII:C par une technique chronométrique en 2 temps restant l'exception. Cependant, la confrontation du FVIII:C 1 temps avec le FVIII:C 2 temps a permis de déterminer des discordances. Ainsi, de telles discordances ont été rapportées, soit avec un dosage de FVIII:C 1 temps supérieur au FVIII:C 2 temps (rapport FVIII:C 1 temps / FVIII:C 2 temps élevé), soit l'inverse (rapport FVIII:C 1 temps / FVIII:C 2 temps abaissé).

Du fait des deux étapes analytiques liées au principe de son dosage (génération puis mesure du FXa proportionnel), le dosage du FVIII:C Chromo est parfois assimilé à une technique en 2 temps et il a aujourd'hui remplacé le FVIII:C 2 temps, particulièrement pour évaluer le taux de FVIII:C dans les concentrés thérapeutiques (Carlebjork, *et al* 1987, Hellstern, *et al* 1986, Rosen, *et al* 1985). Jusqu'à récemment, pour ce qui concerne les patients présentant des discordances entre les dosages chronométriques

en 1 temps et en 2 temps, peu d'études évaluaient les performances de la méthode chromogénique. En janvier 2007, une équipe australienne a démontré que les dosages chromogéniques retrouvaient les mêmes phénotypes biologiques discordants entre le dosage chromométrique en 1 temps et la méthode chromogénique (Rodgers, *et al* 2007). Cette même équipe a rapporté depuis que l'utilisation de 3 coffrets commercialisés différents de dosage du FVIII:C Chromo permettent de façon équivalente ce diagnostic (Rodgers, *et al* 2008). Enfin, lors du congrès de l'*International Society of Thrombosis and Haemostasis* (ISTH) de Genève en juillet 2007, différentes équipes démontrent que le dosage chromogénique permet une bonne appréciation du FVIII:C de ces patients (Bowyer, *et al* 2007, Duncan, *et al* 2007, Inaba, *et al* 2007).

Etant donné ces similitudes analytiques entre dosage chromométrique en 2 temps et dosage chromogénique, et dans un souci de ne pas obscurcir la compréhension du texte, nous utiliserons le terme FVIII:C 2 temps pour qualifier l'une ou l'autre des 2 méthodes. Si nécessaire, la technique sera précisée au cas par cas.

A.III.1 - Discordance avec taux de FVIII:C 1 temps supérieur au taux de FVIII:C 2 temps

Initialement, les auteurs ont montré que le FVIII:C 1 temps pouvait être mis en défaut dans le diagnostic de l'hémophilie A, considérant que cette méthode surestimait le taux de FVIII:C par rapport aux résultats du dosage en 2 temps. Dès 1988, Parquet-Gernez *et al* , identifient une population d'hémophiles A atténués où une évaluation du taux de FVIII:C chromométrique en 1 temps entraîne une sous-estimation du risque hémorragique (Parquet-Gernez, *et al* 1988). En 1994, Duncan *et al* décrivent une surestimation du taux de FVIII:C par le dosage chromométrique en 1 temps chez 29/95 (30%) patients hémophiles A atténués (Duncan, *et al* 1994). D'autres équipes ont également confirmé ces résultats (Hathaway, *et al* 1993, Schwaab, *et al* 2000). Plus récemment, Keeling *et al* rapportent un sujet présentant des complications hémorragiques et dont le dosage de FVIII:C est strictement normal en technique chromométrique en 1 temps (FVIII:C 1 temps = 106 UI/dL) ; les 2 autres techniques (chromométrique 2 temps et chromogénique) ont retrouvé un taux de FVIII:C compris entre 18 et 35 UI/dL, permettant de diagnostiquer l'hémophilie qui serait passée inaperçue par la technique usuelle (Keeling, *et al* 1999). Comme nous l'avons précisé dans l'introduction de ce travail, un patient présentant le même profil (syndrome

hémorragique, dosage de FVIII:C normal avec la technique de routine (1 temps) et chez lequel une mutation au niveau du gène du FVIII a été mise en évidence), a également été décrit par notre équipe nantaise (Fressinaud, *et al* 2000).

L'équipe australienne qui avait initialement décrit ce type de discordance chez environ un tiers des patients (Duncan, *et al* 1994) a depuis suggéré que les mutations génétiques responsables se situaient préférentiellement dans les domaines A1, A2 et A3 du FVIII (Rudzki, *et al* 1996). Ces mêmes domaines ont également été incriminés dans ces phénotypes particuliers par d'autres auteurs (Fressinaud, *et al* 2000, Keeling, *et al* 1999, Pipe, *et al* 2001, Schwaab, *et al* 2000). L'équipe britannique de Sheffield retrouve chez ce type de patients des mutations dans les domaines A1 et A3 mais également dans le domaine C2. Dans leur expérience, une mutation du domaine A3 (p.Arg1966Gln) paraît relativement fréquente puisque retrouvée chez 15% des patients non apparentés (Nesbitt, *et al* 2001a).

A ce jour, une évaluation globale des mutations rapportées dans la base de données du FVIII (Kemball-Cook, *et al* 1998) nous permet d'apprécier qu'au sein du domaine A1 (aa 1 à 336), A2 (aa 373 à 711) ou A3 (aa 1690 à 2020), la proportion d'hémophilie atténuée représente respectivement : 37/116 (32%) ; 41/110 (37%) ; 35/92 (38%) de l'ensemble. Dans l'immense majorité des cas, à l'exception des publications citées précédemment, les évaluations phénotypiques de l'activité fonctionnelle du FVIII sont imprécises et les données cliniques le plus souvent négligées.

Etant donné que les techniques en 2 temps (chronométrique et chromogénique) comprennent une phase de pré-incubation avant la mesure, de nombreuses études permettent aujourd'hui d'affirmer qu'une augmentation de la vitesse de dissociation du domaine A2 induit une augmentation de l'inactivation du FVIIIa et donc une réduction de l'activité globale. En effet, Pipe *et al* ont d'abord démontré ce phénomène chez un hémophile avec une mutation du domaine A2 (Arg531His) (Pipe, *et al* 1999). Il confirme que ce mécanisme d'inactivation est essentiel dans la régulation *in vivo* de l'activité du FVIIIa et démontre qu'une augmentation de la dissociation spontanée de la sous unité A2 induit une hémophilie clinique.

Une « modélisation moléculaire » de l'environnement du résidu Arg531 dans le domaine A2 suggère que ce résidu participe à une liaison hydrogène avec l'Arg282 du domaine A1, ce qui constitue une explication plausible au phénotype des patients porteurs de ces mutations du gène du FVIII.

Ce modèle a l'avantage d'explorer également les variants Ala284Pro et Ala284Glu qui induisent également des discordances phénotypiques (figure 18). Ici l'environnement hydrophobe de Ala284 enveloppe étroitement l'Arg531 dans la liaison A1-A2, proche de la liaison hydrogène Arg531-Arg282. Le remplacement d'une alanine (de faible encombrement) par une proline ou un acide glutamique (comme chez les hémophiles avec ces mutations) peut induire une perturbation de la liaison hydrogène Arg531-Arg282.

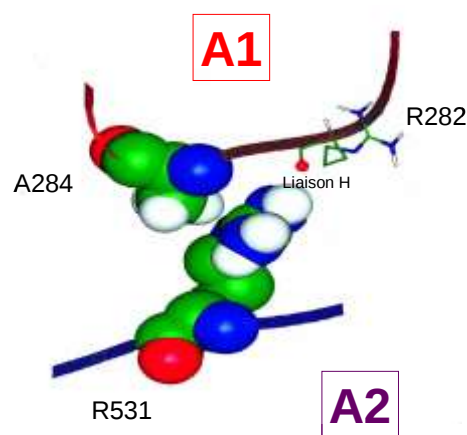


Figure 18 : Modélisation des régions “inter-domaines” entre A1/A2 et du rôle des résidus Ala284, Arg531 et Arg282 (d’après Pipe et al (Pipe, et al/ 2001)).

Gros plan sur la liaison inter-domaines A1/A2 montrant l’interaction entre Arg531 et Arg282, tous les deux très proches de Ala284. Le remplacement de Ala284 par « l’encombrant » Glu (comme dans le cas de l’hémophilie induite par la mutation Ala284Glu) perturbe donc très probablement l’interaction entre Arg282 et Arg531. (Atome C (vert), O (rouge), N (bleu) et H (blanc).

Pour ce qui concerne la mutation Ser289Leu, ce même type de modélisation a permis de suggérer une liaison hydrogène entre la Ser289 et la Tyr1979 (figure 19). Le remplacement de la sérine par la corpulente leucine pourrait entraîner une disparition de cette liaison entre les domaines, mais pourrait aussi modifier la zone d’interactions entre les 3 domaines.

L'ensemble de ces résultats suggère fortement que l'arrangement très spécifique des 3 domaines tripliqués est essentiel à la fonction du FVIII et que les inter-domaines d'interaction protéine-protéine sont nécessaires à la stabilisation des formes actives ou inactives du FVIII (Pipe, *et al* 1999, Pipe, *et al* 2001).

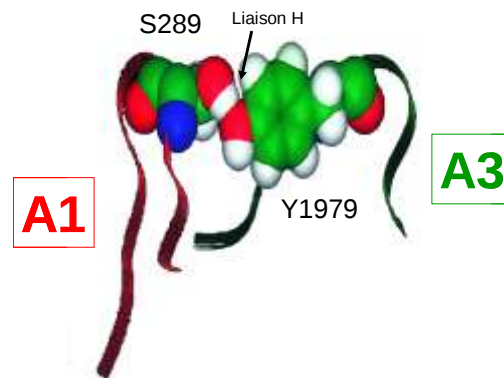


Figure 19 : Modélisation des régions “inter-domaine” entre A1/A3 et du rôle des résidus Ser289 et Tyr1979 (d’après Pipe et al (Pipe, *et al* 2001)).

Gros plan sur la liaison inter-domaines A1/A2 montrant une probable interaction entre Ser289 et Tyr1979. Le remplacement de la serine par « l’encombrante » chaîne hydrophobe de la leucine (comme dans le cas de l’hémophilie induite par la mutation Ser289Leu) perturbe donc très probablement l’interaction entre Ser289 et Tyr1979 et la conformation de la région environnante. (Atome C (vert), O (rouge), N (bleu) et H (blanc)).

Typiquement, les anomalies responsables de ces discordances impliquent des substitutions d’acides aminés qui modifient la charge (comme p.Arg698Trp) ou l’hydrophobicité (comme p.Ala284Glu, p.Ala284Pro et p.Ser289Leu). Il a été démontré depuis que les mutations p.Ala284Glu et p.Ser289Leu, bien que non confinées à une des régions acides du domaine A1 ou de la sous-unité A2, peuvent interférer avec une faible interaction électrostatique dans ce site critique d’interaction et ainsi aboutir à une instabilité similaire du FVIII hétérotrimérique (Pipe, *et al* 1999, Pipe, *et al* 2001).

Keeling *et al* décrivent une discordance de ce type chez un hémophile avec une mutation du domaine A3 (His1954Leu) (Keeling, *et al* 1999). La cristallographie montre que cet acide aminé est situé dans l’interface entre les domaines A2 et A3, proche de 2 résidus Arg698, Met1947 et de la Tyr1979 (Mazurier, *et al* 1997, Rudzki, *et al* 1996). Les mutations dans cette région semblent donc tout particulièrement générer des discordances méthodologiques telles que nous les avons décrites. Les auteurs concluent également que les techniques en 2 temps reflètent de façon plus précise

l'activité coagulante du FVIII:C et que cette activité est limitée par la dissociation de A2 in vivo.

Enfin, ces résultats ont été confirmés par une équipe australienne qui, en utilisant un dosage chromogénique de FVIII:C, a décrit huit familles de patients (dont une avec une nouvelle mutation : pArg1749His) (Rodgers, *et al* 2007).

Toutes ces publications de phénotype particulier retrouvent des anomalies d'interactions dans, ou proche des domaines d'interface entre A1-A2, A1-A3 ou A2-A3 (figure 20). On peut observer que tous les résidus concernés (Asn694, Arg698, Met1947, His1954) sont situés dans une région d'interface entre le domaine A2 et les domaines A1 et A3 (Hakeos, *et al* 2002, Schwaab, *et al* 2000).

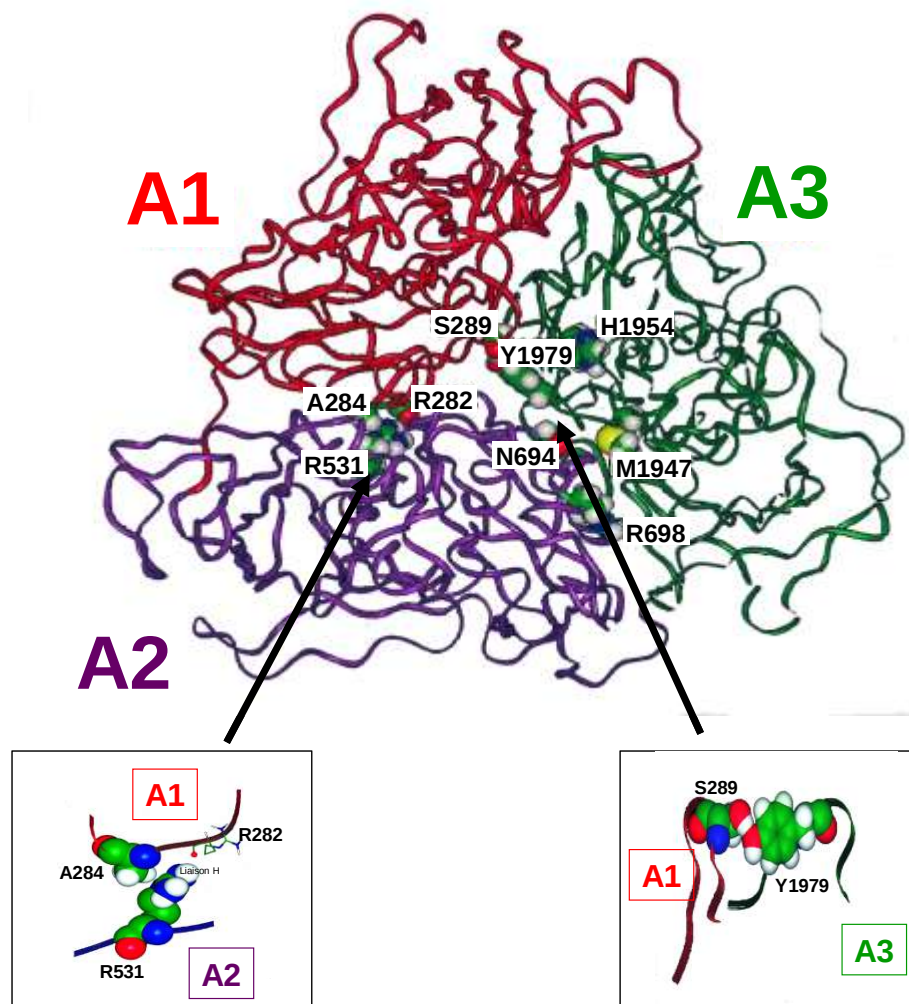


Figure 20 : Schéma de l'interface des domaines A1, A2 et A3 et localisation des acides aminés impliqués dans les hémophilies avec discordance entre FVIII:C 1 temps et FVIII:C 2 temps :

Vue générale avec positionnement des Ala284, Ser289, Arg531, Asn694, Arg698, Met1947, His1954 et Tyr1979. En encadré : gros plans sur les relations Ala284, Arg531 et Arg282 de l'interface A1/A2 et Ser289 et Tyr1979 de l'interface A1/A3 (d'après Pipe *et al* (Pipe, *et al* 2001)).

Il faut noter qu'à l'occasion du XVIII^e congrès de l'ISTH à Paris en 2001, Nesbitt *et al* rapportent que dans la population d'hémophiles A atténués qu'il a explorée de façon prospective, 48% des patients ont un taux de FVIII:C 1 temps supérieur au FVIII:C 2 temps (Nesbitt, *et al* 2001b). A cette occasion, de nouvelles mutations sont décrites (p.Glu272Lys, p.Glu1682Lys, p.His1755Tyr, p.Leu1932Phe, p.Arg1966Gln, p.Pro2300Leu). Les mécanismes physiopathologiques ne sont malheureusement pas discutés dans l'abstract proposé. A ce jour, ces résultats n'ont pas été publiés.

A.III.2 - Discordance avec taux de FVIII:C 1 temps inférieur au taux de FVIII:C 2 temps

Pour la première fois, en 1999, Roelse *et al* a rapporté le cas d'un patient avec un FVIII:C 1 temps abaissé mais normal en FVIII:C Chromo ; ce patient était porteur d'une mutation p.Glu720Lys. L'étude du rFVIII-E720K a montré que l'activation par la thrombine est normale mais que l'activation par le FXa nécessite de fortes concentrations en FIX pour une activation complète. Ce résultat suggère que le résidu Glu720, proche d'un des 3 sites putatifs de liaison au FIXa du domaine A2 contribue à l'interaction du domaine A2 avec le FIXa (Roelse, *et al* 1999).

En 2002, Mumford *et al* décrit un patient hémophile avec une substitution Tyr346Cys dans la région a1 qui présente un taux de FVIII:C 1 temps abaissé mais normal en technique chromogénique (Mumford, *et al* 2002). Le dosage antigénique permet de montrer que le patient présente un déficit qualitatif en FVIII.

Les régions inter-domaines a1, a2 et a3 n'ont d'homologie avec aucune autre protéine. Elles sont proches des sites importants de clivage du FVIII (Arg372) et contiennent 6 résidus tyrosines, hautement conservés, qui sont sulfatés en post-traductionnel (Pittman, *et al* 1992). Ces résidus tyrosines et leur environnement « acides » constituent des sites importants pour l'interaction du FVIII avec les autres facteurs de la coagulation ; ces sites sont essentiels à la fonction cofacteur du FVIIIa. Ainsi, Mumford *et al* se sont attachés à étudier la capacité du FVIII Tyr346Cys à s'activer dans un modèle *in vitro* et démontrent que la génération de FXa chez ce patient est normale après 10-15 minutes d'incubation avec de la thrombine ; mais, si on considère des délais plus courts, le taux de FVIII:C ne peut dépasser 40% de la normale, ce qui correspond au dosage chromométrique de FVIII:C 1 temps. De plus, pour des faibles concentrations de thrombine, l'activation du FVIII est plus faible pour le FVIII Tyr346Cys que pour le FVIII normal. Les auteurs suggèrent que cette anomalie pourrait donc

induire une réduction de l'affinité du FVIII pour la thrombine. Pour des valeurs supérieures de thrombine, l'activation du FVIII muté devient normale.

Dans le dosage en 1 temps, le délai entre la première apparition de thrombine et la mesure du caillot peut être aussi court que 15 à 20 secondes. Dans ces conditions, ce test est extrêmement sensible aux effets d'une fixation insuffisante de la thrombine ou du clivage du FVIIIa. Si les temps d'incubation sont prolongés (comme dans les dosages de FVIII:C en 2 temps), l'activation du FVIII est donc accrue et le taux de FVIII:C mesuré normal.

Les conséquences cliniques de cette activation retardée du FVIII sont difficiles à affirmer. Très récemment, certains auteurs ont même suggéré que le risque hémorragique de ces patients « hémophiles » pourrait être très faible, voire inexistant (Lyall, *et al* 2008). Nous verrons plus loin que, pour une famille porteuse d'une hémophilie A atténuée avec une mutation similaire à celle-ci dans sa localisation et son mécanisme physiopathologique (Ile369Thr), nos conclusions sont très proches de celle de cette équipe.

Enfin en 2001, à l'occasion du congrès de l'ISTH à Paris, Goodeve *et al* ont rapporté 12 cas de patients avec ce type de discordance dont une famille avec une mutation qui n'avait jamais été décrite (p.Glu321Lys) sans que le mécanisme physiopathologique ne soit discuté (Goodeve, *et al* 2001). A ce jour, ces résultats n'ont pas été publiés.

Le tableau I reprend l'ensemble des publications concernant les patients avec des discordances dans les dosages de FVIII:C.

Domaine	Mutation décrite	Rapport FVIII:C 1 tps/2 tps	Référence
A1 (1 - 336)	p.Glu272Lys p.Glu321Lys p.Ala284Glu p.Ala284Pro p.Ser289Leu	Elevé Bas Elevé Elevé Elevé	(Nesbitt, <i>et al</i> 2001a) (Goodeve, <i>et al</i> 2001) (Rudzki, <i>et al</i> 1996) (Mazurier, <i>et al</i> 1997) (Rudzki, <i>et al</i> 1996), (Nesbitt, <i>et al</i> 2001a)
a1 (337- 371)	p.Tyr346Cys	Bas	(Hill, <i>et al</i> 2005, Mumford, <i>et al</i> 2002)
A2 (372 - 711)	p.Arg527Trp p.Arg531His p.Asn694Ile p.Arg698Leu p.Arg698Trp	Elevé Elevé Elevé Elevé Elevé	(Mazurier, <i>et al</i> 1997) (Rudzki, <i>et al</i> 1996), (Mazurier, <i>et al</i> 1997), (Pipe, <i>et al</i> 1999) (Schwaab, <i>et al</i> 2000) (Rudzki, <i>et al</i> 1996) (Rudzki, <i>et al</i> 1996)
a2 (712 - 739)	p.Glu720Lys	Bas	(Roelse, <i>et al</i> 1999)
B (740 - 1648)	/	/	
a3 (1649 - 1689)	p.Glu1682Lys	Elevé	(Nesbitt, <i>et al</i> 2001a)
A3 (1690 - 2020)	p.Arg1749His p.His1755Tyr p.Leu1932Phe p.Met1947Ile p.Met1947Val p.His1954Leu p.Arg1966Gln	Elevé Elevé Elevé Elevé Elevé Elevé Elevé	(Rodgers, <i>et al</i> 2007) (Nesbitt, <i>et al</i> 2001a) (Rudzki, <i>et al</i> 1996) (Mazurier, <i>et al</i> 1997) (Hill, <i>et al</i> 2005) (Keeling, <i>et al</i> 1999), (Nesbitt, <i>et al</i> 2001a) (Nesbitt, <i>et al</i> 2001a)
C1 (2021 - 2173)	/	/	
C2 (2174 - 2332)	p.Pro2300Leu	Elevé	(Nesbitt, <i>et al</i> 2001a)

Tableau I : récapitulatif des mutations (selon les domaines) associées à des discordances phénotypiques exprimées par le rapport FVIII:C 1 temps/2 temps.

(Elevé est défini par un rapport FVIII 1 tps/2 tps > 1 ; Bas est défini par un rapport FVIII 1 tps/2 temps < 1).

BI : CHAPITRE I

**Phénotype et génotype
dans l'hémophilie A modérée/atténuée :
prévalence des discordances entre
FVIII:C 1 temps et FVIII:C Chromo
et 29 nouvelles mutations.**

***Phenotype and genotype in moderate/mild hemophilia A:
prevalence of discrepancy between one-stage and chromogenic
Factor VIII activity and twenty-nine novel mutations***

soumis pour publication

Chapitre I

Le diagnostic de sévérité de l'hémophilie a naturellement été initialement clinique, qualifié selon l'incidence des accidents hémorragiques. Puis, avec l'aide la biologie et comme nous l'avons rappelé dès l'introduction, il est devenu classique de définir la sévérité de l'hémophilie sur le taux de FVIII ou FIX. Ainsi, pour l'hémophilie A, on admet classiquement que le FVIII:C est < 1 UI/dL pour la forme sévère, entre 1 et 5 UI/dL pour la forme modérée et > 5 UI/dL dans l'hémophilie A atténuée ou mineure. Ces critères ont fait l'objet d'un consensus international en 2001 dans le cadre du *Scientific Subcommittee on Factor VIII and Factor IX of the Scientific and Standardization committee (SSC) of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH)* (White, *et al* 2001). On a également l'habitude de parler d'hémophilie A fruste quand le déficit en FVIII est discret, en pratique > 30 UI/dL. Cependant, depuis la première description de Parquet-Gernez *et al* , qui décrivent une discordance de valeur de FVIII:C selon la technique (Parquet-Gernez, *et al* 1988), ce diagnostic de sévérité peut s'avérer délicat et le profil clinique reprend alors toute sa valeur. La fréquence de ce phénomène de discordance biologique est mal connue, variant considérablement selon la population étudiée mais pouvant atteindre 30 à 48% des patients hémophiles A atténués (Duncan, *et al* 1994, Nesbitt, *et al* 2001a).

Pour évaluer l'ampleur de ces discordances dans la population des patients hémophiles suivis par le Centre Régional de Traitement de l'Hémophilie de Nantes, nous avons donc choisi d'étudier, de façon prospective entre 1996 et 2006, les dosages de FVIII:C par différentes techniques chez tous les patients porteurs d'une hémophilie A modérée ou atténuée. Afin d'identifier les anomalies moléculaires responsables de ce phénotype, une étude génétique a été systématiquement proposée et réalisée chaque fois que possible.

Ainsi, nous rapportons ici les résultats de l'exploration phénotypique de 307 patients issus de 173 familles et de l'analyse génétique de 196 patients (144 familles).

B.I.1 Choix des méthodes de dosages du FVIII:C

B.I.1.1 Méthode chronométrique en 1 temps :

Le choix du réactif pour la pratique du FVIII:C 1 temps est essentiel et peut montrer de nettes différences, surtout dans l'étude des patients hémophiles avec discordance. En effet, Lucia *et al* ont pu démontrer en 2005 que l'utilisation de certains réactifs (comme

le Pathromtin[®] SL de chez Dade Behring, Marburg, Allemagne) sur certains automates (comme le BCS de la même société Dade Behring), du fait de la nature optique de la lecture du caillot et des temps d'incubation prolongés, pouvait négliger le diagnostic d'hémophilie atténuée en "normalisant" le taux de FVIII:C (Lucia, *et al* 2005). Nous avons choisi un plasma déficient immunodéplété en FVIII (avec un taux de FVIII:C résiduel confirmé comme < 1 UI/dL dans notre laboratoire) et un réactif CK Prest[®] dont l'activateur est le kaolin, réputé le plus pertinent pour l'exploration des déficits en facteurs de la coagulation. Les 2 réactifs sont commercialisés par la société Stago (Asnières, France). L'ensemble des dosages a été effectué sur un automate STA-R[®], également de la société Stago. Le temps d'incubation choisi est de 240 secondes. La calibration est effectuée grâce à un standard commercialisé (Dade Behring).

B.I.1.2 Méthodes chromogéniques

Nous avons évalué les performances de 2 kits de dosages chromogéniques du FVIII:C : le coffret « Coamatic[®] FVIII » commercialisé par la société Instrumentation Laboratory (Lexington, Etats-Unis) et le coffret « FVIII chromogenic assay » de la société Dade Behring. Les dosages ont été automatisés sur automate STA-R[®].

- Avec le réactif « Coamatic[®] Factor VIII » :
en présence d'ions calcium et de phospholipides, le FX est activé en FXa par le FIXa. Cette activation est fortement stimulée par le FVIII qui joue ici un rôle de cofacteur. La mise en œuvre de quantités optimales de Ca²⁺, de phospholipides et de FIXa, plus un excès de FX, se traduira par une réaction linéaire entre la vitesse d'activation du FX et la quantité de FVIII. Le FXa hydrolyse le substrat chromogène S2765, libérant le groupe chromophore p.nitroaniline (pNA). La coloration est ensuite lue par photométrie à 405 nm. Le FXa généré, et donc l'intensité de la coloration, est proportionnel (le) à l'activité du FVIII dans l'échantillon. De manière à éviter l'hydrolyse du S-2765 par la thrombine formée, on ajoute en même temps que le substrat, l'inhibiteur synthétique de la thrombine I-2581.

- Avec le réactif « FVIII chromogenic assay » :

Dans cette méthode, le FVIII est activé par la thrombine : le FVIIIa accélère alors la conversion du FX en FXa en présence de FIXa, de phospholipides et d'ions calcium. L'activité FXa est mise en évidence par hydrolyse d'un substrat pNA spécifique du FXa. La vitesse initiale de libération de pNA mesurée à 405 nm est proportionnelle à l'activité FXa, donc à l'activité FVIII dans l'échantillon.

Ces deux méthodes de dosages sont relativement semblables quant à leurs réactifs mais utilisent des temps d'incubation différents (tableau II).

	Coamatic® Factor VIII (Instrumentation Laboratory)	FVIII chromogenic assay (Dade Behring)
Plasma	50 µl Dilué au 1/80 Dans tampon albumine	50 µl Dilué au 1/20 Dans Owren-Koller
Etape 1	FIXa bovin (0,3 U) FX bovin (1,8 U) Thrombine bovine (1 U NIH) Calcium (40 µmol) Phospholipides (0,2 µmol)	FIXa bovin (0,6 nmol) ; pH=8 FX bovin (2 nmol) ; pH =8 Thrombine bovine (0,6 nmol) ; pH = 8 Calcium (60 µmol) Phospholipides (0,12 µmol)
Incubation	240 secondes	90 secondes
Etape 2	Substrat S-2765 N-α-Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA (7,7 mg) + I-2581 (Inhib. Thrombine) (0,2 mg)	Substrat CH3-OCO-D-CHG-Gly-Arg-pNA.AcOH + Nα- (2-naphthylsulfonylglycyl)-D + α-NAPAP (L-amidinophénylalanine-pipéridide) + EDTA + azide de sodium (tampon d'arrêt)
Lecture	Cinétique 405 nm 30-130 secondes	Cinétique 405 nm 10-130 secondes

Tableau II : Méthodologie appliquée pour chacun des 2 coffrets de dosages du FVIII:C par méthode chromogénique utilisés dans ce travail.

Dans cette première partie de ce travail, la prévalence des discordances des dosages de FVIII:C a été rapportée en utilisant essentiellement les résultats obtenus avec le réactif Coamatic® FVIII pour lequel la durée d'incubation permet une optimisation des résultats (Rodgers, *et al* 2008) et qui est celui le plus largement utilisé dans la littérature

dans ce contexte. Cependant, comme nous le verrons dans le chapitre II, la comparaison des deux techniques a été essentielle dans notre travail puisqu'elle nous a permis d'appréhender le mécanisme moléculaire responsable du déficit fonctionnel en FVIII pour l'une des familles présentant une discordance phénotypique (de la discordance du FVIII:C mutation p.Ile369Thr).

B.I.2 Analyse génétique

Durant ce travail les méthodes utilisées pour la détermination des anomalies génétiques responsables de l'hémophilie ont évolué avec les performances de la génétique médicale. Dans un premier temps (1997 - 2001), la recherche de la mutation était effectuée par DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography), technique initialement décrite par Oefner *et al*, qui présente l'avantage d'être rapide et sensible pour la détection des changements de nucléotides (Oefner, *et al* 1992). A partir de 2002, le développement de techniques de routine plus performantes a permis d'envisager le séquençage direct de l'ADN chez tous les patients, en première intention. La méthodologie utilisée est détaillée dans l'annexe 1.

