

**ACADÉMIE D'ORLÉANS-TOURS**

**UNIVERSITÉ DE TOURS**

**FACULTE DE PHARMACIE « Philippe-Maupas »**

Année 2020-2021

N° 01

**MÉMOIRE DE DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES**

**Spécialité Biologie médicale  
TENANT LIEU DE THÈSE D'EXERCICE**

**pour le**

**DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Par**

**WAHL Clémentine**

**PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 21 JANVIER 2021**

**OPTIMISATION DU DOSAGE DE L'ACTIVITE DU FACTEUR VIII (FVIII:C)  
POUR PROPOSER UNE NOUVELLE DEFINITION DE L'HEMOPHILIE A SEVERE**

**JURY**

**Président :**

Madame le Professeur POUPLARD Claire – PUPH (CHRU de Tours)

**Membres :**

Madame le Professeur BENE Marie-Christine – PUPH (CHU de Nantes)

Monsieur le Docteur TROSSAERT Marc – PH (CHU de Nantes)

Madame le Docteur BOISSIER Elodie – PH (CHU de Nantes)

Monsieur le Docteur DRILLAUD Nicolas – AHU (CHU de Nantes)

**ANNEE : 2020 - 2021**

**Directrice : Pr Véronique MAUPOIL**

**Directeur Adjoint : M. Hervé MARCHAIS**

**Assesseurs : Pr Daniel ANTIER, M. Matthieu JUSTE, Pr Karine MAHEO, Mme Audrey OUDIN**

## **ENSEIGNANTS**

### **16 PROFESSEURS**

ALLOUCHI	Hassan	CHIMIE PHYSIQUE
ANTIER	Daniel	PHARMACIE CLINIQUE
BRAND	Denys	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
CHEVALIER	Stéphane	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
CHOURPA	Igor	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
CLASTRE	Marc	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
DIMIER-POISSON	Isabelle	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
EMOND	Patrick	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
ENGUEHARD-GUEIFFIER	Cécile	PHARMACOGNOSIE
GIRAUDEAU	Bruno	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
LANOTTE	Philippe	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
MAHEO	Karine	PHYSIOLOGIE
MAUPOIL-DAVID	Véronique	PHARMACOLOGIE
POUPLARD	Claire	HEMATOLOGIE
THIBAUT	Gilles	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
VIAUD-MASSUARD	Marie-Claude	CHIMIE ORGANIQUE

### **3 PROFESSEURS EMERITES**

AGAFONOV	Viatcheslav	CHIMIE PHYSIQUE
GUILLOTEAU	Denis	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
BARIN	Francis	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

### **38 MAITRES DE CONFERENCES**

ALLARD-VANNIER	Emilie	PHARMACIE GALENIQUE
ARLICOT	Nicolas	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
AUBREY	Nicolas	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
BAKRI	Françoise	HYGIENE SANTE PUBLIQUE & TOXICOLOGIE
BESSON	Pierre	PHYSIOLOGIE
BIRER-WILLIAMS	Caroline	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
BONNIER	Franck	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
BORDY	Romain	PHARMACOLOGIE
BOUESOCQUE-DELAYE	Leslie	PHARMACOGNOSIE
BOUVIN-PLEY	Mélanie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BRAIBANT	Martine	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BREDELOUX	Pierre	PHARMACOLOGIE

DAVID  
DEBIERRE-GROCKIEGO

Stéphanie  
Françoise

PHARMACIE GALENIQUE  
IMMUNOLOGIE PARASITAIRE

DELAYE	Pierre-Olivier	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DENEVAULT	Caroline	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DOUZIECH-EYROLLES	Laurence	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
DUMAS	Jean-François	BIOCHIMIE GENERALE ET BIOTHERAPIE
GERMON	Stéphanie	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
GLEVAREC	Gaëlle	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
HERVE-AUBERT	Katel	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
JUSTE	Matthieu	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
LAJOIE	Laurie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
LANOUE	Arnaud	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
MARC	Jillian	BIOMOLECULES ET BIOTECHNOLOGIES VEGETALES
MARCHAIS	Hervé	PHARMACIE GALENIQUE
MAVEL	Sylvie	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MUNNIER	Emilie	PHARMACIE GALENIQUE
OMBETTA-GOKA	Jean-Edouard	CHIMIE ORGANIQUE
ODIN	Audrey	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
PASQUALIN	Côme	PHARMACOLOGIE
PRIE	Gildas	CHIMIE ORGANIQUE
RESPAUD	Renaud	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
SOUCE	Martin	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
TAUBER	Clovis	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
VELGE-ROUSSEL	Florence	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
VERCOUILLIE	Johnny	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
VERGOTE	Jackie	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
VIERRON	Emilie	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
ZHANG	Bei-Li	PHARMACOLOGIE

### 1 CONTRAT D'ENSEIGNEMENT

VANIER	Antoine	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
--------	---------	-----------------------------

### 1 DIRECTEUR DE RECHERCHE

CHALON	Sylvie	INSERM
--------	--------	--------

### 2 CHARGES DE RECHERCHE

MEVELEC	Marie-Noëlle	INRA
MOIRE	Nathalie	INRA

### 1 PRAG

WALTERS-GALOPIN	Susan	ANGLAIS
-----------------	-------	---------

### 1 PAST

JOYEUX	VINCENT	Filière Pharmacie
--------	---------	-------------------

### 3 AHU

FOUCAULT	Amélie	HEMATOLOGIE
FOUCAULT-FRUCHARD	Laura	PHARMACIE CLINIQUE
MARLET	Julien	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE



## **SERMENT DE GALIEN**

*En présence des Maîtres de la Faculté, je fais le serment :*

*D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances ;*

*D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;*

*De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité ;*

*En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels ;*

*De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession ;*

*De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens ;*

*De coopérer avec les autres professionnels de santé ;*

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

*Date : 21 janvier 2021*

*L'étudiant  
Mme WAHL Clémentine*

*Le Doyen de la Faculté  
Professeur Véronique Maupoil*

## REMERCIEMENTS

A Madame le Professeur Claire Pouplard,  
Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse.

A Monsieur Marc Trossaërt,  
Pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse. Merci de m'avoir proposé ce sujet, d'avoir accepté de diriger ce travail, pour ton encadrement et ta disponibilité.

A Madame le Professeur Marie-Christine Béné,  
Pour avoir accepté d'être membre de mon jury et pour votre accueil au sein du service d'hématologie de Nantes.

A Madame Elodie Boissier,  
Pour avoir accepté d'être membre de mon jury, pour ton aide et tes précieux conseils pour la réalisation de ce projet.

A Monsieur Nicolas Drillaud,  
Pour avoir accepté d'être membre de mon jury. Pour m'avoir soutenue, encouragée et conseillée pendant mon internat.

Aux biologistes et techniciens de Poitiers, Nantes, de l'ICO d'Angers et de Rennes,  
Pour votre accueil, vos conseils et votre disponibilité depuis le début de mon internat.

A toute l'équipe d'hémostase de Nantes, Marc Fouassier, Catherine Ternisien, Marianne Sigaud,  
Pour votre accueil au sein du service, votre pédagogie et votre disponibilité. Merci également à Nathalie Lecoq et Catherine Larrose pour votre grande aide dans la réalisation de ce travail.

A tous les laboratoires d'hématologie-hémostase des centres hospitaliers ayant participé à ce projet,  
Angers, Dijon, Limoges, Marseille, Nancy, Reims, Rouen, Toulouse, Versailles, Bordeaux, Mulhouse, Besançon, Eaubonne, Lille, Montpellier, Bicêtre, Necker, Nantes-Laennec, Tours, Angers, Rennes, Caen, Nice.

Enfin,

Je remercie particulièrement la fin équipe poitevine, Barbara, Adeline, Louise, Eugénie, Pierre, Alex, Simon sans qui rien n'aurait été pareil.

Un grand merci à Aurélie, Arnaud, Emeline pour tous ces bons moments passés à Nantes et Angers et tout votre soutien.

Merci à Célia sans qui ces deux années d'internat à Nantes n'auraient pas eu la même saveur.

Merci à mes « trois » kinés préférés Clément, Maxime et Justine, de m'avoir soutenue et fait vivre des moments incroyables à Nantes.

Un grand merci à tous les Ploufs, qui m'accompagnent depuis 15 ans, avec qui j'ai vécu des moments merveilleux et qui seront à mes côtés pour longtemps. Remerciements tout particulier à Laure et Solène d'avoir relu ce manuscrit et corrigé les dernières fautes d'orthographe.

Merci à toute l'équipe de Paris XI : Anna, Julie, Charline, Margaux, Maxime, Julien, PLS, Pauline, Rémy, pour ces belles années de fac et nos vacances à St-Lu, vivement que la chaum' réouvre !

Merci à la meilleure des coloc Alexandre, Maëlle, Ben, Emilie, Kim sans oublier Oogie pour cette belle expérience angevine.

Merci à toutes ces belles rencontres à Nantes Anne-Sophie, Sarah, Martin, Charles, Edouard, Arthur et tant d'autres.

Merci à Charly, Xavier et Maëlle de m'avoir soutenue ET supportée dans la dernière ligne droite.

Je remercie toute ma famille de m'avoir soutenue durant toutes ces années et particulièrement à mon frère Thibault, qui se souviendra toujours de m'avoir accompagnée à Rungis en 2012 en se demandant bien dans quoi je m'embarquais !

Et enfin, à tous mes relecteurs de près ou de loin (vous vous reconnaîtrez), merci pour votre temps et tous vos conseils.

## TABLES DES MATIERES

I. L'hémophilie A .....	12
I.1 Définition, incidence et mode de transmission .....	12
I.2 Le FVIII et son rôle dans la coagulation .....	13
I.3 Critères de classification .....	14
I.4 Clinique et complications.....	15
I.5 Traitements de l'hémophilie .....	17
a) La desmopressine :.....	17
b) Traitements substitutifs : .....	17
c) Traitements by-passant : .....	18
d) L'Hemlibra® : emicizumab .....	18
e) Traitements en développement .....	19
I.6 Techniques de dosage du FVIII.....	20
I.7 Difficultés diagnostiques dans l'hémophilie A sévère. ....	21
I.8 Objectifs : .....	24
PEMIERE PARTIE : Validation de méthode de dosage des FVIII:C ultra-bas .....	24
II. Matériels et méthodes.....	24
II.1 Reproductibilité.....	24
1) Echantillons .....	25
2) Automate de dosage du taux de FVIII.....	26
3) Analyse : .....	27
II.2 Etude de la comparaison inter-laboratoire.....	27
1) Echantillons .....	28
2) Dosage dans les autres centres hospitaliers.....	28
3) Analyse .....	28
II.3 Incertitude de mesure.....	29
III. Résultats.....	30
III.1 Reproductibilité :.....	30
III.2 Comparaison inter-laboratoire .....	32
III.3 Incertitude de mesure.....	33



DEUXIEME PARTIE : Patients suivis au CHU de Nantes.....	34
IV. Matériels et méthodes.....	34
IV.1 Patients : .....	34
IV.2 Méthodes :.....	35
1) Dosage du FVIII:C .....	35
2) Dosage antigénique du FVIII .....	35
3) Test de génération de thrombine (TGT) .....	35
V. Résultats.....	37
V.1 Dosage des FVIII:C des patients hémophiles A.....	37
V.2 Comparaison du taux de FVIII:C à la mutation génétique.....	39
V.3 Comparaison des FVIII ultra-bas au dosage antigénique du FVIII .....	40
V.4 Comparaison des FVIII ultra-bas au test de génération de thrombine .....	40
VI. Discussion.....	42
BIBLIOGRAPHIE .....	48

## LISTE DES FIGURES

Figure n°1 : Domaines du FVIII

Figure n°2 : Dosage du FVIII:C par méthode chromométrique avec détection photométrique

Figure n°3 : Principe de la méthode chromogène pour le dosage du FVIII:C

Figure n° 4 : Reproductibilité du FVIII:C à des concentrations comprises entre 0,0% et 3,0%

Figure n°5 : Représentation de l'incertitude de mesure CQI +/- EEQ

Figure n°6 : Courbe de génération de thrombine

Figure n°7 : Dosage des FVIII:C de 34 patients hémophiles A suivis au CHU de Nantes

Figure n°8 : Comparaison des taux de FVIII:C par rapport au TCK

Figure n°9 : Incertitude de mesure CQI +/- EEQ

Figure n°10 : Graphe représentant L'ETP en fonction du taux de FVIII:C

Figure n°11 : Courbe de corrélation entre l'ETP et le taux de FVIII:C

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau n°1 : Fréquence approximative des saignements en fonction des localisations dans l'hémophilie A

Tableau n°2 : Corrélation entre la sévérité clinique et le taux de FVIII:C

Tableau n°3 : Marqueurs cliniques de l'hémophilie A sévère chez 621 patients divisés en 3 groupes en fonction de leur mutation du gène du FVIII

Tableau n°4 : FVIII:C de 5 échantillons de patients hémophiles A sévères (1, 5, 7, 8 et 10) et 5 échantillons de patients hémophiles A modérés (2, 3, 4, 6, et 9). Onze céphalines différentes ont été utilisées.

