



ROYAUME DU MAROC  
UNIVERSITE MOHAMMED V DE  
RABAT  
FACULTE DE MEDECINE ET  
DE PHARMACIE RABAT



Année : 2021

Mémoire N° : 044

## **MONITORING DE L'HÉMOPHILIE A AU MAROC**

**MEMOIRE DE FIN D'ETUDE**

*Présenté et soutenu publiquement par :*

**Dr. MAMAD HASSANE**

Né le 01 Août 1990 à Figuig

**POUR L'OBTENTION DU DIPLOME NATIONAL DE  
SPECIALITE EN ANALYSES BIOLOGIQUES MÉDICALES**

*Sous la direction de*

**Mr AZLARAB MASRAR : Professeur d'Hématologie  
Biologique**

**Laboratoire Central d'Hématologie – CHUIS Rabat**

**Année 2021**

# Dédicaces

## *À MES CHERS PARENTS*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.*

*Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.*

*Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez.*

*Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.*

## *À mes très Chers Frères Mohamed, Rachid, Omar, Mustapha, Brahim et Abderrazak*

*En témoignage des profonds liens fraternels qui nous unissent. Ces quelques lignes ne sauront exprimer toute l'affection et l'amour que je vous porte. Puisse dieu vous procurer santé, bonheur, et prospérité que vous méritiez.*

# Remerciements

NOTRE MAITRE ET ENCADRANT

MONSIEUR LE PROFESSEUR AZLARAB  
MASRAR PROFESSEUR D'HEMATOLOGIE  
BIOLOGIQUE

*Vous avez bien voulu nous confier ce travail riche d'intérêt et nous orienter à chaque étape de sa réalisation. Vous nous avez réservé toujours le meilleur accueil, malgré vos occupations professionnelles. Vos encouragements inlassables, votre amabilité, votre gentillesse méritent toute admiration. Nous saisissons cette opportunité pour vous exprimer notre profonde gratitude tout en vous témoignant notre respect.*

## A NOTRE MAITRE

### MADAME LE PROFESSEUR SOUAD BENKIRANE PROFESSEUR D'HEMATOLOGIE BIOLOGIQUE

*Pour l'honneur que vous nous faites de nous encadrer dans le service. Votre sérieux, votre compétence et votre sens du devoir nous ont énormément marqués. Veuillez trouver ici l'expression de notre immense considération et notre profonde admiration pour toutes vos qualités scientifiques et humaines. Ce travail est pour nous l'opportunité de vous témoigner notre profonde gratitude.*

## A TOUS NOS MAITRES

*Qui nous ont guidés avec bienveillance, sollicitude et compréhension pour l'acquisition du savoir nécessaire à l'exercice de notre profession nous espérons être dignes de leur confiance et à la hauteur de leurs attentes. Veuillez recevoir ici, l'expression de notre dévouement, de notre reconnaissance et de notre grande admiration.*

## ABREVIATIONS

<b>Ac</b>	: Anticorps
<b>ADN</b>	: Acide Désoxyribonucléique
<b>ARNm</b>	: Acide Ribonucléique messenger
<b>AT</b>	: Antithrombine
<b>CHUIS</b>	: Centre Hospitalo-Universitaire Ibn Sina
<b>CHAMP</b>	: CDC Hemophilia A Mutation Project
<b>CPA</b>	: Cellules Présentatrices de l'Antigène
<b>DD</b>	: D-dimère
<b>F8</b>	: Gène du facteur VIII
<b>FAH</b>	: Facteur anti-hémophilique
<b>FIIa</b>	: Facteur II activé (la Thrombine)
<b>FIXa</b>	: Facteur IX activé
<b>FIX</b>	: Facteur IX
<b>FT</b>	: Facteur Tissulaire
<b>FVIIIa</b>	: Facteur VIII activé
<b>FVIII</b>	: Facteur VIII
<b>FX</b>	: Facteur X
<b>HA</b>	: Hémophilie A
<b>HAMSTeRS</b>	: Hemophilia A Mutation Search Test and Resource Site
<b>IgA</b>	: Immunoglobuline A
<b>IgG</b>	: Immunoglobuline G
<b>ITI</b>	: Induction de la Tolérance Immune
<b>PLs</b>	: Phospholipides
<b>PDF</b>	: Produits de dégradation de la fibrine
<b>pdFVIII</b>	: Facteur VIII dérivé du plasma
<b>rFVIII</b>	: Facteur VIII recombinant
<b>TCA</b>	: Temps de Céphaline avec Activateur
<b>TP</b>	: Taux de Prothrombine
<b>UB</b>	: Unité de Bethesda

**vWF** : Facteur de Von Willebrand  
**WFH** : World Federation of Hemophilia

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1:</b> Differentes méthodes de dépistage et titrage des inhibiteurs anti-FVIII .....	<b>10</b>
<b>Tableau 2:</b> Représentations statistiques du taux d'inhibition et du titre d'inhibiteurs .....	<b>17</b>
<b>Tableau 3:</b> Principales caractéristiques de facteurs de coagulation .....	<b>22</b>
<b>Tableau 4:</b> Données sur la population des quatre pays avec le plus nombre de l'HA, selon le rapport sur l'enquête globale annuelle de WFH 2016 . .....	<b>29</b>
<b>Tableau 5:</b> Liste des mutations responsables d'HA répertoriées dans la CHAMP . .....	<b>37</b>
<b>Tableau 6:</b> Principe d'administration du FVIII .....	<b>42</b>
<b>Tableau 7:</b> Exemples de FAH plasmatiques et recombinants .....	<b>43</b>
<b>Tableau 8:</b> Avantages et inconvénients des agents by-passing .....	<b>53</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1: Dosage de l'activité du FVIII par technique chromogénique .....	9
Figure 2: Courbe théorique d'étalonnage de l'unité Bethesda [7] .....	12
Figure 3: Répartition des différentes tranches d'âge des patients hémophiles A 192/267.....	14
Figure 4: Représentation des 268 hémophiles A selon leur degré de sévérité .....	15
Figure 5: Résultat du dépistage des inhibiteurs chez les hémophiles A (série de 267 hémophiles A) .....	15
Figure 6: Répartition des différentes tranches d'âge des patients inhibiteurs positifs 52/67.....	16
Figure 7: Résultats des inhibiteurs positifs selon leur degré de sévérité (67 patients) .....	16
Figure 8: Répartition des inhibiteurs faibles et forts répondeurs.....	17
Figure 9: Répartition des inhibiteurs faibles et forts répondeurs selon le degré de sévérité .....	18
Figure 10: schéma représentative de trois étapes de la coagulation .....	25
Figure 11: localisation et structure du gène F8 [18] .....	30
Figure 12: Structure de facteur VIII : A- organisation des domaines du FVIII humain et FVIII délété du domaine B. B- structure 3D du FVIII délété du domaine B [25] .....	31
Figure 13: Activation du FVIII : la thrombine active le FVIII par un clivage protéolytique dans la chaîne lourde (résidus Arg372 et Arg740) et dans la chaîne légère (Arg1689), le FVIIIa adopte sa forme hétérotrimérique et réduit son affinité pour le vWF. ....	32
Figure 14: Droite d'étalonnage (Log/Log) de l'allongement de TCA [35].....	34
Figure 15: Principe de la mesure du FVIII par méthode chromogénique [35] .....	35
Figure 16: Distribution des mutations ponctuelles sur les différents domaines du FVIII [38].....	36
Figure 17: localisations des hémarthroses et des hématomes chez l'hémophile .....	39
Figure 18: Les principaux représentants des anticorps (Acs) anti-FVIII et leurs mécanismes d'inhibition. ....	46
<b>CONCLUSION</b> Figure 18: Les principaux représentants des anticorps (Acs) anti-FVIII et leurs mécanismes d'inhibition. ....	46

# Table des matières

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>MATERIELS ET METHODES</b> .....	<b>4</b>
<b>I. MATERIELS</b> .....	<b>5</b>
<b>II. METHODES</b> .....	<b>6</b>
1 PHASE PRE-ANALYTIQUE.....	6
2 PHASE ANALYTIQUE .....	6
2.1. TESTS DE DIAGNOSTIC DE L'HEMOPHILIE.....	6
2.2.PROTOCOLES DE DEPISTAGE ET TITRAGE DES INHIBITEURS ANTI FVIII :.....	9
<b>RESULTATS</b> .....	<b>13</b>
1 REPARTITION DES PATIENTS SELON LES TRANCHES D'AGE : .....	14
2 CLASSIFICATION DES PATIENTS SELON LA SEVERITE DE LA MALADIE .....	14
3 REPARTITION DES PATIENTS SELON LA PRESENCE OU L'ABSENCE D'INHIBITEURS.....	15
4 REPARTITION DES INHIBITEURS POSITIFS SELON LE DEGRE DE SEVERITE.....	16
5 REPARTITION DES INHIBITEURS POSITIFS SELON LE TITRE D'INHIBITEUR .....	17
6 CINETIQUE DES INHIBITEURS ANTI-FVIII .....	18
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>19</b>
<b>I. REVUE DE LA LITTERATURE</b> .....	<b>20</b>
1 PHYSIOLOGIE DE L'HEMOSTASE : .....	20
2 HEMOPHILIE A.....	27
3 ANOMALIES GENETIQUES DU FVIII RESPONSABLES DE L'HEMOPHILIE A .....	35
4 MANIFESTATIONS CLINIQUES DE L'HEMOPHILIE A .....	37
5 DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE L'HEMOPHILIE A.....	40
6 TRAITEMENT DE L'HEMOPHILIE A ET SES COMPLICATIONS.....	41
7 LE DEVELOPPEMENT DES INHIBITEURS ANTI-FACTEUR VIII CHEZ LES HEMOPHILES A.....	45
8 MECANISME D'ACTION DES ANTI-FACTEUR VIII .....	47
9 LES FACTEURS DE RISQUE D'APPARITION DES ANTI-FACTEURS VIII .....	50
10 DEPISTAGE ET TITRAGE DES INHIBITEURS DU FVIII.....	51
11 PRISE EN CHARGE DES HEMOPHILES A AVEC INHIBITEURS .....	51
<b>II. DISCUSSION DES RESULTATS</b> :.....	<b>55</b>
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>58</b>
<b>RESUMES</b> .....	<b>60</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>63</b>

# **INTRODUCTION**

## **A- INTRODUCTION**

L'hémostase est un équilibre biologique entre la coagulation et l'hémorragie. Un déficit d'un des facteurs de coagulation crée un déséquilibre à tendance hémorragique. Parmi les maladies de l'hémostase à tendance hémorragique, il y a la maladie de Willebrand et les maladies hémophiliques de classe A et B qui sont dues à une déficience des facteurs de coagulation VIII et IX.