B.I.2.1 DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography)

Le principe de cette méthode repose sur le fait que les individus hétérozygotes pour une mutation ont la même quantité de DNA normal et de DNA muté. En portant l'ADN double brin à 95°C et en abaissant doucement la température, les produits PCR vont s'hybrider en produit formant des homo et des hétéroduplexes. Dans le cas de l'hémophilie, étant donné que le gène est porté sur le chromosome X, unique chez l'homme, un mélange avec l'ADN d'un sujet normal sera nécessaire pour obtenir cette hybridation. Dans notre travail, cette analyse a été réalisée sur le system Wave 3500HT associé au logiciel Navigator® (Transgenomics corp., San Jose, Etats-Unis), à une température suffisante pour dénaturer partiellement les hétéroduplexes. Ces derniers sont séparés des homoduplexes par chromatographie en phase liquide en ion-pair. Dans de conditions de non-dénaturation (50°C), tous les fragments (hétéro et homo) ont le même temps de rétention. Dès que la température augmente à 54° C, l'hétéroduplex commence à se dénaturer dans la région où les paires de bases nucléotidiques ne sont pas appariées. Les simples brins sont élués plus tôt que les doubles brins (du fait que les simples brins ont moins de charges négatives). A des

températures supérieures (55° C) les homoduplexes commencent à dénaturer. La visualisation de la chromatographie permet d'objectiver les hétéroduplex et donc les patients qui présentent une variation de séquence et pour lesquels un séquençage est indispensable (figure 21). La méthodologie est détaillée dans l'annexe 1.

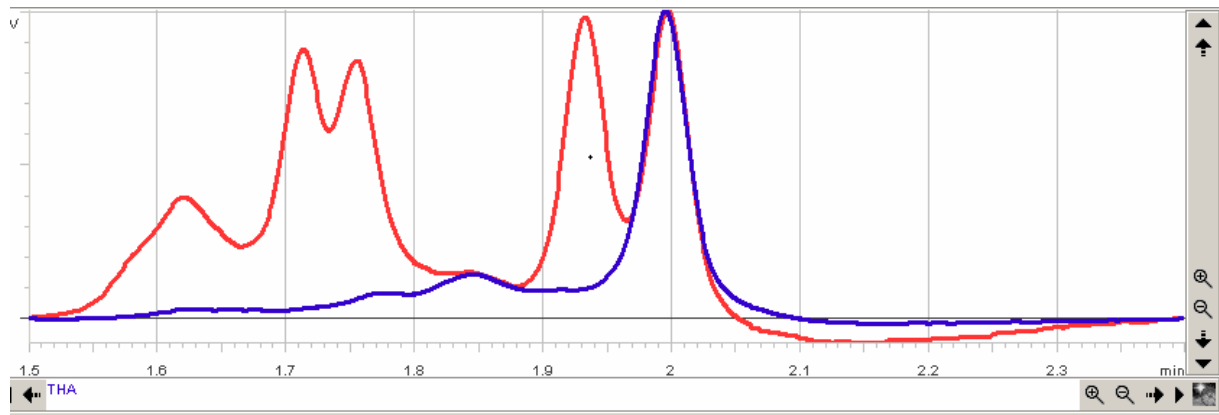


Figure 21 : Exemple d'étude par DHPLC permettant de visualiser la formation des homoduplexes chez un sujet normal (bleu) et chez un patient présentant une variation de séquence (rouge). Chez ce dernier, on peut observer la formation de 4 pics distincts: 1 pic d'homoduplexes normaux superposable au sujet normal, 1 pic d'homoduplexes anormaux et 2 pics d'hétéroduplexes à gauche du graphique. Dans ce dernier cas, un séquençage est indispensable pour identifier la variation nucléotidique.

Dans leur article de 2001, Oldenburg *et al* adaptent cette technique pour l'étude moléculaire du FVIII en utilisant 33 amplicons représentant la totalité de la région codante et des séquences introniques flanquantes des exons (Oldenburg, *et al* 2001). Dans leur expérience, ils ont utilisé la DHPLC chez 156 patients dont la mutation du FVIII était connue et chez 27 patients pour lesquels l'utilisation de la DGGE n'avait pas permis de diagnostic. Chez les patients de génotype connu, la DHPLC a permis de détecter des mutations chez 150/156 (96%). Parmi ces six échecs de la DHPLC, des modifications de températures avaient permis d'en retrouver cinq. Une mutation faux-sens de l'exon 21 (6193T>G) n'était pas retrouvée. Chez les 27 patients sans anomalie génétique détectée par DGGE, 19/27 (30%) se révèlent anormaux en DHPLC permettant l'identification secondaire de la mutation. Ils en concluaient que la DHPLC s'avérait une méthode hautement sensible, rapide et surtout économique par rapport au séquençage direct, bien adaptée au diagnostic moléculaire de l'hémophilie A (Oldenburg, *et al* 2001).

B.1.2.2 Séquençage direct

A partir de 2002, le séquençage direct a pu être envisagé en première intention sur ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, Etats-Unis). Le protocole a été adapté de celui décrit dans la base de donnée HAMSTeRS (<http://europium.csc.mrc.ac.uk>) (Kemball-Cook, *et al* 1998). Certaines des amorces proposées ont été modifiées pour améliorer l'amplification et l'interprétation (pour détail des séquences voir annexe 1).

Chaque nouvelle mutation a été recherchée chez 96 femmes d'origine caucasienne (soit 192 chromosomes X), originaire de notre région Atlantique pour exclure un éventuel polymorphisme.

L'analyse génétique a été réalisée chez 196 patients (soit 144 familles) : 34 hémophiles modérés (23 familles) et 162 hémophiles A atténués (121 familles). Parmi ces familles, une anomalie génétique a pu être identifiée chez 22/23 (96%) des hémophilies A modérées et 106/121 (88%) des hémophilies A atténuées avec 51 mutations retrouvées dont 29 (57%) n'ont jamais été décrites. A l'exception d'une famille, ces anomalies génétiques sont toujours des substitutions d'un nucléotide aboutissant à une mutation faux-sens. Pour la famille restante, il s'agit d'une délétion d'un unique acide aminé. L'étude génétique a pu être effectuée chez 120 familles avec déficit quantitatif en FVIII, chez 20 familles avec déficit qualitatif (dont 14 avec une discordance dans les dosages de FVIII:C) et 4 familles sans conclusion (rapport FVIII:C/FVIII:Ag compris entre 0,5 et 0,6); selon la nature du déficit en FVIII, une mutation a été identifiée dans 104/120 (87%) familles avec un déficit quantitatif, 20/20 (100%) familles avec un déficit qualitatif et 4/4 (100%) familles sans conclusion. Une mutation a été retrouvée chaque fois que le rapport FVIII:C/FVIII:Ag s'est avéré inférieur à 0,7; ce qui implique qu'elle a pu l'être dans toutes les familles avec phénotype discordant (puisque'il s'agit toujours de déficits qualitatifs). Ces mutations sont réparties sur l'ensemble de la molécule de FVIII de façon similaire dans les déficits quantitatifs et qualitatifs. On peut cependant noter que toutes les mutations situées dans les zones inter-domaines (*a1*, *a2* et *a3*) sont associées à des déficits qualitatifs avec discordances dans les dosages de FVIII:C.

Sur le même modèle informatique en 3 dimensions (3D) que celui décrit dans certaines publications publiées récemment (Bogdanova, *et al* 2007, Guillet, *et al* 2006, Vencesla, *et al* 2008), avec l'aide du Dr Agnès Quémener de l'unité INSERM U892 de l'Université de Nantes, nous avons pu déterminer les conséquences des mutations faux-sens sur la

conformation de la protéine FVIII. Dans la grande majorité des cas, il s'agit d'acides aminés en surface de la protéine. Plus rarement, l'acide aminé est à l'intérieur de la structure protéique mais très impliqué dans les interfaces entre les domaines A (comme p.His281Asn ou p.Glu676Gly). Le plus souvent, il s'agit de modifications des caractéristiques biochimiques de la chaîne latérale de l'acide aminé concerné et de modifications induites de conformation. Plus rarement, il s'agit de substitutions susceptibles d'induire des modifications d'interactions avec le FIXa, comme pour la mutation p.Val457Phe qui implique un acide aminé très proche d'une zone (séquence 515-520) impliquée dans la liaison FVIIIa-FIXa. Enfin, de façon originale et jamais décrite, 3 sites de mutations (Val201, Pro472 et Asp542) sont très proches des sites de fixation des ions métalliques tels qu'ils ont été identifiés par Shen *et al* (Shen, *et al* 2008), et qui sont essentiels à l'activité du FVIIIa selon les publications de Fay *et al* (Fay 1988, Fay and Jenkins 2005). Malheureusement, à ce jour, les dernières descriptions tridimensionnelles de la protéine de FVIII obtenues par modélisation à partir des structures de la céruléoplasmine ou du FV (Stoilova-McPhie, *et al* 2002, Vencesla, *et al* 2008) ou par cristallographie (Shen, *et al* 2008) sont en désaccord quant aux régions C1 et C2 et en particulier sur leurs interactions avec les domaines A et les phospholipides. Ceci ne nous permet pas, à ce jour, une analyse fiable des conséquences des mutations situées dans ces régions. Elles seront cependant très intéressantes à étudier puisque sites de fixation du FVIII pour le VWF et pour la LRP1. Ces travaux restent donc à mener.

Pour ce qui concerne les huit mutations impliquées dans les discordances entre les taux de FVIII:C 1 temps et FVIII:C Chromo, trois (p.Arg531His, p.Glu720Lys et p.Arg1749His) avaient déjà été publiées (Habart, *et al* 2003, Mazurier, *et al* 1997, Schwaab, *et al* 1995) mais seule la première était identifiée comme induisant ce type de phénotype. Les cinq autres mutations (p.Pro264Leu, p.His281Asn, p.Ile369Thr, p.Phe1785Leu, p.Phe2127Ser) n'avaient jamais été rapportées. Les mécanismes physiopathologiques des mutations sur Pro264 et His281 semblent largement impliquer la stabilisation des interfaces entre les domaines A et peuvent être assimilés à ceux précédemment décrits pour les mutations touchant Ala284, Ser289 ou Arg531 (Mazurier, *et al* 1997, Nesbitt, *et al* 2001b, Pipe, *et al* 1999, Pipe, *et al* 2001, Rudzki, *et al* 1996). Pour ce qui concerne p.Ile369Thr, nous démontrerons plus loin que cette mutation induit un retard d'activation du FVIII, ce qui, pour des raisons

méthodologiques, est plus facilement détectable par la méthode chronométrique en 1 temps que par la méthode chromogénique. Pour les acides aminés Phe1785 et Phe2127, le mécanisme physiopathologique reste à identifier.

**Phenotype and genotype in moderate/mild hemophilia A:
prevalence of discrepancy between one-stage and chromogenic
Factor VIII activity and twenty-nine novel mutations**

Running title:

FVIII:C discrepancy and genotype in hemophilia A

M. Trossaërt*, P. Boisseau[†], M. Sigaud*, M. Fouassier*, C. Ternisien*, A. Lefrançois-Bettembourg*, A. Quéméner[‡], C. Tesson[†], C. Thomas[†], S. Bezieau[†], E. Fressinaud*.

*Centre Régional de Traitement de l'Hémophilie, C.H.U. Nantes, France

[†] Laboratoire de Génétique Moléculaire, C.H.U. Nantes, France

[‡] INSERM, U892, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes/Angers, Université de Nantes, IFR26, Nantes, France

Word count: Abstract: 189 words

Main text: 3071 words

Keywords : Discrepant mild hemophilia
Coagulation Factor VIII
Chromogenic Factor VIII:C assay
Gene mutations

CORRESPONDING AUTHOR: Marc TROSSAËRT

Centre Régional de Traitement de l'Hémophilie
30 Boulevard Jean MONNET – CHU Hôtel-Dieu
44093 NANTES Cedex 01 – FRANCE
Tel: (33) 2 40 08 74 68
Fax: (33) 2 40 08 42 59

Mail to: marc.trossaert@chu-nantes.fr

Abstract :

We measured factor VIII activity (FVIII:C) using two methods (one-stage chromometric and chromogenic assays) in 307 patients with moderate/mild hemophilia belonging to 173 families. To compare chromometric and chromogenic assays, we used a chromometric to chromogenic ratio. Discrepancy was defined as a ratio < 0.5 or > 1.5 . Thirty-six patients from 17 families exhibited discrepancy between the two assays: 12 (6.9%) families had a low ratio (< 0.5) and 5 (2.9%) families had a high ratio (> 1.5). Molecular studies could be performed in 14 of these 17 families, leading always to the identification of a mutation; 8 different mutations were detected: p.Pro264Leu, p.His281Asn, p.Ile369Thr, p.Arg531His, p.Glu720Lys, p.Arg1749His, p.Phe1785Leu and p.Phe2127Ser. Furthermore, we report on the spectrum of mutations in 130 other families with moderate/mild hemophilia A and without discrepancy. Molecular analysis failed to detect the molecular defect in 4% of the moderately and in 12% of the mildly affected patients. In total 28 novel missense mutations and one novel single-residue deletion are described. We studied their putative involvement at known FVIII functional sites, their conservation status with cross-species FVIII proteins, and their spatial position within the FVIII 3D conformation.

Introduction

Hemophilia A is the most frequently occurring X-linked bleeding disorder (about 1 in 5000 males) and results from a defect in or decreased activity of factor VIII (FVIII). Hemophilia A is categorized clinically on the basis of the FVIII procoagulant activity (FVIII:C) into severe (< 1 IU/dL), moderate (1-5 IU/dL) and mild (6-30 IU/dL) disease states. In most laboratories, the severity of hemophilia A is assessed by the FVIII:C one-stage (1-st FVIII:C) assay. However, this method can lead to overestimations of the FVIII:C level, leading to misdiagnosis. Since the first description of this methodological discrepancy in 1988 [1], several studies have confirmed the phenomenon [2,3]. A number of molecular abnormalities have been reported as responsible for these discrepancies, mostly located in the A1, A2 and A3 domains of the FVIII gene [4-7]. The overestimation of FVIII:C by chrometric one-stage assay has been found as occurring in as many as 30-48% of hemophilic patients [2,4]. More recently, two studies have reported the opposite profile, finding reduced FVIII:C with the chrometric method but normal levels with the chromogenic method [8,9]. The aim of the present study was to determine the prevalence of such discrepancies in 307 moderate/mild hemophilic patients (173 families) from a single hemophilia department. We also performed molecular studies in 196 of these patients (144 families) to investigate the correlation between phenotype and genotype.

Materials and Methods

Patients

We investigated 307 moderate/mild hemophilic patients (FVIII:C from 2 to 40 IU/dL). All patients were registered at the hemophilia department of Nantes University Hospital between 1996 and 2006. These patients belonged to 173 families (1 to 18 identified

patients per family) and their family pedigree was established according to information given by the patients. All patients had a FVIII deficiency and/or a low FVIII:C / von Willebrand factor (VWF) antigen ratio (< 0.6). Diagnosis of type 2N von Willebrand disease was systematically excluded in all families by *in vitro* measurement of the capacity of VWF to bind FVIII [10]. No patient developed inhibitors during this study but 2 (5.8%) moderate and 2 (1.2%) mild hemophilic patients from 4 different families had a personal history of inhibitor development. A total of 144 families from this population could be included in the molecular analysis.

FVIII assays

Plasmas were drawn on 0.109 M buffered sodium citrate and then rapidly (< 2 hours after sampling) frozen at -80°C followed by thawing to perform assays in series. All patients underwent chromometric 1-st FVIII:C, chromogenic FVIII:C (Chromo-FVIII:C) and FVIII Antigen (FVIII:CAg) screening. The 1-st FVIII:C method is based on the activated partial thromboplastin time (APTT) using FVIII immunodepleted plasma (Stago, Asnières, France) with APTT reagent (CK Prest[®], Stago) on a STA-R[®] (Stago). In the chromogenic method, Chromo-FVIII:C levels are evaluated by firstly generating Factor Xa (FXa), as an indicator of FVIII cofactor activity in the presence of Factor IXa (FIXa), CaCl_2 and phospholipids (first stage) and then measuring the generation of FXa by chromogenic substrate generation (second stage). In our study, we used the chromogenic method (Coamatic[®] FVIII kit, Instrumentation Laboratory, Lexington, USA). FVIII:CAg was evaluated by ELISA (Asserachrom[®], Stago). All tests were performed in duplicate. For all methods, we used the reference preparation from Dade Behring (Marburg, Germany).

Molecular methods

Molecular analysis was performed in 196 patients (144 families), each having given their informed consent. Mutations were identified using denaturing high performance liquid chromatography screening (dHPLC; Wave 3500HT system and Navigator software, Transgenomics corp., San Jose, USA) or direct sequencing (ABI 3100; Applied Biosystems, Foster City, USA). In order to ensure the detection of splice sites as well as exon sequence alterations, we used a protocol adapted from the HAMSTeRS database (<http://europium.csc.mrc.ac.uk>). Some primers were changed due to amplification or interpretation problems (exons 4, 14 and 21). In order to exclude a polymorphism, each new mutation was tested on a panel of 96 Caucasian females (192 chromosomes) from the same population of western France as the patient population.

Mutation Nomenclature

The numbering of FVIII mutations is based on the cDNA sequence (NM_000132.2) according to international recommendations for the description of sequence changes given on the HGVS website (www.HGVS.org/mutnomen; last modified in May 2005) [11,12]. The numbering of theoretically deduced amino acid changes at the protein level was referenced to the FVIII HAMSTeRS mutation database: the first amino acid was thereby the Alanine 20 of the primary translation product. However, in order to report our novel missense mutations precisely and clearly, the corresponding HGVS-approved nomenclature is also given in Table 2.

Bioinformatic Analysis

All FVIII mutations were compared to those described in the international databases. The sequences for alignment of the FVIII proteins from other species (*Homo sapiens*,

Pan troglodytes, *Macaca mulatta*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Canis familiaris*, *Felis catus*, *Bos taurus*, *Gallus gallus*, *Xenopus tropicalis* and *Tetraodon nigroviridis*) were obtained from the Ensembl database (<http://www.ensembl.org/index.html>).

FVIII 3D structure exploration

The 3D structure model of factor VIII protein [13] was downloaded from the HAMSTeRS database and the relative position of mutated residues was examined using InsightII visualizer (Accelrys, San Diego, CA, USA).

Statistical analysis

All results are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Statistical analysis was performed using paired Student's t test or Spearman's correlation on Statview[®] software. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

FVIII:C assays

Results for 1-st and Chromo-FVIII:C methods were 21 ± 14 IU/dL (range: 2 – 81 IU/dL) and 28 ± 22 IU/dL (range: 2 - 194 IU/dL) respectively, and showed significant correlation ($r = 0.56$; $p < 0.0001$; $n = 307$) though significant difference ($p < 0.0001$). As expected, each patient had FVIII:C < 40 IU/dL with at least one FVIII:C assay. To compare chromometric and chromogenic assays, we defined a 1-st FVIII:C to Chromo-FVIII:C (1-st/Chromo) ratio. The mean value was 0.88 ± 0.33 (range: 0.11 – 2.8). To define normal values, we excluded patients with values outside of mean ± 3 SD and considered as non-discrepant 1-st/Chromo ratios between 0.5 and 1.5. Among the 173 families (307

patients), 17 families (36 patients) had values falling outside defined normal limits, comprising from 12 (6.9%) families (30 patients) with a low ratio (< 0.5) and 5 (2.9%) other families (6 patients) from with a high ratio (>1.5) (Figure 1). Results are detailed in Table 1.

After having excluded the patients with discrepant results, the correlation between chromometric and chromogenic assays became much clearer ($r = 0.95$; $n = 271$), though Chromo-FVIII:C results remained statistically higher than 1-st FVIII:C (23.8 ± 14.6 vs 21.43 ± 13.3 IU/ dL respectively ; $p < 0.0001$).

One-Stage FVIII:C to FVIII:CAg ratios were higher than 0.6 in 241 (79%) patients from 140 (81%) families and lower than 0.5 in 50 (16%) patients from 27 (16%) families. Thus, we considered 140 families as having a quantitative deficiency and 27 families as having a qualitative deficiency. No firm conclusions could be made for 6 families (FVIII:C to FVIII:CAg ratios between 0.5 and 0.6). All 17 families with discrepant results were considered as having a qualitative deficiency (1-st FVIII:C or FVIII:C Chromo to FVIII:CAg ratio < 0.5).

DNA analysis

Mutation detection was carried out on 196 patients from 144 families in whom 14 exhibited discrepant FVIII:C results. Thirty-four patients (23 families) had moderate hemophilia whereas 162 patients (121 families) had mild hemophilia. We identified 51 different causal mutations in respectively 22/23 families (96%) and 106/121 (88%) of moderate and mild hemophilia. Among them, 29 (57%) have not been previously described and were detected in 64 families. Most of these novel mutations were base substitutions inducing missense mutations. One small deletion was found in one family. We identified no nonsense or splice site mutations. Table 2 reports the characteristics of

these 29 novel mutations including molecular data and corresponding laboratory results. These mutations were distributed throughout the FVIII gene with all exons except four affected (exons 1, 2, 3 and 6); 6 are located in A1 domain, 1 in $\alpha 1$ interdomain region, 9 in A2 domain, 3 in A3 domain, 6 in C1 domain and 4 in C2 domain. Among the novel mutations, 18/29 (62%) concerned highly conserved residues between different species. In the discrepant families, 9 mutations have been identified; 5 of them are novel (p.Pro264Leu, p.His281Asn, p.Ile369Thr, p.Phe1785His, p.Phe2127Ser). All results are reported in Table 2 and Figure 2. Twelve (41%) of our novel mutations are located on residue sites previously described, though each substituted with a different amino acid (Pro146, Val201, His281, Phe436, Asp542, Leu625, Met682, Arg1696, His1961, Ile2071, Thr2086, Gln2246). Among missense mutations, most of them induce probable changes of the biochemical properties: substitution with a hydrophobic residue such as p.Pro146Met, or a bulky side chain such as p.Val457Phe, or a smaller residue such as p.Pro151Ser and p.Phe2127Ser, or a charged side chain such as p.Gln2246His, or at last from the loss of the aromatic residue moiety such as p.Phe436Leu, p.Phe1785Leu and p.Phe2127Ser.

The other 22 mutations that were previously reported are detailed in table 3; 5 are located in A2 domain, 1 in $\alpha 1$ and 1 in $\alpha 2$ interdomain regions, 4 in A3 domain, 7 in C1 domain and 4 in C2 domain.

3D analysis

Novel mutations located in A1, A2 or A3 domains were studied by 3D analysis. Unfortunately, the available 3D model does not propose acceptable modelling for interdomains or C domains of FVIII protein. Most mutations are located on the external surface of the protein, often involving structuring residues. Two mutations (p.His281Asn,

p.Glu676Gly) are located inside the interface of the three A domains and may also induce important modifications of the FVIII structure. Concerning mutations inducing discrepant phenotype, we can describe that Pro264 and His281 are located in the A1-A2 interface just in front of Gln645 and Ala284, Ser289, Arg531 respectively (figure 3). Three of the mutation sites (Val201, Pro472, Asp542) appeared implicated, or very close to residues involved, in the binding of metal ions (i.e. respectively residues His267- His315-Cys310 or Asp538-Asp542).

DISCUSSION

The results reported here show a high correlation between 1-st and Chromo-FVIII:C evaluations in hemophilic patients with a slightly though significantly higher value for Chromo-FVIII:C compared to 1-st FVIII:C in hemophilic patients defined here as “non-discrepant” (1-st/Chromo ratio between 0.5 and 1.5). Such differences have been widely reported, mostly in measurements of FVIII:C levels in plasmatic or recombinant FVIII concentrates, although the basic causes of this discrepancy remain unclear [14,15]. To our knowledge, no data has been included in previous studies comparing 1-st and Chromo-FVIII:C assays in such a large population of hemophilic patients. The mean difference did, however, remain close to 2.5 IU/dL. Figure 1 shows that these upper and lower limits allowed a Gaussian distribution of FVIII:C in non-discrepant patients. In a large population of 173 families with moderate/mild hemophilia mostly from the western coast of France, we found discrepant values in 17/173 families (9.8%). This prevalence does not confirm previous reports concerning the frequency of discrepant results in a population of hemophiliacs where high ratios were diagnosed in one third [2] or even in 48% of patients [4]. Unlike these reports where all patients had 1-st FVIII:C results much higher (> 1.5 fold) than those of the Chromo-FVIII:C assay, this phenotype

appeared to be relatively uncommon (2.8% of families) in our experience. Furthermore, low ratios that are rarely described were fairly frequent in our population of mild hemophilic families (6.9%). In the literature, most mutations reported in patients with “standard” discrepancy (i.e. 1-st/Chromo ratio > 1.5) are located in the A1, A2 and A3 domains [3,6,7,16,17], except for one patient with a mutation in the C2 domain [4]. These previously published mutations are detailed in Table 4. In the present study, also concerning patients with “standard” discrepancy, we identified 5 mutations. Two of these, located on residues Arg531 and Arg1749, have previously been reported as inducing FVIII:C discrepancy by decreased FVIIIa stability [6,16,18,19]. Rodgers *et al* particularly demonstrated that the reduced activity detected using chromogenic assay is due, at least in part, to the instability of the factor VIII molecule during long incubation [19]. The amino acid residues concerned by the newly identified mutations implicated in discrepant FVIII:C results, were located in the A1 (Pro264 and His281) or A3 (Phe1785) domains. The FVIII 3D structure demonstrated that one of these (p.His281Asn) could be considered as similar to mutations involving Ala284, Ser289 or Arg531 since the replacement of His281 by Asn may perturb the stabilization of the A domain interface. Indeed, the very close Arg282 has been suggested as implicated in a H-bond with Arg531 suggesting that any modification of these interactions may induce faster spontaneous dissociation of the A2 domain, particularly diagnosed by two-stage FVIII:C assays [5]. Concerning Pro264, the 3D structure model of the FVIII protein [13] reveals its location just in front of Gln645 in the A1-A2 interface, very close to Ser289. We can also postulate that the substitution of this structuring Pro by Leu could interfere with FVIIIa stability.

More recently, three studies have reported patients with reduced FVIII:C levels when assayed with the chrometric method but normal values with the chromogenic method,

involving three missense mutations: p.Glu321Lys, p.Tyr346Cys and p.Glu720Lys [8,9,20]. This phenotype is sometimes called an “inverse” discrepancy. The two first residue substitutions are located close to (Glu321) or within (Tyr346) the interdomain region *a1* (337-372) and were thought to delay thrombin activation of FVIII since *in vitro* prolonged incubation times allowed FVIII activation. The mutation in the third case (p.Glu720Lys) is located between the A2 and B domains, in the *a2* interdomain region, with the mutated FVIII showing a 4-fold reduced procoagulant activity [9]. In our population, we have identified 3 mutations inducing “inverse” discrepancy including 2 newly identified: p.Ile369Thr and p.Phe2127Ser. The residue Ile369 is located within the *a1* acidic domain, very close to Arg372, which is the activation site of thrombin. In FVIII Thr369, the substitution by a hydrophilic residue could therefore induce altered interactions between thrombin and FVIII. Varying the duration of incubation times, we have previously demonstrated that FVIII Thr369 appears quite similar to the mutation involving Glu321 or Tyr346 previously described, i.e. inducing a delayed thrombin activation of FVIII [21]. This phenomenon could easily explain why in chromogenic assays the longer the incubation time, the higher the FVIII:C. The second newly identified mutation (p.Phe2127Ser), located in the C1 domain, is the first to be described in such a discrepancy phenomenon. As this mutation was found in 7 initially unrelated discrepant families, genealogic investigations were undertaken and demonstrated that 5 of these families had a common ancestor living in the XVIIIth century. In light of these findings, we can postulate that the prevalence of “inverse” discrepancy results from an actual bias on the selection of patients identified as unrelated but who are in fact from the same family. In the same way, our low prevalence of “classical” discrepancy as compared to previous reports [1,2,4] may also reflect a bias on the selected population.

Causal FVIII mutations were identified in 96% of moderate and 88% of mild hemophilic families. These detection rates are in agreement with those previously described [22-26]. The FVIII mutations are distributed all along the gene and the different locations are detailed according to severity on Figure 2. In the present study, we identified 9/51 (18%) of the FVIII mutations as located in exon 23 (C1 domain); something not reported by the HAMSTeRS database. Interestingly, the most concerned exons (11, 14 and 23) were found to be exactly the same as those recently described by Bogdanova et al in a study involving a German population of moderate/mild hemophilic patients [22]. These authors even suggested that it would be reasonable to start the molecular analysis in these exons in such hemophilic patients [22]. Thus, according to these data, it could be postulated that other stages in the life cycle of FVIII can be altered and induce FVIII deficiencies diagnosed as mild hemophilia A.

Residues which are conserved cross-species, buried and hydrophobic are strongly suspected of participating in the stability of globular proteins [27,28]. In this study, 62% of the novel mutations concerned highly conserved (at least until *Xenopus tropicalis*) residues between different species with a possible disruptive effect on FVIII conformation. Interestingly, the HAMSTeRS database revealed 41% of our novel mutations as located on residue sites previously described as responsible for moderate/mild hemophilia A. This constitutes an indirect relevance to the biochemical importance of these amino acids in the FVIII function.

p.Gln305Pro is located in the FVIII Thr291–Phe309 region that constitutes a binding site for the intracellular chaperone immunoglobulin-binding protein (BiP) [29]. This mutation could therefore diminish the intracellular BiP-mediated FVIII transport to the extracellular compartment.

For each novel mutation, we evaluated the impact of the amino acid substitution on the 3D structure model of the FVIII protein. The location of the residue sites and the biochemical changes are often compatible with alterations of the FVIII properties. Interestingly, 3 of the mutation sites (Val201, Pro472, Asp542) appeared implicated in the binding of metal ions as recently defined by Shen et al [30]. Bearing in mind the importance of these metal ions in FVIIIa activity [31], these mutations could induce significant modifications of the FVIII protein. Such as p.His281Asn, another mutation (p.Glu676Gly) is located inside the interface of the three A domains and may also induce important modifications of the FVIII structure. Concerning the C1 and C2 regions, it would be very interesting to evaluate the impact of these novel mutations on the A2-C1 interface and binding to VWF. Indeed, some of the implicated residues are very close to sites usually described as important in these interactions (such as Ile2098, Ser2119 or Arg2150) [32] or as exposed clusters of hydrophobic regions (Ile2080, Leu2171, Ile2145, and Leu2107 and Leu2123-Val2125, Ile2102, Phe2068 and Phe2127) [13]. Unfortunately, the complete crystallographic structure described by Shen et al, pointing out some conformational differences with the model of Stoilova-McPhie in the orientation of the C1 domain, is not yet available to allow us to carry out this specific evaluation [13,30].

In conclusion, within our large series of 173 families (307 patients) with moderate/mild hemophilia A from the same haemophilia centre, we have demonstrated a discrepancy between FVIII:C assays in 10% (17/173) of families; and the prevalence of this phenomenon depends on the selection of the studied population. We detected 29 novel mutations of the FVIII gene (of whom 5 induced discrepant FVIII:C results) and, in most cases, we were further able to propose a physiopathologic explanation by combining

state of the art bioinformatics tools and knowledge of the FVIII structure/function relationships.