Tableau n° 5 : Dosages des différents facteurs de la coagulation après décongélation (utilisation normale) et après un cycle supplémentaire de congélation

Tableau n° 6 : Dilutions du calibrateur Siemens® pour obtenir 6 plasmas à des concentrations différentes

Tableau n° 7 : Reproductibilité du FVIII:C à des concentrations comprises entre 0,0% et 3,0%

Tableau n°8 : Comparaison inter-laboratoire avec 8 centres français

Tableau n°9 : Type de mutation génétique du FVIII retrouvée chez les 34 patients

## LISTE DES ABREVIATIONS

AAV	Adeno-associated virus
APTT	Activated partial thrombin time
ARN	Acide ribonucléique
AT	Antithrombine
AMM	Autorisation de mise sur le marché
CHU	Centre hospitalier universitaire
DDAVP	1-Deamino-8-d-arginine vasopressin (desmopressine)
ECAT	External quality control of diagnostic assays and tests
EEQ	Evaluation externe de la qualité
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay ou méthode immuno-enzymatique
CV	Coefficient de variation
FVIIa	Facteur VII activé
FVIII	Facteur VIII
FVIIIa	Facteur VIII activé
FVIII:C	Dosage de l'activité du FVIII
FVIII:Ag	Dosage du FVIII antigène
FIX	Facteur IX
FIXa	Facteur IX activé
FX	Facteur X
FXa	Facteur X activé
GFHT	Groupe Français d'étude sur l'hémostase et thrombose
GpIb $\alpha$	Glycoprotéine plaquettaire Ib $\alpha$
IMC	Indice de masse corporelle
ISTH	International Society of Thrombosis and Haemostasis
IV	Intraveineux
RE	Réticulum endoplasmique
rFVIIa	Facteur VII active recombinant
TFPI	Tissue factor pathway inhibitor ou inhibiteur de la voie du facteur tissulaire
UB	Unité Bethesda

VWF	Von Willebrand Factor
WFH	World Federation of Hemophilia
WHO	World Health Organization

## INTRODUCTION

L'hémophilie A constitutionnelle est une pathologie héréditaire, récessive liée au chromosome X qui se traduit par un déficit congénital en Facteur VIII (FVIII) de la coagulation. L'hémophilie est l'anomalie de la coagulation la plus fréquente avec une incidence de 1/5000 naissances masculines. Actuellement seul le dosage de l'activité du FVIII (FVIII:C) permet de déterminer la sévérité de la pathologie : l'hémophilie est dite sévère quand le taux de FVIII:C est inférieur à 1,0%, modérée entre 1,0 et 5,0% et enfin mineure lorsque le taux est compris entre 5,0% et 40,0%. Il a été établi une corrélation entre la gravité des manifestations hémorragiques et le taux de FVIII:C.

En absence de traitement, la répétition des accidents hémorragiques (hémarthroses, hématomes...) aboutit à un handicap moteur avec destruction articulaire liée aux saignements intra-articulaires. Dans les formes sévères, il est recommandé d'initier précocement un traitement prophylactique, par injections pluri-hebdomadaires de concentrés de facteurs de coagulation, pour éviter toute séquelle articulaire. Dans les formes modérées, ce traitement n'est proposé qu'au cas par cas, en fonction de l'expression clinique de la maladie.

Or, cliniquement certains patients classés comme modérés sur des résultats de FVIII:C  $\geq$  1,0% ont une symptomatologie hémorragique parfois proche et une arthropathie hémophilique comparable à certains patients classés comme sévères (FVIII:C < 1,0%). Le seuil de 1,0% est donc un critère qui peut paraître arbitraire.

L'objectif de notre travail est de mieux définir par la biologie le profil hémorragique des patients hémophiles sévères ou modérés en s'intéressant plus particulièrement aux patients présentant des taux de FVIII:C proches de 1,0%. Dans un premier temps il nous a semblé intéressant d'étudier le dosage des FVIII:C « ultra-bas » c'est-à-dire < 1,0%, pour comparer le taux de FVIII:C au phénotype hémorragique, à la mutation génétique retrouvée, au dosage du FVIII antigénique et à un test global de la coagulation : le test de génération de thrombine.

## **I. L'hémophilie A**

### **I.1 Définition, incidence et mode de transmission**

L'hémophilie A constitutionnelle correspond à un déficit en FVIII, protéine de la coagulation(1). C'est une pathologie héréditaire, de transmission récessive et liée à l'X. Elle touche majoritairement les sujets de sexe masculin qui ne possède qu'un seul X, les sujets de sexe féminin seront conductrices de l'hémophilie sauf dans de très rare cas tels que la lyonisation extrême de l'X ou le syndrome de Turner (XO). En cas de déficit en FVIII:C < 40%, certaines femmes conductrices peuvent présenter une symptomatologie hémorragique et être donc qualifiée d'hémophile.

L'hémophilie A touche un garçon sur 5000 naissances(2). En décembre 2020, il est recensé en France 6847 hémophiles A tous stades confondus(3).

Si la mère a un chromosome X muté, ses filles ont 50% de risque d'être conductrices, ses fils ont 50% de risque d'être hémophiles. Si le père est hémophile avec son chromosome X muté, ses filles ont 100% de risque d'être conductrices, ses fils seront quant à eux sains(4).

A noter qu'il a été rapporté que 25% des cas d'hémophilie étaient dus à des mutations de novo, sans antécédents familiaux(5).

## I.2 Le FVIII et son rôle dans la coagulation

Lors d'une brèche vasculaire, une vasoconstriction du vaisseau va permettre de limiter les pertes sanguines, puis plusieurs mécanismes se mettent en place pour arrêter le saignement(6). On peut décrire trois grands temps de l'hémostase :

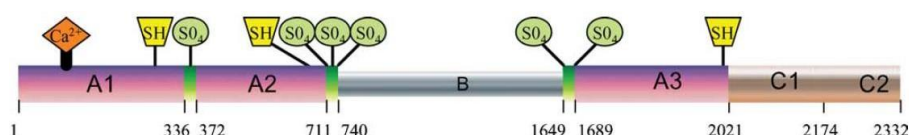
- L'hémostase primaire : le processus initial est l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium vasculaire grâce au facteur von Willebrand (VWF). Après lésion vasculaire, le VWF adhère au collagène du sous-endothélium, adopte une conformation « active », ce qui lui permet de lier son récepteur plaquettaire, la glycoprotéine Ib $\alpha$  (GPIb $\alpha$ ). Cette liaison entraîne l'activation puis l'agrégation plaquettaire, et enfin la formation d'un thrombus plaquettaire grâce à l'établissement de ponts interplaquettaires entre le fibrinogène et les plaquettes(7).
- La coagulation va permettre de consolider ce thrombus plaquettaire. C'est un processus composé d'une série de sérines protéases et de leur cofacteurs qui vont interagir sur une surface recouverte de phospholipides (membrane plaquettaire, endothélium lésé) et former un caillot de fibrine insoluble qui va obstruer la brèche vasculaire(8).
- La dernière étape correspond à la fibrinolyse qui correspond à la dissolution du caillot de fibrine grâce à une enzyme : la plasmine. Cela permet de garantir la reperméabilisation du vaisseau(8).

Le FVIII est une protéine de la coagulation qui, une fois activée (FVIIIa), a un rôle de cofacteur du FIX (facteur IX), essentiel pour la formation du caillot de fibrine et l'arrêt du saignement. Le gène du FVIII est situé sur le bras long du chromosome X (Xq28). Le clonage du gène du FVIII en 1984 (Gitschier et al) a permis l'analyse détaillée de la protéine(9). Le gène du FVIII est long de 186 kb et est réparti en 26 exons dont l'épissage génère un messenger de 9kb (soit 5% du gène initial). L'ARNm est traduit en une protéine précurseur de 2351 acides aminés(10) incluant un peptide signal de 19 acides aminés



(éliminé durant la translocation dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE)). La protéine mature est ainsi constituée de 2332 acides aminés et les 95 % de séquences restantes correspondent aux introns et peuvent être par conséquent porteurs d'une mutation responsable du déficit en FVIII.

Le FVIII possède trois domaines : domaine A répété trois fois, domaine central B et un domaine C répété deux fois(11).



**Figure n°1 : Domaines du FVIII.** Les numéros des acides aminés encadrant les différents domaines sont représentés sur la figure. Les domaines A et C sont respectivement en rose et doré, les segments a1, a2 et a3 en vert. Le domaine B en argent n'est pas à l'échelle. La localisation approximative des résidus cystéine (SH), tyrosine sulfatée (SO<sub>4</sub>) et du site de liaison pour le calcium est indiquée

### I.3 Critères de classification

L'*International Society on Thrombosis and Haemostasis* (ISTH) définit les stades de sévérité de l'hémophilie A en fonction du taux de FVIII:C(5).

En effet, l'hémophilie est dite :

- sévère si le taux de FVIII:C est inférieur à 1,0% (30% des hémophiles en décembre 2020 soit 2021 patients en France)
- modérée si le FVIII:C est compris entre 1,0% et 5,0% (13% des hémophiles soit 868 patients en France),
- mineure si le taux de FVIII:C est compris entre 5,0% et 40,0% (57% des hémophiles soit 3958 patients en France)(3).

#### **I.4 Clinique et complications**

Les manifestations caractéristiques de l'hémophilie sévère sont les hématomes musculaires et les hémarthroses, particulièrement au niveau des genoux, des coudes et des chevilles(12). Les hémarthroses aiguës débutent généralement par un léger inconfort et une légère limitation des mouvements articulaires, suivie par une douleur, un gonflement des articulations et un réchauffement cutané. En l'absence de traitement, l'hémarthrose conduit généralement à une limitation sévère du mouvement. Le processus pathologique se poursuit malgré l'arrêt du saignement, en effet, l'inflammation locale provoque des lésions articulaires menant à une synovite, augmentant le risque de récurrences des hémarthroses dans les mêmes articulations (appelées articulations cibles)(1). La répétition des saignements peut entraîner une arthropathie chronique, très invalidante et évoluant vers la destruction articulaire si elle n'est pas prise en charge.

Une étude publiée dans Haemophilia en 2005, menée au Pays-Bas et ayant inclus 171 hémophiles sévères montre que l'âge de la première hémarthrose est entre 0,2 et 5,8 ans et que l'âge du premier évènement est un bon marqueur pronostic pour estimer la sévérité du phénotype clinique. En effet, les patients présentant la première hémarthrose plus tardivement, nécessitent moins de traitements substitutifs par la suite(13).

Pour les patients présentant une hémophilie modérée, les saignements spontanés sont occasionnels et le risque hémorragique survient essentiellement lors d'actes invasifs ou de traumatismes.

Pour les patients présentant une hémophilie mineure les saignements sont rares, majoritairement lors d'actes invasifs ou de traumatisme majeur ; la découverte peut être tardive ou fortuite lors de la réalisation d'un bilan d'hémostase.

Tableau n°1 : Fréquence approximative des saignements en fonction des localisations  
dans l'hémophilie A(12)

Localisation des saignements	Fréquence approximative (%)
Hémarthrose <i>Le plus souvent : chevilles, genoux, coudes</i> <i>Plus rarement : épaules, poignets, hanches</i>	<b>70-80%</b>
Muscles	<b>10-20%</b>
Autres saignements majeurs	<b>5-10%</b>
Système nerveux central	<b>&lt; 5%</b>

Tableau n°2 : Corrélation entre la sévérité clinique et le taux de FVIII:C(14)

Sévérité	FVIII:C	Clinique
<b>Sévère</b>	<b>&lt; 1,0%</b>	<b>Saignements spontanés articulaires ou musculaires.</b>
<b>Modérée</b>	<b>1,0-5,0%</b>	<b>Saignements spontanés occasionnels, prolongés en cas de chirurgie ou de traumatisme mineur.</b>
<b>Mineure</b>	<b>5-40%</b>	<b>Saignements lors de traumatisme majeur ou de chirurgie. Saignement spontané exceptionnel.</b>

- Les pseudo-tumeurs hémophiliques constituent une complication majeure, heureusement aujourd'hui rare en France principalement chez les hémophiles sévères qui n'ont pas été traités en prophylaxie. C'est un hématome chronique similaire à une masse kystique encapsulée suite à des saignements itératifs(17). La pseudo-tumeur peut affecter l'os, l'espace sous-périosté et les tissus mous, sa paroi est constituée de tissu fibreux renfermant des macrophages remplis d'hémosidérine(18).
- L'apparition d'un inhibiteur anti-FVIII reste la complication grave et fréquente, apparaissant en effet, dans environ 30% des cas d'hémophilie A sévère traités par FVIII exogène(15).

## **I.5 Traitements de l'hémophilie**

### **a) La desmopressine :**

Desmopressine ou DDAVP (1-Deamino-8-d-arginine vasopressin) est un analogue de la vasopressine qui est utilisée par voie nasale (Octim®) ou intraveineuse (Minirin® IV) qui va permettre une libération du FVIII et du facteur Willebrand des cellules endothéliales et donc augmenter de manière transitoire le taux de FVIII:C circulant(19). Ce traitement est essentiellement envisagé dans les formes mineures (parfois modérée) de l'hémophilie A en cas de saignements modérés ou en situation peropératoire. Il est nécessaire de réaliser un test thérapeutique avant l'instauration de ce traitement.