L'hémophilie A est un trouble hémorragique congénital héréditaire à transmission récessive liée au sexe et dû à une anomalie de la coagulation sanguine en rapport avec un déficit en facteur VIII (FVIII) responsable d'un défaut qualitatif et/ou quantitatif en F VIII (HA), dont la sévérité de la maladie dépend du taux FVIII circulant. Ce défaut de production est causé par d'anomalies génétiques touchant le gène F8 situé sur le bras long du chromosome X (Xq28).

Cette pathologie est la plus fréquente des maladies rares et touche principalement les garçons à une fréquence de 1/5000 naissances masculines soit avec antécédents familiaux ou bien de façon sporadique (dans 1/3 de cas), les femmes sont souvent conductrices, de rares exceptions sont malades. Cliniquement l'hémophilie en général se manifeste par des épisodes de saignements qui durent plus longtemps que le normal, les plus fréquentes hémorragies sont localisées au niveau des articulations, des muscles et au niveau buccal.

Le diagnostic biologique de l'hémophilie A repose sur un allongement du temps de céphaline avec activateur (TCA) avec un déficit en facteur de coagulation dans la circulation (< 30%). La prise en charge des personnes hémophiles est basée sur la substitution du facteur manquant par de produits substitutifs d'origine plasmatique ou recombinant, cette stratégie thérapeutique est à visée curative et préventive permettant le prolongement de la durée de vie des patients et de mieux gérer les complications.

Cependant, Les complications du traitement par des concentrés sont le risque d'infection et la survenue des inhibiteurs dirigés contre le facteur VIII rendant le traitement substitutif inefficace (complication majeure).

Ce travail est une étude rétro-prospective à propos d'une série des cas hémophiles A suivis au Centre Hospitalo-Universitaire Ibn Sina (CHUIS) de Rabat étalée sur une durée allant du 1<sup>er</sup> Janvier 2016 jusqu'à Novembre 2020, dont l'objectif est de mettre en évidence sur la survenue des inhibiteurs anti facteurs chez cette série de patients en exposant leurs caractéristiques épidémiologiques et cliniques, et en étudiant leur degré de sévérité de l'hémophilie ainsi que leur prévalence du développement des inhibiteurs anti-facteur VIII.

# **MATERIELS ET METHODES**

## **B- MATERIELS ET METHODES**

### **I. MATERIELS**

Notre travail est une étude descriptive des résultats des patients hémophiles A admis au Laboratoire Central de l'Hématologie de l'Hôpital Ibn Sina, durant la période allant du 01/01/2016 jusqu'au 30/11/2020, pour le motif de développement des inhibiteurs anti facteur VIII (La méthode de référence utilisée au laboratoire est celle de Bethesda-Nijmegen) :

Les patients inclus dans cette étude : Les patients ayant bénéficié d'un dosage de facteur VIII avec un taux  $\leq 30\%$  et ceux ayant bénéficié d'une mesure du taux d'inhibition et dosage des inhibiteurs anti-FVIII dont le titre est  $\geq 0,6$  UB/ml.

Les patients exclus : Les non hémophiles A (ayant le taux du FVIII  $> 30\%$ ) et les hémophiles A qui ont un titre d'inhibiteurs inférieur à 0,6 UB/ml (inhibiteurs négatifs).

Notre échantillon initial est composé de 267 hémophiles A ayant bénéficié d'un dosage de facteur VIII et un suivi par mesure du taux d'inhibition et d'un dosage des anti-facteurs VIII. Parmi ces hémophiles A, 67 patients ont développé d'inhibiteurs anti-facteur VIII.

La fiche d'exploitation dument renseignée par le clinicien et complétée par le laboratoire contient les informations suivantes :

- Les caractéristiques épidémiologiques : nom, prénom, âge,
- Les caractéristiques concernant la maladie : type de l'hémophilie, degré de sévérité, âge de découverte, présence ou non d'inhibiteurs, date de recherche des inhibiteurs.

Les dosages et tests hématologiques effectués :

- Le temps de céphaline avec activateur (TCA).
- Le taux de prothrombine (TP).
- Le dosage de fibrinogène (Fg).
- Le dosage de l'activité FVIII.
- Dépistage des inhibiteurs du FVIII et leur dosage.

## II. METHODES

### 1 PHASE PRE-ANALYTIQUE

- Le Prélèvement veineux a été réalisé par ponction franche, pose de garrot peu serré pendant moins d'une minute puis acheminé au laboratoire sans délai à Température 20°C +/- 2°C.
- Respect de remplissage : 1V citrate/9V sang : Excès de citrate dans le plasma allonge les temps de coagulation tandis qu'un déficit en citrate favorise l'activation plaquettaire et un raccourcissement des temps de coagulation
- Deux tubes de 5ml de sang veineux citratés, suivi d'une double centrifugation thermostatée 15 à 20°C, 2x2500g pendant 15 min et congelé à -80°C si l'analyse est différée.

### 2 PHASE ANALYTIQUE

Les tests réalisés sont répartis en des tests permettant de s'assurer de l'atteinte hémophilique et son évolution, et des tests permettant de déceler la présence d'inhibiteurs et de doser leur taux. Au sein du laboratoire, les tests d'hémostase sont réalisés par la méthode optique sur l'automate *Sysmex CS-5200* et les réactifs *Siemens*.

#### 2.1. TESTS DE DIAGNOSTIC DE L'HEMOPHILIE

Dans l'hémophilie, le temps de céphaline et activateur (TCA) est allongé, tandis que le temps de Quick (TQ), temps de thrombine, temps de saignement ou test d'occlusion sur PFA et le taux de plaquettes sont normaux. La combinaison d'un résultat normal de TQ et d'un allongement du TCA localise l'anomalie au niveau des facteurs contacts dont le déficit n'entraîne pas d'hémorragie, mais aussi au niveau du facteur XI et des facteurs VIII et IX. Le dosage spécifique des facteurs précise le type de l'hémophilie et sa gravité.

##### a. Temps de Quick

Le TQ est le temps de coagulation à 37°C d'un plasma pauvre en plaquettes décalcifié en présence d'un excès de thromboplastine calcique, mesuré en secondes par rapport à un témoin et convertit en Taux de prothrombine TP (%).

Valeurs de références chez l'adulte : TP : 70-100%.

### **b. Temps de céphaline et activateur (TCA)**

Le TCA est le temps de coagulation d'un plasma pauvre en plaquettes à 37°C en présence de phospholipides (céphaline), d'un activateur de la phase contact (acide ellagique, silice micronisée, kaolin, céliste, citrate) et de chlorure de calcium à une concentration de 0,025M. La concentration en phospholipides apportés par la céphaline étant optimale, ce test explore la voie intrinsèque de la coagulation (il explore tous les facteurs de la coagulation à l'exception du FVII). Il est par ailleurs très sensible aux conditions de prélèvement.

Les résultats sont exprimés par le ratio TCA malade/TCA témoin, on admet comme normal, des valeurs inférieures ou égales à 1,2 chez l'adulte.

### c. Dosage fonctionnel du fibrinogène : Méthode de Von Clauss

Temps de coagulation à 37°C d'un plasma dilué, citraté, déplaqueté, en présence de thrombine concentrée, est inversement proportionnel à la quantité de fibrinogène (Valeurs de références chez l'adulte : 2 à 4 g/L).

### d. Recherche d'effet inhibiteur : Test de correction

IR :  $[TCA (P+T) - TCA (T) / TCA (P)] * 100$

Indice de Rosner (IR) < 12% : absence d'effet inhibiteur

IR entre 12 et 15% : état douteux

IR > 15% : présence d'effet inhibiteur.

Avec P : Plasma du Patient, T : Plasma Témoin

### e. Détermination du taux basal du plasma patient en FVIII

Dosage de l'activité FVIII par technique chronométrique et/ou chromogénique après exclusion des autres anomalies de l'hémostase qui allongent le TCA avec dosage de l'activité du vWF pour le diagnostic différentiel d'une maladie de Willebrand.