REFERENCES

1. Parquet-Gernez A, Mazurier C and Goudemand M. Functional and immunological assays of FVIII in 133 haemophiliacs--characterization of a subgroup of patients with mild haemophilia A and discrepancy in 1- and 2-stage assays. *Thromb Haemost.* 1988;59:202-6
2. Duncan EM, Duncan BM, Tunbridge LJ, *et al.* Familial discrepancy between the one-stage and two-stage factor VIII methods in a subgroup of patients with haemophilia A. *Br J Haematol.* 1994;87:846-8
3. Keeling DM, Sukhu K, Kembell-Cook G, *et al.* Diagnostic importance of the two-stage factor VIII:C assay demonstrated by a case of mild haemophilia associated with His1954-->Leu substitution in the factor VIII A3 domain. *Br J Haematol.* 1999;105:1123-6
4. Nesbitt I, Kinks J, Sampson B, *et al.* Discrepant one and two stage FVIII assays are very common in mild haemophilia A : correlation with FVIII gene mutations. *Thromb Haemost.* 2001;84:Abstract 195
5. Pipe SW, Saenko EL, Eickhorst AN, *et al.* Hemophilia A mutations associated with 1-stage/2-stage activity discrepancy disrupt protein-protein interactions within the triplicated A domains of thrombin-activated factor VIIIa. *Blood.* 2001;97:685-91
6. Rudzki Z, Duncan EM, Casey GJ, *et al.* Mutations in a subgroup of patients with mild haemophilia A and a familial discrepancy between the one-stage and two-stage factor VIII:C methods. *Br J Haematol.* 1996;94:400-6
7. Schwaab R, Oldenburg J, Kembell-Cook G, *et al.* Assay discrepancy in mild haemophilia A due to a factor VIII missense mutation (Asn694Ile) in a large Danish family. *Br J Haematol.* 2000;109:523-8
8. Mumford AD, Laffan M, O'Donnell J, *et al.* A Tyr346-->Cys substitution in the interdomain acidic region a1 of factor VIII in an individual with factor VIII:C assay discrepancy. *Br J Haematol.* 2002;118:589-94
9. Roelse J, Mertens K, van Mourik J, *et al.* Altered sensitivity towards factor IXa explains assays discrepancy in plasma of haemophilia A patients with GLU720LYS substitution in factor VIII. *Thromb Haemost.* 1999;82:Abstract 5
10. Caron C, Mazurier C and Goudemand J. Large experience with a factor VIII binding assay of plasma von Willebrand factor using commercial reagents. *Br J Haematol.* 2002;117:716-8
11. Antonarakis SE. Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. Nomenclature Working Group. *Hum Mutat.* 1998;11:1-3
12. den Dunnen JT and Paalman MH. Standardizing mutation nomenclature: why bother? *Hum Mutat.* 2003;22:181-2
13. Stoilova-McPhie S, Villoutreix BO, Mertens K, *et al.* 3-Dimensional structure of membrane-bound coagulation factor VIII: modeling of the factor VIII heterodimer within a 3-dimensional density map derived by electron crystallography. *Blood.* 2002;99:1215-23
14. Barrowcliffe TW, Raut S and Hubbard AR. Discrepancies in potency assessment of recombinant FVIII concentrates. *Haemophilia.* 1998;4:634-40
15. Kirkwood TB and Barrowcliffe TW. Discrepancy between one-stage and two-stage assay of factor VIII:C. *Br J Haematol.* 1978;40:333-8
16. Mazurier C, Gaucher C, Jorieux S, *et al.* Mutations in the FVIII gene in seven families with mild haemophilia A. *Br J Haematol.* 1997;96:426-7
17. Hill M, Deam S, Gordon B, *et al.* Mutation analysis in 51 patients with haemophilia A: report of 10 novel mutations and correlations between genotype and clinical phenotype. *Haemophilia.* 2005;11:133-41
18. Pipe SW, Eickhorst AN, McKinley SH, *et al.* Mild hemophilia A caused by increased rate of factor VIII A2 subunit dissociation: evidence for nonproteolytic inactivation of factor VIIIa in vivo. *Blood.* 1999;93:176-83
19. Rodgers SE, Duncan EM, Barbulescu DM, *et al.* In vitro kinetics of factor VIII activity in patients with mild haemophilia A and a discrepancy between one-stage and two-stage factor VIII assay results. *Br J Haematol.* 2007;136:138-45
20. Goodeve A, Hinks J, Nesbitt I, *et al.* Unusual discrepant factor VIII:C assays in haemophilia A patients with Tyr346Cys and Glu321Lys FVIII gene mutations. *Thromb Haemost.* 2001;Suppl july:Abstract P1370
21. Trossaert M, Regnault V, Sigaud M, *et al.* Mild hemophilia A with factor VIII assay discrepancy: using thrombin generation assay to assess the bleeding phenotype. *J Thromb Haemost.* 2008;6:486-93

22. Bogdanova N, Markoff A, Eisert R, *et al.* Spectrum of molecular defects and mutation detection rate in patients with mild and moderate hemophilia A. *Hum Mutat.* 2007;28:54-60
23. Liu ML, Nakaya S and Thompson AR. Non-inversion factor VIII mutations in 80 hemophilia A families including 24 with alloimmune responses. *Thromb Haemost.* 2002;87:273-6
24. Citron M, Godmilow L, Ganguly T, *et al.* High throughput mutation screening of the factor VIII gene (F8C) in hemophilia A: 37 novel mutations and genotype-phenotype correlation. *Hum Mutat.* 2002;20:267-74
25. Habart D, Kalabova D, Novotny M, *et al.* Thirty-four novel mutations detected in factor VIII gene by multiplex CSGE: modeling of 13 novel amino acid substitutions. *J Thromb Haemost.* 2003;1:773-81
26. Cutler JA, Mitchell MJ, Smith MP, *et al.* The identification and classification of 41 novel mutations in the factor VIII gene (F8C). *Hum Mutat.* 2002;19:274-8
27. Matthews BW. Structural and genetic analysis of the folding and function of T4 lysozyme. *Faseb J.* 1996;10:35-41
28. Sauer RT, Milla ME, Waldburger CD, *et al.* Sequence determinants of folding and stability for the P22 Arc repressor dimer. *Faseb J.* 1996;10:42-8
29. Swaroop M, Moussalli M, Pipe SW, *et al.* Mutagenesis of a potential immunoglobulin-binding protein-binding site enhances secretion of coagulation factor VIII. *J Biol Chem.* 1997;272:24121-4
30. Shen BW, Spiegel PC, Chang CH, *et al.* The tertiary structure and domain organization of coagulation factor VIII. *Blood.* 2008;111:1240-7
31. Fay PJ and Jenkins PV. Mutating factor VIII: lessons from structure to function. *Blood Rev.* 2005;19:15-27
32. Jacquemin M, Lavend'homme R, Benhida A, *et al.* A novel cause of mild/moderate hemophilia A: mutations scattered in the factor VIII C1 domain reduce factor VIII binding to von Willebrand factor. *Blood.* 2000;96:958-65

Table 1

	Family	Mutation	FVIII:C			FVIII:CAg (IU/dL)
			1-st assay (IU/dL)	chromogenic assay (IU/dL)	1-st/Chromo FVIII:C ratio	
LOW RATIO	A	p.Phe2127Ser	7	49	0.14	71
			5	31	0.16	41
			20	100	0.20	148
			14	64	0.22	84
			16	72	0.22	94
			12	53	0.23	61
			8	33	0.24	30
			14	52	0.27	49
			24	67	0.36	70
			13	51	0.25	50
	B	p.Phe2127Ser	4	32	0.13	50
			4	30	0.13	16
	C	p.Phe2127Ser	10	55	0.18	34
			25	124	0.20	130
	D	p.Phe2127Ser	8	40	0.20	43
			13	45	0.29	58
	E	p.Phe2127Ser	18	76	0.24	82
			16	57	0.28	57
	F	ND	18	61	0.30	74
	G	p.Ile369Thr	10	82	0.12	126
			9	74	0.12	91
			20	105	0.19	156
			16	100	0.16	100
	H	p.Phe2127Ser	9	32	0.28	47
			7	18	0.39	39
	I	p.Glu720Lys	30	99	0.30	128
	J	p.Phe2127Ser	3	11	0.27	18
			4	14	0.29	26
	K	ND	39	194	0.20	195
	L	ND	39	115	0.34	144
HIGH RATIO	M	p.His281Asn	38	25	1.52	70
	N	p.Arg531His	81	39	2.08	97
	O	p.Arg1749His	71	32	2.22	80
	P	p.Phe1785Leu	21	13	1.62	40
	R	p.Pro264Leu	30	16	1.88	47
			14	5	2.80	39

Table 2

Nucleotide Change	Amino Acid Change		H	P	M	R	Mu	C	F	B	G	X	T	Exon	Domain	Patients (n)	1-st FVIII:C (IU/dl)	Chromo-FVIII:C (IU/dl)	FVIII:CAg (IU/dl)	Inhibitor (Y/N)
	HAMSTeRS	HGVS																		
c.494C>G	p.Pro146Arg	p.Pro165Arg												4	A1	1	2	<3	7	Y
c.508C>T	p.Pro151Ser	p.Pro170Ser												4	A1	1	32	33	29	N
c.658G>C	p.Val201Leu	p.Val220Leu				M			?			I		5	A1	1	22	18	29	N
c.848C>T	p.Pro264Leu*	p.Pro283Leu											N	7	A1	2	14-30	5-16	39-47	N
c.898C>A	p.His281Asn*	p.His300Asn												7	A1	1	38	25	70	N
c.971A>C	p.Gln305Pro	p.Gln324Pro				R					S	K	S	7	A1	32	11.8 ± 5.7 (6 – 31)	13.5 ± 6.6 (6 – 38)	12.3 ± 6.1 (5 – 29)	N
c.1163T>C	p.Ile369Thr*	p.Ile388Thr											?	8	A1/A2	4	13.7 ± 5.2 (9 – 20)	90.2 ± 14.7 (74 – 105)	118 ± 29.2 (91 – 156)	N
c.1365T>G	p.Phe436Leu	p.Phe455Leu												9	A2	1	6	8	8	N
c.1426G>T	p.Val457Phe	p.Val476Phe											?	9	A2	1	38	38	53	N
c.1472C>T	p.Pro472Leu	p.Pro491Leu											?	10	A2	1	25	29	37	N
c.1642C>G	p.Leu529Val	p.Leu548Val												11	A2	1	28	33	49	N
c.1683T>A	p.Asp542Glu	p.Asp561Glu												11	A2	2	3 - 3	<3 - <3	4 - 4	N
c.1832_1834delCAA	p.Gln592del	p.Gln611del		?		R			K		R	K	H	12	A2	1	17	16	20	N
c.1931T>C	p.Leu625Ser	p.Leu644Ser											R	13	A2	1	5	7	6	N

c.2084A>G	p.Glu676Gly	p.Glu695Gly				V			?			?	M	13	A2	1	22	27	32	N
c.2101A>G	p.Met682Val	p.Met701Val							?		V	P	P	13	A2	1	15	19	33	N
c.5144G>C	p.Arg1696Pro	p.Arg1715Pro										?	P	14	A3	1	6	8	23	N
c.5412C>G	p.Phe1785Leu*	p.Phe1804Leu												16	A3	1	21	13	40	N
c.5939A>G	p.His1961Arg	p.His1980Arg							?		Q	N	L	18	A3	1	7	9	14	N
c.6267G>C	p.Trp2070Cys	p.Trp2089Cys										L		21	C1	2	5 - 8	10 - 11	10 - 10	N
c.6268A>C	p.Ile2071Leu	p.Ile2090Leu							?					21	C1	1	23	28	24	N
c.6314C>T	p.Thr2086Ile	p.Thr2105Ile												22	C1	1	35	40	38	N
c.6437T>C	p.Phe2127Ser*	p.Phe2146Ser											H	23	C1	19	12.6 ± 6.8 (3 - 25)	47.8 ± 27.2 (3 - 124)	56.5 ± 31.5 (16 - 148)	N
c.6448G>A	p.Asp2131Asn	p.Asp2150Asn												23	C1	4	14.3 ± 7.1 (8 - 22)	17.7 ± 8.1 (12 - 127)	17.3 ± 6.7 (8 - 23)	N
c.6512A>G	p.His2152Arg	p.His2171Arg									N			23	C1	1	12	8	14	N
c.6607G>C	p.Ala2184Pro	p.Ala2203Pro				W	V				G	T	Q	23	C2	3	2 - 3 - 4	3 - 3 - 3	<3 - <3 - <3	Y/N **
c.6793C>A	p.Gln2246Lys	p.Gln2265Lys							?					25	C2	1	3	<3	<3	N
c.6795G>C	p.Gln2246His	p.Gln2265His							?					25	C2	7	2.9 ± 1.1 (2 - 5)	3.5 ± 0.5 (<3 - 4)	3.5 ± 0.5 (<3 - 23)	N
c.6929C>T	p.Thr2291Ile	p.Thr2310Ile									S		E	26	C2	1	30	36	42	N

Table 3

Amino Acid Change		Exon	Domain	Patients (n)	1-st FVIII:C (IU/dl)	Chromo-FVIII:C (IU/dl)	FVIII:CAg (IU/dl)	Inhibitor (Y/N)
HAMSTeRS	HGVS							
p.Arg527Trp	p.Arg546Trp	11	A2	3	38-33-41	31-35-35	53-62-54	N
p.Arg531His*	p.Arg550His	11	A2	1	81	39	97	N
p.Arg593Cys	p.Arg612Cys	12	A2	3	16-12-13	13-13-15	10-9-15	N
p.Cys692Phe	p.Cys711Phe	14	A2	3	1-2-2	2-2-5	15-21-30	N
p.Ala704Thr	p.Ala723Thr	14	A2	1	6	5	11	N
p.Glu720Lys*	p.Glu739Lys	14	a2	1	30	99	128	N
p.Arg1689Cys	p.Arg1708Cys	14	a3	1	8	13	126	N
p.Arg1749His*	p.Arg1768His	15	A3	1	71	32	80	N
p.Glu1875Gly	p.Glu1894Gly	17	A3	1	2	3	<3	N
p.Ser2011Asn	p.Ser2030Asn	19	A3	30	28.9 ± 10.1 (18-42)	29.6 ± 9.5 (18-44)	29.0 ± 10.4 (20-48)	N
p.Val2016Ala	p.Val2125Ala	19	A3	3	10-10-10	10-9-12	17-6-12	N
p.Cys2021Tyr	p.Cys2040Tyr	20	C1	3	3-4-8	7-7-10	3-9-7	N
p.Tyr2105Cys	p.Tyr2124Cys	22	C1	1	14	18	10	N
p.Asn2129Ser	p.Asn2148Ser	23	C1	1	18	12	15	N
p.Arg2150His	p.Arg2169His	23	C1	4	2.9 ± 1.2 (2 – 5)	2.3 ± 1.7 (2 – 4)	4.2 ± 2.5 (<3 – 7)	N
p.Arg2159Cys	p.Arg2178Cys	23	C1	1	12	13	19	N
p.Arg2159His	p.Arg2178His	23	C1	26	28.5 ± 8.9 (13-43)	25.3 ± 13.4 (16-42)	20.1 ± 7.2 (10-33)	N

p.Arg2163His	p.Arg2182His	23	C1	2	1-2	2-2	<3 - <3	N
p.Gln2189Glu	p.Gln2208Glu	24	C2	6	27± 8.4 (20 – 39)	25 ± 8.4 (18 – 42)	21± 8.4 (15 – 43)	N
p.Arg2209Gln	p.Arg2228Gln	24	C2	4	1-1-1-2	2-2-2-3	<3 - <3 - <3- <3	N
p.Trp2229Cys	p.Trp2248Cys	25	C2	3	2-1-2	2-2-3	<3-<3-<3	N
p.Pro2300Leu	p.Pro2319Leu	26	C2	2	12-11	11-9	11-12	N

Table 4 :

Domain	Mutation	1-st/2-st FVIII:C ratio	Reference
A1 (1-336)	p.Glu272Lys p.Glu321Lys p.Ala284Glu p.Ala284Pro p.Ser289Lys	High Low High High High	Nesbitt <i>et al.</i> [4] Goodeve <i>et al.</i> [20] Rudzki <i>et al.</i> [6] Mazurier <i>et al.</i> [16] Rudzki <i>et al.</i> [6], Nesbitt <i>et al.</i> [4]
a1 (337-372)	p.Tyr346Cys	Low	Mumford <i>et al.</i> [8], Hill <i>et al</i> [17]
A2 (373-711)	p.Arg527Trp p.Arg531His p.Asn694Ile p.Arg698Leu p.Arg698Trp	High High High High High	Mazurier <i>et al.</i> [16] Rudzki <i>et al.</i> [6], Mazurier <i>et al.</i> [16], Pipe <i>et al.</i> [18] Schwaab <i>et al.</i> [7] Rudzki <i>et al.</i> [6] Rudzki <i>et al.</i> [6]
a2 (712-739)	p.Glu720Lys	Low	Roelse <i>et al.</i> [9]
B (740 – 1648)			
a3 (1649 –1689)	p.Glu1682Lys	High	Nesbitt <i>et al.</i> [4]
A3 (1690 – 2020)	p.Arg1749His p.His1755Tyr p.Leu1932Phe p.Met1947Ile p.Met1947Val p.His1954Leu p.Arg1966Gln	High High High High High High High	Rodgers <i>et al.</i> [19] Nesbitt <i>et al.</i> [4] Rudzki <i>et al.</i> [6] Mazurier <i>et al.</i> [16] Hill <i>et al</i> [17] Keeling <i>et al.</i> [3], Nesbitt <i>et al.</i> [4] Nesbitt <i>et al.</i> [4]
C1 (2021 – 2173)			
C2 (2174 – 2332)	p.Pro2300Leu	High	Nesbitt <i>et al.</i> [4]

Figure 1

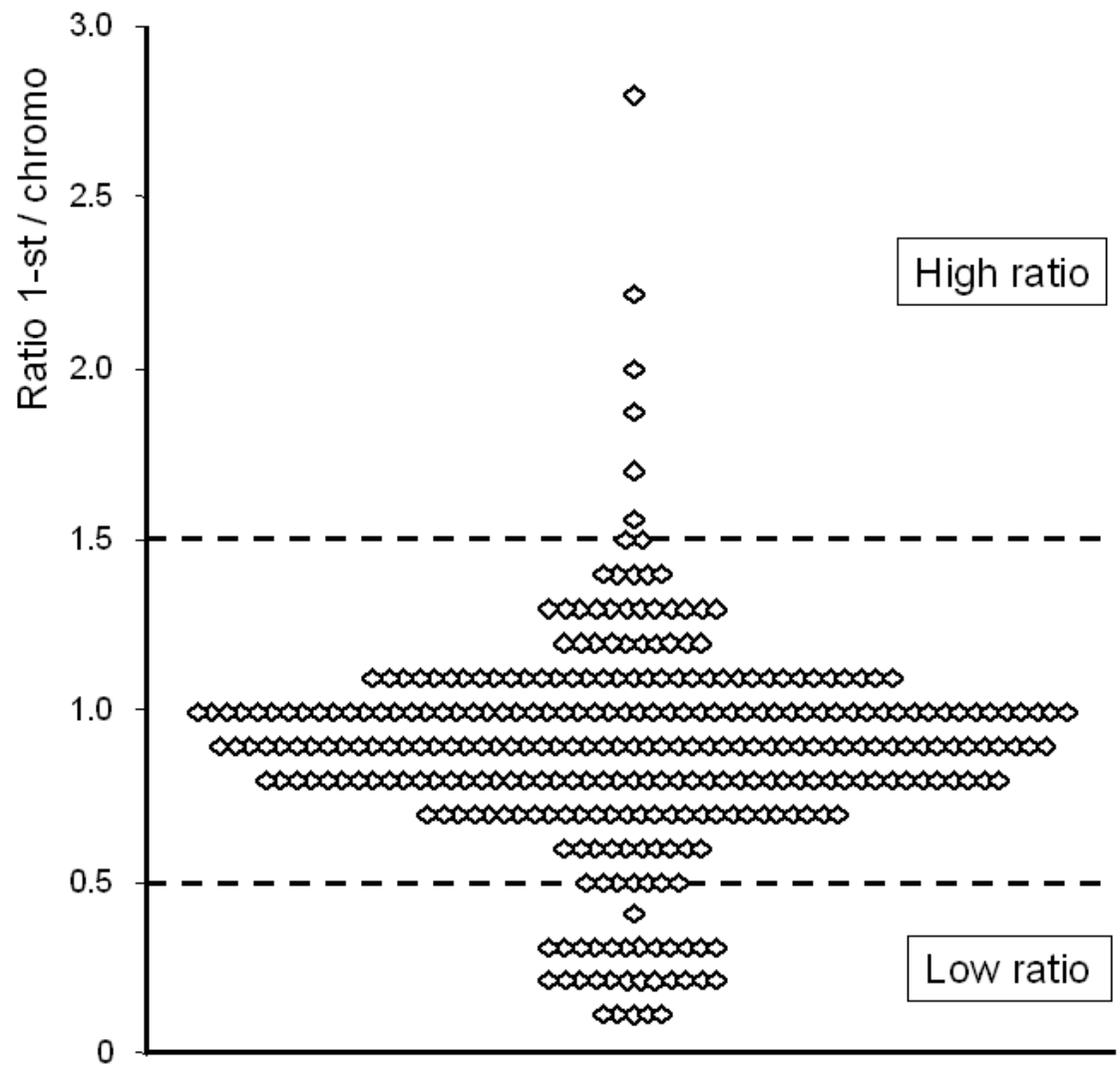


Figure 2

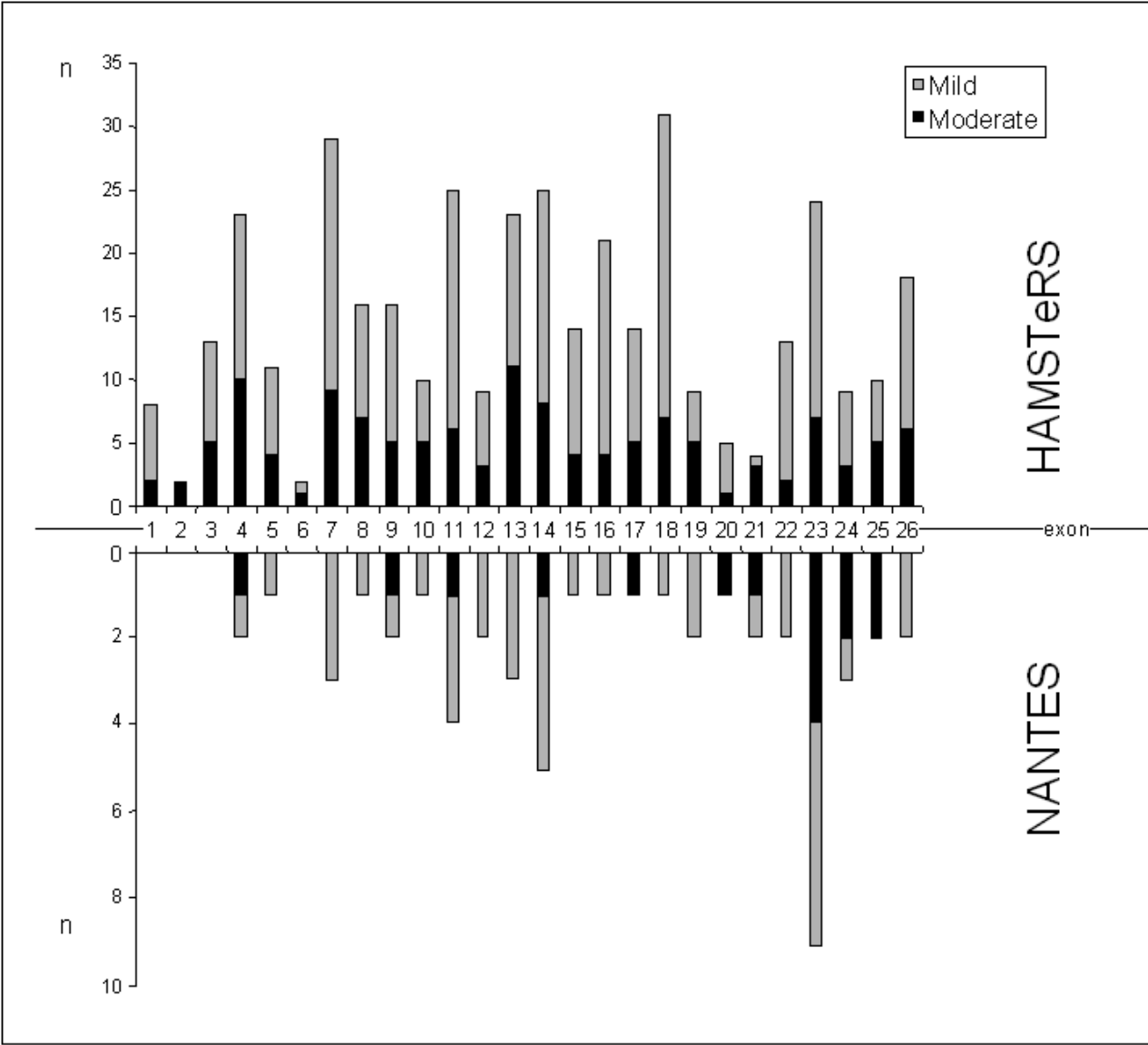


Figure 3

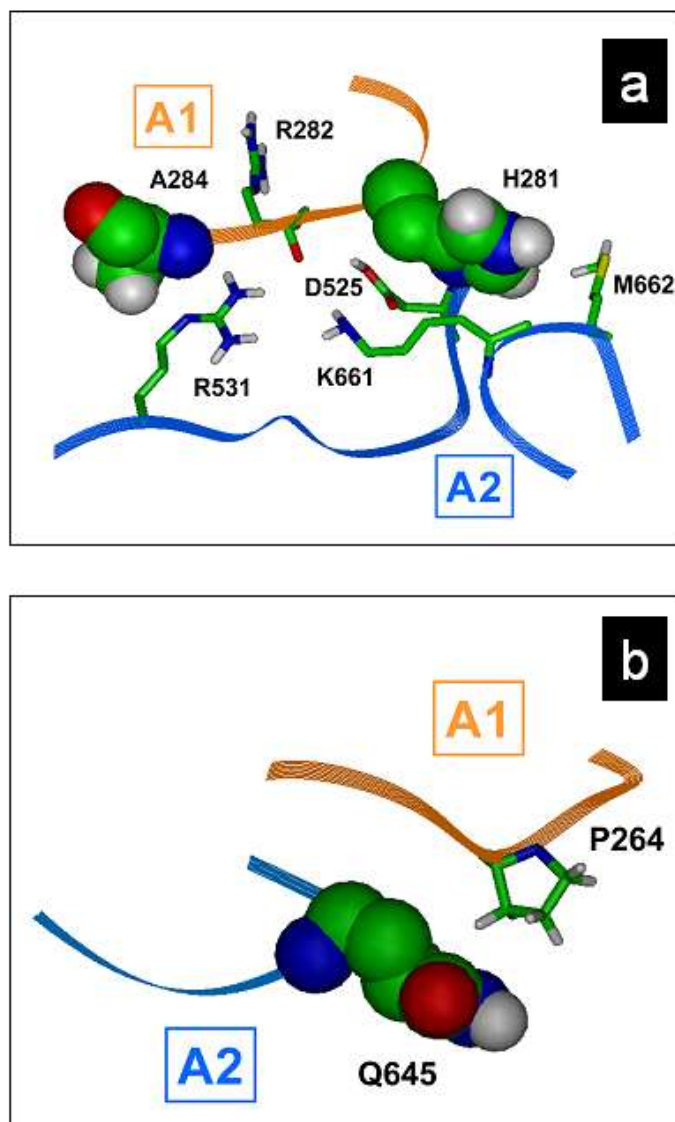


Figure legends:

Table 1: 17 families with abnormal chronometric to chromogenic ratios: A to L with a low ratio (< 0.5) and M to R with a high ratio (> 1.5). Results of FVIII:C assays and FVIII mutations are indicated according to the HAMSTeRS nomenclature. ND = not determined.

Table 2: Molecular and laboratory characteristics of the 29 novel mutations in our moderate/mild hemophilia A population. Nucleotide numbering refers to the FVIII GenBank reference sequence (N 000132.2) and the numbering of changed nucleotides is given according to the recommended HGVS nomenclature. The numbering of changed amino acid residues is given according to the initially reported HAMSTeRS nomenclature, and according to the recommended HGVS nomenclature. Degree of conservation of amino acid sequences of FVIII in different species: *Homo sapiens* (H), *Pan troglodytes* (P), *Macaca mulatta* (M), *Rattus norvegicus* (R), *Mus musculus* (Mu), *Canis familiaris* (C), *Felis catus* (F), *Bos taurus* (B), *Gallus gallus* (G), *Xenopus tropicalis* (X) and *Tetraodon nigroviridis* (T). If the residue is not conserved, the substituted amino acid is specified. “?” = undetermined;

* Mutation associated with FVIII:C discrepancy. **One of these 3 patients has developed an inhibitor.

Table 3: Molecular and laboratory characteristics of the 22 mutations previously described in HAMSTeRS database in our moderate/mild hemophilia A population. The numbering of changed amino acid residues is given according to the initially reported HAMSTeRS nomenclature, and according to the recommended HGVS nomenclature. * Mutation associated with FVIII:C discrepancy.

Table 4: Mutations and results of the 1-st to 2-st FVIII:C ratio in previously described FVIII:C discrepancy in hemophilia A.

Figure 1: Comparison between 1-st and chromogenic FVIII:C assays: distribution of the 1-st/Chromo ratios of the 307 moderate/mild hemophilic patients. Low and high ratios are defined as < 0.5 and > 1.5 respectively.

Figure 2: Spectrum of the mutations in moderate (black) and mild (grey) hemophilia A according to exons of the FVIII gene in the HAMSTeRS database (upper histogram) or Nantes' hemophilia centre (lower histogram). In both cases, each mutation is counted only once regardless of the number of patients in whom it was diagnosed.

Figure 3: Predicted destabilization of interdomain interaction His281 and Pro264 region. (a) Close-up view of a portion of the A1-A2 interdomain boundary in the factor VIII model, showing the putative interaction of the His281 with Arg282, Ala284 and Arg531. The replacement of His281 by Asn is predicted to disturb this interdomain region. (b) Close-up view of a portion of the A1-A2 interdomain boundary, showing the putative interaction of Pro264 with Gln645. The replacement of the structuring Pro by the bulky hydrophobic Leu side chain is predicted to disturb the interdomain interaction. Side chains are colored by atom (C, green; O, red; N, blue; H, white). A1 domain is figured in orange and A2 domain in blue. Residues are mentioned according 1-letter nomenclature.

B.II CHAPITRE II

**Intérêt de la thrombinographie
dans l'évaluation du risque hémorragique
chez les patients hémophiles A mineurs
avec discordance
de dosage de l'activité FVIII:C**

*Mild haemophilia A with factor VIII assay discrepancy:
using thrombin generation assay to assess the bleeding phenotype*

*J Thromb Haemost
Volume 6 Issue 3 Page 486-493, March 2008*

Chapitre II

L'étude précédente montre que les discordances de dosage de FVIII:C chez les patients hémophiles A atténués ne sont pas rares et posent des problèmes diagnostiques importants : en effet, comment affirmer le risque hémorragique d'un patient si l'affirmation que « le risque hémorragique est proportionnel à la sévérité du déficit en FVIII » ne peut être appliquée lorsqu'il existe des discordances selon la méthodologie ? Ainsi, nous avons choisi de nous intéresser aux deux familles identifiées A et G dans l'article du chapitre I. Les patients de ces 2 familles ont été choisis sur plusieurs arguments :

- nous voulions éviter toute éventuelle variation individuelle de l'hémostase et l'analyse devait être pertinente chez plusieurs membres hémophiles de la même famille et présentant le même phénotype biologique,
- la discordance des résultats entre les deux méthodes devaient être la plus importante possible et nous avons choisi des patients pour lesquels une des 2 méthodes donnait même un résultat normal, qui, isolé, aurait fait ignorer le diagnostic.
- l'anomalie génétique responsable de l'hémophilie devait être identifiée (p.Phe2127Ser et p.Ile369Thr).

Pour déterminer le risque hémorragique, il nous fallait donc nous tourner vers des tests biologiques reflétant *in vitro* la réalité de l'hémostase *in vivo*.