### **b) Traitements substitutifs :**

Le traitement de l'hémophilie A repose historiquement sur la substitution en FVIII d'origine plasmatique puis recombinante(16). La dose, la posologie et la concentration en facteur substitutif dépend du type et de la sévérité du saignement. En 2013, la World Federation of Hemophilia (WFH) a publié des lignes directrices pour la prise en charge thérapeutique de l'hémophilie(19).

Trois types de traitements substitutifs sont disponibles :

- les concentrés d'origine plasmatique issus du don du sang,
- les concentrés d'origine recombinante obtenus par génie génétique en utilisant l'ADNc du FVIII,
- les concentrés d'origine recombinante à durée d'action prolongée appelés les « long acting ».

Il existe deux schémas de traitement de l'hémophilie :

- traitement prophylactique : injection intraveineuse de FVIII pour prévenir les saignements et la destruction articulaire dans le but de préserver la fonction musculo-squelettique du patient(16). La prophylaxie primaire nécessite des injections 1 à 3 fois

par semaine, dès le plus jeune âge (<2ans), idéalement avant la première hémarthrose. La prophylaxie secondaire est débutée après la première hémarthrose. Usuellement, la prophylaxie est classiquement débutée à une dose de 25-40 UI/kg 2 à 3 fois par semaine(20).

- traitement à la demande : les concentrés de FVIII sont utilisés lors d'évènements hémorragiques ou en peropératoire pour éviter un saignement lors du geste(21).

Les traitements substitutifs peuvent être responsables de l'apparition d'inhibiteurs anti-FVIII. Ce sont des alloanticorps neutralisants, le plus souvent des IgG polyclonales de forte affinité. L'apparition d'un inhibiteur peut rendre le traitement substitutif inefficace. Un inhibiteur est caractérisé par son titre (exprimé en unités Bethesda : UB/mL) et la réponse immunologique (forts et faibles répondeurs). Un patient avec un inhibiteur de faible titre (< 5 UB/mL) et faible répondeur pourra être traité par des fortes doses de FVIII qui satureront l'inhibiteur. A l'inverse un patient avec un titre élevé (> 5 UB/mL) et fort répondeur ne pourra être traité en curatif que par des agents by-passant (Feiba®, Novoseven®)(16).

#### **c) Traitements by-passant :**

Dans le cas de l'apparition d'un inhibiteur, une tolérance immune peut être envisagée. Lorsque le titre d'inhibiteur est élevé (> 5 UB/mL) ou que la tolérance immune revient inefficace, il est possible d'utiliser des agents dits « by-passant » tels que le rFVIIa (Novoseven®) ou un concentré de facteurs activés (Feiba®)(22). Ces traitements permettent d'activer la coagulation en contournant l'activité du FVIII et de son inhibiteur(23).

#### **d) L'Hemlibra® : emicizumab**

L'Hemlibra® (emicizumab) est un anticorps monoclonal humanisé bispécifique de type immunoglobuline (IgG4) modifiée(24). L'emicizumab se lie au FIX (facteur IX) activé et au FX (facteur X) pour shunter la fonction du FVIIIa. Cet anticorps ne présente pas

d'homologie de structure avec le FVIII donc n'induit pas le développement d'inhibiteur anti-FVIII(25). Selon l'AMM en France, les indications de ce traitement sont aujourd'hui :

- chez les patients atteints d'hémophilie A (déficit congénital en facteur VIII) avec inhibiteurs anti-facteur VIII.
- chez les patients atteints d'hémophilie A sévère (déficit congénital en facteur VIII, FVIII < 1,0 %) sans inhibiteur anti-facteur VIII.

#### **e) Traitements en développement**

Plusieurs traitements sont en développement actuellement :

- La thérapie génique est encore en phase d'essai. Le but est d'apporter le gène déficient responsable de l'absence d'expression ou du défaut d'expression de la protéine (FVIII) en utilisant comme vecteur un AAV (adeno-associated virus) dérivés des adénovirus(26).
- Le traitement de l'hémophilie par la restauration de la génération de thrombine peut être une approche efficace. Une cible prometteuse pour restaurer la génération de thrombine est l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI), un inhibiteur multivalent de la sérine-protéase de type Kunitz qui régule la coagulation induite par le facteur tissulaire via une rétro-inhibition (dépendante du facteur Xa) du complexe facteur tissulaire-facteur VIIa(27).
- Le fitusiran est une thérapie par interférence ARN qui cible l'antithrombine (AT) dans le foie et interfère avec la traduction de l'AT en liant et en dégradant l'ARN messager de l'AT, réduisant ainsi au silence l'expression du gène de l'AT et empêchant la synthèse de l'AT. Dans les essais cliniques, l'augmentation de la dose de fitusiran a entraîné une amélioration de la production de thrombine et de l'hémostase clinique, mesurée par la réduction du taux d'hémorragie annualisé(28).

## I.6 Techniques de dosage du FVIII

### 1) Dosage de l'activité du FVIII (FVIII:C)

Il existe plusieurs techniques de dosage du FVIII:C. La plus répandue est le dosage chromométrique qui consiste à chronométrer le temps de coagulation d'un plasma mélangé avec un déficient en FVIII qui apporte toutes les autres protéines de la coagulation. Le temps de formation du caillot n'est alors dépendant que de l'activité de FVIII du plasma du patient(29). La détection de la formation du caillot peut être mécanique ou photométrique en fonction des automates.

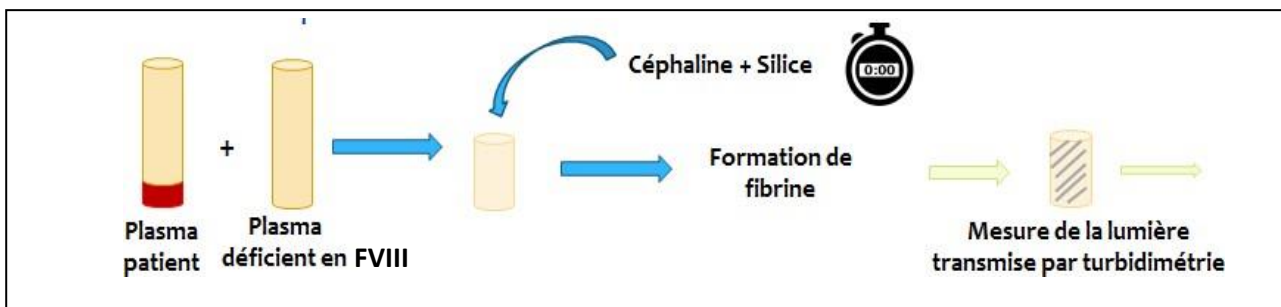


Figure n° 2 : Dosage du FVIII par méthode chromométrique avec détection photométrique

La méthode chromogène est une méthode en deux étapes qui exploite la capacité du FVIIIa à agir comme cofacteur dans l'activation du FX. Dans un premier temps, l'échantillon à tester est incubé en présence de thrombine, de phospholipides, de calcium et du FIX activé et de FX, le FVIIIa constitue l'élément limitant de la réaction. Un complexe est ensuite formé avec les FVIIIa, IXa, les phospholipides et le calcium. Dans un second temps, ce complexe active le FX, le FXa est généré en quantité proportionnelle à l'activité du FVIII initialement contenu dans l'échantillon. Le FXa entraîne le clivage d'un substrat chromogène et l'apparition d'une coloration induite par la libération de p-nitroaniline qui est mesurée par densité optique à la longueur d'onde de 405 nm tel que l'illustre la figure n°3(30).

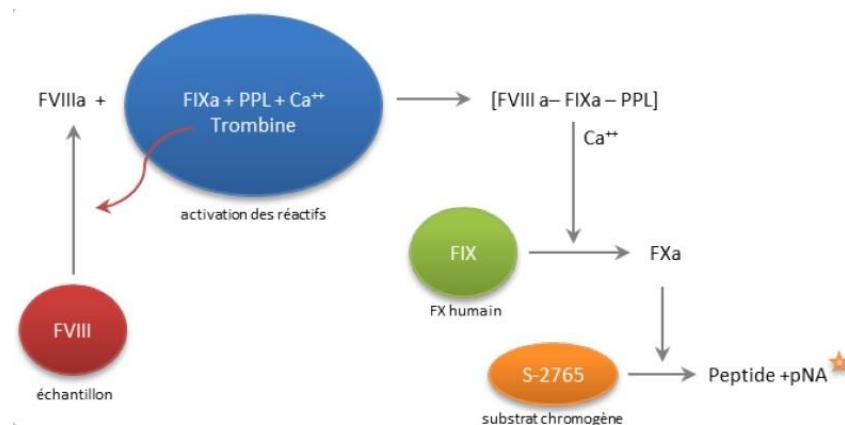


Figure n°3 : Principe de la méthode chromogène pour le dosage du FVIII:C(30)

## 2) Dosage antigénique du FVIII (FVIII:Ag)

Le dosage antigénique du FVIII (FVIII:Ag) peut être réalisé en radioimmunologie ou par méthode ELISA (méthode immuno-enzymatique).

### I.7 Difficultés diagnostiques dans l'hémophilie A sévère.

Il a été montré que 10 à 15% des hémophiles considérés comme hémophiles sévères par leur taux de FVIII:C <1,0%, présentent une clinique similaire à un hémophile modéré (1,0-5,0% de FVIII:C)(31). Les saignements spontanés et les hémarthroses sont beaucoup plus rares et par conséquent les articulations sont préservées. L'hétérogénéité clinique de l'hémophilie dépend de nombreux facteurs : taux de FVIII:C mais aussi, de la mutation génétique responsable de l'absence de production de FVIII(32).

L'étude de Carcao et al a montré en 2014 que sur les 621 enfants hémophiles A sévères inclus, ceux présentant une mutation nulle sont diagnostiqués plus tôt et ont une première hémarthrose plus jeunes que ceux avec une mutation non nulle(33).



**Tableau n° 3 : Marqueurs cliniques de l'hémophilie A sévère chez 621 patients divisés en 3 groupes en fonction de leur mutation du gène du FVIII(31)**

	Groupe 1 (mutations nulles)	Groupe 2 (mutations non nulles)	Groupe 3 (mutations inconnues)	p-value
Nombre de patients	402 (64,7)	129 (203,8)	90 (14,5)	
Age médian de diagnostic*	8,3 (4,1-11,9)	10,1 (6,4-13,0)	8,4 (0,9-12,8)	0,04
Age médian 1 <sup>er</sup> saignement †	9,7 (5,8-13,2)	10,9 (7,7-15,0)	8,8 (2,1-13,5)	0,009-0,007
Age médian 1 <sup>ère</sup> hémarthrose †	13,8 (10,0-21,0)	16,1 (10,8-26,7)	14,8 (8,4-23,3)	0,05
Age médian 2 <sup>ème</sup> hémarthrose †	21,8 (13,4-29,9)	21,3 (12,9-36,5)	16,9 (11,7-21,8)	Ns
Temps médian entre les 2 premières hémarthroses	2,2 (0,8-8,1)	2,7 (0,9-6,9)	2,2 (0,5-6,7)	Ns
Age médian introduction prophylaxie	16,2 (11,8-23,7)	19,8 (12,6-27,6)	17,2 (12,2-24,9)	Ns

Ns : non significatif

\*L'âge du diagnostic a été évalué sur seulement 340 patients sans histoire familiale d'hémophilie

†L'âge de la première hémarthrose, de la deuxième hémarthrose ont été calculé chez les patients qui n'avaient pas démarré de prophylaxie et qui n'avait pas développé d'inhibiteur avant le premier saignement, la première hémarthrose, ou la seconde hémarthrose (n=549, 342 et 179 respectivement)

D'autres facteurs interviennent dans l'hétérogénéité clinique de l'hémophilie A sévère : facteurs environnementaux : l'Indice de Masse Corporelle (IMC) (un IMC élevé peut aggraver l'arthropathie hémophilique), l'activité physique qui peut augmenter le risque de saignement mais avoir un effet protecteur sur les articulations cibles(32).

En 2008 Verbruggen B et al. a publié dans Haemophilia une étude sur le dosage du FVIII:C. Ils ont testé 11 réactifs les plus utilisés lors des EEQ européens sur 5 échantillons d'hémophilie A sévère et 5 échantillons d'hémophilie A modérée. Les résultats de l'étude montrent que 2 réactifs sur 11 ne permettent pas de détecter un FVIII:C < 1,0%. Il en résulte que le diagnostic de l'hémophilie sévère peut être difficile en dehors de l'utilisation d'un réactif approprié et des exigences optimales de test(34).

Tableau n°4 : FVIII:C de 5 échantillons de patients hémophiles A sévères (1, 5, 7, 8 et 10) et 5 échantillons de patients hémophiles A modérés (2, 3, 4, 6, et 9). Onze céphalines différentes ont été utilisées.