❖ Technique chronométrique FVIIIc : Ce dosage est basé sur le pouvoir de correction, par le plasma à tester, du temps de coagulation d'un plasma dépourvu électivement du facteur FVIII : Mélange d'1V de plasma dilué au 1/10 et d'1V de plasma déficient VIII et réalisation du TCA sur les mélanges.

❖ Technique chromogénique FVIIIc : on ajoute en deux étapes :

1. Ca<sup>2+</sup>, PLP, FIIa, FIXa et FX en excès => FX est activé par FIXa en présence de FVIII (FVIII provient du plasma patient ou étalon)

2. Substrat chromogénique avec inhibiteur synthétique de la thrombine => FXa généré, hydrolyse le substrat chromogène, libérant le groupe chromophore. L'intensité de la coloration est proportionnelle à l'activité FVIII de l'échantillon.

L'inhibiteur synthétique de la thrombine permet d'éviter l'hydrolyse du substrat chromogène par la thrombine formée.

Les résultats sont exprimés en pourcentage (Valeurs de références FVIII : 50 - 140%)

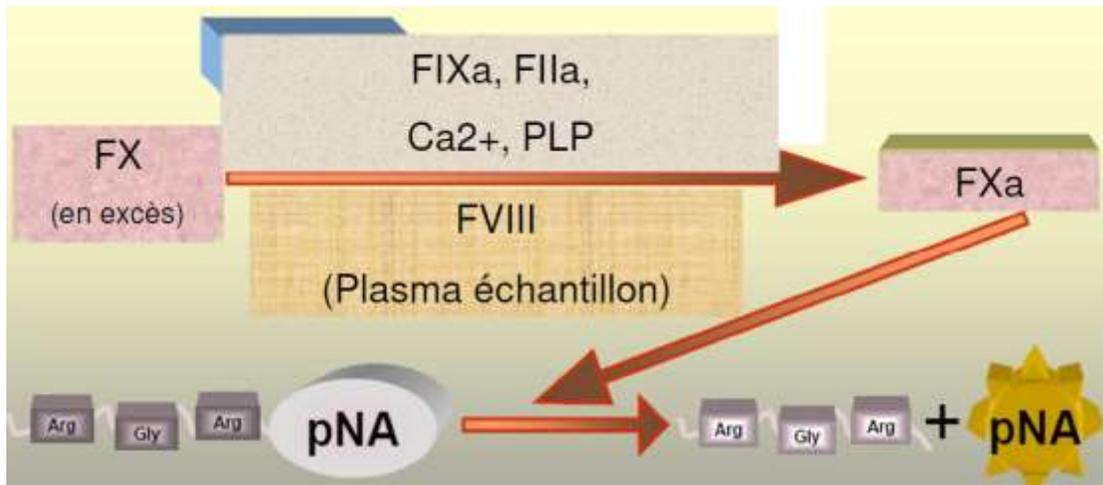


Figure 1: Dosage de l'activité du FVIII par technique chromogénique

## 2.2 PROTOCOLES DE DEPISTAGE ET TITRAGE DES INHIBITEURS ANTI FVIII :

### a. Dépistage et Titration des inhibiteurs : quelle méthode d'analyse ?

La décroissance du FVIII est appréciée par le dosage du FVIII coagulant (FVIII:C) résiduel d'un mélange du plasma du malade avec une source de FVIII.

- ❖ Dans la **méthode d'Oxford** <sup>1</sup> (" nouvelle " méthode), la source de FVIII est un concentré de FVIII (3-6 U/ml) incubé (mélange " test ") durant 4 heures à 37° avec le plasma du malade (1 vol/4 vol) en même temps qu'un mélange contrôle (1 vol concentré FVIII/4 vol tampon imidazole) (Tableau 1). Le FVIII résiduel dans le mélange test est exprimé en % du taux mesuré dans le mélange contrôle [1, 2].
- ❖ Dans la **méthode de Bethesda** <sup>2</sup>, la source de FVIII est un plasma normal mélangé volume à volume avec le plasma du malade (mélange test). Le mélange est incubé à 37° durant 2 heures en même temps qu'un mélange contrôle (1 vol plasma normal/1 vol tampon imidazole) (Tableau 1).

Dans ces conditions, 1 UB est définie comme la quantité d'inhibiteur capable de neutraliser 50% du FVIII:C contenue dans 1 ml de plasma normal [1, 3].

La comparaison historique des 2 méthodes demandée par l'ISTH a établi une relation de 1 unité Oxford pour 1,21 unité Bethesda [1, 4]. La méthode de Bethesda a dès lors été considérée comme la méthode de référence.

- ❖ **La variante Nijmegen**<sup>3</sup> : méthode de référence selon l'ISTH 1996, comprend donc deux modifications par rapport à la méthode Bethesda : Plasma déficient FVIII remplace le tampon imidazole dans le mélange contrôle et un tamponnement par l'imidazole du plasma normal utilisé comme source de FVIII dans le mélange " test " ou " contrôle " [1, 5] (Tableau 1).

Tableau 1: Différentes méthodes de dépistage et titrage des inhibiteurs anti-FVIII

	Source de FVIII	Contrôle	mélange	Incubation
<b>Oxford (1973)<sup>1</sup></b>	Concentré de FVIII	Tampon	1vol/4vol	4H 37°C
<b>Bethesda (1975)<sup>2</sup></b>	Plasma normal	Tampon	1 vol/ 1vol	2H 37°C
<b>Nijmegen (1995)<sup>3</sup></b>	Plasma normal tamponné	Plasma Déficient en FVIII	1 vol/vol	2H 37°C

b. Protocole de dépistage et de titrage pratiqué au Laboratoire Central d'Hématologie Ibn Sina Rabat : Méthode Nijmegen

❖ **Première étape : dépistage des anti FVIII**

- Réaliser un mélange à volume égale de plasma patient (P) et de plasma témoin (T) à 100% de FVIII : P+T. (c'est le mélange test : R2)
- En parallèle, réaliser un mélange à volume égale de plasma témoin et de plasma déficient FVIII : T1/2. (C'est le mélange contrôle : R1)
- Incuber les mélanges (R1 et R2) 2 heures à 37°C.
- Réaliser les dosages des activités FVIII sur les plasmas des deux mélanges R1 et R2.
- Interprétation des résultats : Le dépistage est considéré comme positive, quand il y a une perte du minimum ¼ de l'activité FVIII par rapport à l'étalon

de référence. Si taux d'inhibition est supérieur à 25% : dépistage positif et réalisation du titrage.

Taux FVIII résiduel :  $[R2 / R1] \times 100$ .

❖ **Deuxième étape : titrage des anti FVIII**

**Définition** : 1 Unité Bethesda correspond à la quantité d'anticorps neutralisant 50% de facteur VIII dans un plasma en contenant 100% [6].

Le FVIII résiduel « corrigé » permet de titrer le taux d'inhibiteur en Unité Bethesda (Figure 2).

- Mélanges tests : 1V plasma étalon + 1V plasma patient à différentes dilutions (pur, au 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32...). Dilution sur tampon pH 7,35.
- Mélange témoin : 1V plasma étalon à 1V plasma déficient VIII.
- Laisser incuber les mélanges 2H à 37°C.
- Dosage du FVIII des mélanges : FVIII des mélanges tests [patient + étalon] sont notés R2 et FVIII du mélange [étalon + déficient FVIII] est noté R1.

Taux FVIII résiduel :  $[R2/R1] \times 100$ .

Choisir la dilution qui donne un taux FVIII résiduel voisin de 50% et lire le nombre d'unité Bethesda/ml sur la courbe théorique d'étalonnage sachant que 50% de FVIII résiduel correspond à 1UB/ml.

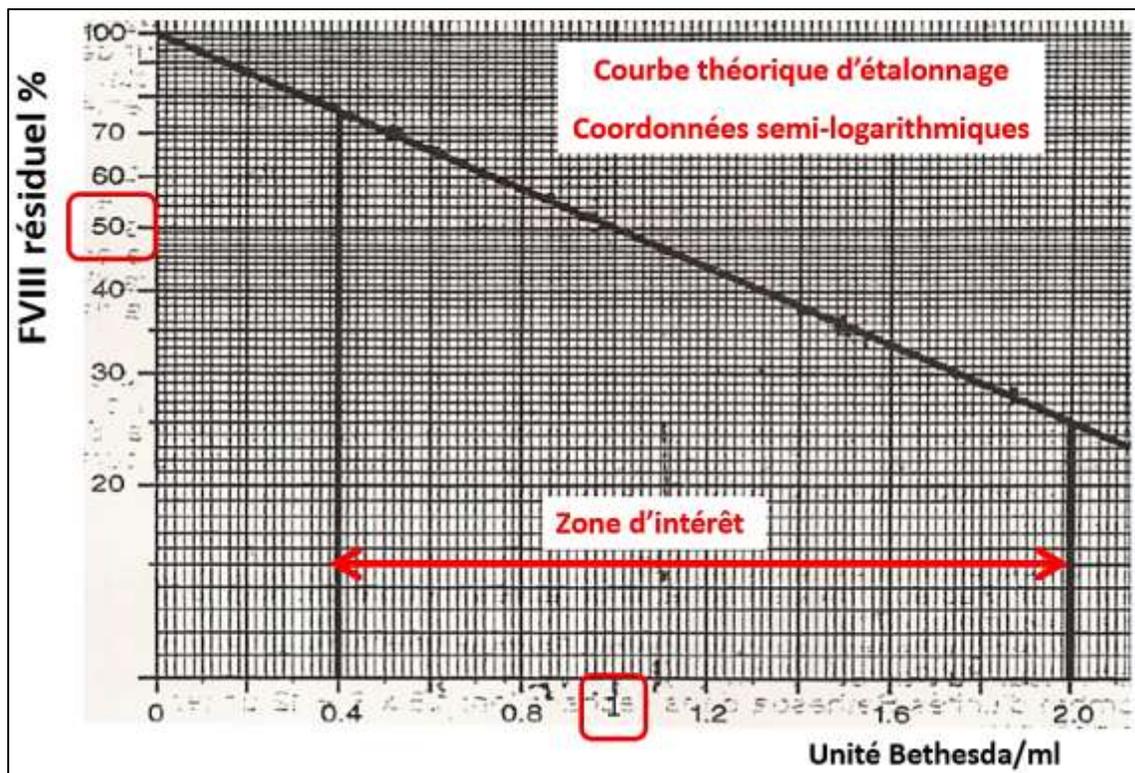


Figure 2: Courbe théorique d'étalonnage de l'unité Bethesda [7]