La génération de thrombine a été utilisée il y a plus de 50 ans pour étudier les pathologies hémorragiques et en particulier l'hémophilie (Macfarlane and Biggs 1953, Pitney and Dacie 1953). Elle a été quasi complètement abandonnée pour être remplacée par des tests de coagulation à la fois plus spécifiques et plus simples, facilement automatisables. Depuis une dizaine d'années, la problématique s'est complètement inversée et l'étude de la thrombinographie s'est montrée intéressante dans cette indication. On peut en effet considérer aujourd'hui comme établi que cette méthode s'avère anormale en cas de pathologies de la coagulation à risque hémorragique (Al Dieri, *et al* 2002, Keularts, *et al* 2001, Siegemund, *et al* 2003). Comme cela a été rapporté précédemment, les travaux sur l'intérêt de la thrombinographie dans la population hémophile démontrent que ses résultats corrélaient d'abord avec le taux de FVIII:C (essentiellement dosé par technique chromométrique en 1 temps (Dargaud, *et al*

2005, Dargaud, *et al* 2007), mais parfois en technique chromogénique (Beltran-Miranda, *et al* 2005)), mais encore, et peut-être surtout, avec le phénotype clinique de ces patients (Beltran-Miranda, *et al* 2005, Dargaud, *et al* 2005, Dargaud, *et al* 2007). Plus récemment, il a été démontré que le système, lorsqu'il utilise du plasma riche en plaquettes (PRP) peut être également appliqué à la maladie de Willebrand (Rugeri, *et al* 2007).

Aucune étude n'a appliqué cette technique à l'étude de patients hémophiles avec des résultats discordants selon la technique de dosage du FVIII:C.

Nous avons choisi de travailler sur le système directement développé par HC Hemker : le CAT System (Stago, Asnières, France) (Hemker, *et al* 2003). Il présente l'intérêt de l'utilisation d'un calibrant constitué de thrombine en quantité connue, complexée à de l' α 2-macroglobuline qui permet de corriger l'influence des facteurs intrinsèques au spécimen, à l'appareillage et au consommable (Lecompte, *et al* 2006).

Ce dispositif comporte :

- un fluorimètre permettant la lecture quasi simultanée de plusieurs cupules réactionnelles (par exemple le Fluoroskan Ascent de ThermoLabsystems)
- le substrat fluorigène (Z-Gly-Gly-Arg-AMC de Bachem)
- le logiciel Thrombinoscope® qui, entre autres fonctions, transforme, grâce à la courbe obtenue avec le calibrant, l'intensité de fluorescence en concentration de thrombine active
- le milieu réactionnel : PRP citraté « frais » (numération plaquettaire normalisée à 150 G/L), avec agitation initiale, pour le déclenchement par addition de concentrations de l'ordre du pM de FT humain recombinant.

La qualité et la quantité des surfaces phospholipidiques du milieu réactionnel sont essentielles à la génération de thrombine. Le plus physiologique est naturellement l'utilisation de plaquettes entières dans un PRP. Cependant, dans l'immense majorité des publications, des plasmas pauvres en plaquettes (PPP) sont utilisés et l'apport de phospholipides est assuré grâce à l'apport de vésicules phospholipidiques (VP) de nature moléculaire très précisément définie (60mole% phosphatidylcholine, 20mole% phosphatidylsérine et 20mole% phosphatidyl-éthanolamine) (Smeets, *et al* 1996). Malgré

l'optimisation qui a été effectuée sur la composition idéale de ces VP, l'avantage de l'utilisation du PRP reste certain (Lecompte, *et al* 2006). L'utilisation de PRP n'étant pas envisageables, pour des raisons purement pratiques, il nous a fallu déterminer la nature idéale des prélèvements à effectuer chez ces patients hémophiles. Il nous a semblé intéressant d'évaluer l'intérêt d'échantillons de PRP (standardisé à 150 000 plaquettes/mm³) ayant subi un cycle de congélation / décongélation, ce qui, de plus, permet de tenir compte de la variabilité interindividuelle des surfaces cellulaires plaquettaires (avec son éventuel retentissement sur le thrombinogramme) (Regnault, *et al* 2003). Nous identifierons ces échantillons comme Plasma + « *Platelet Membranes* » (Plasma+PM).

Plusieurs travaux, majoritairement issus d'équipes françaises, ont utilisé des prélèvements de type Plasma+PM pour réaliser l'étude thrombinographique, essentiellement à la recherche d'hypercoagulabilité (Hezard, *et al* 2006a, Regnault, *et al* 2003). Le choix de ce type de plasma a été contesté. Ainsi, Lippi *et al* rappellent que des études précédentes ont en effet démontré que l'ETP n'est pas modifié par l'utilisation de PRP+PM mais que la génération de thrombine paraît accélérée (raccourcissement du temps de latence) et que le pic de thrombine est augmenté, secondairement à l'inévitable activation plaquettaire, les dommages membranaires et l'exposition des phospholipides procoagulants induits par le froid (Gerotziafas, *et al* 2005, Lippi, *et al* 2006, Regnault, *et al* 2003). La variabilité de la membrane plaquettaire paraît un inconvénient du fait de la distribution en acides gras liée au bilan lipidique du patient. La variation interindividuelle des résultats est plus grande qu'avec l'utilisation de PPP + VP surtout à faible concentration de FT. Ainsi, cette équipe recommande d'éviter l'utilisation de Plasma+PM et de lui préférer idéalement, l'utilisation de PRP ou, à défaut, de PPP + VP.

Ces arguments ont été contestés : Hezard *et al* rétorquent que l'utilisation de PPP exige qu'il soit d'excellente qualité avec un taux de phospholipides résiduels le plus faible possible (Chantarangkul, *et al* 2004, Gerotziafas, *et al* 2005, Hezard, *et al* 2006b). Chantarangkul *et al* proposent que le PPP soit filtré (0,22 µ) avant utilisation ou que la concentration de VP soit >1.5 µmol/L (la concentration habituellement admise est de 4 µM) (Chantarangkul, *et al* 2004).

Deux arguments plaident néanmoins en faveur de l'utilisation de Plasma+PM :

- l'utilisation de phospholipides d'origine plaquettaire autologue permet de maintenir un environnement plus physiologique,
- dans le cadre de l'étude de la résistance à la PCa, le PRP a été comparé au PRP+PM, ce dernier permettant une meilleure discrimination des patients (Hezard, *et al* 2006b).

Avec l'aide de l'équipe du laboratoire de l'INSERM U734 du Pr Thomas Lecompte, et en particulier du Dr Véronique Regnault, nous avons démontré que la concentration phospholipidique des échantillons Plasma+PM ne modifie pas les résultats de TG.

Ainsi, chez 5 témoins normaux, nous avons utilisé différents mélanges de PPP ultracentrifugé (2500 g pendant 15 minutes, décantation puis 13000 g pendant 10 minutes) avec du Plasma+PM selon un gradient variant de 0% à 100%. Le PPP était évalué seul (sans aucune addition de phospholipides) et avec VP à la concentration classique de 4 μ M (figure 22).

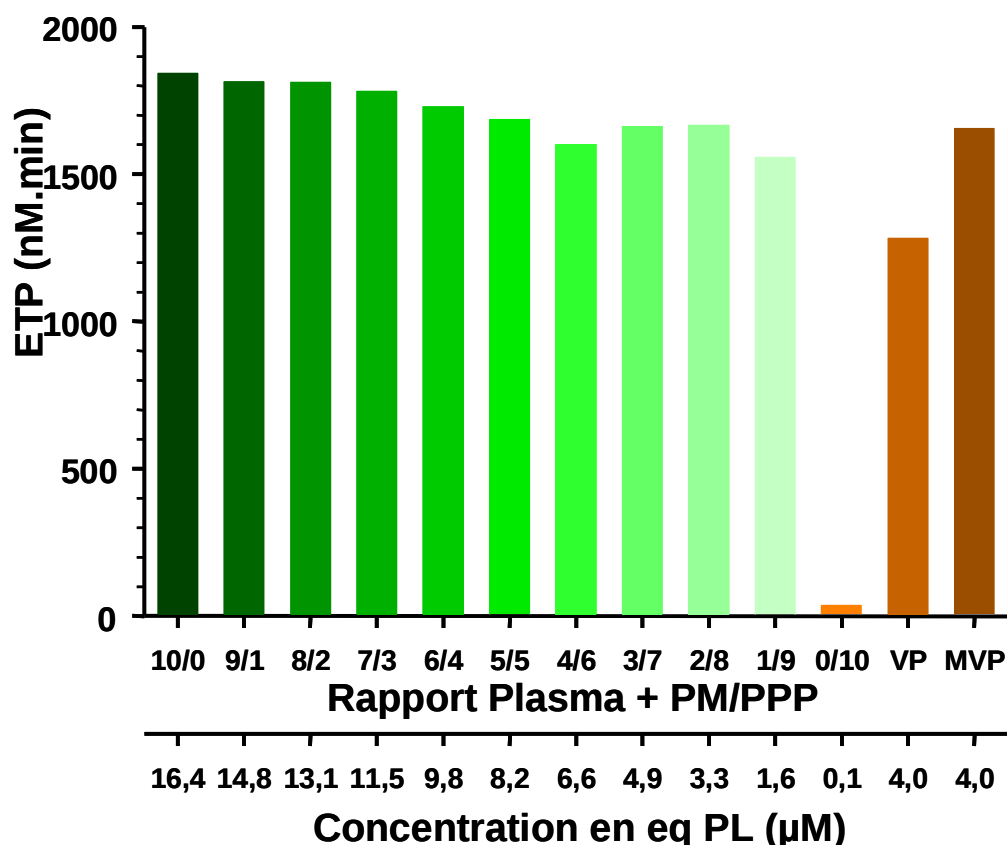


Figure 22 : Etude de l'influence de la concentration de phospholipides sur les résultats de la thrombinographie. Etude de mélanges de Plasma+PM et de PPP (rapport vol/vol de 10/0 à 0/10), en PPP + Vésicules Phospholipidiques et en PPP + Microvésicules plaquettaires (MVP). Eq PL = Equivalent Phospholipides.

En l'absence de phospholipides, il n'existe qu'une infime quantité de thrombine générée. Dès la première dilution (1 vol Plasma+PM pour 9 vol PPP), l'ETP dépasse 1500 nM.min et ne se modifie guère avec l'augmentation de la concentration en phospholipides membranaires d'origine plaquettaire. La valeur obtenue avec plasma+PM est toujours supérieure à celle obtenue avec PPP + VP et similaire à celle qu'on obtient avec l'utilisation de microvésicules plaquettaires (MVP). Ce travail préanalytique a fait l'objet d'une présentation sous forme de poster au congrès de l'ISTH à Genève (Membre, *et al* 2007a).

Afin d'évaluer les conséquences de la congélation du PRP de nos prélèvements, l'équipe du laboratoire de l'INSERM U734 a effectué une analyse de la morphologie des plaquettes en microscopie électronique (figure 23).

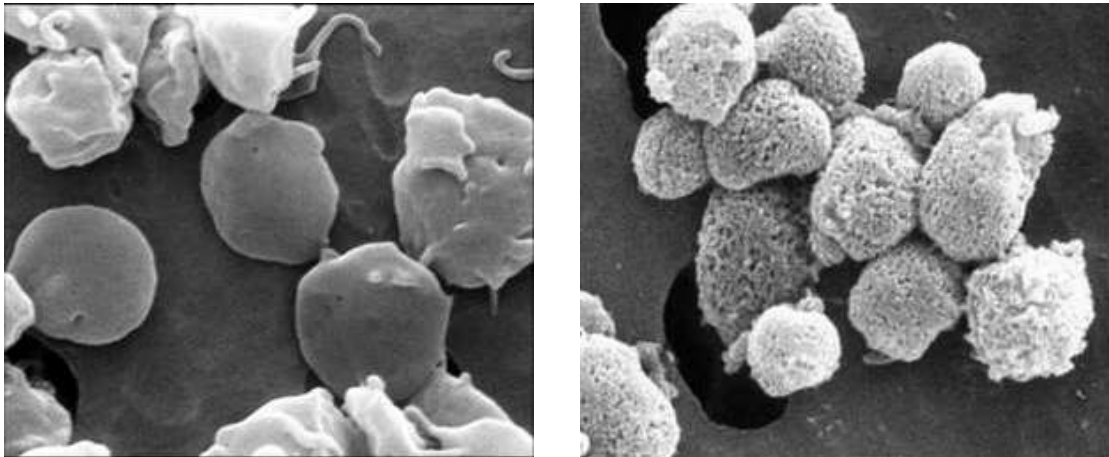


Figure 23 : Plaquettes en PRP observées en microscopie électronique à balayage. : PRP avant congélation (gauche) et PRP+Platelet Membrane (PM) après un cycle de congélation à -80°C puis décongélation à 37°C (droite). Images aimablement données par Véronique Regnault de l'INSERM U734 de Nancy.

Les images de microscopie permettent d'observer qu'en PRP (image de gauche), les plaquettes sont non activées et sous forme discoïde ; quelques plaquettes émettent des pseudopodes. En Plasma+PM, les plaquettes sont encore sous forme de cellules et non de débris cellulaires comme cela aurait pu être après un cycle de congélation/décongélation ; néanmoins, leur aspect en forme d'éponge montre que le processus a induit des changements morphologiques irréversibles (Membre 2008).

Pour valider l'utilisation d'échantillons Plasma+PM dans l'étude des patients hémophiles, il nous fallait comparer nos conditions préanalytiques (Plasma+PM) à celles précédemment utilisées dans la littérature (PPP + VP) (Beltran-Miranda, *et al* 2005,

Dargaud, *et al* 2005, Dargaud, *et al* 2007). Nous avons donc exploré l'influence de la concentration en phospholipides procoagulants en nous appuyant sur l'étude réalisée chez les témoins et en sélectionnant les concentrations les plus pertinentes : la plus élevée (Plasma+PM non dilué) et la plus basse (10 vol Plasma+PM / 9 vol PPP). Ces résultats ont été comparés aux résultats de PPP + VP.

Vingt-cinq hémophiles A atténués sans discordance dans les dosages de FVIII:C ont été explorés mais, la thrombinographie étant une méthode très consommatrice d'échantillons, toutes les mesures n'ont pu être effectuées pour tous les patients et à toutes les conditions analytiques. Cependant, quel que soit le mélange utilisé, l'utilisation de Plasma+PM permet une corrélation entre le taux FVIII:C et les paramètres du TG au minimum toujours égale et souvent meilleure que l'utilisation de PPP + VP (figure 24 et tableau III)

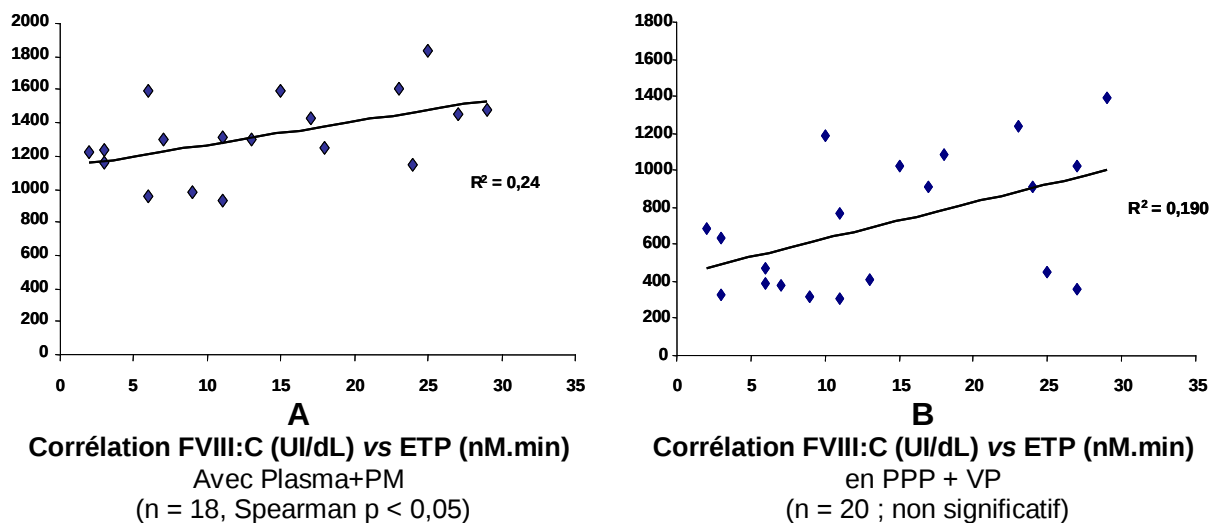


Figure 24 : Corrélation entre le taux de FVIII:C chronométrique en 1 temps et l'ETP chez des patients hémophilies A atténués sans discordance dans les dosages de FVIII:C.

	Plasma+PM	Mélanges Plasma+PM / PPP		PPP + VP
	pur	5 vol / 5 vol	1 vol / 9 vol	
LT	$r < 0,01$ (NS)	$r = 0,09$ (NS)	$r = 0,24$ (NS)	$r = 0,24$ (NS)
ETP	$r = 0,49$ ($p < 0,05$)	$r = 0,52$ ($p < 0,05$)	$r = 0,51$ ($p < 0,05$)	$r = 0,44$ (NS)
Pic de thrombine	$r = 0,70$ ($p < 0,005$)	$r = 0,68$ ($p < 0,005$)	$r = 0,67$ ($p < 0,005$)	$r = 0,50$ ($p < 0,05$)
TTP	$r = - 0,53$ ($p < 0,05$)	$r = - 0,60$ ($p < 0,01$)	$r = - 0,67$ ($p < 0,01$)	$r = - 0,54$ ($p < 0,05$)
Vélocité	$r = 0,73$ ($p < 0,005$)	$r = 0,71$ ($p < 0,005$)	$r = 0,65$ ($p < 0,005$)	$r = 0,50$ ($p < 0,05$)

Tableau III : Corrélation des paramètres de la thrombinographie selon la nature du prélèvement. La signification statistique a été évaluée grâce au test non paramétrique de corrélation de Spearman. NS = Non significatif pour un $p > 0,05$. Plasma+PM (Platelet membranes) ; PPP + VP (Plasma Pauvre en Plaquettes + Vésicules Phospholipidiques) ; LT = Lag Time ; ETP = Endogenous Thrombin Potential ; TTP = Time to Peak.

Pour notre étude, nécessitant la méthode la plus corrélée au taux de FVIII:C, nous avons donc choisi d'utiliser des Plasma+PM. L'étude de 61 patients hémophiles modérés et atténués sans discordance entre le FVIII:C dosé par technique 1 temps et le FVIII:C dosé par technique chromogénique, a confirmé que l'utilisation de PRP+PM permet une excellente corrélation entre l'ETP, le pic de thrombine, le « time to peak », la vélocité et le FVIII:C, en particulier pour les taux de FVIII:C < 20 UI/dL (figure 25 et tableau IV). En revanche, selon ces critères préanalytiques, le temps de latence n'est pas corrélé avec le taux de FVIII:C. Ceci ne paraît pas lié à l'utilisation de Plasma+PM puisque Dargaud *et al* avaient déjà observé ce résultat en utilisant le système PPP + VP (Dargaud, *et al* 2007).

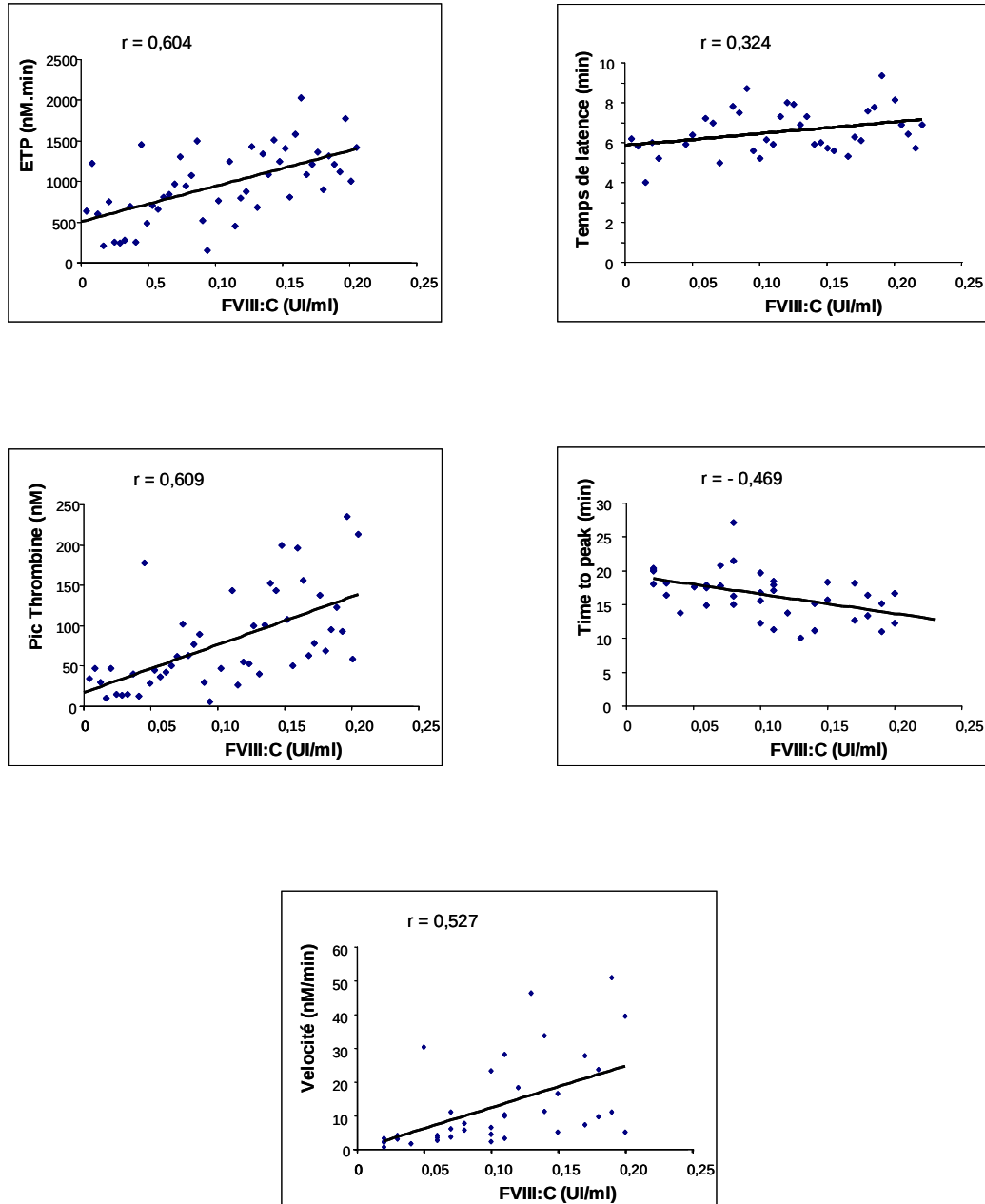


Figure 25 : Corrélation entre les différents paramètres de la thrombinographie en fonction du taux de FVIII:C 1 temps (UI/ml) chez des patients hémophiles A modérés ou atténués sans discordance entre la technique chronométrique 1 temps et la technique chromogénique.

A partir de 20 UI/dL, selon le paramètre choisi, la TG devient moins sensible au déficit et n'est plus systématiquement statistiquement différente de la population témoins (tableaux IV).

ETP		Hémophiles FVIII:C (UI/dL)		
		< 10	10 ≤ ≤ 20	20 < ≤ 30
Témoins		< 0,00001	< 0,0005	NS
Hémophiles FVIII:C (UI/dL)	< 10		< 0,0001	< 0,00001
	10 ≤ ≤ 20			NS

Pic de Thrombine		Hémophiles FVIII:C (UI/dL)		
		< 10	10 ≤ ≤ 20	20 < ≤ 30
Témoins		< 0,00001	< 0,0001	< 0,001
Hémophiles FVIII:C (UI/dL)	< 10		< 0,00005	< 0,0001
	10 ≤ ≤ 20			NS

Vélocité		Hémophiles FVIII:C (UI/dL)		
		< 10	10 ≤ ≤ 20	20 < ≤ 30
Témoins		< 0,0005	< 0,001	< 0,005
Hémophiles FVIII:C (UI/dL)	< 10		< 0,05	NS
	10 ≤ ≤ 20			NS

Tableaux IV : Comparaisons de l'ETP (Endogenous Thrombin Potential), du pic de thrombine et de la vélocité entre témoins et patients hémophiles en fonction du taux de FVIII:C (UI/dL). La signification statistiques est donnée selon le test non paramétrique de Mann-Whitney.

Ainsi, après avoir validé la nature méthodologie de TG pour les patients hémophiles, nous avons pu étudier les patients des 2 familles présentant les discordances dans les dosages de FVIII:C. Ce travail a fait l'objet d'une publication en mars 2008 dans le Journal of Thrombosis and Haemostasis. La principale conclusion est que la thrombinographie permet une bonne évaluation du phénotype clinique chez les patients hémophiles modérés/atténués, particulièrement adaptée en cas de discordance des taux de FVIII:C selon la méthode.

ORIGINAL ARTICLE

Mild hemophilia A with factor VIII assay discrepancy: using thrombin generation assay to assess the bleeding phenotype

M. TROSSAËRT,* V. REGNAULT,† M. SIGAUD,* P. BOISSEAU,‡ E. FRESSINAUD* and T. LECOMPTE†

*Centre Régional de Traitement de l'Hémophilie – Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire, Nantes; †INSERM, U734, Nancy Université, Nancy; and ‡Laboratoire de Génétique Médicale, Centre Hospitalier Universitaire, Nantes, France

To cite this article: Trossaert M, Regnault V, Sigaud M, Boisseau P, Fressinaud E, Lecompte T. Mild hemophilia A with factor VIII assay discrepancy: using thrombin generation assay to assess the bleeding phenotype. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 486–93.

Summary. *Introduction:* In some patients with mild hemophilia A, there are discrepancies between 1-stage (1-st) and 2-stage (2-st) factor VIII (FVIII) clotting assays, and also chromogenic assays for FVIII activity (FVIII:C). We examined whether thrombography could provide a better evaluation of the hemostatic status of these patients. *Methods:* Two families with such discrepancies and markedly contrasting clinical histories were studied. Family X had no serious bleedings, in contrast to family Y. Sixty-one moderate/mild hemophiliacs without discrepancy and 15 healthy subjects served as controls. Calibrated automated thrombography was performed with platelet-rich plasma after one freeze-thawing cycle and low tissue factor concentration. *Results:* The chromogenic FVIII:C levels were higher (0.90 ± 0.15 and 0.47 ± 0.13 IU mL⁻¹) than the 1-st clotting ones (0.14 ± 0.05 and 0.10 ± 0.05 IU mL⁻¹) in family X and Y, respectively ($P < 0.001$). Mean endogenous thrombin potential (ETP) was 1579 ± 359 nm min⁻¹ and 1060 ± 450 for healthy controls and hemophilic controls, respectively. For members of family X, the ETP values were 1188, 1317 and 2277 nm min⁻¹, whereas for those of family Y they ranged from 447 to 1122 nm min⁻¹. Two novel missense point mutations were evidenced: p.Ile369Thr in family X and p.Phe2127Ser in family Y. In family X, we postulate that the mutation is responsible for a delayed but non-deleterious FVIII activation. *Conclusions:* Our results suggest that the hemostatic phenotype assessed by thrombography may be clinically relevant in moderate/mild hemophilic patients with discrepant FVIII:C results.

Keywords: chromogenic factor VIII, discrepant mild hemophilia, factor VIII, thrombography, two-stage factor VIII assay.

Correspondence: Marc Trossaert, Centre Régional de Traitement de l'Hémophilie, 30 Boulevard Jean MONNET – CHU Hôtel-Dieu, 44093 NANTES Cedex 01, France.

Tel.: +33 2 40 08 74 68; fax: +33 2 40 08 42 59; e-mail: marc.trossaert@chu-nantes.fr

Received 15 July 2007, accepted 21 November 2007

Introduction

It is usual to evaluate the bleeding risk in hemophilia A and B with antihemophilic factor levels. More specifically regarding hemophilia A, factor VIII (FVIII) activity (FVIII:C), often correlated with the clinical expression of the disease, can be measured by either the 1-stage (1-st) or 2-stage (2-st) clotting, or chromogenic method. In most laboratories, considering that 1-st assays are technically easier, the diagnosis of hemophilia A is assessed by FVIII:C activated partial thromboplastin time (APTT) 1-st method. However, these assays are particularly subject to variability in results due to change in reagent test conditions and analyzers. Furthermore, some discrepancies between 1-st and 2-st clotting assays have been reported: 1-st method assays may overestimate the FVIII:C levels and misdiagnose mild hemophilia A. Since the first description of this methodological discrepancy in 1988 [1], several studies have confirmed this phenomenon [2,3]. Discrepancies between 1-st and 2-st clotting assays can also be detected by using a chromogenic method, which moreover is easier to perform [4]. Different molecular abnormalities have been reported to confer this discrepancy, mostly located in the A1, A2 and A3 domains of the FVIII protein [5–8]. In one publication, as many as 40% of hemophiliacs were considered to have 'overestimated' FVIII:C levels with a 1-st clotting assay [2]. Few studies have reported the opposite phenomenon with reduced FVIII:C when assayed with the 1-st clotting method but normal value with a 2-st one [9–11]. Then, it is difficult to decide which method gives the clinically relevant FVIII:C levels.

The study of thrombin generation course or thrombography (TG) could be useful to assess hemostatic status [12]. It is now established that thrombin generation is diminished in bleeding coagulation disorders [13,14]. Studying samples from severe, moderate and mild hemophiliacs, Dargaud *et al.* reported that TG results correlate with FVIII:C levels (1-st method) [15]. Furthermore, they suggested that clinical bleeding phenotypes could be better correlated with TG results than with FVIII:C levels. More recently, in a similar patient population, Beltrán-Miranda *et al.* concluded that TG parameters correlated with FVIII:C levels and could also detect hemorrhagic phenotypes

[16]. Until now, no study has investigated TG in discrepant mild hemophilia A.

In this study, we studied two families with mild hemophilia A exhibiting novel mutations associated with a discrepancy between 1-st and chromogenic FVIII:C assays to determine if TG could help to establish the effective FVIII potency and to evaluate the hemorrhagic risk.

Patients and methods

Patients

Family X (Fig. 1A). Mild hemophilia was diagnosed in the 13-year-old proband (patient III-4) suffering from epistaxis: 1-st FVIII:C of 0.12 IU mL⁻¹. He received twice FVIII concentrates: systematically when 16 before surgery and after heavy trauma at 36, to treat a joint bleeding at his right ankle. All the hemophilic relatives were diagnosed within the context of familial investigation. Patient I-1 was diagnosed when he was 78. He underwent several uneventful surgical procedures (appendectomy, inguinal hernia, hemorrhoidectomy, colonoscopic polypectomies) and only two others (tooth extraction and nasal polypsis cure) were followed by minor bleedings. Patients III-10 and III-11 have no bleeding history at all (now 7 and 14 years old). Patients III-4, III-10 and III-11 could be evaluated for TG.

Family Y (Fig. 1B). The proband (III-3) was diagnosed at the age of 5 because of multiple subcutaneous hematomas. He is now 25. Since the diagnosis, he has experienced multiple post-traumatic joint bleeds, nose bleedings or minor surgical operations and the use of desmopressin or FVIII

concentrates was frequently required (to date 67 exposure days). His grandfather (I-1) was diagnosed at the age of 65, even though he reported significant previous bleedings: post-traumatic hematomas on his face requiring five iterative surgical cures. Inguinal hernia was complicated by hematoma at day 2. One of the proband's cousins (III-2) died after post-traumatic intracranial hemorrhage. Patients III-5, III-6 and III-9 had numerous hematomas and joint bleeds or post-surgical bleedings. The youngest patient (IV-1) had experienced small hematomas or bruises until the age of 9 and was the only one who could not be evaluated for TG.