Echantillons	Mutation du gène	Céphalines										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	inv. Intron 1	1.4	0.4	0.4	0.3	0.9	0.1	0.3	0.8	1.4	0.3	0.5
2	ex10 Tyr 476 stop C → G	6.4	4.1	5.1	4.3	5.4	3.8	4.6	4.6	6.8	5.2	5.8
3	ex7 His256Arg A → G	2.5	1.4	1.5	1.4	2.1	1.2	1.3	1.9	3.6	1.7	1.8
4	ex14 Asp121461u C → G	5.4	3.9	4.5	3.7	5.0	3.8	4.1	4.6	8.3	5.0	4.9
5	inv. Intron 22	1.3	0.4	0.4	0.4	0.9	0.1	0.2	0.8	2.0	0.4	0.4
6	ex23 Arg2163Cys C → T	1.8	0.8	0.9	0.9	1.3	0.5	0.8	1.5	3.0	1.0	1.0
7	ex14 Arg795stop C → T	nd	0.4	0.7	0.3	0.6	0.1	0.3	0.9	1.3	nd	0.5
8	inv. Intron 1	1.7	1.0	1.0	0.8	0.9	0.5	0.6	0.9	1.8	0.7	0.9
9	ex7 His256Arg A → G	2.8	1.7	2.0	1.3	3.0	1.6	1.9	2.9	1.9	2.1	2.6
10	inv. Intron 22+/-	2.1	1.1	0.4	1.0	1.9	1.0	1.3	2.0	1.6	1.2	1.6

Résultats exprimés en %

Céphalines : 1, STA Cephascreen (Stago) ; 2, STA APTT Kaolin (Stago) ; 3, PTT-LA (Stago) ; 4, PTT a (Stago) ; 5, PTT reagent (Stago) ; 6, Synthasil (HemoSIL) ; 7, APTT-SP (HemoSIL) ; 8, Dade® Actin® FSL Activated PTT reagent (Dade Behring) ; 9, Dade® Actin® FS Activated PTT reagent (Dade Behring) ; 10, Pathromtin SL (Dade Behring) ; 11, Platelin®LS (Biomerieux)

nd : non déterminé

De plus, un EEQ a été réalisé par l'ECAT (External quality Control of diagnostic Assays and Tests) en 2010 avec un plasma d'hémophile sévère avec FVIII:C < 1,0% : 20% des laboratoires seulement ont retrouvé un FVIII:C < 1,0%, 75% des laboratoires ont rendu FVIII:C ≈ 1,0% et 5,0% ont trouvé un FVIII:C > 2,0%. Un autre EEQ ECAT de 2018 avec un plasma d'hémophile modéré à 4,0%, 5% des laboratoires ont rendu un FVIII:C < 1,0% (hémophile sévère), 9% ont rendu un FVIII:C ≥ 5,0% (hémophilie mineure). Ces résultats montrent bien la difficulté de doser précisément un FVIII:C, base du diagnostic de l'hémophilie A.

## **I.8 Objectifs :**

Le premier objectif de ce travail a été de valider la méthode de dosage pour les FVIII:C ultra-bas, c'est-à-dire inférieurs à 1,0% en se basant sur la méthode utilisée en routine au CHU de Nantes.

Dans un second temps il nous a semblé intéressant de comparer les dosages de FVIII:C de patients hémophile A sévères et modérés suivis au CHU de Nantes à la mutation génétique retrouvée au diagnostic, au dosage antigénique du FVIII et enfin au test de génération de thrombine.

## **PEMIERE PARTIE : Validation de méthode de dosage des FVIII:C ultra-bas**

Dans cette première partie nous avons voulu valider la méthode de dosage du FVIII:C ultra-bas en calculant notre incertitude de mesure par étude de la reproductibilité au sein du laboratoire du CHU, ainsi qu'en effectuant une comparaison inter-laboratoire.

## **II. Matériels et méthodes**

### **II.1 Reproductibilité**

Cette notion correspond à la fidélité de mesure selon un ensemble de conditions.

L'étude de la reproductibilité intra-laboratoire consiste à analyser un même échantillon dans les conditions les plus différentes possibles. Il est nécessaire de faire varier au moins un des paramètres suivants :

- Opérateur
- Temps
- Lots de réactifs
- Etalonnages

Les échantillons ont été passés sur le même automate avec le même lot de réactif et le même opérateur mais sur plusieurs jours différents.

## 1) Echantillons

Les échantillons ont été créés à partir du calibrateur Siemens® « Standard Human Plasma» (lot 503267) FVIII:C = 95%. Pour obtenir les plasmas aux concentrations recherchées, une première dilution a été réalisée grâce à un tampon (Factor diluent HemosIL® du laboratoire Werfen®) puis une seconde avec le déficient FVIII Cryopep® (lot D8-78). L'utilisation du déficient FVIII Cryopep® nous a permis de réaliser des solutions isotoniqument proches du plasma humain.

Dans un premier temps, il a été vérifié que nous pouvions décongeler le déficient FVIII Cryopep®, réaliser les dilutions puis recongeler les différents aliquots sans impact sur le déficient (dosage 4 jours après la seconde congélation).

Tableau n° 5 : Dosages des différents facteurs de la coagulation après décongélation (J4)  
(utilisation normale) et après un cycle supplémentaire de congélation

Facteur	Déficient FVIII Cryopep®	Déficient FVIII Cryopep® décongelé puis recongelé
II	97,8%	95,3%
V	69,4%	68,0%
VII	91,7%	90,4%
X	90,6%	91,7%
VIII	0,1%	0,1%
IX	134%	130%
XI	102%	102%

Les taux des différents facteurs sont inchangés, nous avons pu recongeler les aliquots.

Les dilutions ont été réalisées de sorte à obtenir 6 plasmas à des concentrations de 0,0%, 0,3%, 0,7%, 1,0%, 1,5% et 3,0%. Une première dilution du calibrateur (FVIII:C 95%) au 1/10<sup>ème</sup> dans du tampon a été faite pour obtenir une solution à 9,5% de FVIII:C, puis les différentes dilutions ont été réalisées comme ci-dessous :

Tableau n° 6 : Dilutions du calibrateur Siemens® pour obtenir 6 plasmas à des concentrations différentes

FVIII	Calibrateur 9,5%	Déficient FVIII
0%	-	4 mL
0,3%	120 µL	3880 µL
0,7%	280 µL	3720 µL
1,0%	400 µL	3600 µL
1,5%	600 µL	3400 µL
3,0%	1200 µL	2800 µL

Les contrôles utilisés pour les différentes séries de tests ont été le contrôle normal (lot 507768 FVIII WHO-Standard : 94% [75-113]) et le contrôle pathologique (lot 556714 FVIII WHO- Standard : 30% [22-38]) du laboratoire Siemens®. Le contrôle pathologique a été dilué au 1/20<sup>ème</sup> pour être au plus proche de nos taux de FVIII:C.

## 2) Automate de dosage du taux de FVIII

### Dosage chronométrique du FVIII:C au CHU de Nantes

L'automate utilisé au CHU de Nantes a été l'ACL TOP 550 du laboratoire Werfen®. Les réactifs utilisés sont le déficient FVIII Cryopep® et la céphaline APTT Synthasil®. La calibration est en gamme unique à partir du Plasma Calibrator (Werfen®). La courbe de calibration est effectuée à partir de prélèvements dilués dans du tampon (Factor diluent HemosIL®, Werfen®) avec une valeur à 100% qui correspond à une dilution au 1/10<sup>ème</sup>. Huit points de gamme sont effectués en triplicate (150%, 100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 2%, 0%).

Pour les dosages de FVIII :C ultra-bas de ce travail, les dosages ont été réalisés en triplicate sur une dilution 1/5<sup>ème</sup>.

### **Conditions opératoires :**

6 échantillons, passés chacun 10 fois sur des jours différents.

### **3) Analyse**

Calcul de la moyenne et l'écart type des valeurs obtenues pour un même spécimen au cours des n séries indépendamment effectuées, en exploitant les formules suivantes :

Moyenne (m) : 
$$m = \frac{\sum xi}{n}$$

Ecart-type ( $\sigma_{CQI}$ ) : 
$$\sigma_{CQI} = \sqrt{\frac{\sum (xi - m)^2}{n - 1}}$$

Coefficient de variation (CV) : 
$$CV = \frac{\sigma_{CIQ}}{m} \times 100$$

## **II.2 Etude de la comparaison inter-laboratoire**

Nous avons réalisé une comparaison inter-laboratoire, en envoyant 3 échantillons à 23 centres Français : Angers, Dijon, Limoges, Marseille, Nancy, Reims, Rouen, Toulouse, Versailles, Bordeaux, Mulhouse, Besançon, Eaubonne, Lille, Montpellier, Bicêtre, Necker, Nantes-Laennec, Tours, Angers, Rennes, Caen, Nice. Chaque centre a dosé les échantillons en routine en ne connaissant pas les valeurs attendues. Nous avons comparé nos valeurs de FVIII:C trouvées à Nantes, à celles des différents centres, nous avons calculé la moyenne robuste du groupe de pairs pour éliminer les valeurs aberrantes, l'écart-type du groupe de pairs, le Z-score et le biais.

## 1) Echantillons

Les échantillons pour la comparaison inter-laboratoire ont été obtenus à partir du calibrateur Siemens® (FVIII:C à 95%) dilué au 1/10<sup>ème</sup> dans du déficient FVIII Cryopep® pour obtenir un plasma avec 9.5% de FVIII:C, puis différentes dilutions pour obtenir 3 plasmas à 0,0%, 0,7%, 1,4% :

Deux aliquots de 500µL des 3 échantillons ont été envoyés aux 24 centres hospitaliers français. Le but était de réaliser une comparaison inter-laboratoire pour étudier l'incertitude de mesure du dosage des FVIII:C ultra- bas avec des automates, réactifs, calibrateurs différents.

## 2) Dosage dans les autres centres hospitaliers

Les échantillons envoyés dans les autres centres ont été techniqués sur l'automate STAR du laboratoire Stago® ou sur le CS-2500 du laboratoire Siemens® ou sur l'ACL top du laboratoire Werfen®.

Quel que soit l'automate, le dosage du FVIII:C a été réalisé par une méthode chromométrique utilisée en routine par les différents centres.

## 3) Analyse

Formules utilisées pour la comparaison inter-laboratoire :

Moyenne du groupe de pairs ( $m_p$ ) :

$$m_p = \frac{\sum x_i}{n}$$

Ecart-type du groupe de pairs ( $\sigma_p$ ) :

$$\sigma_p = \sqrt{\frac{\sum (x_i - m_p)^2}{n-1}}$$

Coefficient de variation (CV) :

$$CV = \frac{\sigma_p}{m_p} \times 100$$

Moyenne robuste du groupe de pairs (selon la norme ISO 13528 :2015 «Méthodes statistiques utilisées dans les essais d'aptitude par comparaison inter-laboratoire») : exclusion des valeurs aberrantes (10%), moyenne robuste identique à la moyenne (pas de valeurs aberrantes).

Z-score :

$$Z - score = \frac{x_i - mp}{\sigma_p}$$

Biais :

$$Biais = \frac{x_i - mp}{mp} \times 100$$

### II.3 Incertitude de mesure

L'incertitude de mesure est un paramètre non négatif qui caractérise la dispersion des valeurs attribuées à une mesure à partir des informations utilisées.

On peut déterminer l'incertitude de mesure à partir de deux composantes qui regroupent les principaux facteurs de variation. Ces deux composantes disponibles sont l'écart type de reproductibilité de la méthode et son biais.

L'incertitude combinée est définie par la formule suivante :

$$u(C) = \sqrt{(\sigma_{CQ})^2 + \left(\frac{\bar{E}}{\sqrt{3}}\right)^2 + (\sigma_E)^2}$$



Avec :

$\sigma_{CIQ}$  = Ecart-type des CIQ obtenus au cours de la reproductibilité

$\sigma_E$  = Ecart-type des écarts entre le résultat du laboratoire et la valeur cible

$$\bar{E} = \frac{\sum_i (\text{Valeur labo} - \text{Valeur cible})_i}{\text{nombre de mesures "n"}}$$

$$\sigma_E = \sqrt{\frac{\sum_i (E_i - \bar{E})^2}{n - 1}}$$

L'incertitude élargie (k = 2) est calculée :  $U = 2 \times U(C)$

### III. Résultats

#### III.1 Reproductibilité :

Tableau n° 7 : Reproductibilité du FVIII:C à des concentrations comprises entre 0,0% et 3,0%

	Moyenne (m)	Médiane	Ecart-type ( $\sigma_{CIQ}$ )	CV (%)
N	10	10	10	
FVIII:C 0,0%	0,00	0,00	0,00	<b>Non calculable</b>
FVIII:C 0,3%	0,18	0,20	0,08	<b>43,82</b>
FVIII:C 0,7%	0,60	0,60	0,12	<b>19,25</b>
FVIII:C 1,0%	0,95	0,90	0,10	<b>10,23</b>
FVIII:C 1,5%	1,33	1,30	0,22	<b>16,64</b>
FVIII:C 3,0%	2,64	2,70	0,47	<b>17,69</b>

Selon les recommandations du GFHT (Groupe Français d'Hémostase et Thrombose) le coefficient de variation recommandé pour le dosage de FVIII:C est de 7,9% et acceptable jusqu'à 9,5%.

Ces recommandations ont été élaborées d'après les données de CQI (contrôle de qualité interne) portant sur une étendue de mesure de 35,0% à 99,0% : elles ne sont donc pas adaptées aux valeurs très basses (FVIII:C < 10,0%).