# **RESULTATS**

## C- RESULTATS

### 1 Répartition des patients selon les tranches d'âge :

L'étude a été portée sur 267 patients hémophiles A d'une tranche d'âge située entre 2 mois et 59 ans, (la tranche d'âge moyenne est située entre 6 mois et 10 ans), comme indiqué dans la figure 3.

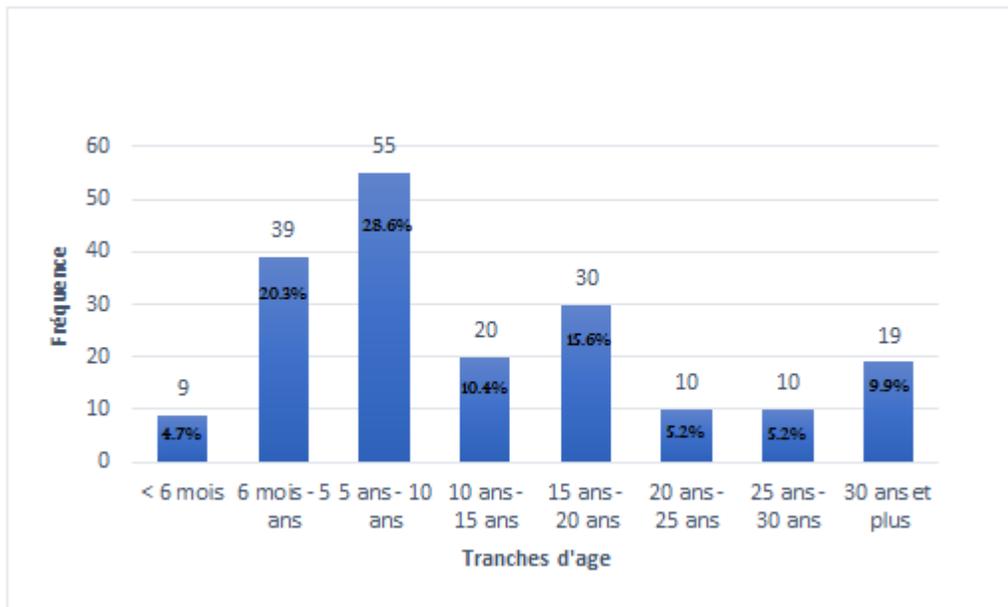


Figure 3: Répartition des différentes tranches d'âge des patients hémophiles A 192/267

### 2 Classification des Patients selon la Sévérité de la Maladie

La majorité des patients étudiés sont des hémophiles A sévères, 181 hémophiles sévères (dont le taux du FVIII  $\leq 1\%$ ) contre 35 HA modérés ( $1 < \text{FVIII} \leq 5\%$ ) et 51 HA mineurs ( $5 < \text{FVIII} < 30\%$ ).

La figure 4 montre la répartition des sujets selon la sévérité de la maladie :

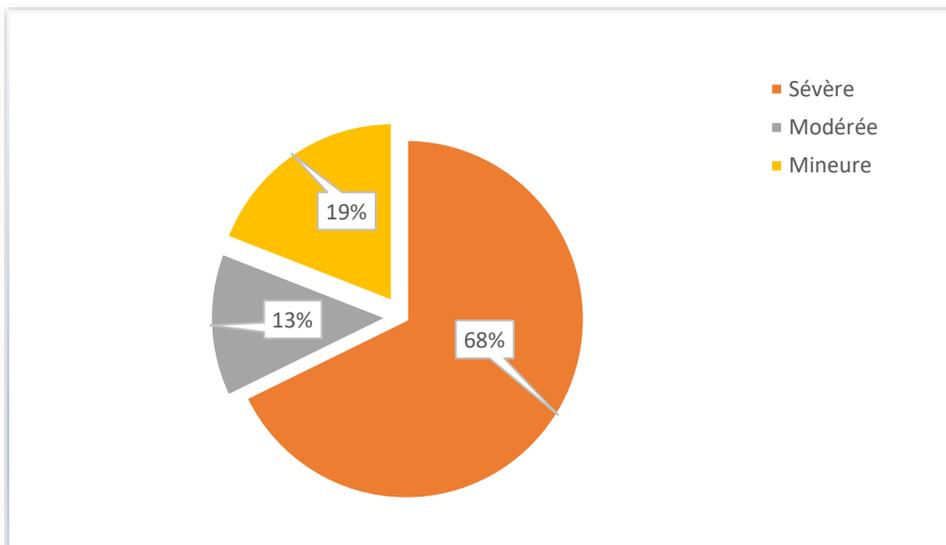


Figure 4: Renrépresentation des 268 hémophiles A selon leur degré de sévérité

### 3 Répartition des patients selon la présence ou l'absence d'inhibiteurs

Sur 267 hémophiles A recueillis, 67 soit équivalent à 25,1% des sujets étudiés ont développé d'inhibiteurs anti-FVIII (appelés inhibiteurs positifs), tandis que 200 cas sont dépistés inhibiteurs négatifs. Les résultats sont représentés dans la figure 5.

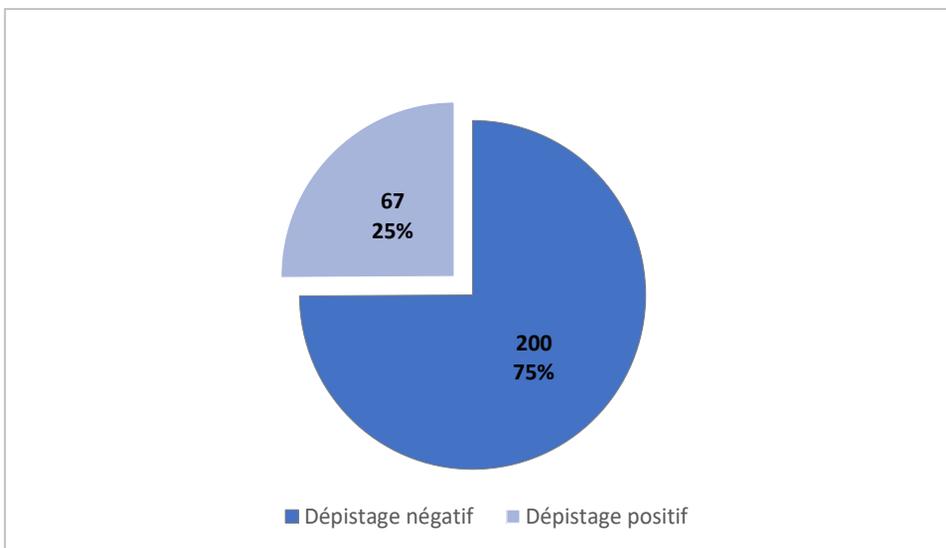


Figure 5: Résultat du dépistage des inhibiteurs chez les hémophiles A (série de 267 hémophiles A)

L'âge moyen des patients inhibiteurs positif est de 13 ans, la figure 6 présente les différentes tranches d'âge des patients inhibiteurs positifs.

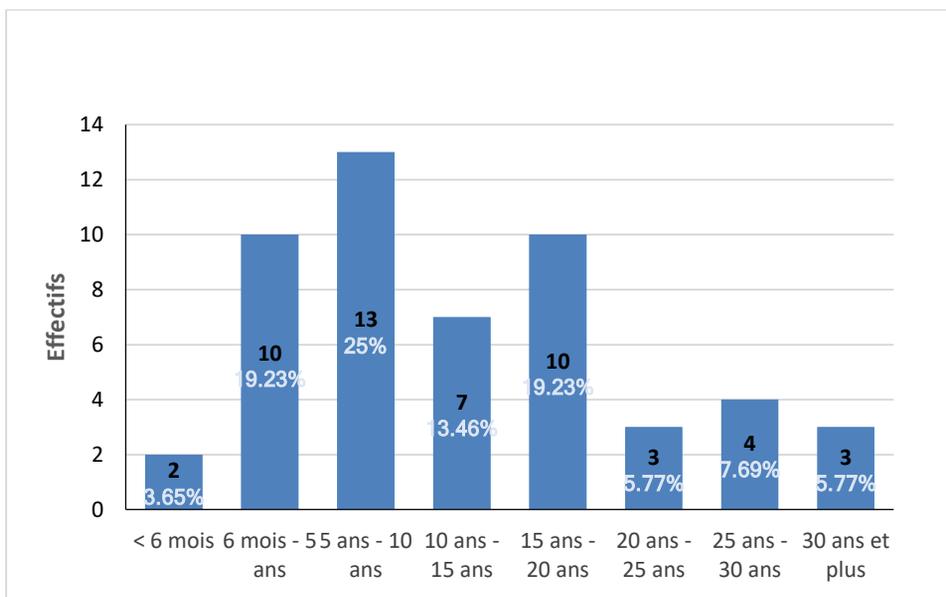


Figure 6: Répartition des différentes tranches d'âge des patients inhibiteurs positifs 52/67

#### 4 Répartition des inhibiteurs positifs selon le degré de sévérité

Parmi 181 hémophiles A sévères, 63 cas ont développé des inhibiteurs anti-FVIII, alors que 1 patient sur 35 hémophiles A modérés et 3 patients sur 51 hémophiles A mineurs ont développés des inhibiteurs (Figure 7).