Controls

We compared the laboratory phenotypes of the hemophiliacs of the two families having discrepant FVIII:C results, with those of two populations of controls: 15 healthy subjects (40.4 ± 9.4 years old) with normal FVIII:C assays whatever the method and 61 moderate/mild hemophiliacs (37.1 ± 19.2 years old) without discrepancy between 1-st and chromogenic FVIII:C methods. For all these patients, FVIII antigen (FVIII:Ag) levels were similar to the FVIII:C (FVIII:C/FVIII:Ag ratio > 0.6), which is consistent with quantitative deficiency.

FVIII assays

Plasmas were drawn on 0.109 M buffered citrate. The 1-st FVIII:C method was based on the activated partial thromboplastin time (APTT). We performed this assay using FVIII-deficient plasma (Diagnostics Stago, Asnières, France), an APTT reagent with kaolin as contact phase activator (CK Prest[®], Diagnostics Stago) and assays were performed on a STA-R[®] coagulometer (Diagnostics Stago); at least three dilutions were used to obtain a linear profile paralleling the suitable calibration curve. The chromogenic methods were: method A (Coamatic[®] FVIII kit, Instrumentation Laboratory, Lexington, KY, USA) and method B (FVIII chromogenic assay, Dade Behring, Marburg, Germany). All tests were performed in duplicate, with at least two dilutions to obtain a linear response, parallel to the reference preparation. The varying incubation times (Xa generation) varied: 90 s, 150 s, 240 s, 400 s, 600 s, and 900 s. For these six incubation times, we obtained a reliable calibration curve with method A but not beyond 240 s for method B. For all methods, we used the reference preparation from Dade Behring. FVIII:CAg levels were evaluated by ELISA (Asserachrom[®], Diagnostics Stago).

Genotyping

Mutations were identified using denaturing high performance liquid chromatography screening (dHPLC; Wave 3500HT system and Navigator software, Transgenomics corp., San Jose, CA, USA) and direct sequencing (ABI 3100; Applied

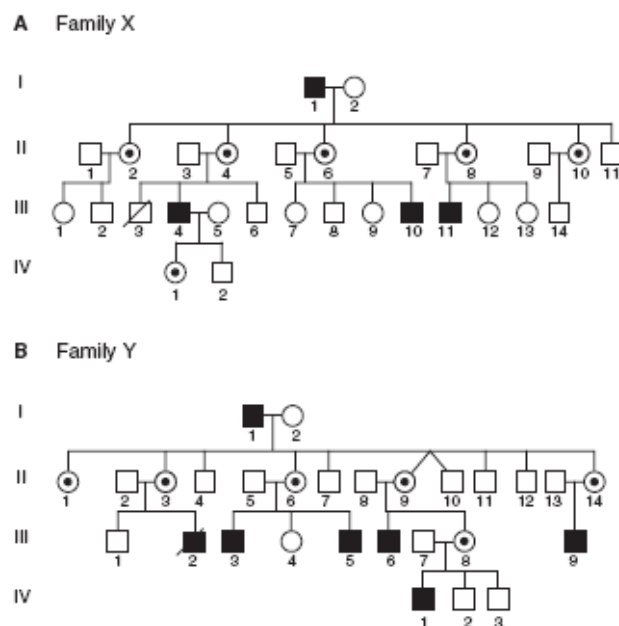


Fig. 1. Pedigrees of families X and Y.

Biosystems, Foster City, CA, USA). In order to ensure detection of the splice sites as well as exon sequence alterations, we used a protocol adapted from the HAMSTeRS data base (<http://europium.csc.mrc.ac.uk>) [17]. Some primers had to be changed because of amplification or interpretation difficulties (exons 4, 14 and 21).

Calibrated automated thrombography

For TG assays, as previously described [18], blood was drawn into Monovette® (Sarstedt, Leicester, UK) syringes containing 0.106 M citrate and without Corn Trypsin Inhibitor (CTI). Centrifugations were performed to obtain platelet rich plasmas (PRP) and platelet depleted plasmas (PDP). Calibrated automated thrombin activity measurements were performed in triplicate using the CAT® system (Diagnostica Stago). The results were then analyzed using the dedicated software program (Thrombinoscope®, Synapse, Maastricht, The Netherlands) and expressed as: endogenous thrombin potential (ETP, area under the curve), peak, time to peak and velocity [12]; because lag times are normal in hemophiliacs [19], we did not report them. Coagulation was triggered by recombinant human tissue factor (TF) reagent (Innovin®, Dade Behring) 1:30 000 diluted, *c.* 0.5 pM. This TF concentration was chosen as the relevant concentration because it allowed TF-triggered, strictly antihemophilic factor-dependent thrombin generation whatever the source of phospholipids (data not shown). We have chosen to work with platelet surfaces. For practical reasons, we had to work with patients' samples after one freeze/thawing cycle of their PRP. This plasma will be referred to as plasma with platelet membranes (plasma+PM). Thus, we have investigated the influence of the procoagulant phospholipid concentration on sensitivity to FVIII:C levels using mixtures of different ratios of plasma+PM:PDP (10:0; 5:5; 1:9 and 0:10 + phospholipids vesicles, see below) in 25 moderate/mild hemophiliacs. Phospholipids vesicles (PV) were added as a mixture of 60mole% phosphatidylcholine, 20mole% phosphatidylserine and 20mole% phosphatidylethanolamine (dioleoylglycerophospholipids from Avanti Polar Lipids Inc, Alabaster, AL, USA). Whatever plasma+PM:PDP ratio, the correlations between TG parameters and FVIII:C levels were statistically significant ($P < 0.05$) and similar, and always better than with PDP + PV [20].

Statistical analysis

All results are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney test or Spearman's correlation on Statview® software. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

All phenotypic results are displayed in Table 1.

FVIII:C assays

Concerning control populations (normal subjects and non-discrepant hemophiliacs), 1-st and method A assays were highly correlated ($r^2 > 0.8$; $P < 0.0001$). For non-discrepant hemophiliacs ($n = 61$) and controls ($n = 15$), 1-st FVIII:C was 0.14 ± 0.09 and 0.86 ± 0.17 IU mL⁻¹ respectively. In families X and Y, the 1-st FVIII:C results were 0.14 ± 0.05 and 0.10 ± 0.05 IU mL⁻¹ (mean $\pm$ SD). As expected for families X and Y, chromogenic method A results (0.90 ± 0.15 and 0.47 ± 0.13 IU mL⁻¹) or the chromogenic method B results (0.43 ± 0.09 and 0.50 ± 0.19 IU mL⁻¹) were significantly higher than 1-st FVIII:C values. Moreover, for family X, there were discrepant results between the two chromogenic assays when using manufacturer's instructions regarding incubation time. FVIII:C levels were higher with method A as compared with method B in family X. In both families, FVIII:C:Ag indicated cross-reacting material at levels close to method A values (i.e. close to normal levels).

These 10 patients from families X and Y were compared with 15 mild hemophiliacs A without discrepancy and selected to have similar FVIII:C values (1-st FVIII:C = 0.16 ± 0.04 IU mL⁻¹, range = 0.10–0.20 IU mL⁻¹; chromogenic FVIII:C = 0.17 ± 0.04 IU mL⁻¹, range 0.09–0.25 IU mL⁻¹; no statistical difference between 1-st and chromogenic FVIII:C levels). In both groups, FVIII:C was measured with 1-st and chromogenic (A and B) methods with varying incubation times. The results are shown in Fig. 2. For family X patients, the more prolonged the incubation time, the more significant were these differences ($P < 0.05$ for 90 s and 150 s and $P < 0.001$ from 240 s to 900 s). This phenomenon does not exist in family Y. For method B, data seemed similar until the maximum possible incubation time (240 s).

Genotyping

Molecular analysis of FVIII gene showed a point mutation in the two families: p.Ile369Thr in exon 8 in family X (*al* interdomain) and p.Phe2127Ser (C1 domain) in family Y. The remaining coding sequence was normal. Confirmation study was performed on DNA from 200 chromosomes representing the general population and allowed us to exclude a frequent polymorphism.

Thrombography

For healthy controls and hemophiliacs, TG graph curves and results are shown in Fig. 3 and Table 1. The mean values of the 61 hemophilic patients were significantly lower for ETP, thrombin peak and velocity and higher for time to peak than those of the healthy controls ($P < 0.00001$). For non-discrepant hemophiliacs, FVIII:C (whatever the method) was correlated statistically with ETP, thrombin peaks and velocities but not with times to peak. When significant, the lower the FVIII:C levels are, the better the correlation with TG parameters is. More specifically, considering hemophiliacs with

Table 1 FVIII:C and FVIII:CAg results expressed in IU/mL using clotting and chromogenic assays in discrepant patients of family X ($n = 4$) and Y ($n = 6$), in non-discrepant moderate/mild hemophilias ($n = 61$) and in healthy controls ($n = 15$). Chromogenic FVIII:C results are reported when using method A (Coamate[®] FVIII kit, Instrumentation Laboratory) and method B (FVIII chromogenic assay, Dade Behring). Concerning TG, ETP is expressed in nm min^{-1} , peak in nM , time to peak in min and velocity in nm min^{-1} . Results are expressed as mean $\pm$ SD

	FVIII:C									
	Chromogenic assays					Thrombin generation				
	Method A		Method B							
	1-st clotting assay	240 s*	900 s†	90 s*	240 s†	FVIII:CAg	ETP	Peak	Time to peak	Velocity
Family X										
Patient I-1	0.20	1.05	1.22	0.52	0.77	1.56	ND	ND	ND	ND
Patient III-4	0.10	0.82	1.33	0.32	0.73	1.26	2277	362	11.2	92.74
Patient III-10	0.16	1.00	0.93	0.48	0.83	1.00	1317	147	16.7	27.42
Patient III-11	0.09	0.74	1.20	0.38	0.53	0.91	1188	160	13.3	25.47
Mean $\pm$ SD	0.14 $\pm$ 0.05	0.90 $\pm$ 0.15	1.17 $\pm$ 0.17	0.43 $\pm$ 0.09	0.71 $\pm$ 0.13	1.18 $\pm$ 0.29	1594 $\pm$ 595	223 $\pm$ 121	13.7 $\pm$ 2.7	48.5 $\pm$ 9.1
Family Y										
Patient I-1	0.14	0.64	0.41	ND	ND	0.84	447	57.41	12.4	13.05
Patient III-3	0.05	0.31	0.16	0.30	0.30	0.41	632	29.30	21.9	2.38
Patient III-5	0.14	0.52	0.42	0.63	0.57	0.59	1122	87.97	14.6	22.56
Patient III-6	0.07	0.49	0.32	0.60	0.56	0.71	838	61.4	11.7	8.65
Patient III-9	0.12	0.53	0.48	0.67	0.53	0.61	929	74.73	12.4	9.00
Patient IV-1	0.08	0.33	0.18	0.29	0.50	0.30	ND	ND	ND	ND
Mean $\pm$ SD	0.10 $\pm$ 0.04	0.47 $\pm$ 0.13	0.35 $\pm$ 0.13	0.50 $\pm$ 0.19	0.53 $\pm$ 0.03	0.58 $\pm$ 0.20	833 $\pm$ 348	73.4 $\pm$ 15.3	13.1 $\pm$ 1.2	11.1 $\pm$ 7.4
Haemophilias ($n = 61$)										
FVIII:C (IU mL^{-1})	0.14 $\pm$ 0.09	0.16 $\pm$ 0.11	ND	ND	ND	0.18 $\pm$ 0.12	1060 $\pm$ 450	90 $\pm$ 60	17.5 $\pm$ 4.9	13.7 $\pm$ 12.8
< 0.10 ($n = 23$)	0.05 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.04	ND	ND	ND	0.03 $\pm$ 0.03	756 $\pm$ 402	47 $\pm$ 38	19.8 $\pm$ 5.8	5.9 $\pm$ 7.0
0.10 $\leq$ 0.20 ($n = 24$)	0.14 $\pm$ 0.03	0.18 $\pm$ 0.07	ND	ND	ND	0.13 $\pm$ 0.07	1201 $\pm$ 326	112 $\pm$ 59	16.7 $\pm$ 5.0	18.0 $\pm$ 14.9
0.20 $<$ 0.30 ($n = 14$)	0.27 $\pm$ 0.02	0.29 $\pm$ 0.06	ND	ND	ND	0.22 $\pm$ 0.09	1413 $\pm$ 329	135 $\pm$ 58	15.0 $\pm$ 2.5	17.8 $\pm$ 11.7
Healthy controls ($n = 15$)										
FVIII:C (IU mL^{-1})	0.84 $\pm$ 0.17	0.86 $\pm$ 0.14	ND	ND	ND	ND	1579 $\pm$ 359	217 $\pm$ 73	10.3 $\pm$ 2.8	52.1 $\pm$ 30.2

*Results when using the incubation times given by the manufacturer. †Results when using the longest possible incubation times.

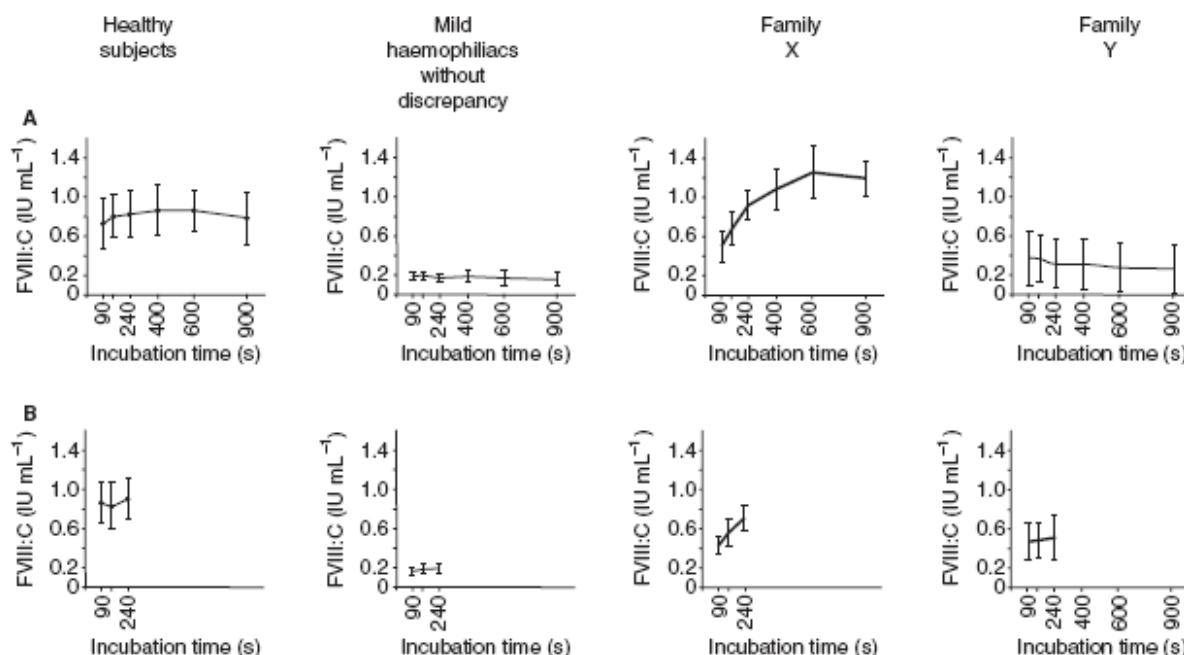


Fig. 2. Chromogenic FVIII:C levels (IU mL^{-1}) according to incubation times in healthy subjects ($n = 10$), in mild hemophiliacs without discrepancy ($n = 15$) and in patients from family X ($n = 4$) or Y ($n = 5$). (A) for method A; (B) for method B. For the latter method, results are given only from 90 s to 240 s (maximum validated incubation time). Bars represent one SD.

FVIII:C $< 0.20 \text{ IU mL}^{-1}$, the P -values were < 0.001 and the correlation between FVIII:C and times to peak became statistically significant ($P < 0.01$). ETP, thrombin peak and velocity values obtained for the three patients of family X fell within the control range ($1142\text{--}2688 \text{ nm min}^{-1}$ for ETP, $89\text{--}360 \text{ nm}$ for thrombin peak and $24\text{--}127 \text{ nm min}^{-1}$ for velocity). As shown and displayed in Table 1, the mean $\pm$ SD for the controls are 1579 ± 359 , 217 ± 73 and 52.1 ± 30.2 , respectively. In contrast, the five patients of family Y had ETP, thrombin peaks and velocity values lower than the lowest control value and within the values of non-discrepant hemophiliacs with FVIII:C between 0.10 and 0.20 IU mL^{-1} ($452\text{--}1775 \text{ nm min}^{-1}$ for ETP, $26\text{--}235 \text{ nm}$ for thrombin peak and $2.4\text{--}51.0 \text{ nm min}^{-1}$ for velocity).

Discussion

Discrepancies between 1-st and 2-st FVIII:C assays are not uncommon as Duncan *et al.* described this phenomenon in 40% of patients in an Australian mild hemophilic population [2]. However, in most studies, the 1-st assay was giving higher FVIII:C levels (2- to 5-fold greater than the 2-st) and the authors usually recommended the use of 2-st methods to assess the bleeding risk [2,3,5–8]. Recently, it has been shown that both 2-st clotting and chromogenic methods can be used to identify such discrepancies in FVIII:C assays in hemophilia [21,22]. To date, hemophilic patients with low 1-st FVIII:C but normal 2-st FVIII:C were only described once [9], although some cases were reported as abstract forms [10,11]. We studied two families with this latter type of discrepancy and observed

differences depending on the chromogenic FVIII:C assay. In family Y, chromogenic FVIII:C levels were quite similar to FVIII:CAg whatever chromogenic assay, whereas in family X, FVIII:C levels measured with method A were significantly higher than the method B values and are close to FVIII:CAg. These differences could be explained by methodological characteristics: both methods are quite similar in their components; however, in method A, the manufacturer proposed a first stage incubation lasting 240 s, whereas in method B, this incubation is much shorter (90 s). Thus, it is not surprising that the difference is particularly greater in family X patients because we demonstrated that the longer the first incubation is, the higher the FVIII:C levels. Moreover, for both methods, when incubation times were modified, FVIII:C levels appeared as being very influenced by the first stage of FVIII activation but not by the nature of the reagent. Rodgers *et al.* had previously reported the major role of incubation times in hemophiliacs with 1-st/2-st FVIII:C discrepancy [4]. Considering the FVIII:CAg values in family X patients, we can postulate that the abnormal FVIII protein (p.Ile369Thr) in family X needs a longer period of time for a complete activation.

In previous studies, in the rare cases where 1-st assays appeared to underestimate the FVIII:C levels, three missense mutations were involved: p.Glu321Lys, p.Tyr346Cys and p.Glu720Lys [9–11]. The two first residue substitutions are located close to (Glu321) or in (Tyr346) the interdomain region *a1* (337–372) and were thought to delay thrombin activation of FVIII because *in vitro* prolonged incubation times allowed FVIII activation. For p.Glu720Lys, mutation

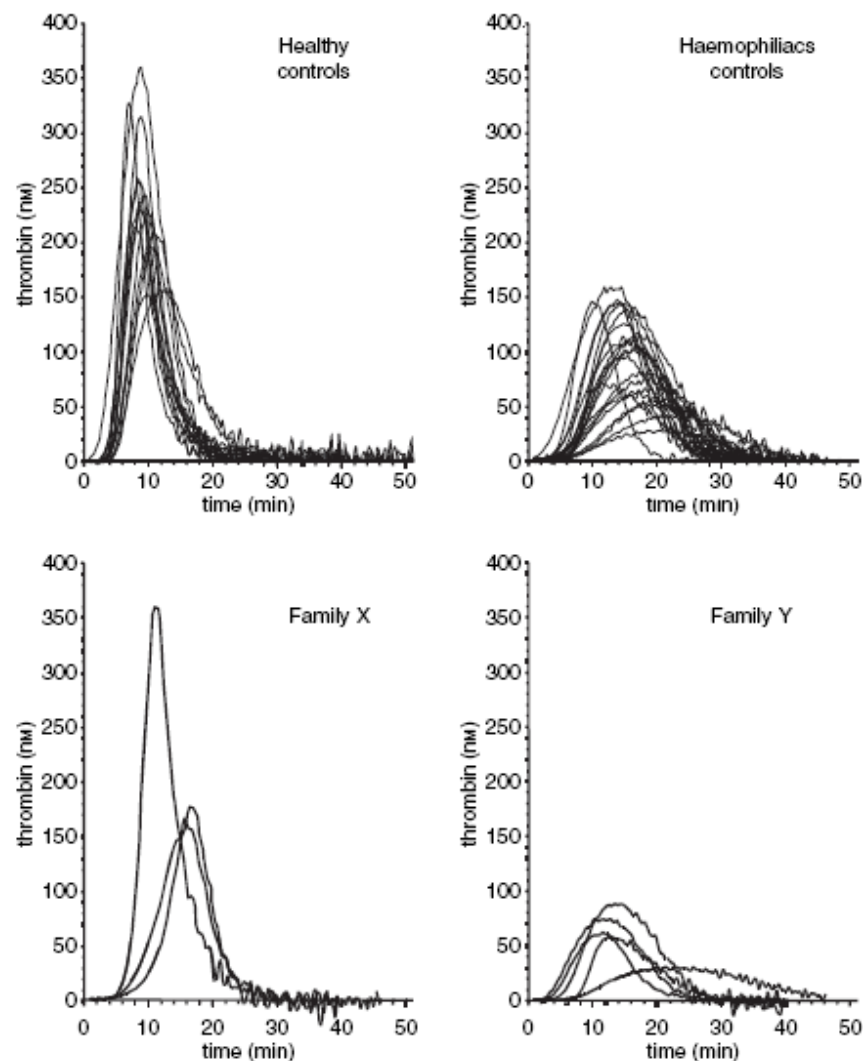


Fig. 3. TG curves in 15 healthy controls, patients of family X ($n = 3$) and Y ($n = 5$), and 24 hemophilic controls without discrepancy and with FVIII:C between 10 and 20 IU mL⁻¹ (FVIII:C = 0.14 ± 0.03 IU mL⁻¹).

induced a normal activation by thrombin but a reduced sensitivity towards FIXa, explaining the discrepancy [11]. We described two novel mutations (p.Ile369Thr and p.Phe2127Ser), which to date are not included in HAMSTERS data base (<http://europium.csc.mrc.ac.uk>). Ile369 is located in the *a1* acidic domain, very close to Arg372, which is the activation site by thrombin. In FVIII Thr369, the substitution by a hydrophilic residue could induce altered interactions between thrombin and FVIII. The laboratory phenotype of plasma FVIII Thr369 (family X) appeared quite similar to the mutation involving Glu321 or Tyr346 previously described and strongly suggested a delayed thrombin activation of FVIII [9,10]. This phenomenon could also explain why it is that in chromogenic assays, the longer incubation times are, the higher the FVIII:C levels are. The other mutation (p.Phe2127Ser) is located in the C1 domain, region of the FVIII that has never been involved in a discrepancy phenomenon. Today, the mechanism appears

unclear. Residues Ser2119 and Asn2129 are involved in the binding of FVIII to von Willebrand factor [23]. However, an abnormal binding to von Willebrand factor could not explain the FVIII:C discrepancy. Phe2127 belongs to solvent-exposed clusters of hydrophobic residues on the flank of C1 opposite the A1 and A3 domains [24] and could form part of protein recognition sites on the surface of the glycoprotein. Thus, a substitution of the hydrophobic Phe by the hydrophilic Ser in this interfacial region between C1 and A domains may modify FVIII activation.

Recent publications have emphasized the interest of TG in hemophilia and have suggested that ETP and thrombin peak are correlated to FVIII:C results [15,16,25]. In these studies, FVIII:C was mostly evaluated by 1-st clotting assay, although in a small population of 12 moderate/mild hemophiliacs, Beltran-Miranda suggested that 2-st FVIII:C could be also correlated with ETP or thrombin peak [16]. In our study of a larger population of 61 moderate/mild hemophilic patients

without discrepancy, the data confirm that there is a correlation between FVIII:C levels and the following parameters of TG: ETP, thrombin peak, time to peak and velocity. These TG parameters were better correlated with the FVIII:C levels when the latter were below 0.20 IU mL⁻¹. When the FVIII:C levels were above 0.20 IU mL⁻¹, TG became much more influenced by the other hemostatic parameters likely to be involved in the thrombin generation.

In previous studies, CTI was shown to reduce variations due to the preanalytical and methodological conditions [26,27]. Although we cannot rule out a possible effect of contact activation at the low concentration in tissue factor used in our experiments, it is unlikely that correlation between FVIII:C levels and TG parameters would be improved because the best correlation was obtained with low FVIII:C levels where the effect of contact activation was thought to be maximum.

At first, thrombography has been studied in hemophilia from a methodological point of view, mostly in severe hemophilia, to assess the role of FVIII or FIX activities in TG parameters [13]. It has been also proposed that TG may be of interest in optimization of dosages of substitutive or prophylactic therapy [28]. Recently, it has been reported that TG analysis may evaluate the clinical bleeding phenotype, especially in severe hemophilia where the factor activity could not have an excellent predictive value of the individual bleeding risk. Indeed, according to the number of joint bleeds and the severity of arthropathy [16] and/or the need for prophylaxis or history of multiple spontaneous hemorrhages [15], it was suggested that with similar FVIII:C levels (even when <0.01 IU mL⁻¹), ETP and thrombin peak allow a better evaluation of bleeding tendency.

In families with discrepancy between 1-st and 2-st FVIII:C levels, it is not easy to determine which value reflects the clinical phenotype of the patient and then to assess the severity of hemophilia A. In the two families that we reported here, patients had quite similar 1-st FVIII:C ($\approx$ 0.10–0.20 IU mL⁻¹) and chromogenic FVIII:C ($\approx$ 0.50–0.80 IU mL⁻¹) levels. However, in family Y, many bleedings occurred spontaneously or in postoperative periods, whereas in family X, all diagnoses were established because of abnormal APTT results and no (or minor) spontaneous bleeding occurred. When considering TG parameters, statistical analysis could not be performed because of the low number of values. However, the values of family X are very close to those of the healthy controls and, in contrast, the results of family Y are similar to those observed in the hemophilic population with FVIII:C levels <0.10 IU mL⁻¹. Haidl *et al.* have shown that age has to be considered in the interpretation of thrombin generation [29]. However, in our study, age was evenly distributed in each group and results can be appropriately compared. Thus, in these two examples of hemophilia with discrepant FVIII:C results linked to unreported mutations and located far apart in different domains, thrombography appeared to allow a relevant laboratory evaluation regarding the bleeding tendency. In conclusion, phenotyping the hemostatic system with TG might improve the

laboratory estimation of the bleeding risk of hemophiliacs, including those with mild hemophilia and discrepant results of FVIII:C levels in relation to peculiar mutations.

Disclosure of Conflict of Interests

The authors state that they have no conflict of interest.

References

- 1 Parquet-Gernez A, Mazurier C, Goudemand M. Functional and immunological assays of FVIII in 133 haemophiliacs—characterization of a subgroup of patients with mild haemophilia A and discrepancy in 1- and 2-stage assays. *Thromb Haemost* 1988; 59: 202–6.
- 2 Duncan EM, Duncan BM, Tunbridge LJ, Lloyd JV. Familial discrepancy between the one-stage and two-stage factor VIII methods in a subgroup of patients with haemophilia A. *Br J Haematol* 1994; 87: 846–8.
- 3 Keeling DM, Sukhu K, Kembal-Cook G, Waseem N, Bagnall R, Lloyd JV. Diagnostic importance of the two-stage factor VIII:C assay demonstrated by a case of mild haemophilia associated with His1954 → Leu substitution in the factor VIII A3 domain. *Br J Haematol* 1999; 105: 1123–6.
- 4 Rodgers SE, Duncan EM, Barbulescu DM, Quinn DM, Lloyd JV. In vitro kinetics of factor VIII activity in patients with mild haemophilia A and a discrepancy between one-stage and two-stage factor VIII assay results. *Br J Haematol* 2007; 136: 138–45.
- 5 Pipe SW, Saenko EL, Eickhorst AN, Kembal-Cook G, Kaufman RJ. Hemophilia A mutations associated with 1-stage/2-stage activity discrepancy disrupt protein-protein interactions within the triplicated A domains of thrombin-activated factor VIIIa. *Blood* 2001; 97: 685–91.
- 6 Rudzki Z, Duncan EM, Casey GJ, Neumann M, Favaloro EJ, Lloyd JV. Mutations in a subgroup of patients with mild haemophilia A and a familial discrepancy between the one-stage and two-stage factor VIII:C methods. *Br J Haematol* 1996; 94: 400–6.
- 7 Schwaab R, Oldenburg J, Kembal-Cook G, Albert T, Juhler C, Hanfland P, Ingwersen J. Assay discrepancy in mild haemophilia A due to a factor VIII missense mutation (Asn694Ile) in a large Danish family. *Br J Haematol* 2000; 109: 523–8.
- 8 Nesbitt I, Kinks J, Sampson B, Kitchen S, Peake I, Makris M, Goodeve A. Discrepant one and two stage FVIII assays are very common in mild haemophilia A: correlation with FVIII gene mutations. *Thromb Haemost* 2001; Suppl: Abstract OC195.
- 9 Mumford AD, Laffan M, O'Donnell J, McVey JH, Johnson DJ, Manning RA, Kembal-Cook G. A Tyr346 → Cys substitution in the interdomain acidic region a1 of factor VIII in an individual with factor VIII:C assay discrepancy. *Br J Haematol* 2002; 118: 589–94.
- 10 Goodeve A, Hinks J, Nesbitt I, Sampson B, Burgess C, Khair K, Leisner R, Kitchen S, Peake I, Makris M. Unusual discrepant factor VIII:C assays in haemophilia A patients with Tyr346Cys and Glu321Lys FVIII gene mutations. *Thromb Haemost* 2001; Suppl: Abstract P1370.
- 11 Roelse J, Mertens K, van Mourik J, Oldenburg J, Voorberg J. Altered sensitivity towards factor IXa explains assay discrepancy in plasma of haemophilia A patients with GLU720LYS substitution in factor VIII. *Thromb Haemost* 1999; 82: Abstract 5.
- 12 Hemker HC, Al Dieri R, De Smedt E, Beguin S. Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system. *Thromb Haemost* 2006; 96: 553–61.
- 13 Siegemund T, Petros S, Siegemund A, Scholz U, Engelmann L. Thrombin generation in severe haemophilia A and B: the endogenous thrombin potential in platelet-rich plasma. *Thromb Haemost* 2003; 90: 781–6.