Concernant la dispersion des résultats, aucune valeur n'est au-delà de l'intervalle moyenne  $\pm 2$  x écart-types.

	0,0%	0.3%	0.7%	1.0%	1.5%	3.0%
$m \pm 2\sigma_{CQI}$	0,00	0,18 $\pm$ 0,16	0,6 $\pm$ 0,24	0,95 $\pm$ 0,20	1,33 $\pm$ 0,44	2,64 $\pm$ 0,94

m : moyenne

$\sigma_{CQI}$  : Ecart-type contrôle interne de qualité

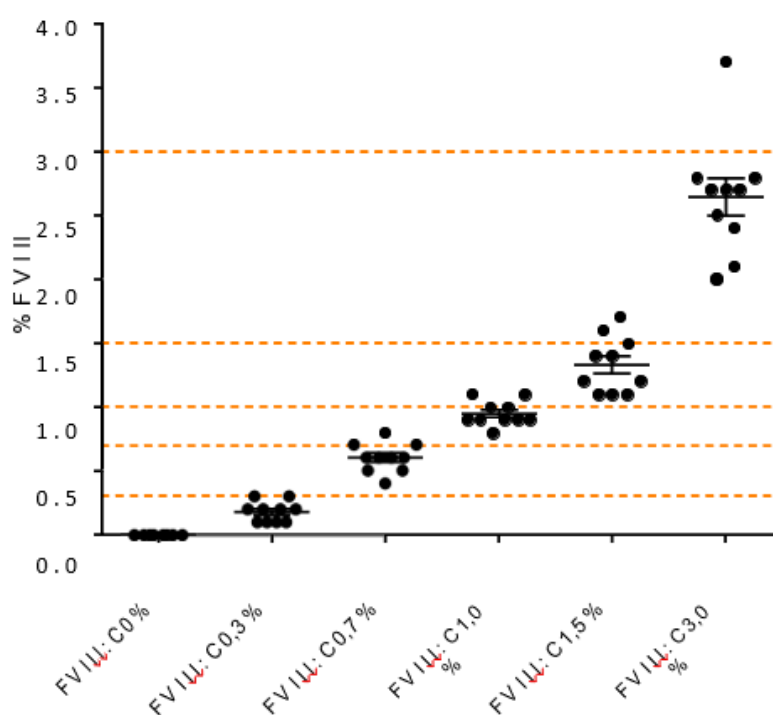


Figure n° 4 : Reproductibilité du FVIII:C à des concentrations comprises entre 0,0% et 3,0%

### III.2 Comparaison inter-laboratoire

Trois échantillons ont été envoyés dans 24 centres français et ont été dosés en triplicate. La moyenne des triplicate a été prise comme résultat du centre.

Tableau n°8 : Comparaison inter-laboratoire avec 24 centres français

	ECHANTILLON 1	ECHANTILLON 2	ECHANTILLON 3
Laboratoire (nombre de réponses)	15	24*	24*
FVIII:C Moyenne $m_p$ (%) Ensemble	0,5	1,0	1,80
FVIII:C Moyenne $m_p$ (%) Groupe de pairs	0,4	0,97	1,72
Ecart-type $\sigma_p$ Ensemble	0,2	0,3	0,5
Ecart-type $\sigma_p$ Groupe de pairs	0,15	0,29	0,43
CV (%)	45,0	32,0	29,83
Biais (%)	-28,6	-17,5	-12,8
<b>Notre résultat</b>	0,2	0,8	1,5
<b>z-score</b>	-0,65	-0,55	-0,50

\*Un centre n'a pas répondu, deux centres nous ont rendus 2 résultats (2 automates différents)

Pour l'échantillon 1, neuf résultats ont été exclus car rendus incoagulables sur les différentes triplicate.

D'après le GFHT, le biais maximum recommandé pour l'inexactitude est de 15,5% et le biais maximum acceptable est de 18,8%. Cependant, comme pour les normes GFHT de reproductibilité, ces normes ont été établies à partir de données d'EEQ (Evaluation Externe de la Qualité) avec une étendue de valeurs de FVIII:C de 10,5 à 118,0%, elles ne sont donc pas adaptées aux valeurs très basses (FVIII:C < 10,0%).

### III.3 Incertitude de mesure

Tableau n° 9 : Incertitude de mesure étendue

	CQI +/- EEQ
Niveau 1	0,18 +/- 0,18
Niveau 2	0,6 +/- 0,31
Niveau 3	1,33 +/- 0,51

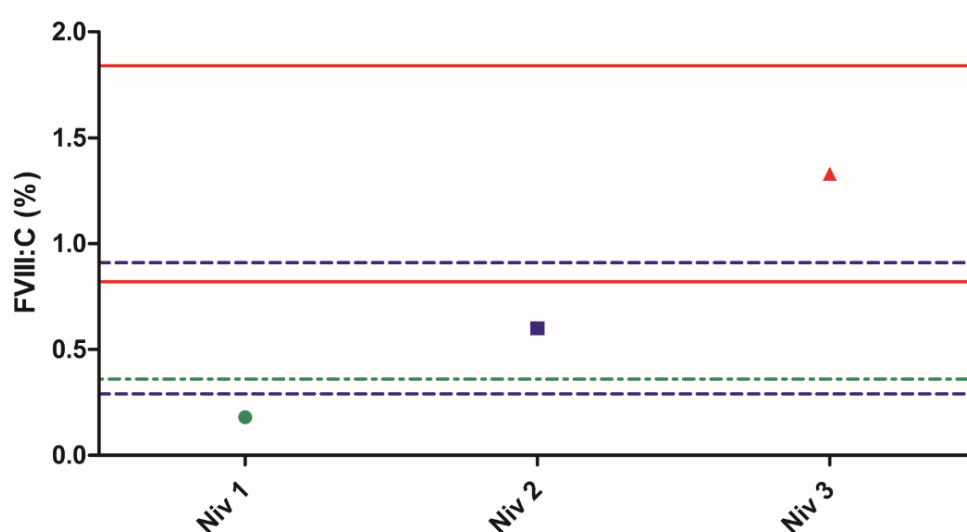


Figure n°9 : Incertitude de mesure CQI +/- EEQ

Ricos (Spécifications souhaitables pour l'erreur totale, l'imprécision et le biais, découlant de la variation biologique intra- et inter-individuelle) préconise une limite maximale acceptable d'incertitude de mesure de 10,5%. Cependant, comme pour le GFHT, ces données n'ont pas été obtenues sur des valeurs de FVIII:C < 10,0%.

A notre connaissance, il n'existe pas de normes ou de recommandations sur les incertitudes de mesures maximales acceptables pour les valeurs très basses (< 10%) du FVIII:C.

Ces premiers résultats de validation de méthode de dosage de FVIII:C ultra-bas nous indiquent que pour des valeurs comprises entre 0,3% et 3,0%, nous retrouvons des

variations très faibles entre les différentes valeurs ( $< 0,2\%$ ) ce qui est très satisfaisant. En revanche, le CV est élevé du fait que nous travaillons sur des valeurs très basses. De plus, au vu de la figure n°4, nous sommes en mesure de différencier un FVIII:C à 0,3%, 0,7%, 1,0%, 1,5% et 3,0% avec très peu de recouvrement entre ces différentes valeurs. Malheureusement, nous n'avons pas de norme de CV adaptée à des valeurs de FVIII:C  $< 10,0\%$ . Dans un deuxième temps, nous avons réalisé une comparaison inter-laboratoires avec 24 laboratoires d'hémostase français afin de déterminer l'incertitude de mesure sur des valeurs de FVIII:C  $< 3,0\%$ . A notre connaissance il n'y a pas de recommandations pour des valeurs de FVIII:C  $< 10,0\%$ , mais l'incertitude de mesure retrouvée lors de ce travail nous permet, au vu de la figure n°5, d'affirmer qu'il est possible de différencier des taux de FVIII:C ultra-bas avec très peu de recouvrement.

## **DEUXIEME PARTIE : Patients suivis au CHU de Nantes**

Nous avons voulu étudier l'application de la méthode de dosage des FVIII:C ultra-bas chez des patients hémophiles A sévères et modérés suivis au CHU de Nantes pour ensuite comparer ce taux de FVIII:C à la mutation génétique retrouvée chez ces patients, au dosage antigénique du FVIII ainsi qu'au test de génération de thrombine (TGT).

### **IV. Matériels et méthodes**

#### **IV.1 Patients :**

Nous avons étudié les résultats de 34 patients de sexe masculin, suivis au CHU de Nantes, hémophiles A sévères ou modérés :

- 21 patients porteurs d'une hémophilie A sévère précédemment diagnostiqués avec un taux de FVIII:C  $< 1,0\%$ .
- 13 patients porteurs d'une hémophilie A modérée précédemment diagnostiqués avec un taux de FVIII:C compris entre 1,0 et 5,0%.

Les 34 patients étudiés n'ont pas reçu de traitement substitutif (FVIII exogène) dans les 7 derniers jours précédant le prélèvement. De plus, aucun de ces patients ne présentaient

un inhibiteur anti-FVIII le jour du prélèvement, risquant de sous-estimer nos résultats. Cependant cinq patients avaient un antécédent d'inhibiteur.

## **IV.2 Méthodes :**

### **1) Dosage du FVIII:C**

Nous avons dosé le FVIII:C selon la technique précédemment validée dans la première partie sur ces 34 plasmas sur l'automate ACL top550® avec le déficient FVIII Cryopep® et la céphaline APTT Synthasil® du laboratoire Werfen®. Le dosage a été réalisé en triplicate à la dilution 1/5<sup>ème</sup>. Nous avons aussi dosé le TCK pour ces patients, avec la céphaline STA®-CK Prest® du laboratoire Stago®.

### **2) Dosage antigénique du FVIII**

Le dosage antigénique (FVIII:Ag) du FVIII a été réalisé grâce au kit ASSECRHOM® de STAGO® par méthode ELISA. Les dosages ont été réalisés en duplicate au pur 1/1 et à la dilution de 1/2.

### **3) Test de génération de thrombine (TGT)**

Le test de génération de thrombine (TGT) a été réalisé sur l'automate Thrombinograph™ du laboratoire Stago®. Le TGT permet d'apprécier la capacité d'un plasma à générer de la thrombine in vitro suite à une activation par du facteur tissulaire en présence de phospholipides et de calcium(35).

Nous avons réalisé les TGT avec deux concentrations de facteur tissulaire : 0,5 et 1 pMol.

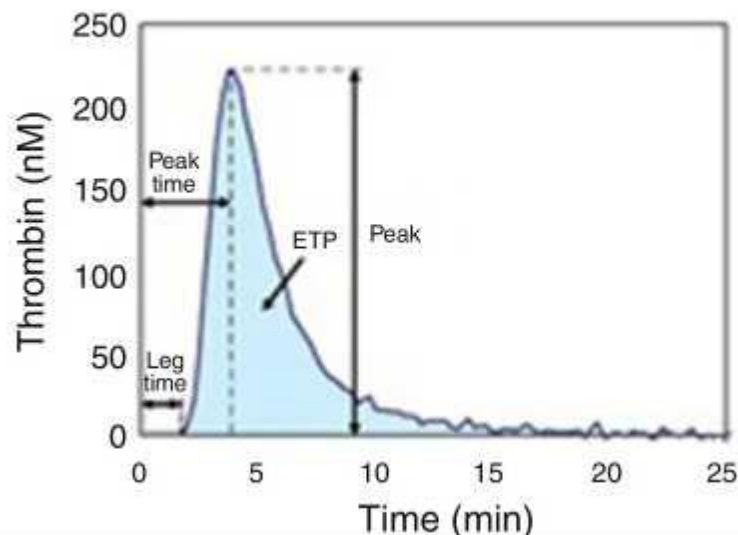


Figure n°6 : Courbe de génération de thrombine

L'analyse des résultats se fait sur la dérivée première de la courbe de génération de fluorescence corrigée de l'effet de l' $\alpha_2$ macroglobuline et transformée en unités de thrombine. Cette courbe permet de mesurer différents paramètres appréciant l'efficacité de la coagulation :

- Le « Lag time », ou latence correspond au délai entre l'ajout de l'activateur ( $\text{CaCl}_2$ ) et le début de la formation du caillot. Ce temps met en évidence l'initiation du processus de coagulation. L'unité est la minute.
- L'ETP pour « Endogen Thrombin Potential », (appelé parfois AUC pour Area Under Curve), ou potentiel de thrombine endogène, correspond à la totalité de thrombine générée sous la courbe. Il est exprimé en  $\text{nM} \times \text{min}$ .
- Le « peak » (ou  $\text{C}_{\text{max}}$  pour concentration maximale) est la quantité maximum de thrombine en  $\text{nM}$  qui a été générée lors du test à un temps  $T$  appelé  $T_{\text{max}}$ .
- 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 »).

- La vélocité correspondant au rapport pic de thrombine / (temps nécessaire au pic moins le temps de latence)(36).

## V. Résultats

### V.1 Dosage des FVIII:C des patients hémophiles A

Sur la base de nos résultats de validation de méthode et en s'aidant de Matsumoto(34) nous avons défini plusieurs catégories d'hémophilies A mineures et modérées.