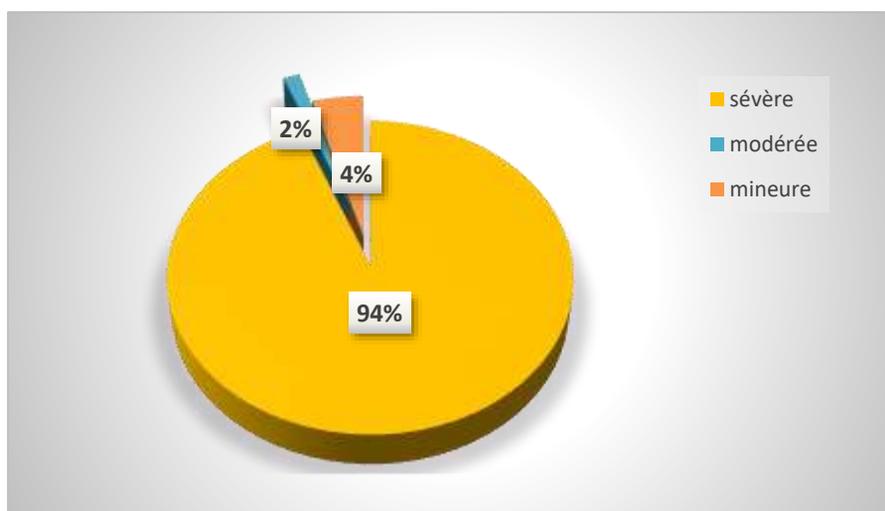


Figure 7: Résultats des inhibiteurs positifs selon leur degré de sévérité (67 patients)

La valeur moyenne du titre des inhibiteurs anti-FVIII est de 23,32 UB/ml (le titre est situé entre 0,6 et 99,84 UB/ml), (Tableau 2).

Tableau 2: Représentations statistiques du taux d'inhibition et du titre d'inhibiteurs

	N	Minimum	Maximum	Moyenne	Ecart type
Taux d'inhibition en %	67	29,10	99,90	81,8801	22,89795
Titre d'inhibiteur en UB/ml	67	0,60	99,84	23,3234	32,51286

### 5 Répartition des inhibiteurs positifs selon le titre d'inhibiteur

Selon le titre de l'anti-FVIII, les patients développant d'inhibiteurs sont classés en deux types (faibles et forts répondeurs). Par ailleurs, les faibles répondeurs ont un titre d'inhibiteur  $\leq 5$ UB/ml, tandis que les forts répondeurs leur titre soit  $> 5$ UB/ml.

Dans cette étude de 67 patients inhibiteurs positifs, nous avons trouvé 35 cas d'inhibiteurs fort répondeurs et 32 cas d'inhibiteurs faible répondeurs (Figure 8)

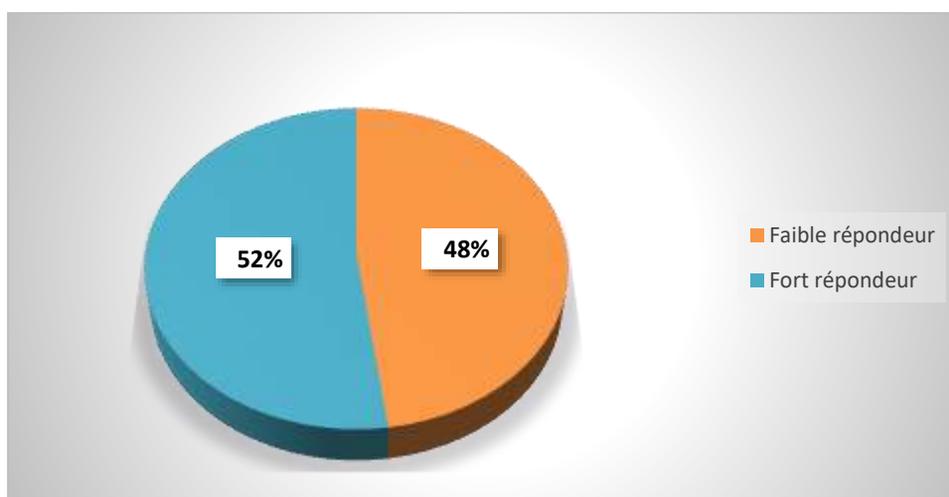


Figure 8: Répartition des inhibiteurs faibles et forts répondeurs

Le taux d'inhibiteurs était entre 29,1 et 99,1% et le titre d'inhibiteurs était variable entre 0,6 et 99,84 UB/ml.

Chez les forts répondeurs le titre d'inhibiteurs varie de 6,3 à 99,84 UB/ml, dont 34 sont des hémophiles A sévères ce qui présente une fréquence de 97,1% et 1 patient hémophile A mineur soit 2,9%, alors que chez les faibles répondeurs le titre d'inhibiteurs était entre 0,6 et 5 UB/ml dont 29 sont des hémophiles A sévères soit 90,62%, 1 hémophile A modéré soit 3,12% et 2 hémophiles A mineures soit 6,25% (figure 9).

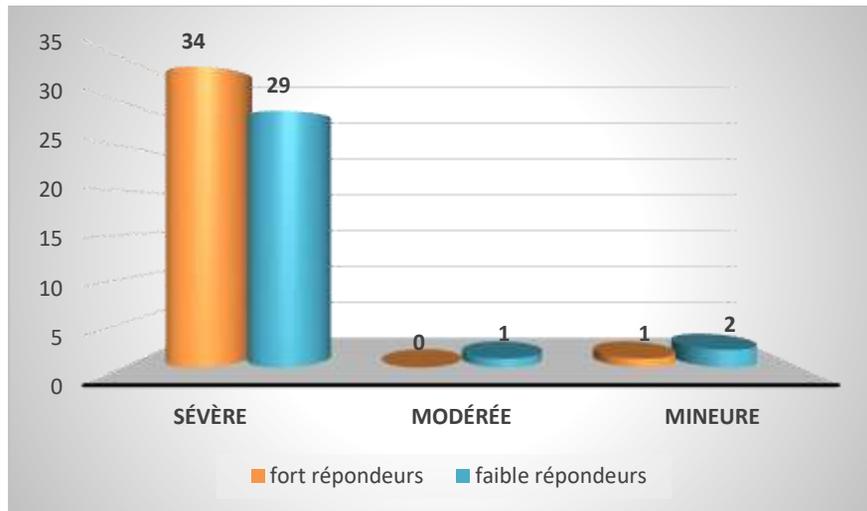


Figure 9: Répartition des inhibiteurs faibles et forts répondeurs selon le degré de sévérité

## 6 Cinétique des Inhibiteurs Anti-FVIII

Parmi les 67 patients inhibiteurs positifs, 37 patients ayant bénéficié plus d'un dosage du FVIII et plus d'un titrage d'inhibiteurs.

On peut distinguer 4 cinétiques d'évolution chez ces 37 patients en fonctions de leur titre en inhibiteurs :

- Treize patients fort répondeurs ayant un titrage en inhibiteurs toujours supérieur à 5 UB/ml.
- Six Patients faible répondeurs ayant un titrage en inhibiteurs toujours inférieur à 5 UB/ml.
- Huit patients ayant changé le titrage d'inhibiteurs de forts répondeurs en faibles répondeurs.
- Dix patients ayant changé le titrage d'inhibiteurs de faibles répondeurs en forts répondeurs.

# **DISCUSSION**

## **D- DISCUSSION :**

### **I. REVUE DE LA LITTERATURE**

#### 1 Physiologie de l'hémostase :

Le processus physiologique de l'hémostase répond à une série de réactions cellulaires et biochimiques à la suite de toute rupture du circuit vasculaire origine d'une fuite sanguine ou hémorragie dont la finalité est de stopper ou contrôler le saignement et la rupture de la brèche vasculaire. Ce processus de l'hémostase comprend trois grandes étapes/temps qui sont initiés simultanément dès qu'est enclenché le processus de l'hémostase :

##### a. Hémostase primaire

Conduit à la formation d'un clou plaquettaire appelé thrombus blanc par l'obturation initiale de la brèche vasculaire, cette étape est déclenchée en deux temps [8] :

- ❖ Temps vasculaire : caractérisé par une vasoconstriction réduisant le calibre vasculaire ce qui ralentit le débit sanguin et en conséquence réduit les pertes du sang. Cette vasoconstriction est induite par l'élasticité sous endothéliale des cellules musculaires lisses, ainsi que par le système neurovégétatif aboutit à la sécrétion des substances (sérotonine, endothéline, TXA2) en innervant des structures vasculaires.
- ❖ Temps plaquettaire : où interviennent les plaquettes circulantes, en s'adhérant à des structures sous-endothéliales comme le collagène, favorisée par la fixation du facteur de von Willebrand au collagène qui s'interagit avec les glycoprotéines plaquettaires (GPIb), cette interaction permet l'activation des plaquettes qui caractérisée par du changement de forme et de l'activation métabolique en présence de l'ATP et d'ions de calcium. Elles émettent des pseudopodes sur la surface d'adhésion et libèrent des substances proagrégantes, procoagulantes et vasomotrices (FV, vWF, sérotonine, fibrinogène...).