- 14 Al Dieri R, Peyvandi F, Santagostino E, Giansily M, Mannucci PM, Schved JF, Beguin S, Hemker HC. The thrombogram in rare inherited coagulation disorders: its relation to clinical bleeding. *Thromb Haemost* 2002; 88: 576–82.
- 15 Dargaud Y, Beguin S, Lienhart A, Al Dieri R, Trzeciak C, Bordet JC, Hemker HC, Negrier C. Evaluation of thrombin generating capacity in plasma from patients with haemophilia A and B. *Thromb Haemost* 2005; 93: 475–80.
- 16 Beltran-Miranda CP, Khan A, Jaloma-Cruz AR, Laffan MA. Thrombin generation and phenotypic correlation in haemophilia A. *Haemophilia* 2005; 11: 326–34.
- 17 Kemball-Cook G, Tuddenham EG, Wacey AI. The factor VIII Structure and Mutation Resource Site: HAMSTeRS version 4. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 216–9.
- 18 Regnault V, Hemker HC, Wahl D, Lecompte T. Phenotyping the haemostatic system by thrombography—potential for the estimation of thrombotic risk. *Thromb Res* 2004; 114: 539–45.
- 19 Dargaud Y, Bordet JC, Francillon S, Negrier C. Haemophilia patients exhibit prolonged coagulation time but normal lag time of thrombin generation test: are these results really discordant? *Thromb Haemost* 2007; 97: 675–6.
- 20 Membre A, Trossaert M, Max J, Brunette A, Kis T, Lecompte T, Regnault V. Influence of phospholipid surface and concentration in thrombography. *J Thromb Haemost* 2007; 5: Abstract P-W-020.
- 21 Duncan EM, Rodgers SE, Sobieraj-Teague M, Casey CR, Lloyd JV. Laboratory diagnosis of the discrepant phenotype of mild haemophilia A using modified chromogenic factor VIII assay. *J Thromb Haemost* 2007; 5: P-S-157.
- 22 Bowyer AE, Kitchen S, Makris M. The chromogenic FVIII:C assay is a suitable alternative to the two-stage assay in detection of mild haemophilia A patients with one-stage, two-stage discrepancy. *J Thromb Haemost* 2007; 5: P-S-122.
- 23 Jacquemin M, Lavend'homme R, Benhida A, Vanzeleghem B, d'Oiron R, Lavergne JM, Brackmann HH, Schwaab R, Vanden-Driessche T, Chuah MK, Hoylaerts M, Gilles JG, Peerlinck K, Vermeylen J, Saint-Remy JM. A novel cause of mild/moderate hemophilia A: mutations scattered in the factor VIII C1 domain reduce factor VIII binding to von Willebrand factor. *Blood* 2000; 96: 958–65.
- 24 Stoikova-McPhie S, Villoutreix BO, Mertens K, Kemball-Cook G, Holzenburg A. 3-Dimensional structure of membrane-bound coagulation factor VIII: modeling of the factor VIII heterodimer within a 3-dimensional density map derived by electron crystallography. *Blood* 2002; 99: 1215–23.
- 25 Chantarangkul V, Clerici M, Bressi C, Giesen PL, Tripodi A. Thrombin generation assessed as endogenous thrombin potential in patients with hyper- or hypo-coagulability. *Haematologica* 2003; 88: 547–54.
- 26 Dargaud Y, Luddington R, Baglin TP. Elimination of contact factor activation improves measurement of platelet-dependent thrombin generation by calibrated automated thrombography at low-concentration tissue factor. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 1160–1.
- 27 Luddington R, Baglin T. Clinical measurement of thrombin generation by calibrated automated thrombography requires contact factor inhibition. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1954–9.
- 28 Varadi K, Turecek PL, Schwarz HP. Thrombin generation assay and other universal tests for monitoring haemophilia therapy. *Haemophilia* 2004; 10 Suppl. 2: 17–21.
- 29 Haidl H, Cimenti C, Leschnik B, Zach D, Muntean W. Age-dependency of thrombin generation measured by means of calibrated automated thrombography (CAT). *Thromb Haemost* 2006; 95: 772–5.

C.

**DISCUSSION GENERALE
ET
CONCLUSION**

Discussion générale et conclusion

« *Thus, the diagnosis of mild haemophilia cannot be excluded by the one-stage FVIII:C assay* ». Ainsi notre équipe concluait-elle le résumé de la communication présentée sous forme d'un poster à la XXIV^e réunion de la WFH à Montréal en 2000 et qui rapportait le cas d'un patient hémophilie A atténué avec un taux de FVIII:C 1 temps normal, diagnostiqué grâce à une technique chromogénique (Fressinaud, *et al* 2000). Ce type de discordance entre dosage chromométrique en 1 temps d'une part et dosage chromométrique en 2 temps ou chromogénique d'autre part avait été décrite en 1988 pour la première fois à Lille par Parquet-Gernez *et al* (Parquet-Gernez, *et al* 1988). Rapidement, il a été indiqué que ce phénomène de discordance pouvait être fréquent : 30% (Duncan, *et al* 1994), voire 48% des cas (Nesbitt, *et al* 2001b).

Plus récemment, deux études ont rapporté le phénomène « inverse », à savoir un FVIII:C Chromo plus élevé que le FVIII:C 1 temps (Mumford, *et al* 2002, Roelse, *et al* 1999). Ce type de discordance est beaucoup plus rarement rapporté que le précédent. A notre connaissance, leur prévalence n'a jamais été étudiée.

Afin d'évaluer la prévalence de ces deux types de discordances chez les patients vivant dans notre région, nous avons exploré de façon prospective tous les patients suivis par notre Centre de Traitement de l'Hémophilie à Nantes. Dans les 173 familles explorées phénotypiquement, 140 (81%) présentent un déficit quantitatif et 27 (16%) un déficit qualitatif. Pour 6 (3%) familles, les valeurs du rapport FVIII:C/FVIII:Ag sont comprises entre 0,5 et 0,6 et la littérature n'ayant pas défini de seuil discriminant, la nature du déficit ne peut être précisée.

Dans un souci de praticabilité et d'amélioration de la reproductibilité liée à l'automatisation de la technique, nous avons choisi de comparer le dosage chromométrique du FVIII:C 1 temps avec les techniques chromogéniques.

Ainsi, 307 patients issus de 173 familles ont été explorés et nous avons retrouvé une prévalence de familles avec la discordance « classique » (taux de FVIII:C 1 temps supérieur au taux de FVIII:C Chromo) de 5/173 (2,8%), ce qui est beaucoup plus faible que celle précédemment rapportée. La prévalence des familles présentant une

discordance « inverse » (taux de FVIII:C 1 temps inférieur au taux de FVIII:C Chromo) est élevée : 12/173 (6,9%) dans notre population.

Concernant la discordance « classique », sa première description par Parquet-Gernez *et al* (Parquet-Gernez, *et al* 1988) la rapportait chez 11/73 (15%), Duncan *et al* (Duncan, *et al* 1994) chez 29/74 (39%) et Nesbitt *et al* (Nesbitt, *et al* 2001b) chez 25/52 (48%) de patients hémophiles modérés/atténués respectivement d'origine lilloise, australienne ou britannique et décrits comme non-apparentés. On peut constater qu'il s'agit de populations relativement faibles dont, pour les deux premières études, le génotype n'a pas été exploré, et pour la dernière exploration seulement de 25 patients, seules 7 mutations différentes ont été identifiées, ce qui suggère de nombreux apparentés. De la même façon, dans notre étude, au vu des résultats qui montrent que 7 familles identifiées comme non-apparentées par l'interrogatoire ont le même génotype, des études généalogiques ont été entreprises et ont indiqué qu'il s'agit en fait d'une seule famille avec un ancêtre commun vivant au XVIII^e siècle dans un village vendéen : Chavagnes les Redoux.

La notion de prévalence est donc très dépendante de la population étudiée et toute évaluation devrait prendre en compte des patients d'origine géographique différente en nombre suffisant (idéalement quelques milliers...) avec une étude génétique systématique pour repérer d'éventuel biais de sélection des familles.

Les 17 familles avec phénotype discordant ont toutes un déficit qualitatif et l'anomalie moléculaire responsable a toujours été mise en évidence. Etant donné la fréquence des discordances dans les anomalies qualitatives du FVIII (17/27 soit 63% des familles), il s'avère indispensable de les rechercher systématiquement. Toute hémophilie modérée ou mineure doit être phénotypiquement caractérisée par le dosage du FVIII:Ag, le dosage du FVIII:C 1 temps et chromogénique.

Dans les 144 familles, avec ou sans discordance entre les dosages de FVIII:C, pour lesquelles nous avons effectué une analyse moléculaire, une mutation génétique a été identifiée chez 22/23 (96%) des hémophiles A modérés et 106/121 (88%) des hémophiles A atténués.

Dans l'hémophilie A modérée et atténuée, la littérature rapporte respectivement 2-5% et 15-20% patients sans anomalie génétique identifiée (Bogdanova, *et al* 2007, Citron, *et al* 2002, Cutler, *et al* 2002, Habart, *et al* 2003, Liu, *et al* 2002). Malheureusement, les

auteurs n'indiquent pas le pourcentage en fonction de la nature du déficit, quantitatif ou qualitatif.

Pour les patients dont la mutation n'a pas été retrouvée, plusieurs explications ont été suggérées (El-Maarri, *et al* 2006a) :

- De nouveaux remaniements géniques (en dehors des inversions des introns 1 et 22). Ceci est surtout envisagé dans l'hémophilie sévère où de nouvelles inversions ou duplications d'exons n'altéreraient pas la séquence des exons mais interrompraient l'ARN normal.
- Des mutations situées au niveau du promoteur du gène du FVIII, non explorées actuellement par les techniques habituelles. De telles mutations ont en effet été récemment décrites (Bogdanova, *et al* 2007, Dai, *et al* 2008) mais peuvent être très en amont du gène et être très difficiles à mettre en évidence.
- Des mutations ponctuelles qui siègeraient au sein des grands introns et altéreraient l'épissage de l'ARN.
- Des anomalies d'expression protéique
- Des anomalies de la sécrétion protéique ou de la transformation intracellulaire qui pourraient retenir la protéine de FVIII à l'intérieur de la cellule.

Toutes ces anomalies devraient être responsables de déficits quantitatifs.

Le laboratoire de génétique de l'Université de Bonn a recherché des nouveaux remaniements chez des patients atteints essentiellement d'hémophilie sévère et modéré) et, à ce jour, ne retrouve aucune anomalie de ce type (El-Maarri, *et al* 2005).

Ceci pourrait indiquer que la cause de l'hémophilie résiderait dans une région d'ADN aujourd'hui inconnue et qui régulerait l'expression génique. A l'exemple des protéines ERGIC-53 et MCFD2, molécules chaperonnes communes au FV et au FVIII, il pourrait exister d'autres molécules jouant un rôle dans la conformation du FVIII, sa sécrétion, son transport ou modulant sa maturation. Des anomalies de telles molécules pourraient induire des déficits plus ou moins importants en FVIII plasmatique. La sécrétion protéique dépend largement de sa transformation par l'appareil de Golgi, sa phosphorylation, sa sulfatation, sa glycosylation ou le clivage protéique du domaine B du FVIII. Il serait également théoriquement possible que les phénotypes observés dans l'hémophilie mineure, résulte d'une expression diminuée de l'ARN messager comme cela a été déjà d'ores et déjà décrit chez un patient hémophile A sévère qui présentait

un défaut complet d'expression d'ARN messager (El-Maarri, *et al* 2006b). Ainsi, de nombreux mécanismes physiopathologiques méritent encore d'être explorés. Ce sont des travaux d'envergure internationale qui pourraient étudier la co-ségrégation du gène du FVIII avec le phénotype au sein de grandes familles hémophiles sans mutation connue avec, en cas de non-ségrégation du gène du FVIII avec le phénotype, la détermination de régions chromosomiques à la recherche de gène (s) candidat (s) pour des protéines impliquées dans la physiopathologie de l'hémophilie A.

Dans ce travail, pour les 19/29 nouvelles mutations identifiées dans les domaines A du FVIII, les conséquences de ces mutations faux-sens sur la conformation de la protéine ont pu être évaluées grâce à une modélisation 3D. Dans la grande majorité des cas, elles induisent des modifications de conformation pouvant modifier la fonctionnalité du FVIII. Pour la première fois à notre connaissance, des mutations susceptibles de modifier les sites de fixation des ions métalliques sont rapportées (p.Val201Leu, p.Pro472Leu et p.Asp542Glu). Etant donné le nombre important de mutations que nous avons identifiées dans les domaines C1 et C2, et le rôle physiopathologique majeur de ces régions (en particulier en relation avec VWF, LRP1 et phospholipides), il sera important d'étudier leurs conséquences sur les sites d'interaction du FVIII, dès qu'un consensus conformationnel aura établi une structure 3D fiable.

Très récemment, Bogdanova *et al*, ont identifié, au sein d'une population d'origine allemande, 3 exons du gène du FVIII particulièrement impliqués dans l'hémophilie A modérée/atténuée : les exons 11, 14 et 23 (Bogdanova, *et al* 2007). De façon très intéressante, il s'agit également des 3 exons les plus souvent concernés par les mutations dans notre expérience ; particulièrement au niveau de l'exon 23 (18% des mutations se situant dans cet exon). Ce déséquilibre n'est pas retrouvé lorsqu'on se réfère à la base de données HAMSTeRS. Peut-être serait-il intéressant, dans un but d'efficacité et comme le suggèrent ces auteurs allemands, de débiter systématiquement l'analyse moléculaire des hémophiles modérés/mineurs par ces 3 exons.

Enfin, la dernière partie de notre travail s'est intéressée à évaluer le risque hémorragique de nos patients présentant un phénotype discordant puisque, si on se réfère à la définition telle qu'elle a été établie en 2001 par le *sous-comité scientifique sur les FVIII et FIX* du SSC à l'ISTH (White, *et al* 2001), nous ne pouvions établir aucun

diagnostic de sévérité chez eux. De nombreuses publications ont évalué la thrombinographie (Al Dieri, *et al* 2002, Beltran-Miranda, *et al* 2005, Dargaud, *et al* 2005, Hemker, *et al* 2006, Rugeri, *et al* 2007, Siegemund, *et al* 2003) qui a l'intérêt de refléter *in vitro* l'hémostase *in vivo*. En effet, la thrombinographie nous a permis différencier les patients à fort risque hémorragique de ceux pour lesquels le risque paraît moindre et, dans nos observations, elle est bien corrélée à la clinique. L'intérêt de la thrombinographie n'avait jamais été étudié chez ce type de patients.

En conclusion, ce travail, entrepris à partir de l'histoire d'un patient hémophile A dont le diagnostic était difficile à établir nous a permis de parcourir de nombreux aspects de cette pathologie : du nucléotide de l'ADN jusqu'à l'évaluation globale de l'hémostase par la thrombinographie, de la visualisation 3D de la protéine *in silico* jusqu'au phénotype clinique. La confrontation de nos résultats avec la littérature confirme que la compréhension moléculaire reste malgré tout encore parcellaire et que des zones entières sont encore obscures et restent à explorer. La thrombinographie, qu'on croyait obsolète ou inaccessible, apparaît aujourd'hui comme un outil complémentaire. Dans tous les cas, et quelle que soit l'approche scientifique utilisée, la poursuite de l'étude des rapports structure/fonction du FVIII chez les patients hémophiles est indispensable pour avancer dans nos connaissances sur cette maladie.

D. BIBLIOGRAPHIE

|

BIBLIOGRAPHIE

- Ahmed, R.P., Ivaskevicius, V., Kannan, M., Seifried, E., Oldenburg, J. & Saxena, R. (2005) Identification of 32 novel mutations in the factor VIII gene in Indian patients with hemophilia A. *Haematologica*, **90**, 283-284.
- Al Dieri, R., Peyvandi, F., Santagostino, E., Giansily, M., Mannucci, P.M., Schved, J.F., Beguin, S. & Hemker, H.C. (2002) The thrombogram in rare inherited coagulation disorders: its relation to clinical bleeding. *Thromb Haemost*, **88**, 576-582.
- Aly, A.M., Arai, M. & Hoyer, L.W. (1992) Cysteamine enhances the procoagulant activity of Factor VIII-East Hartford, a dysfunctional protein due to a light chain thrombin cleavage site mutation (arginine-1689 to cysteine). *J Clin Invest*, **89**, 1375-1381.
- Aly, A.M. & Hoyer, L.W. (1992) Factor VIII-East Hartford (arginine 1689 to cysteine) has procoagulant activity when separated from von Willebrand factor. *J Clin Invest*, **89**, 1382-1387.
- Antonarakis, S.E., Rossiter, J.P., Young, M., Horst, J., de Moerloose, P., Sommer, S.S., Ketterling, R.P., Kazazian, H.H., Jr., Negrier, C., Vinciguerra, C., Gitschier, J., Goossens, M., Girodon, E., Ghanem, N., Plassa, F., Lavergne, J.M., Vidaud, M., Costa, J.M., Laurian, Y., Lin, S.W., Lin, S.R., Shen, M.C., Lillicrap, D., Taylor, S.A., Windsor, S., Valleix, S.V., Nafa, K., Sultan, Y., Delpech, M., Vnencak-Jones, C.L., Phillips, J.A., 3rd, Ljung, R.C., Koumbarelis, E., Gialeraki, A., Mandalaki, T., Jenkins, P.V., Collins, P.W., Pasi, K.J., Goodeve, A., Peake, I., Preston, F.E., Schwartz, M., Scheibel, E., Ingerslev, J., Cooper, D.N., Millar, D.S., Kakkar, V.V., Giannelli, F., Naylor, J.A., Tizzano, E.F., Baiget, M., Domenech, M., Altisent, C., Tusell, J., Beneyto, M., Lorenzo, J.I., Gaucher, C., Mazurier, C., Peerlinck, K., Matthijs, G., Cassiman, J.J., Vermeylen, J., Mori, P.G., Aquila, M., Caprino, D. & Inaba, H. (1995) Factor VIII gene inversions in severe hemophilia A: results of an international consortium study. *Blood*, **86**, 2206-2212.
- Arai, M., Higuchi, M., Antonarakis, S.E., Kazazian, H.H., Jr., Phillips, J.A., 3rd, Janco, R.L. & Hoyer, L.W. (1990) Characterization of a thrombin cleavage site mutation (Arg 1689 to Cys) in the factor VIII gene of two unrelated patients with cross-reacting material-positive hemophilia A. *Blood*, **75**, 384-389.
- Aurell, L., Friberger, P., Karlsson, G. & Claeson, G. (1977) A new sensitive and highly specific chromogenic peptide substrate for factor Xa. *Thromb Res*, **11**, 595-609.
- Bagnall, R.D., Waseem, N., Green, P.M. & Giannelli, F. (2002) Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood*, **99**, 168-174.
- Bajaj, S.P., Schmidt, A.E., Mathur, A., Padmanabhan, K., Zhong, D., Mastri, M. & Fay, P.J. (2001) Factor IXa:factor VIIIa interaction. helix 330-338 of factor IXa interacts with residues 558-565 and spatially adjacent regions of the $\alpha 2$ subunit of factor VIIIa. *J Biol Chem*, **276**, 16302-16309.
- Barrowcliffe, T.W. (1984) Comparisons of one-stage and two-stage assays of Factor VIII:C. *Scand J Haematol Suppl*, **41**, 39-54.
- Barrowcliffe, T.W. (1993) Factor VIII and factor IX Sub-Committee. Recommendations for the assay of high-purity factor VIII concentrates. *Thromb Haemost*, **70**, 876-877.
- Barrowcliffe, T.W. & Kirkwood, T.B. (1978) An international collaborative assay of factor VIII clotting activity. *Thromb Haemost*, **40**, 260-271.

- Beguin, S., Lindhout, T. & Hemker, H.C. (1989) The effect of trace amounts of tissue factor on thrombin generation in platelet rich plasma, its inhibition by heparin. *Thromb Haemost*, **61**, 25-29.
- Beltran-Miranda, C.P., Khan, A., Jaloma-Cruz, A.R. & Laffan, M.A. (2005) Thrombin generation and phenotypic correlation in haemophilia A. *Haemophilia*, **11**, 326-334.
- Bihoreau, N., Pin, S., de Kersabiec, A.M., Vidot, F. & Fontaine-Aupart, M.P. (1994) Copper-atom identification in the active and inactive forms of plasma-derived FVIII and recombinant FVIII-delta II. *Eur J Biochem*, **222**, 41-48.
- Bogdanova, N., Markoff, A., Eisert, R., Wermes, C., Pollmann, H., Todorova, A., Chlystun, M., Nowak-Gottl, U. & Horst, J. (2007) Spectrum of molecular defects and mutation detection rate in patients with mild and moderate hemophilia A. *Hum Mutat*, **28**, 54-60.
- Bontempo, F.A., Lewis, J.H., Gorenc, T.J., Spero, J.A., Ragni, M.V., Scott, J.P. & Starzl, T.E. (1987) Liver transplantation in hemophilia A. *Blood*, **69**, 1721-1724.
- Bovenschen, N., Boertjes, R.C., van Stempvoort, G., Voorberg, J., Lenting, P.J., Meijer, A.B. & Mertens, K. (2003a) Low density lipoprotein receptor-related protein and factor IXa share structural requirements for binding to the A3 domain of coagulation factor VIII. *J Biol Chem*, **278**, 9370-9377.
- Bovenschen, N., Herz, J., Grimbergen, J.M., Lenting, P.J., Havekes, L.M., Mertens, K. & van Vlijmen, B.J. (2003b) Elevated plasma factor VIII in a mouse model of low-density lipoprotein receptor-related protein deficiency. *Blood*, **101**, 3933-3939.
- Bovenschen, N., Mertens, K., Hu, L., Havekes, L.M. & van Vlijmen, B.J. (2005a) LDL receptor cooperates with LDL receptor-related protein in regulating plasma levels of coagulation factor VIII in vivo. *Blood*.
- Bovenschen, N., Rijken, D.C., Havekes, L.M., van Vlijmen, B.J. & Mertens, K. (2005b) The B domain of coagulation factor VIII interacts with the asialoglycoprotein receptor. *J Thromb Haemost*, **3**, 1257-1265.
- Bovenschen, N., van Stempvoort, G., Voorberg, J., Mertens, K. & Meijer, A.B. (2006) Proteolytic cleavage of factor VIII heavy chain is required to expose the binding-site for low-density lipoprotein receptor-related protein within the A2 domain. *J Thromb Haemost*, **4**, 1487-1493.
- Bowyer, A.E., Kitchen, S. & Makris, M. (2007) The chromogenic FVIII:C assay is a suitable alternative to the two-stage assay in detection of mild haemophilia A with one-stage, two-stage discrepancy. *J Thromb Haemost*, **5**, PS 122.
- Brisson, A., Olofsson, A., Ringler, P., Schmutz, M. & Stoylova, S. (1994) Two-dimensional crystallization of proteins on planar lipid films and structure determination by electron crystallography. *Biol Cell*, **80**, 221-228.
- Brummel, K.E., Paradis, S.G., Butenas, S. & Mann, K.G. (2002) Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation. *Blood*, **100**, 148-152.
- Brummel-Ziedins, K.E., Vossen, C.Y., Butenas, S., Mann, K.G. & Rosendaal, F.R. (2005) Thrombin generation profiles in deep venous thrombosis. *J Thromb Haemost*, **3**, 2497-2505.
- Carlebjork, G., Oswaldsson, U. & Rosen, S. (1987) A simple and accurate microplate assay for the determination of factor VIII activity. *Thromb Res*, **47**, 5-14.
- Cawthorn, K.M., van 't Veer, C., Lock, J.B., DiLorenzo, M.E., Branda, R.F. & Mann, K.G. (1998) Blood coagulation in hemophilia A and hemophilia C. *Blood*, **91**, 4581-4592.

- Celie, P.H., Van Stempvoort, G., Jorieux, S., Mazurier, C., Van Mourik, J.A. & Mertens, K. (1999) Substitution of Arg527 and Arg531 in factor VIII associated with mild haemophilia A: characterization in terms of subunit interaction and cofactor function. *Br J Haematol*, **106**, 792-800.
- Chantarangkul, V., Clerici, M., Bressi, C. & Tripodi, A. (2004) Standardization of the endogenous thrombin potential measurement: how to minimize the effect of residual platelets in stored plasma. *Br J Haematol*, **124**, 355-357.
- Cinotti, S., Paladino, E. & Morfini, M. (2006) Accuracy of FVIII: C assay by one-stage method can be improved using hemophilic plasma as diluent. *J Thromb Haemost*, **4**, 828-833.
- Citron, M., Godmilow, L., Ganguly, T. & Ganguly, A. (2002) High throughput mutation screening of the factor VIII gene (F8C) in hemophilia A: 37 novel mutations and genotype-phenotype correlation. *Hum Mutat*, **20**, 267-274.
- Cunningham, N., Laffan, M.A., Manning, R.A. & O'Donnell, J.S. (2005) Low-density lipoprotein receptor-related protein polymorphisms in patients with elevated factor VIII coagulant activity and venous thrombosis. *Blood Coagul Fibrinolysis*, **16**, 465-468.
- Cutler, J.A., Mitchell, M.J., Smith, M.P. & Savidge, G.F. (2002) The identification and classification of 41 novel mutations in the factor VIII gene (F8C). *Hum Mutat*, **19**, 274-278.
- Dai, L., Cutler, J.A., Savidge, G.F. & Mitchell, M.J. (2008) Characterization of a causative mutation of hemophilia A identified in the promoter region of the factor VIII gene (F8). *J Thromb Haemost*, **6**, 193-195.
- Dargaud, Y., Beguin, S., Lienhart, A., Al Dieri, R., Trzeciak, C., Bordet, J.C., Hemker, H.C. & Negrier, C. (2005) Evaluation of thrombin generating capacity in plasma from patients with haemophilia A and B. *Thromb Haemost*, **93**, 475-480.
- Dargaud, Y., Bordet, J.C., Francillon, S. & Negrier, C. (2007) Haemophilia patients exhibit prolonged coagulation time but normal lag time of thrombin generation test: are these results really discordant? *Thromb Haemost*, **97**, 675-676.
- Dargaud, Y., Luddington, R. & Baglin, T.P. (2006) Elimination of contact factor activation improves measurement of platelet-dependent thrombin generation by calibrated automated thrombography at low-concentration tissue factor. *J Thromb Haemost*, **4**, 1160-1161.
- David, D., Moreira, I., Lalloz, M.R., Rosa, H.A., Schwaab, R., Morais, S., Diniz, M.J., de Deus, G., Campos, M., Lavinha, J. & et al. (1994) Analysis of the essential sequences of the factor VIII gene in twelve haemophilia A patients by single-stranded conformation polymorphism. *Blood Coagul Fibrinolysis*, **5**, 257-264.
- Dawson, N.J., Kemball-Cook, G. & Barrowcliffe, T.W. (1989) Assay discrepancies with highly purified factor VIII concentrates. *Haemostasis*, **19**, 131-137.
- d'Oiron, R., Volot, F., Reynaud, J., Peerlinck, K., Goudemand, J., Guerois, C., Rothschild, C., Chambost, H., Borel-Derlon, A., Roussel-Robert, V., Marques-Verdier, A., Lienhart, A., Berthier, A.M., Moreau, P. & Lambert, T. (2006) Impact of choice of treatment for bleeding episodes on inhibitor outcome in patients with mild/moderate hemophilia a and inhibitors. *Semin Hematol*, **43**, S3-9.
- Dorner, A.J., Bole, D.G. & Kaufman, R.J. (1987) The relationship of N-linked glycosylation and heavy chain-binding protein association with the secretion of glycoproteins. *J Cell Biol*, **105**, 2665-2674.

- Duncan, E.M., Duncan, B.M., Tunbridge, L.J. & Lloyd, J.V. (1994) Familial discrepancy between the one-stage and two-stage factor VIII methods in a subgroup of patients with haemophilia A. *Br J Haematol*, **87**, 846-848.
- Duncan, E.M., Rodgers, S.E., Sobieraj-Teague, M. & Casey, G.J. (2007) Laboratory diagnosis of the discrepant phenotype of mild haemophilia A using modified chromogenic factor VIII assay. *J Thromb Haemost*, **5**, PS 157.
- El-Maarri, O., Brackman, H.H., Hanfland, P. & Oldenburg, J. (2006a) Hemophilia A patients with undetectable mutations: current knowledge and future directions. *Transfus Med*, **33**, 156-159.
- El-Maarri, O., Herbiniaux, U., Graw, J., Schroder, J., Terzic, A., Watzka, M., Brackmann, H.H., Schramm, W., Hanfland, P., Schwaab, R., Muller, C.R. & Oldenburg, J. (2005) Analysis of mRNA in hemophilia A patients with undetectable mutations reveals normal splicing in the factor VIII gene. *J Thromb Haemost*, **3**, 332-339.
- El-Maarri, O., Singer, H., Klein, C., Watzka, M., Herbiniaux, U., Brackmann, H.H., Schroder, J., Graw, J., Muller, C.R., Schramm, W., Schwaab, R., Haaf, T., Hanfland, P. & Oldenburg, J. (2006b) Lack of F8 mRNA: a novel mechanism leading to hemophilia A. *Blood*, **107**, 2759-2765.
- Fay, P.J. (1988) Reconstitution of human factor VIII from isolated subunits. *Arch Biochem Biophys*, **262**, 525-531.
- Fay, P.J. (1993) Factor VIII structure and function. *Thromb Haemost*, **70**, 63-67.
- Fay, P.J. (2004) Activation of factor VIII and mechanisms of cofactor action. *Blood Rev*, **18**, 1-15.
- Fay, P.J., Anderson, M.T., Chavin, S.I. & Marder, V.J. (1986) The size of human factor VIII heterodimers and the effects produced by thrombin. *Biochim Biophys Acta*, **871**, 268-278.
- Fay, P.J., Beattie, T., Huggins, C.F. & Regan, L.M. (1994) Factor VIIIa A2 subunit residues 558-565 represent a factor IXa interactive site. *J Biol Chem*, **269**, 20522-20527.
- Fay, P.J., Haidaris, P.J. & Huggins, C.F. (1993) Role of the COOH-terminal acidic region of A1 subunit in A2 subunit retention in human factor VIIIa. *J Biol Chem*, **268**, 17861-17866.
- Fay, P.J. & Jenkins, P.V. (2005) Mutating factor VIII: lessons from structure to function. *Blood Rev*, **19**, 15-27.
- Fay, P.J., Mastri, M., Koszelak, M.E. & Wakabayashi, H. (2001) Cleavage of factor VIII heavy chain is required for the functional interaction of a2 subunit with factor IXa. *J Biol Chem*, **276**, 12434-12439.
- Fay, P.J. & Scandella, D. (1999) Human inhibitor antibodies specific for the factor VIII A2 domain disrupt the interaction between the subunit and factor IXa. *J Biol Chem*, **274**, 29826-29830.
- Foster, P.A., Fulcher, C.A., Houghten, R.A. & Zimmerman, T.S. (1990) Synthetic factor VIII peptides with amino acid sequences contained within the C2 domain of factor VIII inhibit factor VIII binding to phosphatidylserine. *Blood*, **75**, 1999-2004.
- Fressinaud, E., Trossaert, M., Sigaud-Fiks, M., Voisin, S. & Betbeze, V. (2000) Diagnostic importance of the chromogenic factor VIII assay before excluding mild haemophilia A. *Haemophilia*, **6**, 250.