- « *extremely severe* » pour un FVIII :C entre 0,0 et 0,3%
- « *modestly severe* » pour un FVIII :C entre 0.3 et 1.5%
- Hémophilie modérée pour un FVIII:C > 1,5%

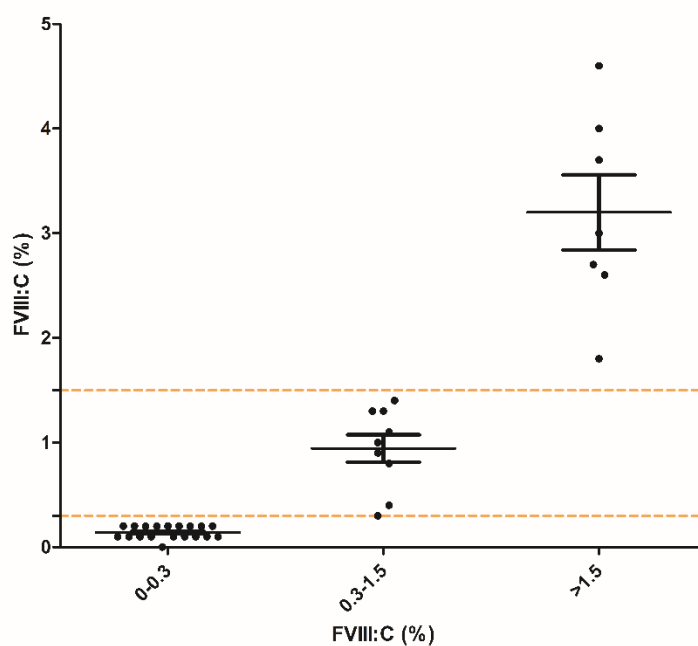


Figure n°7 : Dosage des FVIII:C de 34 patients hémophiles A suivis au CHU de Nantes



Sur les 34 patients, 18 présentaient un taux de FVIII:C < 0,3% (moyenne : 0,2% + /- écart-type : 0,1%, étendue : [0,0-0,2%]).

Neuf patients présentaient un taux de FVIII:C compris entre 0,3% et 1,5% (1,06% + /- 0,3%, [0,3-1,4%]).

Enfin, 7 patients présentaient un taux de FVIII:C > 1,5% (3,4% + /- 0,7%, [1,8-4,6%]).

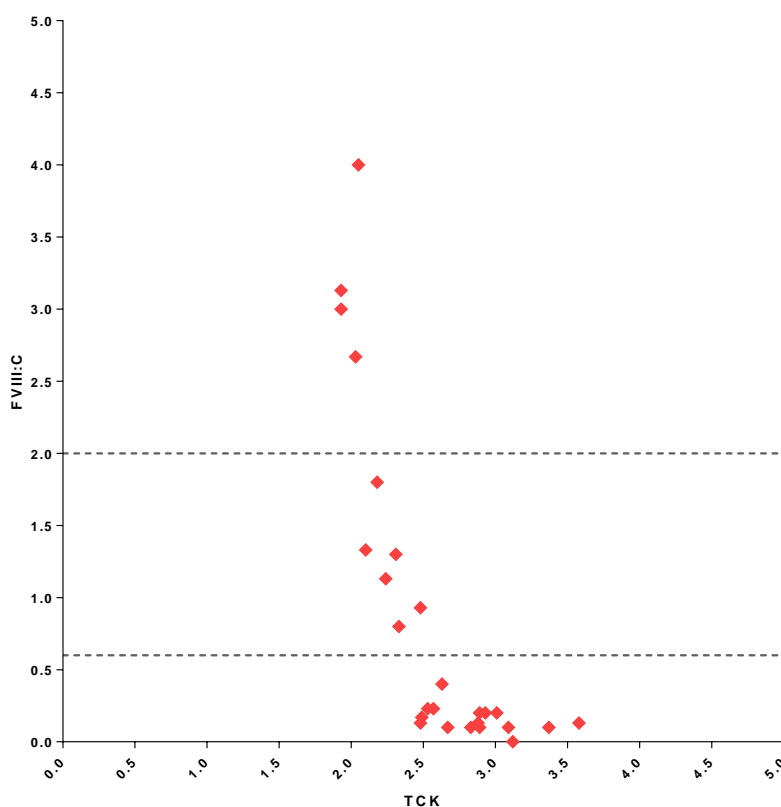


Figure n°8 : Comparaison des taux de FVIII:C obtenus par rapport au TCK

Sur les 34 patients étudiés, pour un TCK > 2,5, les FVIII:C retrouvés sont  $\leq$  0,3%.

## V.2 Comparaison du taux de FVIII:C à la mutation génétique

Nous avons comparé les résultats de FVIII:C obtenus chez nos 34 patients à la mutation génétique.

Tableau n°9 : Type de mutation génétique du FVIII retrouvée chez les 34 patients

	<i>Extremely severe</i> FVIII:C < 0,3%	<i>Modestly severe</i> FVIII:C 0,3-1,5%	<i>Moderate</i> FVIII:C > 1,5%
Inversion intron 22	8	-	-
Inversion intron 1	1	-	-
Codon stop	4 - p.Ser910X - p.Ser1414* - p.Trp2015* - p.Trp979*	-	-
Frameshift	2 -p.Glu1101Argfs*37 -p.Leu566Profs*13	3 -p.Ile1213Asnfs*28 -p.Asn1460Lysfs*2 -p.Arg48Serfs*38	-
Faux sens	3 -p.Ile668Pro -p.Gly565Ala -p.Gly565Ala	6 -p.Arg2323Cys -p.Arg2228Gln -p.Arg2323Cys -p.pro165Met -p.Arg2182His -p.Ser260Cys	7 -p.Ala2203Pro -p.Val445Leu -p.Arg391His -p.Gln2265His -p.Ala2203Pro -p.Ala723Thr -p.Gln2265His

Parmi les cinq patients présentant un antécédent d'inhibiteur, quatre sont classés *extremely severe* (FVIII:C < 0,3%) : 2 inversions de l'intron 22, une inversion de l'intron 1, et un codon stop. Le cinquième, *modestly severe*, est porteur d'une mutation faux-sens.

### **V.3 Comparaison des FVIII ultra-bas au dosage antigénique du FVIII**

Les résultats obtenus ne nous ont pas paru pertinents.

Dans la courbe de calibration établie de 0 à 50% selon les recommandations du fabricant la valeur minimale (blanc) donnait un résultat à 0,3% de FVIII:Ag.

Le 100% de la calibration était effectué sur une dilution du calibrant au 1/20<sup>ème</sup>. Les plasmas des patients ont été testés en duplicate au pur 1/1 et à la dilution de 1/2.

Les contrôles de qualité sortaient dans les cibles attendues pour les valeurs supérieures à 3,0%. Cependant le contrôle de qualité ayant pour valeur cible 0,3% donnait un résultat à 0,6%, ce qui ne nous semble pas satisfaisant vu notre objectif de travail.

De plus, nous avons eu des résultats discordants concernant nos duplicatas.

Au total nous considérons que dans notre pratique, cette technique ne nous paraît pas fiable et nous préférons ne pas l'intégrer dans nos résultats.

### **V.4 Comparaison des FVIII ultra-bas au test de génération de thrombine**

Le test de génération de thrombine (TGT) a été réalisé chez 19 des patients inclus. Neuf d'entre eux avaient un FVIII:C < 0,3%. Les résultats entre les 3 groupes sont significativement différents (Mann-Whitney  $p < 0,01$ ). Chez les patients avec FVIII:C < 0,3%, le potentiel de thrombine endogène (ETP) était significativement plus faible (moyenne : 188,8 +/- écart-type : 81,1 étendue : [60-334] nM/min) que chez les patients dont le FVIII:C se situait entre 0,3 et 1,5 % (354,9 +/- 95,0 [239-493] nM/min) et ceux dont le FVIII:C se situait entre 1,5 et 4,0% (695,0 +/- 167,4 [518-907] nM/min). Il existe un chevauchement des valeurs d'ETP entre les patients avec FVIII:C < 0,3% et ceux entre 0,3 et 1,5% mais pas entre les patients < 1.5% et > 1.5%.

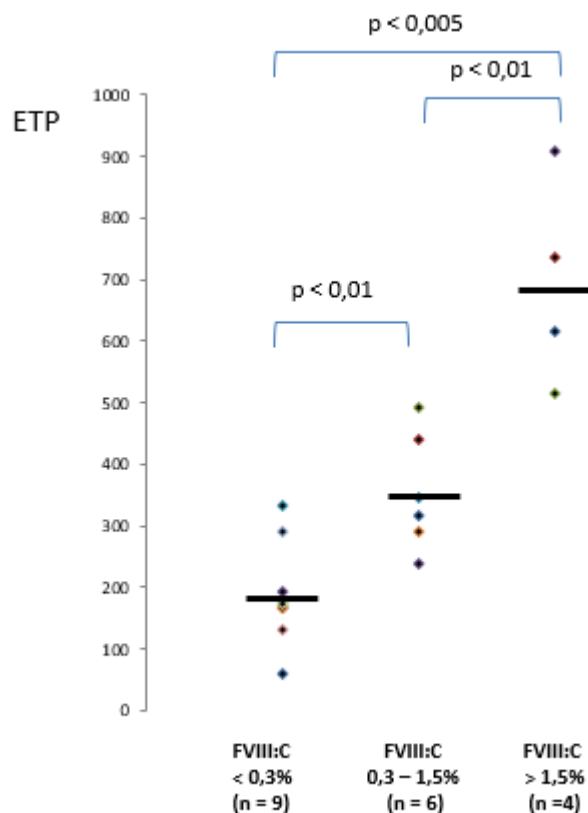


Figure n°10 : Graphe représentant L'ETP en fonction du taux de FVIII:C

La corrélation entre les valeurs de FVIII:C et les ETP est excellente (Pearson  $p < 0,0001$ ).

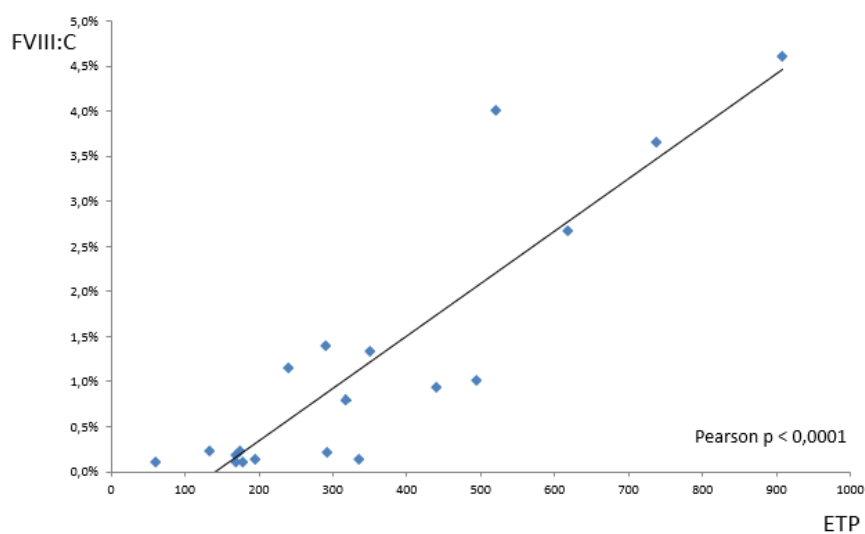


Figure n°11 : Courbe de corrélation entre l'ETP et le taux de FVIII:C

Dans cette deuxième partie de travail, les résultats obtenus permettent de comparer les taux de FVIII:C obtenus chez des patients suivis au CHU de Nantes n'ayant pas reçu de traitement substitutif depuis plus de 7 jours au génotype et au test de génération de thrombine.

Ces résultats nous ont permis de proposer 3 catégories d'hémophilie en s'appuyant sur l'étude de Mastumoto et al de 2017 : *extremely severe* < 0,3%, *modestly severe* entre 0,3 et 1,5% et *moderate* > 1,5%.

En comparant nos résultats de dosage de FVIII:C à la génétique nous observons que les patients qui présentent une mutation génétique associée, dans les bases de données internationales, à un phénotype sévère (inversion intron 1, 22, codon stop, frameshift et faux-sens associé à un phénotype sévère) ont tous un FVIII:C < 0,3%. De plus ces mêmes patients présentent un ETP sur TGT, significativement plus bas (188,8 +/- 81,1 [60-334] nM/min) que les patients *modestly severe* ou *moderate*.

## VI. Discussion

En 2014, les recommandations de l'ISTH ont confirmé la définition de la sévérité de l'hémophilie A basée sur le taux de FVIII:C en différenciant l'hémophilie sévère (FVIII:C < 1,0%) de l'hémophilie modérée (FVIII:C ≥ 1,0%). Cette définition de l'hémophilie sévère est importante puisque la prise en charge initiale du jeune patient en dépend. En particulier, les recommandations françaises publiées en 2009(37) sur la prise en charge de ces patients précise que, dans tous les cas, et avant l'âge de 3 ans, un enfant porteur d'hémophilie sévère doit être en prophylaxie. Ainsi, même si un sujet hémophile avec un dosage de FVIII:C < 1,0% n'a pas eu d'hémarthrose, une prophylaxie aura le plus souvent été instaurée. En revanche, pour ce qui concerne les patients avec des taux de FVIII:C ≥ 1,0%, la prophylaxie n'est pas systématique, il est donc indispensable que les laboratoires possèdent des méthodes robustes de dosage du FVIII:C.