Par ailleurs, les plaquettes activées vont fixer les facteurs de coagulation vitamine K-dépendants grâce au phénomène de « flip-flop » membranaire.

Grâce à des substances proagrégantes comme ADP, traces de thrombine et fibrinogène qui crée des ponts adhésifs interplaquettaires en se fixant à son

récepteur membranaire gpIIb/IIIa, les plaquettes activées recrutent d'autres PLTs qui vont s'agréger entre elles. Ce phénomène nécessite aussi de l'énergie et d'ions Calcium et conduit au clou plaquettaire hémostatique et crée des conditions favorables de la coagulation.

### b. Coagulation sanguine

La coagulation sanguine vise à consolider le clou plaquettaire formé lors de l'étape d'hémostase primaire en créant un caillot de fibrine non soluble résultant de la transformation de fibrinogène et qui obturera définitivement la brèche vasculaire, sous l'action de la thrombine à la suite d'une cascade de réactions par l'intervention des facteurs plaquettaires et de protéines plasmatiques dites facteurs de coagulation, dont le facteur tissulaire est l'élément principal déclenchant ce processus quand une lésion vasculaire l'amène au contact du sang.

Le **tableau 4** résume les caractéristiques principales de ces facteurs.

*Tableau 3:Principales caractéristiques de facteurs de coagulation [9]*

<b>Protéines de la coagulation</b>	<b>Masse moléculaire (kDa)</b>	<b>Fonction</b>	<b>Concentration plasmatique (mg/l)</b>	<b>Demi-vie plasmatique (h)</b>
<b><u>Facteurs de la coagulation : I</u></b> (fibrinogène)	340	Substrat	2,4-10	120
II (prothrombine)*	72	Zymogène	100-150	80
V (Proaccelérine)	330	Cofacteur	5-10	24
VII (Proconvertine)*	50	Zymogène	50	6
VIII (Facteur antihémophilique A)	330	Cofacteur	0,1-0,2	12
IX (Facteur antihémophilique B)*	57	Zymogène	3-5	24
X (Facteur Stuart)*	59	Zymogène	7-17	48
XI (Facteur Rosenthal)	160	Zymogène	3-6	60

XII (Facteur Hageman)	80	Zymogène	30-40	60
XIII (facteur stabilisant de la fibrine)	320	Zymogène	20-30	240
Prékallikréine	85	Zymogène	25-50	35
Kininogène de haut poids moléculaire	100	Cofacteur	60-90	150
Facteur tissulaire**	47	Cofacteur	-	-
<b><u>Inhibiteurs de la coagulation :</u></b>				
Antithrombine	65	Seprine	180-300	60
Protéine C*	62	Zymogène	2,7-6	6
Protéine S*	70	Cofacteur	25	ND
HCII	65	Seprine	60-110	60
TFPI (inhibiteur du facteur tissulaire)	42	Inhibiteur de type Kunitz	0,1	ND

*Tous les zymogènes sont des précurseurs de sérine protéases, sauf le facteur XIII (zymogène d'une transglutaminase).*

*HCII : cofacteur II de l'héparine ;*

*ND : non déterminé.*

*\* : Synthèse vitamine K dépendante.*

*\*\* : Facteur tissulaire n'est pas une protéine plasmatique mais une protéine membranaire*

Classiquement les étapes de la coagulation font intervenir la voie endogène et exogène, cette théorie a été récemment substituée par une théorie moderne caractérisée par trois phases : **initiation, amplification et propagation** [9-10] (**figure 10**).

- ❖ **Etape d'initiation** : le facteur tissulaire (FT) exprimé par les fibroblastes, cellules musculaires lisses, se lie au facteur VII activé qui existe déjà à l'état de trace dans la circulation (FVIIa), pour former le complexe (FT – FVIIa) permettant l'activation des facteurs X (FX→FXa) et IX (FIX→FIXa). L'activation de ces facteurs permet ensuite la génération de quelques traces de thrombine (FIIa) en présence de calcium et des phospholipides représentés par la surface plaquettaire. La thrombine synthétisée n'est pas suffisante pour produire la fibrine nécessaire à la constitution du caillot, mais permet de déclencher la phase de propagation
- ❖ **Etape d'amplification** : aboutit à **l'accumulation des facteurs activés** à la surface des plaquettes.
  - Les traces de thrombine générées à la surface des cellules exprimant le FT vont permettre d'activer le facteur VIII (FVIII), le facteur XI (FXI) et le facteur V (FV), où le FVIII se sépare du vWF pour se lier aux phospholipides.
  - Le FIXa généré à la fin de la phase d'initiation se fixe sur les plaquettes où se lie au FVIII en présence du calcium. Cette liaison (FIXa-FVIII) implique les domaines A2 et A3 du FVIIIa créant un complexe ténase intrinsèque (FIXa-FVIIIa) dont l'activation du FX en FXa est augmentée du facteur  $> 10^5$ .
  - Par ailleurs, la thrombine crée un complexe prothrombinase (FXa-FVa) en activant le FV qui se fixe aussi à la surface des plaquettes.Ces facteurs de coagulation activés se retrouvent concentrés à la surface des plaquettes activées à la fin de cette étape
- ❖ **Etape de propagation** : La phase de propagation comporte l'assemblage de larges complexes enzymatiques à la surface des plaquettes, la génération « explosive » de fortes concentrations de thrombine induisant la formation d'un caillot stable. Le complexe ténase génère des quantités importantes de FXa.

L'activation du FX en FXa par le complexe tenase est 50 fois supérieure à celle du FX par le complexe [FT-FVIIa]. Le complexe prothrombinase clive la prothrombine (Facteur II de la coagulation) en thrombine, mais après la phase d'amplification, la présence de concentrations élevées de facteurs activés à la surface des plaquettes permet la génération « explosive » de quantités importantes de thrombine (thrombin burst) qui aura de nombreuses actions : activation en boucle du facteur XI (FXI), du FVIII et du FV, activation des plaquettes et surtout protéolyse du fibrinogène en monomères de fibrine.

La polymérisation spontanée de ces monomères crée la trame du réseau de fibrine qui structure le caillot. Ce caillot est consolidé par l'action du FXIII, lui-même activé par la thrombine.

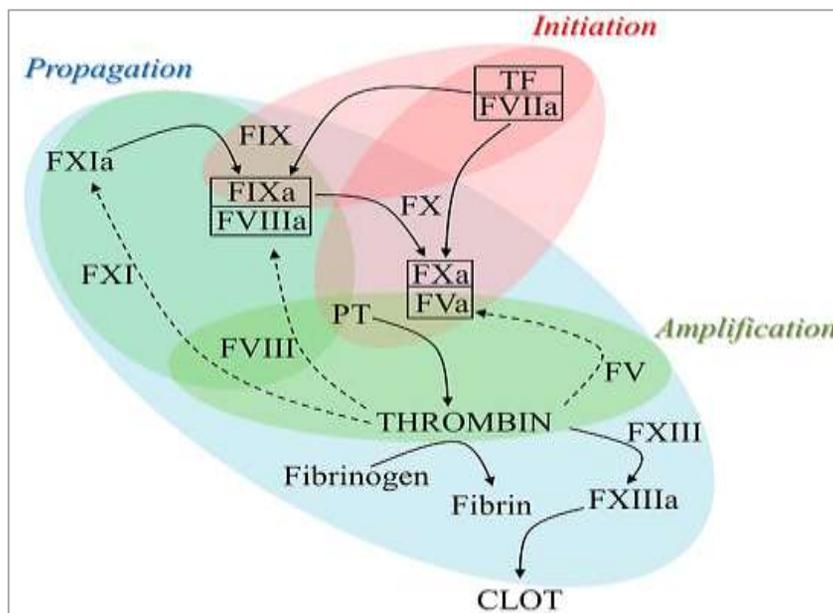


Figure 10:schéma représentative de trois étapes de la coagulation

### c. Fibrinolyse

Intervient de façon physiologique pour assurer la reperméabilisation du vaisseau. La plasmine, issue du plasminogène sous l'action de l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA), agit en particulier sur la fibrine pour former les produits de dégradation de la fibrine (PDF) et les D-Dimères (DD) [11].

Une régulation précise est nécessaire pour maintenir la fluidité du sang. Elle est assurée par l'antithrombine (AT), le système protéine S et C (PS, PC) et l'inhibiteur du facteur tissulaire (TFPI). Ces molécules ont différents modes d'action sur plusieurs facteurs de la coagulation. D'autres protéines agissent sur le système fibrinolytique tels que l'inhibiteur de t-PA (PAI1) et les inhibiteurs de la plasmine ( $\alpha 2$  antiplasmine et  $\alpha 2$  macroglobuline).