- Friberger, P. (1983) Synthetic peptide substrate assays in coagulation and fibrinolysis and their application on automates. *Semin Thromb Hemost*, **9**, 281-300.
- Gerotziafas, G.T., Depasse, F., Busson, J., Leflem, L., Elalamy, I. & Samama, M.M. (2005) Towards a standardization of thrombin generation assessment: the influence of tissue factor, platelets and phospholipids concentration on the normal values of Thrombogram-ThrombinoScope assay. *Thromb J*, **3**, 16.
- Giansily-Blaizot, M., Al Dieri, R. & Schved, J.F. (2003) Thrombin generation measurement in factor VII-depleted plasmas compared to inherited factor VII-deficient plasmas. *Pathophysiol Haemost Thromb*, **33**, 36-42.
- Girma, J.P., Fressinaud, E., Houllier, A., Laurian, Y., Amiral, J. & Meyer, D. (1998) Assay of factor VIII antigen (VIII:CAG) in 294 haemophilia A patients by a new commercial ELISA using monoclonal antibodies. *Haemophilia*, **4**, 98-103.
- Girma, J.P., Lavergne, J.M., Meyer, D. & Larrieu, M.J. (1981) Immunoradiometric assay of factor VIII: coagulant antigen using four human antibodies. Study of 27 cases of haemophilia A. *Br J Haematol*, **47**, 269-282.
- Gitschier, J. (2004) Remembrances of factor VIII. Part 1: the race to the gene. *J Thromb Haemost*, **2**, 383-387.
- Gitschier, J. (2006) Remembrances of factor VIII. Part 2: the path to mutation discovery. *J Thromb Haemost*, **4**, 1175-1179.
- Gitschier, J., Kogan, S., Levinson, B. & Tuddenham, E.G. (1988) Mutations of factor VIII cleavage sites in hemophilia A. *Blood*, **72**, 1022-1028.
- Gitschier, J., Wood, W.I., Goralka, T.M., Wion, K.L., Chen, E.Y., Eaton, D.H., Vehar, G.A., Capon, D.J. & Lawn, R.M. (1984) Characterization of the human factor VIII gene. *Nature*, **312**, 326-330.
- Gitschier, J., Wood, W.I., Shuman, M.A. & Lawn, R.M. (1986) Identification of a missense mutation in the factor VIII gene of a mild hemophiliac. *Science*, **232**, 1415-1416.
- Goodeve, A., Hinks, J., Nesbitt, I., Sampson, B., Burgess, C., Khair, K., Leisner, R., Kitchen, S., Peake, I. & Makris, M. (2001) Unusual discrepant factor VIII:C assays in haemophilia A patients with Tyr346Cys and Glu321Lys FVIII gene mutations. *Thromb Haemost*, **Suppl july**, Abstract P1370.
- Goudemand, J. (1997) *Hémophilies*. Elsevier, Paris.
- Guillet, B., Lambert, T., d'Oiron, R., Proulle, V., Plantier, J.L., Rafowicz, A., Peynet, J., Costa, J.M., Bendelac, L., Laurian, Y. & Lavergne, J.M. (2006) Detection of 95 novel mutations in coagulation factor VIII gene F8 responsible for hemophilia A: results from a single institution. *Hum Mutat*, **27**, 676-685.
- Habart, D., Kalabova, D., Novotny, M. & Vorlova, Z. (2003) Thirty-four novel mutations detected in factor VIII gene by multiplex CSGE: modeling of 13 novel amino acid substitutions. *J Thromb Haemost*, **1**, 773-781.
- Hakeos, W.H., Miao, H., Sirachainan, N., Kembell-Cook, G., Saenko, E.L., Kaufman, R.J. & Pipe, S.W. (2002) Hemophilia A mutations within the factor VIII A2-A3 subunit interface destabilize factor VIIIa and cause one-stage/two-stage activity discrepancy. *Thromb Haemost*, **88**, 781-787.
- Hathaway, W.E., Christian, M.J. & Jacobson, L.J. (1993) Variant mild haemophilia. Discrepancy in one-stage and two stage factor VIII assays. *Thromb Haemost*, **50**, 357a.

- Hay, C.R. (1998) Factor VIII inhibitors in mild and moderate-severity haemophilia A. *Haemophilia*, **4**, 558-563.
- Hellstern, P., Kiehl, R., Miyashita, C., Schwerdt, H., von Blohn, G., Kohler, M., Buttner, M. & Wenzel, E. (1986) Factor VIII: C (FVIII: C) recovery and half-life after infusion of steam-treated high purity factor VIII concentrate in severe hemophilia A--comparison of one-stage assay, two-stage assay and a chromogenic substrate assay. *Thromb Haemost*, **56**, 353-359.
- Hemker, H.C. (2005) Calibrated automated thrombinography (CAT). *Thromb Res*, **115**, 255.
- Hemker, H.C. (2008) Recollections on thrombin generation. *J Thromb Haemost*, **6**, 219-226.
- Hemker, H.C., Al Dieri, R., De Smedt, E. & Beguin, S. (2006) Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system. *Thromb Haemost*, **96**, 553-561.
- Hemker, H.C. & Beguin, S. (2000) Phenotyping the clotting system. *Thromb Haemost*, **84**, 747-751.
- Hemker, H.C., Giesen, P., Al Dieri, R., Regnault, V., de Smedt, E., Wagenvoort, R., Lecompte, T. & Beguin, S. (2003) Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb*, **33**, 4-15.
- Hezard, N., Bouaziz-Borgi, L., Remy, M.G. & Nguyen, P. (2006a) Utility of thrombin-generation assay in the screening of factor V G1691A (Leiden) and prothrombin G20210A mutations and protein S deficiency. *Clin Chem*, **52**, 665-670.
- Hezard, N., Remy, M.G., Florent, B. & Nguyen, P. (2006b) Reliability of thrombin generation assay on frozen-thawed platelet-rich plasma: a reply. *Clin Chem*, **52**, 2127-2128.
- Higuchi, M., Wong, C., Kochhan, L., Olek, K., Aronis, S., Kasper, C.K., Kazazian, H.H., Jr. & Antonarakis, S.E. (1990) Characterization of mutations in the factor VIII gene by direct sequencing of amplified genomic DNA. *Genomics*, **6**, 65-71.
- Hill, M., Deam, S., Gordon, B. & Dolan, G. (2005) Mutation analysis in 51 patients with haemophilia A: report of 10 novel mutations and correlations between genotype and clinical phenotype. *Haemophilia*, **11**, 133-141.
- Hron, G., Kollars, M., Binder, B.R., Eichinger, S. & Kyrle, P.A. (2006) Identification of patients at low risk for recurrent venous thromboembolism by measuring thrombin generation. *Jama*, **296**, 397-402.
- Inaba, H., Yatomi, Y., Shinozama, K., Otaki, M., Suzuki, T., Amano, K. & Fukutake, K. (2007) Analysis of discrepant assay-determined activity levels of factor VIII associated with R531H mutation. *J Thromb Haemost*, **5**, PS 126.
- Jacquemin, M., Benhida, A., Peerlinck, K., Desqueper, B., Vander Elst, L., Lavend'homme, R., d'Oiron, R., Schwaab, R., Bakkus, M., Thielemans, K., Gilles, J.G., Vermynen, J. & Saint-Remy, J.M. (2000a) A human antibody directed to the factor VIII C1 domain inhibits factor VIII cofactor activity and binding to von Willebrand factor. *Blood*, **95**, 156-163.
- Jacquemin, M., Lavend'homme, R., Benhida, A., Vanzieleghe, B., d'Oiron, R., Lavergne, J.M., Brackmann, H.H., Schwaab, R., VandenDriessche, T., Chuah, M.K., Hoylaerts, M., Gilles, J.G., Peerlinck, K., Vermynen, J. & Saint-Remy, J.M. (2000b) A novel cause of mild/moderate hemophilia A: mutations scattered in the factor VIII C1 domain reduce factor VIII binding to von Willebrand factor. *Blood*, **96**, 958-965.
- Johnson, D.J., Pemberton, S., Aquila, M., Mori, P.G., Tuddenham, E.G. & O'Brien, D.P. (1994) Factor VIII S373L: mutation at P1' site confers thrombin cleavage resistance, causing mild haemophilia A. *Thromb Haemost*, **71**, 428-433.

- Johnson, S.A. & Seegers, W.H. (1954) Use of purified prothrombin in the study of hemophilia and plasma thromboplastin component (PTC) deficiency. *J Appl Physiol*, **6**, 429-436.
- Kaufman, R.J., Pipe, S.W., Tagliavacca, L., Swaroop, M. & Moussalli, M. (1997) Biosynthesis, assembly and secretion of coagulation factor VIII. *Blood Coagul Fibrinolysis*, **8 Suppl 2**, S3-14.
- Kaufman, R.J., Wasley, L.C. & Dorner, A.J. (1988) Synthesis, processing, and secretion of recombinant human factor VIII expressed in mammalian cells. *J Biol Chem*, **263**, 6352-6362.
- Keeling, D.M., Sukhu, K., Kembell-Cook, G., Waseem, N., Bagnall, R. & Lloyd, J.V. (1999) Diagnostic importance of the two-stage factor VIII:C assay demonstrated by a case of mild haemophilia associated with His1954-->Leu substitution in the factor VIII A3 domain. *Br J Haematol*, **105**, 1123-1126.
- Kembell-Cook, G., Tuddenham, E.G. & Wacey, A.I. (1998) The factor VIII Structure and Mutation Resource Site: HAMSTeRS version 4. *Nucleic Acids Res*, **26**, 216-219.
- Keularts, I.M., Zivelin, A., Seligsohn, U., Hemker, H.C. & Beguin, S. (2001) The role of factor XI in thrombin generation induced by low concentrations of tissue factor. *Thromb Haemost*, **85**, 1060-1065.
- Kirkwood, T.B. & Barrowcliffe, T.W. (1978) Discrepancy between one-stage and two-stage assay of factor VIII:C. *Br J Haematol*, **40**, 333-338.
- Koszelak, M.E., Huggins, C.F. & Fay, P.J. (2000) Sites in the A2 subunit involved in the interfactor VIIIA interaction. *J Biol Chem*, **275**, 27137-27144.
- Lakich, D., Kazazian, H.H., Jr., Antonarakis, S.E. & Gitschier, J. (1993) Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nat Genet*, **5**, 236-241.
- Lavergne, J.M., Bahnak, B.R., Vidaud, M., Laurian, Y. & Meyer, D. (1992) A directed search for mutations in hemophilia A using restriction enzyme analysis and denaturing gradient gel electrophoresis. A study of seven exons in the factor VIII gene of 170 cases. *Nouv Rev Fr Hematol*, **34**, 85-91.
- Lazarchick, J. & Hoyer, L.W. (1978) Immunoradiometric measurement of the factor VIII procoagulant antigen. *J Clin Invest*, **62**, 1048-1052.
- Lecompte, T., Wahl, D. & Regnault, V. (2006) Thrombinographie. *Hématologie*, **12**, 115-127.
- Lenting, P.J., CJ, V.A.N.S. & Denis, C.V. (2007) Clearance mechanisms of von Willebrand factor and factor VIII. *J Thromb Haemost*, **5**, 1353-1360.
- Lenting, P.J., Donath, M.J., van Mourik, J.A. & Mertens, K. (1994) Identification of a binding site for blood coagulation factor IXa on the light chain of human factor VIII. *J Biol Chem*, **269**, 7150-7155.
- Lenting, P.J., Neels, J.G., van den Berg, B.M., Clijsters, P.P., Meijerman, D.W., Pannekoek, H., van Mourik, J.A., Mertens, K. & van Zonneveld, A.J. (1999) The light chain of factor VIII comprises a binding site for low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem*, **274**, 23734-23739.
- Lenting, P.J., van de Loo, J.W., Donath, M.J., van Mourik, J.A. & Mertens, K. (1996) The sequence Glu1811-Lys1818 of human blood coagulation factor VIII comprises a binding site for activated factor IX. *J Biol Chem*, **271**, 1935-1940.
- Lenting, P.J., van Mourik, J.A. & Mertens, K. (1998) The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. *Blood*, **92**, 3983-3996.

- Leyte, A., van Schijndel, H.B., Niehrs, C., Huttner, W.B., Verbeet, M.P., Mertens, K. & van Mourik, J.A. (1991) Sulfation of Tyr1680 of human blood coagulation factor VIII is essential for the interaction of factor VIII with von Willebrand factor. *J Biol Chem*, **266**, 740-746.
- Leyte, A., Verbeet, M.P., Brodniewicz-Proba, T., Van Mourik, J.A. & Mertens, K. (1989) The interaction between human blood-coagulation factor VIII and von Willebrand factor. Characterization of a high-affinity binding site on factor VIII. *Biochem J*, **257**, 679-683.
- Lillicrap, D., Holden, J.J., Giles, A.R. & White, B.N. (1988) Carrier detection strategy in haemophilia A: the benefits of combined DNA marker analysis and coagulation testing in sporadic haemophilic families. *Br J Haematol*, **70**, 321-326.
- Lippi, G., Salvagno, G.L., Montagnana, M. & Guidi, G.C. (2006) Reliability of the thrombin-generation assay in frozen-thawed platelet-rich plasma. *Clin Chem*, **52**, 1827-1828.
- Liu, M.L., Nakaya, S. & Thompson, A.R. (2002) Non-inversion factor VIII mutations in 80 hemophilia A families including 24 with alloimmune responses. *Thromb Haemost*, **87**, 273-276.
- Liu, M.L., Shen, B.W., Nakaya, S., Pratt, K.P., Fujikawa, K., Davie, E.W., Stoddard, B.L. & Thompson, A.R. (2000) Hemophilic factor VIII C1- and C2-domain missense mutations and their modeling to the 1.5-angstrom human C2-domain crystal structure. *Blood*, **96**, 979-987.
- Lucia, J.F., Aguilar, C., Dobon, M., Aznar, J.A., Tizano, E., Bores, C., Cornudella, R. & Calvo, M.T. (2005) Discrepant factor VIII activity in a family with mild haemophilia A and 531 mutation using various FVIII assays and APTT reagents. *Haemophilia*, **11**, 561-564.
- Luddington, R. & Baglin, T. (2004) Clinical measurement of thrombin generation by calibrated automated thrombography requires contact factor inhibition. *J Thromb Haemost*, **2**, 1954-1959.
- Lyall, H., Hill, M., Westby, J., Grimley, C. & Dolan, G. (2008) Tyr346-->Cys mutation results in factor VIII:C assay discrepancy and a normal bleeding phenotype - is this mild haemophilia A? *Haemophilia*, **14**, 78-80.
- MacArthur, J.M., Bishop, J.R., Stanford, K.I., Wang, L., Bensadoun, A., Witztum, J.L. & Esko, J.D. (2007) Liver heparan sulfate proteoglycans mediate clearance of triglyceride-rich lipoproteins independently of LDL receptor family members. *J Clin Invest*, **117**, 153-164.
- Macfarlane, R.G. & Biggs, R. (1953) A thrombin generation test; the application in haemophilia and thrombocytopenia. *J Clin Pathol*, **6**, 3-8.
- Malkin, R. & Malmstrom, B.G. (1970) The state and function of copper in biological systems. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, **33**, 177-244.
- Marquette, K.A., Pittman, D.D. & Kaufman, R.J. (1995) A 110-amino acid region within the A1-domain of coagulation factor VIII inhibits secretion from mammalian cells. *J Biol Chem*, **270**, 10297-10303.
- Mazurier, C., Gaucher, C., Jorieux, S. & Parquet-Gerne, A. (1997) Mutations in the FVIII gene in seven families with mild haemophilia A. *Br J Haematol*, **96**, 426-427.
- McGinniss, M.J., Kazazian, H.H., Jr., Hoyer, L.W., Bi, L., Inaba, H. & Antonarakis, S.E. (1993) Spectrum of mutations in CRM-positive and CRM-reduced hemophilia A. *Genomics*, **15**, 392-398.
- Membre, A. (2008) Hypercoagulabilité associée aux anticorps anti-phospholipides : approches descriptives et mécanistiques. *Thèse de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1*.

- Membre, A., Trossaert, M., Max, J., Brunette, A., Kis, T., Lecompte, T. & Regnault, V. (2007a) Influence of phospholipid surface and concentration in thrombography. *J Thromb Haemost*, **5**, Abstract P-W-020.
- Membre, A., Wahl, D., Lecompte, T. & Regnault, V. (2007b) Test de génération de thrombine. La thrombinographie : Méthodologie. *Rev Franc lab*, **393**, 7.
- Meyer, D., Pietu, G., Fressinaud, E. & Girma, J.P. (1991) von Willebrand factor: structure and function. *Mayo Clin Proc*, **66**, 516-523.
- Miao, H.Z., Sirachainan, N., Palmer, L., Kucab, P., Cunningham, M.A., Kaufman, R.J. & Pipe, S.W. (2004) Bioengineering of coagulation factor VIII for improved secretion. *Blood*, **103**, 3412-3419.
- Michnick, D.A., Pittman, D.D., Wise, R.J. & Kaufman, R.J. (1994) Identification of individual tyrosine sulfation sites within factor VIII required for optimal activity and efficient thrombin cleavage. *J Biol Chem*, **269**, 20095-20102.
- Mikaelsson, M., Oswaldsson, U. & Sandberg, H. (1998) Influence of phospholipids on the assessment of factor VIII activity. *Haemophilia*, **4**, 646-650.
- Morfini, M., Mannucci, P.M., Tenconi, P.M., Longo, G., Mazzucconi, M.G., Rodeghiero, F., Ciavarella, N., De Rosa, V. & Arter, A. (1993) Pharmacokinetics of monoclonally-purified and recombinant factor VIII in patients with severe von Willebrand disease. *Thromb Haemost*, **70**, 270-272.
- Mumford, A.D., Laffan, M., O'Donnell, J., McVey, J.H., Johnson, D.J., Manning, R.A. & Kembell-Cook, G. (2002) A Tyr346-->Cys substitution in the interdomain acidic region a1 of factor VIII in an individual with factor VIII:C assay discrepancy. *Br J Haematol*, **118**, 589-594.
- Munro, S. & Pelham, H.R. (1986) An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell*, **46**, 291-300.
- Naylor, J.A., Green, P.M., Rizza, C.R. & Giannelli, F. (1992) Factor VIII gene explains all cases of haemophilia A. *Lancet*, **340**, 1066-1067.
- Naylor, J.A., Green, P.M., Rizza, C.R. & Giannelli, F. (1993) Analysis of factor VIII mRNA reveals defects in everyone of 28 haemophilia A patients. *Hum Mol Genet*, **2**, 11-17.
- Nesbitt, I., Kinks, J., Sampson, B., Kitchen, S., Peake, I., Makris, M. & Goodeve, A. (2001a) Discrepant one and two stage FVIII assays are very common in mild haemophilia A : correlation with FVIII gene mutations. *Thromb Haemost*, **84**, Abstract 195.
- Nesbitt, I.M., Sampson, B., Kitchen, S., Peake, I.R., Makris, M. & Goodeve, A.C. (2001b) Discrepant one and two stage FVIII assays are very common in mild haemophilia : a correlation with FVIII gene mutations. *Thromb Haemost*, **84**, Abstract 195.
- Noe, D.A. (1996) A mathematical model of coagulation factor VIII kinetics. *Haemostasis*, **26**, 289-303.
- Nogami, K., Shima, M., Nishiya, K., Hosokawa, K., Saenko, E.L., Giddings, J.C., Tanaka, I. & Yoshioka, A. (2002) Anticoagulant effects of a synthetic peptide containing residues Thr-2253-Gln-2270 within factor VIII C2 domain that selectively inhibits factor Xa-catalysed factor VIII activation. *Br J Haematol*, **116**, 868-874.
- O'Brien, D.P., Pattinson, J.K. & Tuddenham, E.G. (1990) Purification and characterization of factor VIII 372-Cys: a hypofunctional cofactor from a patient with moderately severe hemophilia A. *Blood*, **75**, 1664-1672.

- O'Brien, D.P. & Tuddenham, E.G. (1989) Purification and characterization of factor VIII 1,689-Cys: a nonfunctional cofactor occurring in a patient with severe hemophilia A. *Blood*, **73**, 2117-2122.
- O'Brien, L.M., Mastro, M. & Fay, P.J. (2000) Regulation of factor VIIIa by human activated protein C and protein S: inactivation of cofactor in the intrinsic factor Xase. *Blood*, **95**, 1714-1720.
- O'Brien, L.M., Medved, L.V. & Fay, P.J. (1995) Localization of factor IXa and factor VIIIa interactive sites. *J Biol Chem*, **270**, 27087-27092.
- Oefner, P.J., Bonn, G.K., Huber, C.G. & Nathakarnkitkool, S. (1992) Comparative study of capillary zone electrophoresis and high-performance liquid chromatography in the analysis of oligonucleotides and DNA. *J Chromatogr*, **625**, 331-340.
- Oldenburg, J., El-Maarri, O. & Schwaab, R. (2002) Inhibitor development in correlation to factor VIII genotypes. *Haemophilia*, **8 Suppl 2**, 23-29.
- Oldenburg, J., Ivaskevicius, V., Rost, S., Fregin, A., White, K., Holinski-Feder, E., Muller, C.R. & Weber, B.H. (2001) Evaluation of DHPLC in the analysis of hemophilia A. *J Biochem Biophys Methods*, **47**, 39-51.
- Oldenburg, J. & Pavlova, A. (2006) Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX. *Haemophilia*, **12 Suppl 6**, 15-22.
- Ortel, T.L., Takahashi, N. & Putnam, F.W. (1984) Structural model of human ceruloplasmin based on internal triplication, hydrophilic/hydrophobic character, and secondary structure of domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 4761-4765.
- Parquet-Gernez, A., Mazurier, C. & Goudemand, M. (1988) Functional and immunological assays of FVIII in 133 haemophiliacs--characterization of a subgroup of patients with mild haemophilia A and discrepancy in 1- and 2-stage assays. *Thromb Haemost*, **59**, 202-206.
- Pattinson, J.K., McVey, J.H., Boon, M., Ajani, A. & Tuddenham, E.G. (1990) CRM+ haemophilia A due to a missense mutation (372----Cys) at the internal heavy chain thrombin cleavage site. *Br J Haematol*, **75**, 73-77.
- Peake, I., Selighsohn, U., Gitel, S., Kitchen, S. & Zivelin, A. (1995) The laboratory diagnosis of haemophilia: Recommendations by the Laboratory Activities Committee of the World Federation of hemophilia. *Haemophilia*, **1**, 159-164.
- Peerlinck, K., Jacquemin, M.G., Arnout, J., Hoylaerts, M.F., Gilles, J.G., Lavend'homme, R., Johnson, K.M., Freson, K., Scandella, D., Saint-Remy, J.M. & Vermynen, J. (1999) Antifactor VIII antibody inhibiting allogeneic but not autologous factor VIII in patients with mild hemophilia A. *Blood*, **93**, 2267-2273.
- Pemberton, S., Lindley, P., Zaitsev, V., Card, G., Tuddenham, E.G. & Kemball-Cook, G. (1997) A molecular model for the triplicated A domains of human factor VIII based on the crystal structure of human ceruloplasmin. *Blood*, **89**, 2413-2421.
- Pipe, S.W., Eickhorst, A.N., McKinley, S.H., Saenko, E.L. & Kaufman, R.J. (1999) Mild hemophilia A caused by increased rate of factor VIII A2 subunit dissociation: evidence for nonproteolytic inactivation of factor VIIIa in vivo. *Blood*, **93**, 176-183.
- Pipe, S.W., Saenko, E.L., Eickhorst, A.N., Kemball-Cook, G. & Kaufman, R.J. (2001) Hemophilia A mutations associated with 1-stage/2-stage activity discrepancy disrupt protein-protein interactions within the triplicated A domains of thrombin-activated factor VIIIa. *Blood*, **97**, 685-691.

- Pitney, W.R. & Dacie, J.V. (1953) A simple method of studying the generation of thrombin in recalcified plasma; application in the investigation of haemophilia. *J Clin Pathol*, **6**, 9-14.
- Pittman, D.D., Wang, J.H. & Kaufman, R.J. (1992) Identification and functional importance of tyrosine sulfate residues within recombinant factor VIII. *Biochemistry*, **31**, 3315-3325.
- Pudlak, P. & E, D. (1966) Quantitative assay of factor VIII (antihaemophilic globulin) using the thrombin generation test. *Br J Haematol*, **12**, 409-418.
- Regnault, V., Beguin, S. & Lecompte, T. (2003) Calibrated automated thrombin generation in frozen-thawed platelet-rich plasma to detect hypercoagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb*, **33**, 23-29.
- Rodgers, S.E., Duncan, E.M., Barbulescu, D.M., Quinn, D.M. & Lloyd, J.V. (2007) In vitro kinetics of factor VIII activity in patients with mild haemophilia A and a discrepancy between one-stage and two-stage factor VIII assay results. *Br J Haematol*, **136**, 138-145.
- Rodgers, S.E., Duncan, E.M., Sobieraj-Teague, M. & Lloyd, J.V. (2008) Evaluation of three automated chromogenic FVIII kits for the diagnosis of mild discrepant haemophilia A. *Int J Lab Hematol*.
- Roelse, J., Mertens, K., van Mourik, J., Oldenburg, J. & Voorberg, J. (1999) Altered sensitivity towards factor IXa explains assays discrepancy in plasma of haemophilia A patients with GLU720LYS substitution in factor VIII. *Thromb Haemost*, **82**, Abstract 5.
- Rosen, S. (1984) Assay of factor VIII:C with a chromogenic substrate. *Scand J Haematol Suppl*, **40**, 139-145.
- Rosen, S., Andersson, M., Blomback, M., Hagglund, U., Larrieu, M.J., Wolf, M., Boyer, C., Rothschild, C., Nilsson, I.M., Sjorin, E. & et al. (1985) Clinical application of a chromogenic substrate method for determination of factor VIII activity. *Thromb Haemost*, **54**, 818-823.
- Rudzki, Z., Duncan, E.M., Casey, G.J., Neumann, M., Favaloro, E.J. & Lloyd, J.V. (1996) Mutations in a subgroup of patients with mild haemophilia A and a familial discrepancy between the one-stage and two-stage factor VIII:C methods. *Br J Haematol*, **94**, 400-406.
- Rugeri, L., Beguin, S., Hemker, C., Bordet, J.C., Fleury, R., Chatard, B., Negrier, C. & Dargaud, Y. (2007) Thrombin-generating capacity in patients with von Willebrand's disease. *Haematologica*, **92**, 1639-1646.
- Ruggeri, Z.M. (1999) Structure and function of von Willebrand factor. *Thromb Haemost*, **82**, 576-584.
- Ryden, L.G. & Hunt, L.T. (1993) Evolution of protein complexity: the blue copper-containing oxidases and related proteins. *J Mol Evol*, **36**, 41-66.
- Saenko, E.L., Ananyeva, N.M., Tuddenham, E.G. & Kemball-Cook, G. (2002) Factor VIII - novel insights into form and function. *Br J Haematol*, **119**, 323-331.
- Saenko, E.L. & Scandella, D. (1997) The acidic region of the factor VIII light chain and the C2 domain together form the high affinity binding site for von willebrand factor. *J Biol Chem*, **272**, 18007-18014.
- Saenko, E.L., Shima, M. & Sarafanov, A.G. (1999a) Role of activation of the coagulation factor VIII in interaction with vWf, phospholipid, and functioning within the factor Xase complex. *Trends Cardiovasc Med*, **9**, 185-192.

- Saenko, E.L., Yakhyaev, A.V., Mikhailenko, I., Strickland, D.K. & Sarafanov, A.G. (1999b) Role of the low density lipoprotein-related protein receptor in mediation of factor VIII catabolism. *J Biol Chem*, **274**, 37685-37692.
- Sarafanov, A.G., Ananyeva, N.M., Shima, M. & Saenko, E.L. (2001) Cell surface heparan sulfate proteoglycans participate in factor VIII catabolism mediated by low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem*, **276**, 11970-11979.
- Sarafanov, A.G., Makogonenko, E.M., Pechik, I.V., Radtke, K.P., Khrenov, A.V., Ananyeva, N.M., Strickland, D.K. & Saenko, E.L. (2006) Identification of coagulation factor VIII A2 domain residues forming the binding epitope for low-density lipoprotein receptor-related protein. *Biochemistry*, **45**, 1829-1840.
- Schwaab, R., Oldenburg, J., Kemball-Cook, G., Albert, T., Juhler, C., Hanfland, P. & Ingerslev, J. (2000) Assay discrepancy in mild haemophilia A due to a factor VIII missense mutation (Asn694Ile) in a large Danish family. *Br J Haematol*, **109**, 523-528.
- Schwaab, R., Oldenburg, J., Schwaab, U., Johnson, D.J., Schmidt, W., Olek, K., Brackman, H.H. & Tuddenham, E.G. (1995) Characterization of mutations within the factor VIII gene of 73 unrelated mild and moderate haemophiliacs. *Br J Haematol*, **91**, 458-464.
- Seghatchian, M.J. & Miller-Andersson, M. (1978) A colorimetric evaluation of factor VIII: C potency. *Med Lab Sci*, **35**, 347-354.
- Shen, B.W., Spiegel, P.C., Chang, C.H., Huh, J.W., Lee, J.S., Kim, J., Kim, Y.H. & Stoddard, B.L. (2008) The tertiary structure and domain organization of coagulation factor VIII. *Blood*, **111**, 1240-1247.
- Siegemund, T., Petros, S., Siegemund, A., Scholz, U. & Engelmann, L. (2003) Thrombin generation in severe haemophilia A and B: the endogenous thrombin potential in platelet-rich plasma. *Thromb Haemost*, **90**, 781-786.
- Smeets, E.F., Comfurius, P., Bevers, E.M. & Zwaal, R.F. (1996) Contribution of different phospholipid classes to the prothrombin converting capacity of sonicated lipid vesicles. *Thromb Res*, **81**, 419-426.
- Stoilova-McPhie, S., Villoutreix, B.O., Mertens, K., Kemball-Cook, G. & Holzenburg, A. (2002) 3-Dimensional structure of membrane-bound coagulation factor VIII: modeling of the factor VIII heterodimer within a 3-dimensional density map derived by electron crystallography. *Blood*, **99**, 1215-1223.
- Stoylova, S.S., Lenting, P.J., Kemball-Cook, G. & Holzenburg, A. (1999) Electron crystallography of human blood coagulation factor VIII bound to phospholipid monolayers. *J Biol Chem*, **274**, 36573-36578.
- Stubbs, J.D., Lekutis, C., Singer, K.L., Bui, A., Yuzuki, D., Srinivasan, U. & Parry, G. (1990) cDNA cloning of a mouse mammary epithelial cell surface protein reveals the existence of epidermal growth factor-like domains linked to factor VIII-like sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 8417-8421.
- Sultan, Y. (2002) L'hémophilie A et B. *Encyclopédie Orphanet* - <http://www.orphanet.net/data/FR/fr-hemophilie.pdf>.
- Tagliavacca, L., Moon, N., Dunham, W.R. & Kaufman, R.J. (1997) Identification and functional requirement of Cu (I) and its ligands within coagulation factor VIII. *J Biol Chem*, **272**, 27428-27434.