Il est difficile aujourd'hui de retrouver dans la littérature une explication à ce taux de « < 1,0% » pour définir le caractère sévère de l'hémophilie. Est-ce du fait de performances longtemps limitées des dosages d'activité du FVIII:C, que les auteurs ont caractérisé « inférieur à la limite de détection de la technique » c'est-à-dire « < 1,0% »,

pour ne pas répondre « 0% » ? Cependant, en 2021, les performances techniques de dosages des facteurs de coagulation se sont améliorées et nous avons voulu évaluer les performances des méthodes de dosage de FVIII:C < 3,0% en termes de reproductibilité et d'incertitude de mesure. En effet, Il existe peu de données sur les performances des dosages de FVIII:C < 1,0%. Une évaluation par l'ECAT sur un plasma avec un taux de FVIII:C < 1,0% a été réalisée en 2010 : les résultats sont très discordants entre les différents laboratoires.

Dans un premier temps, nous avons étudié la reproductibilité de la méthode en passant 6 échantillons de plasmas avec des FVIII:C compris entre 0,0% et 3,0% en utilisant la méthode de dosage chronométrique de routine du FVIII:C. Nous avons observé que pour un FVIII:C à 0,0%, les plasmas sont systématiquement incoagulables ; les taux de FVIII:C peuvent donc être rendus inférieurs à notre seuil de détection, c'est-à-dire FVIII:C < 0,3%. Pour les valeurs comprises entre 0,3% et 3,0%, le CV est élevé (entre 10 et 45%). Malheureusement, les normes recommandées par le GFHT qui ont été établies sur une étendue de valeurs du FVIII:C comprises entre 35,0% et 99,0%, ne sont donc pas applicables ici et nous n'avons donc pas de normes de CV adaptées à des valeurs de FVIII:C < 10,0%. Cependant nos résultats montrent que la variation est très faible entre les différentes valeurs et nous sommes en mesure de différencier un FVIII:C à 0,3%, 0,7%, 1,0%, 1,5% et 3,0% avec très peu de recouvrement entre ces différentes valeurs (figure n°4).

Dans un deuxième temps, nous avons déterminé l'incertitude de mesure sur des valeurs de FVIII:C < 3,0% grâce à une comparaison inter-laboratoires avec 24 laboratoires d'hémostase français. Chaque laboratoire a dosé en triplicate 3 échantillons avec comme valeur attendue de FVIII:C de 0,0%, 0,7% et 1,4% nous permettant d'évaluer le biais, notre z-score et enfin avec les résultats de la reproductibilité notre incertitude de mesure. Comme pour les résultats de reproductibilité les normes recommandées ou acceptables du GFHT et de RICOS pour le biais et l'incertitude de mesure ont été établis pour des étendues de valeurs de FVIII:C comprises entre 35,0% et 99,0%. Cependant au vu des résultats obtenus il nous paraît possible de différencier les taux de FVIII:C ultra-bas.

Les limites de notre travail concernent la reproductibilité puisque le nombre de résultats paraît insuffisant pour valider définitivement la méthode. Lors de cette étude, nous avons travaillé essentiellement sur l'incertitude de mesure mais il nous reste à étudier l'exactitude de la méthode de dosage des FVIII:C  $< 1,0\%$  car le calibrateur utilisé était décrit comme contenant 95% de FVIII:C (WHO-Standard) et a été dosé à 102% dans nos conditions méthodologiques. Enfin, la dilution du calibrateur dans du plasma déficient en FVIII apporte un biais sur le taux exact de FVIII:C dans les plasmas avec taux « ultra-bas » de FVIII:C.

A notre connaissance, il y a dans la littérature peu d'études méthodologiques comparables et aucune recommandation pour des valeurs de FVIII:C  $< 10,0\%$ . Lorsqu'on cherche à comparer nos résultats avec ceux de la littérature scientifique, on est surpris de ne retrouver que 3 publications s'intéressant à ces considérations méthodologiques :

- En 2006, Yatuv et al. a publié une étude dans Haemophilia sur, les dosages de FVIII:C par méthode chromogénique pour des valeurs  $< 1,0\%$  en modifiant le kit commercial Coamatic® (Chromogenix®). Il a ainsi pu obtenir une limite de détection à 0,05% et une limite de quantification à 0,15% permettant un dosage précis de FVIII:C sur une étendue de 0,1% à 2,0%(38).
- En 2007, Matasumoto et al., en utilisant la méthode basée sur les tests de génération de thrombine, a rapporté sa capacité à doser des taux très bas de FVIII:C et une bonne corrélation entre un FVIII:C  $< 0,2\%$  et une clinique hémorragique majorée. Depuis cette première publication, cette méthodologie n'a, à notre connaissance, pas été reprise(39).
- En 2017, cette même équipe a utilisé une autre technique basée sur le « Clot Waveform Analysis » sur l'automate Sysmex et rapporte de bons résultats permettant une excellente discrimination pour des valeurs de FVIII:C ultra-basses (40).

Dans la seconde partie de ce travail, nous avons voulu évaluer la pertinence de ces dosages « ultra-bas » chez des patients hémophiles A suivis au CHU de Nantes. Il nous a semblé pertinent d'étudier des échantillons de patients à distance de tout traitement par FVIII exogène. La demi-vie la plus longue constatée pour les concentrés de FVIII concerne l'émorococog alfa (Elocta®) et est évaluée au maximum à 24 heures(41). Ainsi, considérant l'absence de traitement chez les patients depuis au moins 7 jours, on peut considérer l'absence de FVIII exogène pouvant surestimer nos résultats de FVIII:C. De même, l'absence d'inhibiteur anti-FVIII permet d'éliminer un élément qui aurait pu sous-estimer nos résultats.

Nous avons dosé les FVIII:C des 34 patients après notre validation de méthode de dosage des FVIII:C ultra-bas. Nous avons dosé le FVIII:C en triplicate. Sur les 34 patients, 18 présentent un FVIII:C < 0,3%, 9 patients entre 0,3% et 1,5% et 7 patients > 1,5%.

Nous avons ensuite comparé ces résultats à la mutation génétique retrouvée chez ces 34 patients lors du diagnostic d'hémophilie. La génétique conforte nos résultats de FVIII:C. En effet tous les patients présentant une mutation nulle, induisant une absence totale de synthèse de FVIII sont classés comme *extremely severe* (FVIII :C < 0,3%). Trois mutations faux-sens donnent également ce phénotype et sont déjà caractérisées ainsi par les bases de données internationales. La majorité des patients qualifiés *modestly severe* ou *moderate* sont porteurs d'une mutation faux-sens. Pour ce qui concerne les mutations frameshift, l'interprétation est plus délicate, puisque répartie sur plusieurs catégories de patients.

Malheureusement, la technique du dosage de FVIII:Ag ne nous a rien apporté dans ce travail et ne nous paraît pas pertinente pour travailler sur des valeurs aussi faibles de FVIII:C. Une étude de Spina et al, en 2018 a comparé le taux de FVIII:Ag résiduel à la mutation génétique pour rechercher une corrélation entre le risque d'apparition d'inhibiteur et le génotype. Nous avons utilisé le même kit ASSECHROM® du laboratoire Stago®, mais leurs résultats ne peuvent être comparés aux nôtres puisqu'ils ont réalisé leur étude avec pour cut-off un FVIII:Ag indétectable lorsque celui-ci était < 1,0%(42).



Nous avons ensuite voulu comparer les taux de FVIII:C obtenus chez 19 de ces patients au test de génération de thrombine (TGT). Ce dernier test conforte également nos résultats car pour chez les patients avec FVIII :C < 0.3%, le potentiel de thrombine endogène (ETP) était significativement plus faible (188,8 +/- 81,1 [60-334] nM/min) que chez les patients dont le FVIII:C se situait entre 0,3 et 1,5 % (354,9 +/- 95,0 [239-493] nM/min) et ceux dont le FVIII:C se situait entre 1,5 et 4,0% (695,0 +/- 167,4 [518-907] nM/min). Il existe un chevauchement des valeurs d'ETP entre les patients avec FVIII:C < 0,3% et ceux entre 0,3 et 1,5% mais pas entre les patients < 1.5% et > 1.5%.

Enfin, tous les patients présentant un ETP faible étaient porteurs de mutations très délétères (3 inversions de l'intron 22, 1 inversion de l'intron 1, 2 mutations frameshift et 3 mutations faux-sens connues auparavant avec un phénotype sévère). Nos résultats sont en accord avec ceux de Dargaud et al en 2005(43) qui montre que TGT peut prédire la sévérité de l'hémophilie. Nos résultats confirment que la coagulation est plus altérée chez les *extremely severe* (< 0,3%)

Les principales limites de cette seconde partie de travail sont un nombre de patients limité. En effet, du fait du traitement prophylactique largement instauré chez les hémophiles sévères, et suivis au CHU de Nantes, il a été difficile d'inclure beaucoup de patients n'ayant pas reçu de FVIII exogène dans les 7 derniers jours précédant la consultation.

Se pose la question de la pertinence de ces nouvelles catégories d'hémophilie A sévère. Les formes les plus sévères que Carcao définissait par la génétique correspondent bien avec nos résultats(31). Ces patients porteurs de mutations nulles pour Carcao et *extremely severe* pour nous, seraient donc les plus à risque de manifestations hémorragiques. Ces patients justifient donc pleinement la mise en place d'une prophylaxie précoce pour éviter les séquelles graves des saignements, en particulier des complications articulaires.

Mais quid des patients non *extremely severe* . Parmi les patients qualifiés dans ce travail comme *modestly severe*, 3 étaient considérés comme sévères (FVIII:C < 1,0%) et ont bénéficié d'une prophylaxie systématique et précoce, sans parfois attendre la

survenue d'hémarthroses. Pour les autres, la prophylaxie n'a pas été systématique. Il est régulièrement rapporté qu'il existe une hétérogénéité clinique chez les patients hémophiles sévères : certains patients présentant moins de manifestations hémorragiques(44).

Est-ce que cette hétérogénéité n'est pas simplement le reflet de nos deux classes d'hémophilie sévère (*extremely vs modestly severe*) ? Justifient-ils tous de la même façon d'une prophylaxie précoce ? De même certains patients considérés comme hémophiles modérés par leur taux de FVIII :C > 1,0% présentent de réelles complications hémorragiques et parfois une arthropathie hémophilique. Ces patients auraient probablement tiré avantage de la mise en place d'un traitement prophylactique précoce. Ici aussi, cette hétérogénéité n'est-elle pas due à deux type de patients différents (*modestly severe* versus *moderate*). Pour répondre à ces différentes questions et étoffer ce travail, il serait nécessaire de comparer ces résultats obtenus à la clinique des patients par la réalisation d'un score clinique en s'inspirant du travail de Pavlova et al (2013) en prenant en compte l'âge de survenue du premier accident hémorragique, le nombre de saignements par an et le nombre d'injections par an(45). Cela permettrait potentiellement de confirmer le phénotype hémorragique sévère de certaines mutations génétiques mais cette étude est probablement impossible à envisager aujourd'hui en France du fait de l'instauration précoce de la prophylaxie selon les recommandations françaises de 2009.

En conclusion, ce travail nous permet de nous poser de nombreuses questions concernant la pertinence de la classification actuelle de l'hémophilie A et il serait intéressant de pousser les investigations plus loin sur un nombre plus important de patients et en comparant, idéalement, ces résultats au phénotype clinique. Nos résultats pourraient même remettre en cause les définitions actuelles de l'hémophilie A sévère ou modérée. Cliniquement, cela pourrait surtout permettre éventuellement d'introduire un traitement prophylactique, lourd et contraignant de façon optimale, seulement au « cas par cas » en ne prenant pas uniquement en compte le taux de FVIII :C inférieur ou supérieur strict à 1,0% mais peut-être des valeurs de FVIII :C plus basses, éventuellement aidé du génotype et des résultats du test de génération de thrombine.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Franchini M, Mannucci PM. Hemophilia A in the third millennium. *Blood Rev.* juill 2013;27(4):179-84.
2. Stonebraker J, Bolton-Maggs P, Michael Soucie J, Walker I. A study of variations in the reported haemophilia A prevalence around the world. *Haemophilia.* 2010;20-32.
3. Réseau Francecoag - Assistance Publique - Hôpitaux de Marseille. Disponible sur: [https://www.francecoag.org/SiteWebPublic/public/stats/stats\\_page.jsp?stat2=on](https://www.francecoag.org/SiteWebPublic/public/stats/stats_page.jsp?stat2=on)
4. Sampol J, Arnoux D, Bouché B. Manuel d'hémostase. Paris : Editions scientifiques et médicales Elsevier; 1999; 772p. In.
5. Sebahoun G. Hématologie clinique et biologique. In: 2ème. Rueil-Malmaison: Arnette; 2005. p. 578.
6. Anthony K, Chan C. The coagulation system in human. In: *Haemostasis Methods and Protocols.* Paul Monagle; 2013. p. 3-12.
7. Clemetson KJ. Platelets and Primary Haemostasis. *Thromb Res.* mars 2012;129(3):220-4.
8. Austin SK. Haemostasis. *Medicine (Baltimore).* avr 2017;45(4):204-8.
9. Giannelli F, Green PM. 1 The molecular basis of haemophilia A and B. *Baillière's Clin Haematol.* juin 1996;9(2):211-28.
10. Peake I, The molecular basis of haemophilia A, *Haemophilia,* 1998-07;4(4):346-9
11. Toole J, Knopf J, Wozney J, Sultzman L. Molecular cloning of a cDNA encoding human antihaemophilic factor. 1984. *Biotechnology.* 1992;310.
12. Srivastava A, Brewer AK, Mauser-Bunschoten EP, Key NS, Kitchen S, Llinas A, et al. Guidelines for the management of hemophilia. *Haemophilia.* janv 2013;19(1):e1-47.
13. Dijk K, Fischer K, Bom JG, Grobbee DE, Berg HM. Variability in clinical phenotype of severe haemophilia: the role of the first joint bleed. *Haemophilia.* sept 2005;11(5):438-43.
14. Berntorp E, Young G, Identifying non-responsive bleeding episodes in patients with haemophilia and inhibitors: a consensus definition, *Haemophilia,* 2011-01;17(1):e202-10
15. Gringeri A. Cost of care and quality of life for patients with hemophilia complicated by inhibitors: the COCIS Study Group. *Blood.* 5 juin 2003;102(7):2358-63.
16. Peyvandi F, Garagiola I, Young G. The past and future of haemophilia: diagnosis, treatments, and its complications. *The Lancet.* juill 2016;388(10040):187-97.