#### d. Exploration de l'hémostase

Vu que l'intérêt du processus de l'hémostase dans la limite des pertes sanguines, toute altération ou perturbation de l'un de ses acteurs principaux peut aboutir à la génération d'un processus voire une maladie hémorragique, comme le cas l'hémophilie lors d'un déficit constitutionnel ou acquis en facteur de la coagulation, d'où la nécessité d'une exploration d'un bilan de l'hémostase à la recherche d'une cause acquise ou constitutionnelle. De même, une exploration de l'hémostase doit s'envisager à titre de bilan opératoire pour des interventions chirurgicales présentant un risque hémorragique.

##### ❖ Exploration de l'hémostase primaire

Parmi les bilans de l'hémostase primaire, on trouve en premier lieu la numération plaquettaire faite en hémogramme qui est bien corrélée avec un risque hémorragique, la numération plaquettaire a pour intérêt de rechercher/suspecter une thrombopénie.

La valeur des plaquettes de référence est située entre 150 et 400  $10^5/l$ .

Le temps de saignement est le temps nécessaire pour l'arrêt d'un saignement provoqué par une brèche au niveau de l'avant-bras sous une pression de 40 mm de mercure. La technique d'Ivy-incision est la plus utilisée. Il explore l'hémostase primaire. Un malade dont le temps de saignement est supérieur à 10 minutes a un risque accru d'hémorragie, Son allongement indique soit une anomalie quantitative ou qualitative des plaquettes, soit un déficit du vWF, soit une anomalie vasculaire.

##### ❖ Exploration de la coagulation

Le bilan de coagulation de première intention est effectué en tube d'hémostase (**tube citraté**), comporte [12] :

- Le temps de quick (TQ) ou taux de prothrombine (TP), qui permet d'étudier globalement l'activité des facteurs de la voie extrinsèque (facteurs du complexe prothrombinique) : facteur II (prothrombine), facteur V, facteur VII et le facteur X. Son

principe consiste à comparer, en présence de la thromboplastine calcique, le temps de coagulation du plasma à étudier à celui d'un témoin normal servant de référence.

- Le temps de céphaline avec activateur (TCA), permet d'étudier globalement l'activité des facteurs de la voie intrinsèque : facteurs de la phase contact (prékallicréine, Kininogène de haut poids moléculaire, facteur XII), facteur XI, facteur IX (facteur anti-hémophilique B), facteur VIII (facteur antihémophilique A), facteur X, facteur V, facteur II et le fibrinogène. Le TCA est le temps de recalcification plasmatique en présence de céphaline et d'un activateur (silice).

## 2 Hémophilie A

### a. Description et caractéristiques de l'hémophilie A

L'hémophilie A est une maladie héréditaire de l'hémostase rare, à transmission récessive liée au sexe dont le gène en cause est situé dans le bras long du chromosome X, due à un défaut de production ou du déficit constitutionnel en facteur VIII de coagulation empêchant le sang à se coaguler. Elle se traduit par des épisodes hémorragiques. Les hémorragies les plus fréquentes sont au niveau d'articulation (hémarthroses), des muscles, au niveau buccal, ainsi qu'après interventions chirurgicales/ circoncision et rarement de saignements au niveau du SNC.

Chez le patient atteint d'hémophilie, l'adhésion plaquettaire se fait normalement sur le site de la lésion vasculaire, mais la génération de thrombine est retardée ce qui entraîne un ralentissement de la coagulation. En l'absence d'une tenase intrinsèque fonctionnelle, du fait soit d'un déficit de l'enzyme FIXa, soit d'un déficit du cofacteur FVIIIa, il ne peut pas y avoir cette « explosion de la thrombine » nécessaire à la phase de propagation et indispensable pour conférer une structure stable au caillot. L'hémophilie apparaît ainsi essentiellement comme un défaut de la génération de thrombine à la surface des plaquettes, entraînant une perturbation de la cascade des réactions de la coagulation, ainsi cette dernière est inachevée et ne fonctionne pas normalement, le clou plaquettaire demeure instable, et l'hémorragie se poursuit provoquant un saignement prolongé.

L'hémophilie A touche généralement environ un sur 5000 nouveau-nés de sexe masculin. La sévérité de la maladie est variable et dépendante de l'importance du déficit en Facteur VIII. Il se trouve aussi un type rare de l'hémophilie A chez des sujets non déficitaires, il

s'agit de **l'hémophilie A acquise** à l'origine de l'apparition d'auto-anticorps anti-facteur VIII de sous classe IgG1 et IgG4, IgM et IgA. Ce type est souvent associé à d'autres maladies (néoplasie, maladie auto-immune) ou grossesse [12], avec incidence de 1 à 4/1 millions d'habitants. Cette affection est plus souvent rencontrée chez l'adulte sans prédominance de sexe [13-14].

Dans les 2/3 des cas, il existe un historique familial, tandis que l'autre tier relève d'apparition sporadique de la maladie (mutation de novo).

La forme féminine de l'hémophilie A est exceptionnelle, elle est apparue chez des filles "double hétérozygotes" pour l'hémophilie ou bien en cas d'expression du gène muté chez une fille, dont les causes sont :

- Une lyonisation extrême inactivant la majorité des chromosomes porteurs du gène,
- Un syndrome de Turner (X0),
- Une translocation X-autosome,
- Des parents dont l'homme est hémophile avec une femme conductrice,
- Une disomie X maternelle : anomalie de disjonction du chromosome X au cours de la méiose aboutissant à la présence chez le zygote de deux chromosomes X maternels.

L'hémophilie A est classée en trois classes, dont la sévérité est inversement proportionnelle avec le taux de FVIII dans la circulation [15].

- Hémophilie A sévère : Taux de FVIII <1%
- Hémophilie A modérée : Taux de FVIII compris entre 1% et 5%
- Hémophilie A mineure : Taux de FVIII compris entre 5% et <30%

De multiples anomalies génétiques dans la séquence nucléotidique ont été décrites à l'origine de déficits congénitaux en FVIII. Ces anomalies entraînent un déficit plus ou moins sévère en FVIII, qui va de la simple diminution du taux de FVIII par diminution de sécrétion ou présence de facteur FVIII instable jusqu'au déficit complet de FVIII fonctionnel (FVIII absent ou FVIII tronqué).

#### e. Epidémiologie de l'hémophilie A

Selon le rapport de l'enquête mondiale annuelle de WFH, l'hémophilie en général touche plus de 184000 personnes dans le monde, dont 149764 sont des hémophiles A, les grands cas sont enregistrés dans l'Inde, les Etats Unies, la Chine et le Brésil (**tableau 4**). La prévalence de l'hémophilie A en Afrique est mal connue, les pays avec le plus nombre des hémophiles A sont l'Egypte 4504 hémophiles A, l'Afrique du Sud 1848 cas, l'Algérie 1798 cas et le Soudan avec 828 patients [16].

La prévalence de l'hémophilie A pour 100000 hommes est de 17,1 cas dont 6,0 cas hémophiles A sévère, alors que la prévalence à la naissance est de 24,6 HA et de 9,5 cas HA sévère. D'après une étude méta-analyse basée sur les registres nationaux de 3 pays (Canada, France et Royaume-Uni), le Collège Américain des Médecins estime qu'il existe actuellement 1 125 000 cas d'hémophiles dans le monde, dont 418 000 cas atteints d'hémophilie sévère [17].

Au Maroc on ne dispose pas à l'état actuel de données statistiques exactes sur l'hémophilie, si on prend l'estimation de l'OMS 1/5000 donc l'estimation du nombre au Maroc est 3000 cas selon le même rapport, sur 844 hémophiles 663 personnes sont atteintes de l'hémophilie A (78,55%) [16].

*Tableau 4:Données sur la population des quatre pays avec le plus nombre de l'HA, selon le rapport sur l'enquête globale annuelle de WFH 2016 (World Federation of Hemophilia, 2017).*

<b>Pays</b>	<b>Nombre de cas Hémophiles A</b>	<b>Pourcentage %</b>
Inde	15218	83
USA	12996	77
Chine	12533	87
Brésil	10123	83,5

## f. Facteur VIII de coagulation

### c.1 Gène F8

Le gène F8 est situé à l'extrémité terminale du bras long du chromosome X en position Xq28. Ce gène a été cloné en 1984 grâce aux travaux de Gitschier et ses collaborateurs [18], il s'étend sur une longueur de 186 kpb, le transcrit du F8 est constitué de 26 de 69 à 3106 nucléotides, tandis que la partie non codante est répartie en 25 introns de longueur qui varie entre 207 et 32400 pb [19] dont l'intron 22 mesure 32400 pb et renferme deux transcrits, le F8A qui fait 1,5 kb dans le sens inverse du F8 avec 2 séquences homologues au niveau du télomère Xq à environ 400 Kb du gène FVIII, le gène F8A code pour une protéine associée à l'huntingtine HAP40 dont la mutation est associée à la maladie d'Huntington [20]. Le second transcrit de l'intron 22 est le gène F8B mesure 2,5 Kb [21] (**figure 11**).