- Toole, J.J., Knopf, J.L., Wozney, J.M., Sultzman, L.A., Buecker, J.L., Pittman, D.D., Kaufman, R.J., Brown, E., Showemaker, C., Orr, E.C. & et al. (1992) Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. 1984. *Biotechnology*, **24**, 310-315.
- van den Berg, H.M., De Groot, P.H. & Fischer, K. (2007) Phenotypic heterogeneity in severe hemophilia. *J Thromb Haemost*, **5 Suppl 1**, 151-156.
- van Dieijen, G., Tans, G., Rosing, J. & Hemker, H.C. (1981) The role of phospholipid and factor VIIIa in the activation of bovine factor X. *J Biol Chem*, **256**, 3433-3442.
- Varadi, K., Negrier, C., Berntorp, E., Astermark, J., Bordet, J.C., Morfini, M., Linari, S., Schwarz, H.P. & Turecek, P.L. (2003) Monitoring the bioavailability of FEIBA with a thrombin generation assay. *J Thromb Haemost*, **1**, 2374-2380.
- Vehar, G.A., Keyt, B., Eaton, D., Rodriguez, H., O'Brien, D.P., Rotblat, F., Oppermann, H., Keck, R., Wood, W.I., Harkins, R.N. & et al. (1984) Structure of human factor VIII. *Nature*, **312**, 337-342.
- Vencesla, A., Corral-Rodriguez, M.A., Baena, M., Cornet, M., Domenech, M., Baiget, M., Fuentes-Prior, P. & Tizzano, E.F. (2008) Identification of 31 novel mutations in the F8 gene in Spanish hemophilia A patients: structural analysis of 20 missense mutations suggests new intermolecular binding sites. *Blood*, **111**, 3468-3478.
- Vinciguerra, C., Durand, B. & Rugeri, L. (2007) Déficit combiné en facteurs V et VIII de la coagulation : ou quand la génétique nous explique les déficits combinés en facteurs de la coagulation. *J. Immbio.*, <http://france.elsevier.com/direct/IMMBIO>.
- Vlot, A.J., Koppelman, S.J., van den Berg, M.H., Bouma, B.N. & Sixma, J.J. (1995) The affinity and stoichiometry of binding of human factor VIII to von Willebrand factor. *Blood*, **85**, 3150-3157.
- Vormittag, R., Bencur, P., Ay, C., Tengler, T., Vukovich, T., Quehenberger, P., Mannhalter, C. & Pabinger, I. (2007) Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 polymorphism 663 C > T affects clotting factor VIII activity and increases the risk of venous thromboembolism. *J Thromb Haemost*, **5**, 497-502.
- Wehnert, M., Herrmann, F.H. & Wulff, K. (1989) Partial deletions of factor VIII gene as molecular diagnostic markers in haemophilia A. *Dis Markers*, **7**, 113-117.
- White, G.C., 2nd, Rosendaal, F., Aledort, L.M., Lusher, J.M., Rothschild, C. & Ingerslev, J. (2001) 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*, **85**, 560.
- Wion, K.L., Kelly, D., Summerfield, J.A., Tuddenham, E.G. & Lawn, R.M. (1985) Distribution of factor VIII mRNA and antigen in human liver and other tissues. *Nature*, **317**, 726-729.
- Youssoufian, H., Antonarakis, S.E., Aronis, S., Tsiftis, G., Phillips, D.G. & Kazazian, H.H., Jr. (1987) Characterization of five partial deletions of the factor VIII gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 3772-3776.
- Zelechowska, M.G., van Mourik, J.A. & Brodniewicz-Proba, T. (1985) Ultrastructural localization of factor VIII procoagulant antigen in human liver hepatocytes. *Nature*, **317**, 729-730.
- Zhang, B., Cunningham, M.A., Nichols, W.C., Bernat, J.A., Seligsohn, U., Pipe, S.W., McVey, J.H., Schulte-Overberg, U., de Bosch, N.B., Ruiz-Saez, A., White, G.C., Tuddenham, E.G.,

Kaufman, R.J. & Ginsburg, D. (2003) Bleeding due to disruption of a cargo-specific ER-to-Golgi transport complex. *Nat Genet*, **34**, 220-225.

- Zhang, B. & Ginsburg, D. (2004) Familial multiple coagulation factor deficiencies: new biologic insight from rare genetic bleeding disorders. *J Thromb Haemost*, **2**, 1564-1572.
- Zhang, B., McGee, B., Yamaoka, J.S., Guglielmone, H., Downes, K.A., Minoldo, S., Jarchum, G., Peyvandi, F., de Bosch, N.B., Ruiz-Saez, A., Chatelain, B., Olpinski, M., Bockenstedt, P., Sperl, W., Kaufman, R.J., Nichols, W.C., Tuddenham, E.G. & Ginsburg, D. (2006) Combined deficiency of factor V and factor VIII is due to mutations in either LMAN1 or MCFD2. *Blood*, **107**, 1903-1907.

E. ANNEXES

|

ANNEXE 1

ANALYSE MOLECULAIRE (1)

AMPLIFICATION PCR

- Prélèvement : 2 à 5 ml de sang prélevé sur tube EDTA (consentement éclairé signé par le patient et attestation de consultation du médecin indispensables).
- Extraction de l'ADN grâce au coffret Nucleon Bacc2 (Amersham).
- Amplification PCR sur Thermocycleur type 9700 (Applied Biosystems) en utilisation les amorces proposées par David et al (David, *et al* 1994) et le tampon Pharmacia pour amplifier les performance de la PCR et obtenir une bonne visualisation des pics sur DHPLC. Certaines amorces ont été modifiées pour obtenir une meilleure amplification et éliminer les bandes aspécifiques. La nature des amorces est détaillée dans le tableau.

94° pendant 3 min

94° pendant 30 s	}	x 30 cycles
55° pendant 30 s		
72° pendant 30 s		

72° pendant 10 min

Avant DHPLC, la qualité de l'amplicon est contrôlée par migration sur gel Polyacrylamide ou Easy-to-run[®].

Liste des amorces utilisées pour la réalisation des PCR des 26 exons du gène du FVIII :

EXON	Primer F	Primer R
1	AAT CCT ATC GGT TAC TGC TTA	AGC ATC ACA ACC ATC CTA AC
2	TGG AAG CAT TAC TTC CAG CT	AAC TGC AAC CTC AAG ATT GG
3	TGC TTC TCC ACT GTG ACC T	ATC TAG TAA ATG TTA AGA AAT ACA
4	GTA CAG TGG ATA TAG AAA GGA C	GAT TCA GTT GTT TGT ACT TCT C
5	CTT ACT GTC AAG TAA CTG ATG	CTT CAT TCC TGA ACA GTA ATG
6	TCC CAC TTA TTG TCA TGG AC	TAC AGA ACT CTG GTG CTG AA
7	GGC AAG AGC TGT TGG TTT G	TGT CCA GTA AAT TTT ATT AAA AGT
8	CCA TAT AGC CTG CAG AAC AT	CTG ATG CTC AGC TAT GTT AG
9	CTA ACA TAG CTG AGC ATC AG	AGA TAT GTC CAT TGG AGA CAA
10	CTA GCC TCA AAT TAC TAT AAT G	ACT TTA GAC TGG AGC TTG AG
11	TGC GAC TTT AGC TTC CAC TT	ACT GAC CTA TAT TGC AAA CCA
12	TGC CAT CGC TTT CAT CAT AG	CAT CAT TAT CTG GAC ATC AC
13	AAC AAT CTA CTT TTT TGG AAG A	CCT CAA GCA AGA GAA TGC TA
14a	ATT TAA CCC AAT GAC CTG TG	GAG TAG GA CTC TGT CGC AAG
14b	AGA GAA GAC TGA CCC TTG GT	TTT TTG CCA AAT AGA GTG GT
14c	TCC ATC AGA CAA TTT GGC AG	TCC ATA AGC ATT CTG TCA TGA
14d	GAA TAG TCC ATC AGT CTG GC	AAA TAG GTT TCT GCT GCT TG
14e	TGG TAG TAG GAA AGG GTG AA	CTG CTG GCT GTA TTA GGA G
14f	GAG GAA GAA AA CTT GGA AGG	CTG CTG GAA GAT GAG AAG AG
14g	TCC CTT ATC AGA TTG CCT TA	AGG AGA CCC ATT GCT AGT TT
14h	AAG TTG AAT TGC TTC CAA AA	TGA CTT CTA TTT CGG GCT TA
14i	GAT ACC ATT TTG TCC CT GAA	TGG TGT CAT CAT CTG GTA AA
15	AGA TGA AGT GGT TAA CTA TGC	GTG GGA ATA CAT TAT AGT CAG
16	AGC ATC CAT CTT CTG TAC CA	TCA GTA GAT TCC AGA ATG ACA
17	TGT CAT TCT GGA ATC TAC TGA	CAC TCC CAG AGA TAT ACT CT
18	AGA GTA TAT CTG TGG GAG TG	CTT AAG AGC ATG GAG CTT GT
19	GCA AGC ACT TTG CAT TTG AG	AGC AAC CAT TCC AGA AAG GA
20	ACG TTG AGT ACA GTT CTT GG	ACT AAT AGA AGC ATG GAG ATG
21	GAA TTT AAT CTC TGA TTT CTC TA	GAG TGA ATG TGA TAC ATT TCC
22	AAA TAG GTT AAA ATA AAG TGT TAT	TAA ATG ACT AAT TAC ATA CCA TTA A
23	GTC TTA TGT AGA TGT TGG ATG	AGT CTC AGG ATA ACT AGA ACA
24	GCT CAG TAT AAC TGA GGC TG	CTC TGA GTC AGT TAA ACA GT
25	AGT GCT GTG GTA TGG TTA AG	TTG CTC TGA AAA TTT GGT CAT A
26	GGT TTA ATC CTG GAC TAC TG	GTG TCT GCT AGG ATT TAG CA

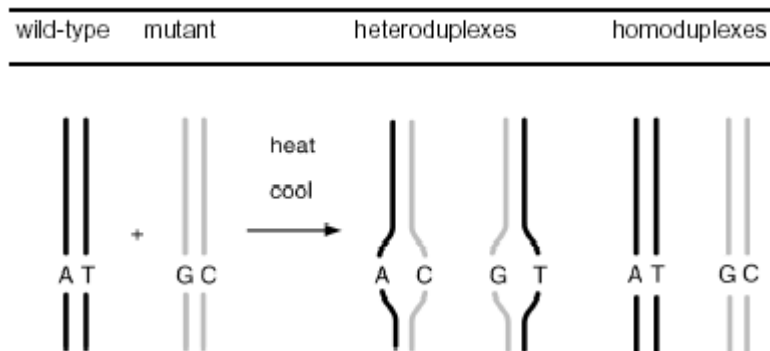
ANNEXE 1

ANALYSE MOLECULAIRE (2)

DHPLC

PRINCIPE :

Technique permettant la détection d'hétéroduplexes. Les hétéroduplexes correspondent à l'appariement d'un brin muté et d'un brin normal. (*Figure 1*)



Les différents fragments seront séparés en fonction :

1/ de leur taille

Plus le fragment est grand plus il est retenu sur la colonne

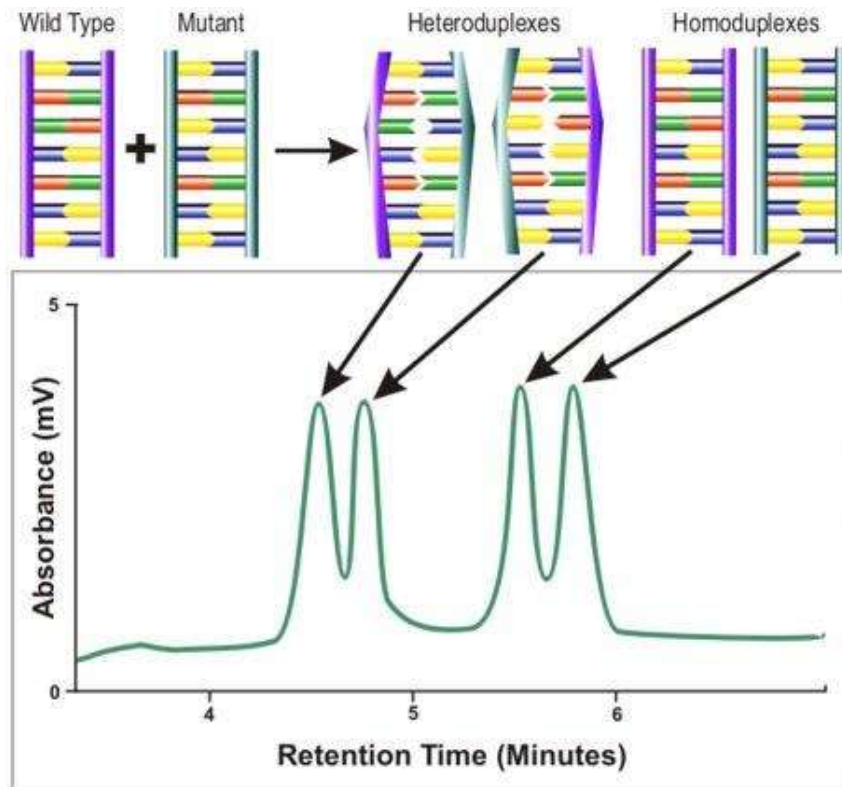
2/ du degré de dénaturation

A une température déterminée (variant selon la modélisation du système) les homoduplexes seront, de façon prédominante sous forme double-brins.

Les acides nucléiques vont se fixer sur une matrice par l'intermédiaire d'un agent de liaison : le Tris Ethyl Amonium Acetate (TEAA). Cet agent de liaison est chargé positivement et s'associe à la charge négative de l'ADN. Son affinité est plus importante avec l'ADN double brin. La fixation des homoduplexes sera donc plus efficace que celle des hétéroduplexes et seront donc mieux retenus sur la colonne.

3/ du degré d'acétonitrile (ACN)

Le flux permanent d'une combinaison de tampon A et B au travers de la colonne, permet l'élution de l'ADN grâce à l'augmentation de la concentration de l'ACN au cours du temps. Le rôle de l'ACN consiste à fragiliser les interactions hydrophobes entre la matrice et le couple TEAA/ADN et permet donc l'élution de l'ADN. Les hétéroduplexes seront donc élués en premier. Tous les produits de l'élution seront analysés par détecteur UV.



Etant donné qu'il s'agit de l'étude d'un gène du chromosome X chez des hommes, l'obtention d'hétéroduplex nécessite un mélange d'amplicon issus de l'ADN du patient et d'un témoin dont la séquence normale du gène du FVIII a été préalablement vérifiée (20 µl Patient + 20 µl Témoin).

Les hétéroduplexes sont générés de manière contrôlée par l'intermédiaire d'un Thermocycleur type 9700 :

- ➔ Dénaturation des ADN à 95 ° C durant 5 minutes,
 - ➔ Puis renaturation lente par diminution progressive de la température jusqu'à 25°C.
- La renaturation lente favorisant l'appariement des hétéroduplexes.

L'analyse est effectuée sur automate Wave 3500HT associé au logiciel Navigator® (Transgenomics corp., San Jose, Etats-Unis),

Pur un patient donné, la visualisation d'hétéroduplex signe une variation de séquence de l'exon donné, qui nécessite un séquençage pour identifier la mutation pathogène ou le polymorphisme.

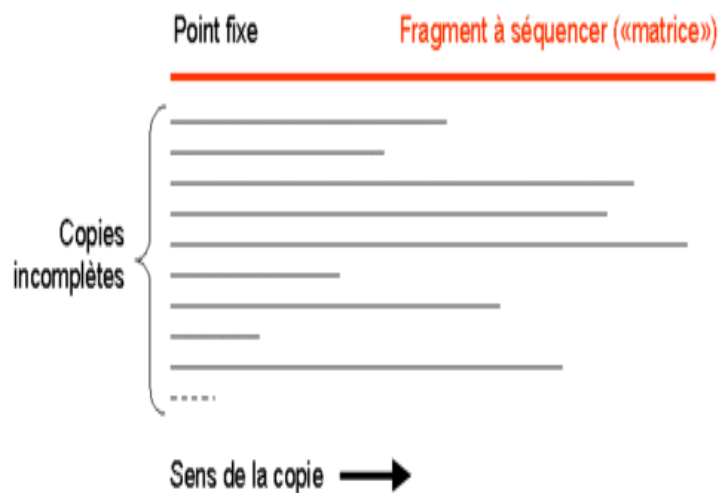
ANNEXE 1
ANALYSE MOLECULAIRE (3)
I. PREPARATION DES REACTIONS DE SEQUENCES

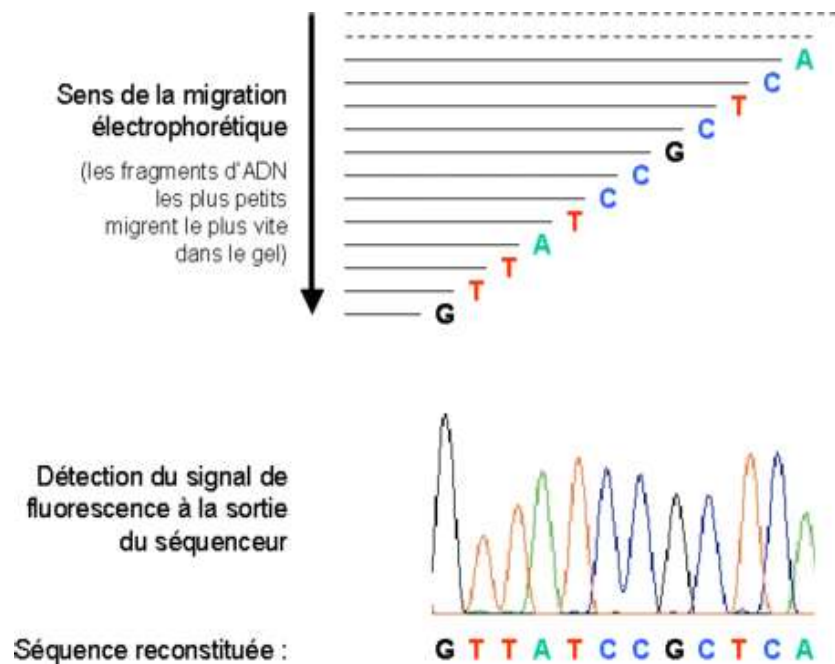
PRINCIPE :

Le séquençage d'un ADN correspond à la détermination de la succession des nucléotides le composant.

Le principe du séquençage est de réaliser, à partir d'un point fixe (amorce), des copies incomplètes de la molécule d'ADN (la "matrice"), interrompues au hasard. L'interruption est provoquée par l'incorporation aléatoire, lors de la copie, d'un analogue de nucléotide (ddNTP) qui bloque la réaction. Comme on travaille sur un très grand nombre de molécules de matrice, on obtient toutes les copies partielles possibles à partir de l'amorce utilisée.

On sépare ensuite ces divers fragments selon leur taille en les faisant migrer dans un gel sous l'action d'un champ électrique. Ceci permet de séparer deux copies incomplètes consécutives qui ont une différence de taille d'un seul nucléotide. Si l'on peut identifier le nucléotide au niveau duquel la copie s'est interrompue (nucléotide terminal marqué par un groupement fluorescent différent selon la base) pour chacune des copies





1 Matériel :

- Centrifugeuse *JOUAN C 3.12*,
- Thermocycleur 9700 / 9800 *APPLIED BIOSYSTEMS*
- Tapis de protection pour microplaque *APPLIED BIOSYSTEMS*

2 Consommables :

- Micro Amp Caps
- Microplaque thermal cycling pour 9800
- Fast reaction tubes ou plaques 96 puits PCR classique ou tube 0,2ml classique *APPLIED BIOSYSTEMS*

3 Réactifs :

- Amorces 1.6 pmol/L
- Eau stérile en ampoule
- Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, *APPLIED BIOSYSTEMS*
- Tampon 5X sequencing buffer
- Plasmide pGEM3Z

Préparation des réactions de séquence :

Préparer des dilutions des amorces de séquence à **1,6 µM**

Mélanger selon le tableau suivant par réaction de séquence :

Réactifs	Volumes (mL) pour 1 réaction	Volumes (mL) pour le témoin*
Big Dye Terminator, version 1	1	1
Tampon Big Dye Terminator (5X)	2	2
amorce (1,6 pmoles/mL)	1	1
	1 à 6	
produit PCR	(selon la concentration)	1
H ₂ O	QSP 10	5

* témoin : plasmide pGEM3Z séquencé avec l'amorce standard -21M13.

Réaction de Séquençage sur PTC 200 / 9700 / 9800* :

96°C – 1 min

96°C - 10 sec
50°C - 5 sec
60°C - 1 min 15 } x 25 cycles

4°C for ever

ANNEXE 1
ANALYSE MOLECULAIRE (5)
PURIFICATION DES REACTIONS DE SEQUENCE
PAR FILTRATION SUR G50

PRINCIPE :

Cette étape a pour but de purifier par gel filtration des produits de réaction de séquences. La résine Sephadex G50 utilisée permet de dessaler les échantillons et d'éliminer les dNTP et ddNTP fluorescents non incorporés et les amorces de PCR en excès. La limite d'exclusion de la résine G 50 est d'environ 20 bases. La plaque 96 puits Multiscreen est utilisée comme support inerte de la résine G50.

1 Matériel :

- Centrifugeuse *JOUAN C 3.12*

2 Consommables :

- Microplaque à membrane filtrante (Multiscreen de *MILLIPORE*),
- Microplaque "réceptacle" fond conique
- Thermo Fast 96 Detection Plate *ABGENE*

3 Réactifs :

- Sephadex G-50 superfine, *Amersham Pharmacia*
- Formamide déionisée

Préparation d'une solution stock de gel Séphadex G50 :

- Dissoudre dans une éprouvette de 1 litre, **50g** de gel dans **1 litre** d'eau déionisée et bien homogénéiser.
- Laisser hydrater 12 heures minimum à température ambiante sans agiter
- Aspirer le surnageant, rajouter de l'eau QSP 1 litre et laisser décanter 3 / 4 heures.
- Recommencer la dernière étape deux fois et laisser en final **1cm** de surnageant.
- Aliquoter en tubes de 50 ml et stocker à + 4°C.

Purification des réactions de séquence sur microplaque :

Utilisation d'une solution stock de G50 : Bien homogénéiser le gel G-50 et aliquoter 300 µl dans les puits de la microplaque à fond filtrant. Ajuster la microplaque « multiscreen » sur une microplaque normale réceptacle « poubelle ». Equilibrer l'ensemble avec un montage équivalent surmonté quant à lui d'un couvercle.

Centrifuger 3 minutes à 2000 rpm sur la Centrifugeuse *JOUAN C 3.12*. Bien homogénéiser le gel G-50 et aliquoter de nouveau 300 µl dans les puits, équilibrer l'ensemble. Centrifuger 3 minutes à 2000 rpm sur *JOUAN C 3.12*.

Ajouter 10µl de formamide dans les puits d'une microplaque propre destinée à recevoir les réactions de séquence. Changer la microplaque inférieure « poubelle » et la remplacer par la microplaque contenant le formamide.

Centrifuger à nouveau 3 minutes à 2000 rpm avec les couvercles. Injection sur 3100 ou stockage à 4°C à l'abri de la lumière.

ANNEXE 1

ANALYSE MOLECULAIRE (6)

PROTOCOLE D'INJECTIONS DES SEQUENCES

SUR SEQUENCEUR 3100

PRINCIPE :

Le séquenceur ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, Etats-Unis) est un système d'électrophorèse de type polyacrylamide à 16 capillaires, fonctionnant en parallèle.

Les fragments d'ADN néosynthétisés sont séparés sur gel d'acrylamide, et après séparation électrophorétique, un laser vient exciter le fluorochrome ce qui permet d'identifier la base correspondante.

Un tracé est finalement obtenu après analyse de l'ensemble des fragments générés.

1 Matériel :

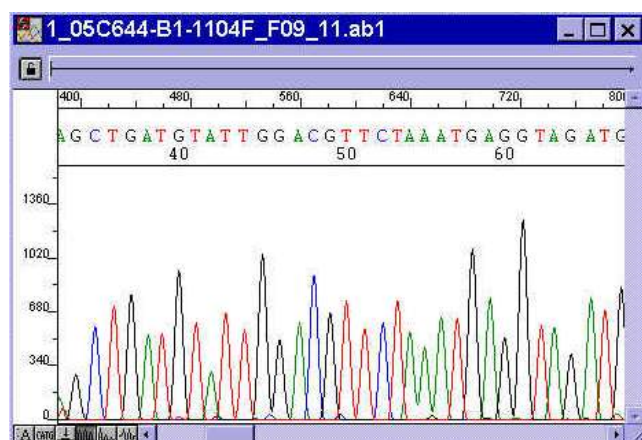
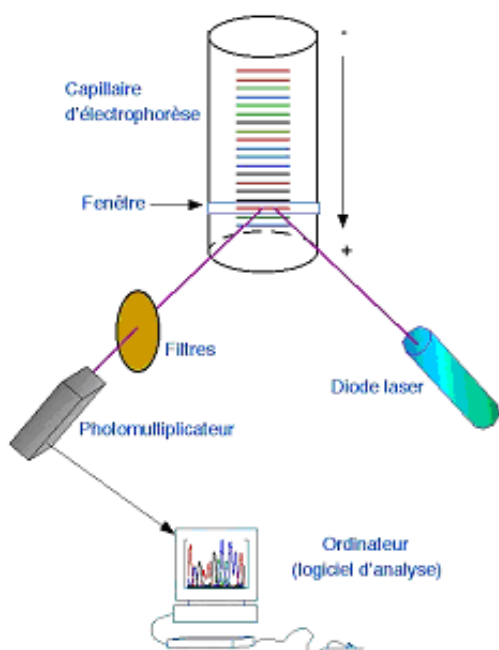
- Septa pour microplaque *APPLIED BIOSYSTEMS*
- Support d'adaptation pour le 3100 séquenceur
- 3100 Séquenceur, *APPLIED BIOSYSTEMS*

2 Consommables :

- microplaque "réceptacle" fond conique
Thermo Fast 96 Detection Plate ABGENE
- *Biotech* Polymère Pop 6, *Applied Biosystems*
Formamide déionisée

3 Réactifs :

- *Biotech* Polymère Pop 6, *Applied Biosystems*
- Formamide déionisée



Analyse informatique
sur séquenceur ABI 310

ANNEXE 2

Liste des 51 mutations identifiées :

36 chez des hémophiles atténués, 15 chez des hémophiles modérés.
29 nouvelles mutations (identifiées par « N »)

Sévérité	Exon	Domaine	Mutation	Nouvelle ?
Modérée	4	A1	p.Pro146Met	N
Atténuée	4	A1	p.Pro151Ser	N
Atténuée	5	A1	p.Val201Leu	N
Atténuée	7	A1	p.Pro264Leu	N
Atténuée	7	A1	p.His281Asn	N
Atténuée	7	A1	p.Gln305Pro	N
Atténuée	8	a1	p.Iso369Thr	N
Modérée	9	A2	p.Phe436Leu	N
Atténuée	9	A2	p.Val457Phe	N
Atténuée	10	A2	p.Pro472Leu	N
Atténuée	11	A2	p.Arg527Trp	
Atténuée	11	A2	p.Leu529Val	N
Atténuée	11	A2	p.Arg531His	
Modérée	11	A2	p.Asp542Glu	N
Atténuée	12	A2	pGln592del	N
Atténuée	12	A2	p.Arg593Cys	
Atténuée	13	A2	p.Leu625Ser	N
Atténuée	13	A2	p.Glu676Gly	N
Atténuée	13	A2	p.Met682Val	N
Modérée	14	A2	p.Cys692Phe	
Atténuée	14	A2	p.Ala704Thr	
Atténuée	14	a2	p.Glu720Lys	
Atténuée	14	a3	p.Arg1689Cys	
Atténuée	14	A3	p.Arg1696Pro	N

Atténuée	15	A3	p.Arg1749His	
Atténuée	16	A3	p.Phe1785Leu	N
Modérée	17	A3	p.Glu1875Gly	
Atténuée	18	A3	p.His1961Arg	N
Atténuée	19	A3	p.Ser2011Asn	
Atténuée	19	A3	p.Val2016Ala	
Modérée	20	C1	p.Cys2021Tyr	
Modérée	21	C1	p.Trp2070Cys	N
Atténuée	21	C1	p.Ile2071Leu	N
Atténuée	22	C1	p.Thr2086Ile	N
Atténuée	22	C1	p.Tyr2105Cys	
Modérée	23	C1	p.Phe2127Ser	N
Atténuée	23	C1	p.Asn2129Ser	
Atténuée	23	C1	p.Asp2131Asn	N
Modérée	23	C1	p.Arg2150His	
Atténuée	23	C1	p.His2152Arg	N
Atténuée	23	C1	p.Arg2159Cys	
Atténuée	23	C1	p.Arg2159His	
Modérée	23	C1	p.Arg2163His	
Modérée	23	C2	p.Ala2184Pro	N
Atténuée	24	C2	p.Gln2189Glu	
Modérée	24	C2	p.Arg2209Gln	
Modérée	25	C2	p.Trp2229Cys	
Modérée	24	C2	p.Gln2246His	N
Modérée	25	C2	p.Gln2246Lys	N
Atténuée	26	C2	p.Thr2291Ile	N
Atténuée	26	C2	p.Pro2300Leu	

Etude phénotypique et génotypique de patients hémophiles A modérés ou atténués avec anomalie qualitative : rapports structure / fonction du facteur VIII

RESUME :

Nous avons évalué l'activité du facteur VIII de la coagulation (FVIII:C) en utilisant 2 techniques différentes (méthode chronométrique en 1 temps et méthode chromogénique) chez 307 patients hémophiles A modérés/atténués issus de 173 familles. Il existe une discordance entre les 2 méthodes chez 36 patients appartenant à 17 (10%) familles. Dans 14 de ces familles où l'anomalie moléculaire a pu être recherchée, une mutation a été mise en évidence : 5 nouvelles mutations du gène du FVIII sont identifiées : p.Pro264Leu, p.His281Asn, p.Ile369Thr, p.Phe1785Leu et p.Phe2127Ser. Nous rapportons également les résultats de l'analyse génétique de 130 autres familles : 29 nouvelles mutations sont décrites en étudiant les conséquences moléculaires de ces substitutions d'acides aminés grâce à une modélisation 3D de la protéine du FVIII. Dans 2 familles (X et Y) avec des résultats de FVIII:C discordants selon la technique, nous étudions l'intérêt de la thrombinographie (TG) pour évaluer le risque hémorragique. Soixante et un patients hémophiles sans discordance dans les résultats de FVIII:C et 15 sujets normaux servirent de contrôles. La famille X ne présentait aucun antécédent hémorragique contrairement à la famille Y. Pour les membres de la famille X, les résultats étaient normaux ; ceux de la famille Y se sont comparables à ceux des patients hémophiles A sans discordance biologique. Ces résultats suggèrent que la TG peut avoir une pertinence clinique chez les patients hémophiles modérés/atténués, particulièrement en cas de discordance des taux de FVIII:C en fonction de la méthode.

MOTS-CLÉS :

Hémophilie A modérée/atténuée ; Facteur VIII ; Dosages chronométrique et chromogénique du FVIII:C ; Thrombinographie ; Mutations.

Phenotypic and genotypic profiles of patients with qualitative moderate/mild hemophilia A Structure/Function interactions of coagulation factor VIII

SUMMARY:

We measured factor VIII activity (FVIII:C) using 2 methods (one-stage chromometric and chromogenic assays) in 307 patients with moderate/mild hemophilia belonging to 173 families. Thirty-six patients from 17 (10%) families exhibited discrepancy between the two assays. Five novel FVIII mutations associated with discrepancy were described: p.Pro264Leu, p.His281Asn, p.Ile369Thr, p.Phe1785Leu and p.Phe2127Ser. Furthermore, we report on the spectrum of mutations in 130 other families with moderate/mild hemophilia A. Twenty-eight novel missense mutations and one single-residue deletion are described. We studied their putative involvement at known FVIII functional sites, their conservation status with cross-species FVIII proteins, and their spatial position within the FVIII 3D conformation. In 2 of these families (X and Y) with discrepant FVIII:C results, we examined whether thrombography (TG) could provide a better evaluation of the haemostatic status of these patients. Sixty-one moderate/mild haemophiliacs without discrepancy and 15 healthy subjects served as controls. Family X had no serious bleedings by contrast to family Y. For members of family X, the TG parameters were normal whereas for those of family Y they were diminished, similar to results of moderate/mild haemophiliacs without discrepancy. These results suggest that the haemostatic phenotype assessed by TG may be clinically relevant in moderate/mild hemophilic patients with discrepant FVIII:C results.

KEY WORDS:

Moderate/mild haemophilia A; Coagulation Factor VIII; Chromogenic and chromometric Factor VIII:C assays; Thrombography; Gene mutations.

Dr Marc TROSSAËRT

Centre de Traitement de l'Hémophilie, 30 Boulevard Jean Monnet 44093 NANTES Cedex 1