17. Seon Park J, Nam Ryu K. Hemophilic Pseudotumor Involving the Musculoskeletal System Spectrum of Radiologic Findings, *AJR Am J Roentgenol*, 2004-07;183(1):55-61
18. Stafford JM, James TT, Allen AM, Dixon LR. Hemophilic Pseudotumor: Radiologic- Pathologic Correlation. *RadioGraphics*. juill 2003;23(4):852-6.
19. Mannucci PM, Ruggeri Z, Pareti F, Capitanio A. 1-Deamino-8-d-arginine vasopressin: a new pharmacological approach to the management of haemophilia and von Willebrands' diseases. *Lancet*. 1977;869-72.
20. Makris M, Oldenburg J, Mauser-Bunschoten EP, Peerlinck K, Castaman G, Fijnvandraat K, et al. The definition, diagnosis and management of mild hemophilia A: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost*. déc 2018;16(12):2530-3.
21. Hazendonk HCAM, van Moort I, Mathôt RAA, Fijnvandraat K, Leebeek FWG, Collins PW, et al. Setting the stage for individualized therapy in hemophilia: What role can pharmacokinetics play? *Blood Rev*. juill 2018;32(4):265-71.
22. Livnat T, Budnik I, Levy-Mendelovich S, Avishai E, Misgav M, Barg AA, et al. Combination of hemostatic therapies for treatment of patients with hemophilia A and inhibitors. *Blood Cells Mol Dis*. juill 2017;66:1-5.
23. Qu'est-ce que l'hémophilie acquise ? AFH. Disponible sur: <https://afh.asso.fr/je-minforme/comprendre-les-maladies-hemorragiques/hemophilie/hemophilie-acquise/>
24. Oldenburg J, Mahlangu JN, Kim B, Schmitt C, Callaghan MU, Young G, et al. Efficacy of Emicizumab Prophylaxis in Hemophilia A with Inhibitors. *N Engl J Med*. 31 août 2017;377(9):809-18.
25. Shima M, Hanabusa H, Taki M, Matsushita T, Sato T, Fukutake K, et al. Factor VIII– Mimetic Function of Humanized Bispecific Antibody in Hemophilia A. *N Engl J Med*. 26 mai 2016;374(21):2044-53.
26. Perrin Q, Herzog W, Markusic D. Update on clinical gene therapy for hemophilia. *Blood*
27. Chowdhry, Pratima, Anti-tissue factor pathway inhibitor (TFPI) therapy : a novel approach to the treatment of haemophilia, *International Journal of Hematology*, 2020-01; 42-50
28. Machin, Nicoletta, An investigational RNAi therapeutic targeting antithrombin for the treatment of hemophilia A and B, *Journal of Blood Medicine*, 2018: 135-140
29. Potgieter J, Hillarp A. One-stage vs. chromogenic assays in haemophilia A, *Eur J Haematol*. 2015-02;94
30. Saint-Louis J, Cloutier S. Détermination de la concentration du facteur VIII par méthode chromogène. INESSS; 2017.

31. Jayandharan GR, Srivastava A. The phenotypic heterogeneity of severe hemophilia. *Semin Thromb Hemost.* févr 2008;34(1):128-41.
32. Nogami K, Shima M. Phenotypic heterogeneity of hemostasis in severe hemophilia. *Semin Thromb Hemost.* nov 2015;41(8):826-31.
33. Carcao MD, Marijke van den Berg H, Ljung R, Mancuso ME. Correlation between phenotype and genotype in a large unselected cohort of children with severe hemophilia A. *Blood. Thrombosis and hemostasis.* 2013;
34. Verbruggen B, Meijer P, NOVÁKOVA I, Heerde WV. Diagnosis of factor VIII deficiency. *Haemophilia.* 2008;14(s3):76-82.
35. Duarte, R. C. F., Ferreira, C. N., Rios, D. R. A., Reis, H. J. dos & Carvalho, M. das G. Thrombin generation assays for global evaluation of the hemostatic system: perspectives and limitations. *Rev. Bras. Hematol. E Hemoter.* **39**, 259–265 (2017).
36. Hemacore. Thrombodynamics parameters. Disponible sur <https://thrombodynamics.com/>
37. Meunier, Trossaërt, Chambost, French guidelines. Long-term prophylaxis for severe haemophilia A and B children to prevent haemophiliac arthropathy, *La société Française de Pédiatrie*, 2009-12; 171-1578.
38. Yatuv R, Dayan I, Baru M. A modified chromogenic assay for the measurement of very low levels of factor VIII activity (FVIII:C). *Haemoph Off J World Fed Hemoph.* mai 2006;12(3):253-7.
39. Matsumoto T, Nogami K, Ogiwara K, Shima M. A modified thrombin generation test for investigating very low levels of factor VIII activity in hemophilia A. *Int J Hematol.* déc 2009;90(5):576-82.
40. Matsumoto T, Nogami K, Tabuchi Y, Yada K, Ogiwara K, Kurono H, et al. Clot waveform analysis using CS-2000i™ distinguishes between very low and absent levels of factor VIII activity in patients with severe haemophilia A. *Haemoph Off J World Fed Hemoph.* sept 2017;23(5):e427-35
41. Résumé des caractéristiques du produit disponible sur [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/elocta-epar-product-information\\_fr.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/elocta-epar-product-information_fr.pdf)
42. Spena, Peyvandi, Prediction of factor VIII inhibitor development in the SIPPET cohort by multinational analysis and Factor FVIII antigen measurement, *Clinical Haemostasis and Thrombosis* 2018.

43. Dargaud, Beguin, Négrier, Evaluation of thrombin generating capacity in plasma from patients with haemophilia A et B, *Thrombosis and Haemostasis*, 2005: 475-480.
44. Franchini, Mannucci, Modifiers of clinical phenotype in severe congenital hemophilia, *Thromb Res.* 2017-08;156:60-64
45. Pavlova, Oldenburg, Defining severity of hemophilia : more than factor levels, *Semin Thromb Hemost*, 2013;39:702-710

### ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussignée WAHL Clémentine,

Déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. (*Décret n°92-657 du 13 juillet 1992*)

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire.



**SIGNATURES DU DIRECTEUR DE THESE ET DU DOYEN**

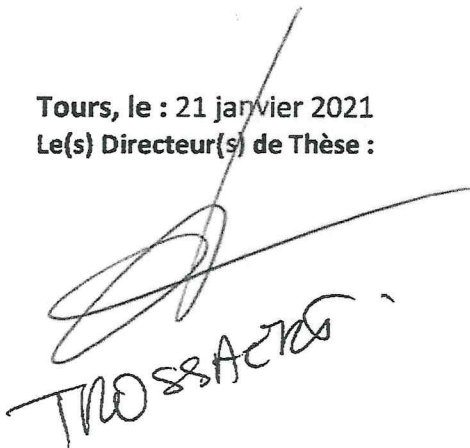
N° Étudiant : 21609617

N° Thèse : .....A.....

Nom et Prénom : WAHL Clémentine

Sujet : OPTIMISATION DU DOSAGE DE L'ACTIVITE DU FACTEUR VIII (FVIII:C) POUR PROPOSER UNE NOUVELLE DEFINITION DE L'HEMOPHILIE A SEVERE

Tours, le : 21 janvier 2021  
Le(s) Directeur(s) de Thèse :

  
TROSSAERT

Vu et Transmis :  
Le Doyen



La Directrice de l'U.F.R.  
des Sciences Pharmaceutiques

Pr V. MAUPOIL-DAVID



NOM, PRÉNOM de l'étudiant : WAHL Clémentine

N° 01

### TITRE DE LA THÈSE

OPTIMISATION DU DOSAGE DE L'ACTIVITE DU FACTEUR VIII (FVIII:C) POUR PROPOSER UNE NOUVELLE DEFINITION DE L'HEMOPHILIE A SEVERE

### RÉSUMÉ DE LA THÈSE

La nomenclature définit la sévérité de l'hémophilie A en fonction du taux d'activité du FVIII (FVIII:C). Pour un FVIII:C < 1,0 %, l'hémophilie est classée comme sévère et pour des valeurs comprises entre 1 et 5 %, elle est classée comme modérée. Il est souvent difficile de conclure pour des valeurs proches de 1 %. Nous avons dans un premier temps validé un dosage de FVIII:C chromométrique pour des valeurs de <1 %. Nous avons ensuite comparé les valeurs de FVIII:C < 1,0 % au génotype et aux tests de génération de thrombine (TGT). Trente-quatre hommes atteints d'hémophilie A sévère ou modérée sans aucun traitement au cours des 7 derniers jours et sans inhibiteur courant ont été inclus dans ce projet. Le taux de FVIII:C a été comparé aux mutations du FVIII. Sur 34 patients, 18 avaient le FVIII:C < 0,3 %,  $m=0,2 \pm 0,1$  %, [0,0-0,3 %]. Huit patients patients présentaient une inversion de l'intron 22, 1 inversion de l'intron 1, 4 mutations codon stop, 2 mutations frameshift et seulement 3 mutations faux-sens connues comme induisant des phénotypes sévères. Neuf patients avaient un FVIII:C compris entre 0,3 et 1,5 %, moyenne de 1,06 %, écart-type de 0,3 % [0,4-1,4 %] avec 6 mutations faux -sens et 3 mutations frameshift. Ces 3 dernières avaient un FVIII:C particulièrement bas (0,4 ; 0,8 et 1,1 %). Sept patients présentaient un FVIII:C > 1,5 %, moyenne de 3,4 %, écart type de 0,7 % [1,8-4,6 %] avec 7 mutations faux-sens. Le test de génération de thrombine conforte également nos résultats car pour les patients avec FVIII :C < 0.3%, le potentiel de thrombine endogène (ETP) était significativement plus faible ( $188,8 \pm 81,1$  [60-334] nM/min) que chez les patients dont le FVIII:C se situait entre 0,3 et 1,5 % ( $354,9 \pm 95,0$  - plage [239-493] nM/min) et ceux dont le FVIII:C se situait entre 1,5 et 4,0% ( $695,0 \pm 167,4$  - plage [518-907] nM/min). Il existe un chevauchement des valeurs d'ETP entre les patients avec FVIII:C < 0,3% et ceux entre 0,3 et 1,5% mais pas entre les patients < 1.5% et > 1.5%. Enfin, tous les patients présentant un ETP faible étaient porteurs de mutations très délétères (3 inversions de l'intron 22, 1 inversion de l'intron 1, 2 mutations frameshift et 3 mutations faux-sens connues auparavant avec un phénotype sévère). Nos résultats sont en accord avec ceux de Dargaud et al en 2005(43) qui montre que TGT peut prédire la sévérité de l'hémophilie. Nos résultats suggèrent qu'une valeur seuil de 0,3 % serait plus pertinente que 1,0% pour définir l'hémophilie A extrêmement sévère. Ces résultats biologiques devraient être comparés aux données cliniques.

### MOTS-CLÉS SIGNIFICATIFS DE SON CONTENU, ATTRIBUÉS PAR LE CANDIDAT EN LIAISON AVEC LA

#### BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE ET LES MEMBRES DU JURY

Hémophilie A, validation de méthode, classification, FVIII:C, génotype, FVIII:Ag, Test de génération de thrombine

### JURY

#### PRÉSIDENT :

Madame le Professeur POUPLARD Claire

#### MEMBRES :

Madame le Professeur BENE Marie-Christine

Monsieur le Docteur TROSSAERT Marc

Madame le Docteur BOISSIER Elodie

Monsieur le Docteur DRILLAUD Nicolas

DATE ET LIEU DE SOUTENANCE : 21 janvier 2021 à Tours.