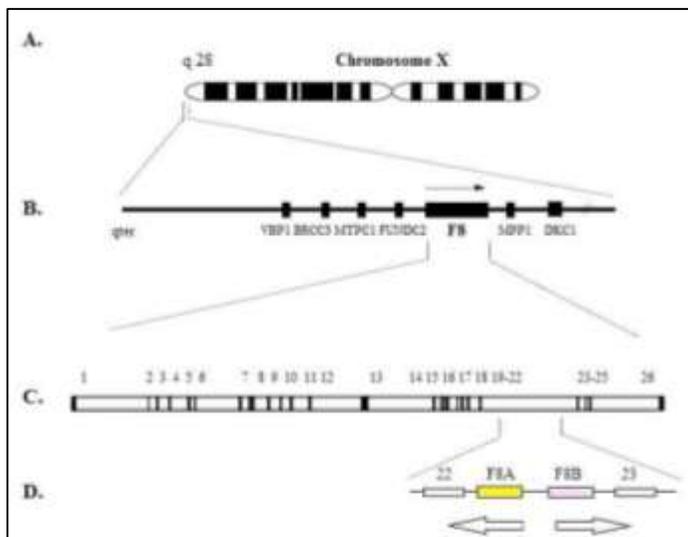


Figure 11:localisation et structure du gène F8 [18]

*A : Chromosome X ; B : Localisation du gène FVIII à 1Mb du Xqter, les 2 séquences homologues à F8A sont représentées ; C : Le gène FVIII avec les 26 exons intercalés des 25 introns ; D : L'intron 22 avec les 2 transcrits F8A et F8B.*

La lecture 5'-3' du gène F8 est orientée dans le sens du télomère vers le centromère, dont la transcription commence au niveau du 170<sup>ème</sup> nucléotide du gène qui se trouve en amont du codant d'initiation de la traduction ATG [18].

## c.2 Protéine FVIII

Le produit de la traduction d'ARNm du F8 est une glycoprotéine à plusieurs domaines présente à l'état de traces, contient 2332 acides aminés à l'état mature après élimination de 19 acides aminés du signal peptide lors de translocation dans le réticulum endoplasmique.

Le facteur VIII est synthétisé majoritairement au niveau du foie par les cellules endothéliales sinusoidales [22] et les hépatocytes, et aussi par les reins, la rate et le placenta, mais il est absent dans l'endothélium vasculaire.

La protéine est composée de 3 domaines A, B et C (un triple domaine A, un domaine et un double domaine C) arrangés de façon suivante : **A1-A2-B-A3-C1-C2** avec présence de 3 **régions acides** ; **a1** entre A1-A2, **a2** entre A2-B et **a3** entre B-A3 [23]. Lors de l'activation du FVIII une grande partie du domaine B peut être déléetée sans perte de l'activité est clivé ce qui suggère qu'il n'intervient pas dans les fonctions procoagulantes du FVIII [24] (**Figure 12**).

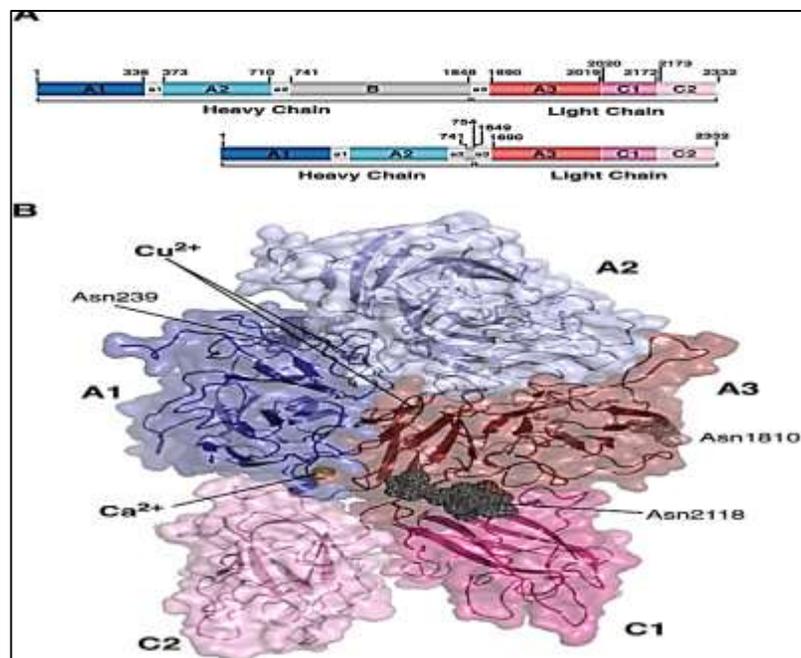


Figure 12: Structure de facteur VIII : A- organisation des domaines du FVIII humain et FVIII délété du domaine B. B- structure 3D du FVIII délété du domaine B [25]

Après translocation, le FVIII interagit avec nombreuses protéines et va se transporter vers l'appareil de Golgi où il subit des modifications post-traductionnelles à savoir les N- et O-glycosylations, la sulfatation de résidus tyrosines [26-27]. Le FVIII subit aussi un clivage

protéolytique au niveau de motifs Arg1313 et Arg1648 dans le domaine B, ce qui rompt les liaisons entre la chaîne lourde et la chaîne légère [28], et par suite sécrétion d'un hétérodimère circulant de chaîne lourde (A1-a1-A2-a2-B) et de chaîne légère (a3-A3-C1-C2) associée de manière non covalente via l'interaction des domaines A1 et A3 par intervention d'ion calcium et cuivre [25].

Cet hétérodimère libéré interagit avec sa molécule chaperonne le vWF via les domaines a3 et C2 de la chaîne légère (**Figure 13**).

Le complexe FVIII-vWF a pour rôle de stabiliser le FVIII, de le protéger de dégradation protéolytique et de permettre son transport vers le site de saignement [29].

La sécrétion se fait sous une forme inactive qui ne deviendra active qu'après l'activation par l'action de la thrombine dans le plasma sanguin. Le FVIII se transforme en un hétérotrimère A1A2-A3C1C2. Il intervient en tant que **cofacteur du FIXa dans le complexe ténase intrinsèque**, associant FIXa, PLs membranaires des plaquettes activées et FX en présence de  $Ca^{2+}$ . Des clivages protéolytiques se font sur la chaîne lourde (résidus Arg372 et Arg740) et dans la chaîne légère (Arg1689), le FVIIIa adopte sa forme hétérotrimérique et réduit son affinité pour le vWF.

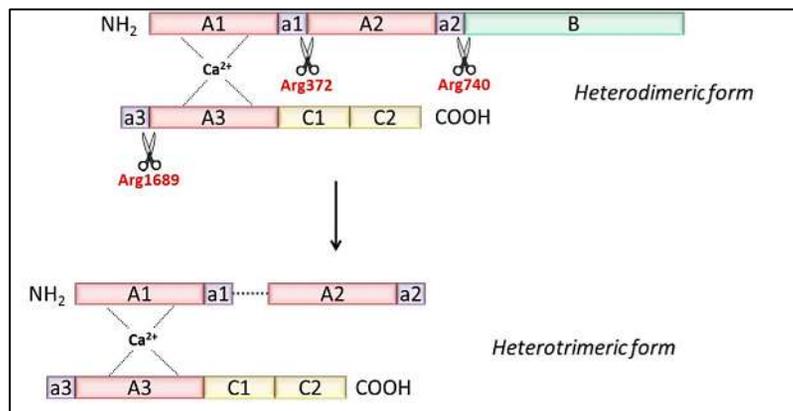


Figure 13: Activation du FVIII : la thrombine active le FVIII par un clivage protéolytique dans la chaîne lourde (résidus Arg372 et Arg740) et dans la chaîne légère (Arg1689), le FVIIIa adopte sa forme hétérotrimérique et réduit son affinité pour le vWF.

Le FIXa se lie à la chaîne légère via les résidus 1811-1818 du domaine A3 constituant un site de liaison de haute affinité pour le domaine Gla du FIXa, [30] ainsi que par son domaine protéase se lie au domaine A2 de la chaîne lourde au niveau des résidus 558-565 [31].

Le FVIIIa, via sa chaîne légère, se lie aux PLs chargés négativement, les phosphatidylsérines (PS), exposés à la membrane des plaquettes activées [32] et des microparticules. Un site de liaison pour la PS a été localisé au niveau des résidus 2303-2332 du domaine C2 [33].

En présence des plaquettes, la liaison des domaines A2 et A3 du FVIII au FIXa, induit un changement de conformation du FIXa favorisant son activité catalytique pour le substrat FX, qui lui, est lié au niveau de la région acide  $\alpha 1$  du FVIIIa, entre les résidus 337 et 372 [34].

**L'inactivation** du FVIIIa se fait par la protéine C activée qui se lie à la chaîne légère du FVIII pour couper uniquement la chaîne lourde au niveau des résidus 740 et 336.

### c.3 Concentration physiologique

Le taux plasmatique physiologique est faible : 0,10 à 0,20 mg/l avec une activité spécifique de 2 à 5 UI/mg (1UI/ml correspond à une activité de 100 %). La demi-vie du FVIII libre est d'environ 2,4 heures, tandis que celle du complexe FVIII-vWF est de 12 heures.

### c.4 Méthodes de dosage

Le dosage du FVIII se fait habituellement par **une méthode chronométrique** en un seul temps avec un plasma déficient en FVIII. Ce dosage permet d'établir la sévérité et le pronostic à long terme de la maladie et est basé sur un test dérivé du TCA et évalue la capacité de l'échantillon à tester, à corriger ou à raccourcir le temps de coagulation d'un plasma complètement déficient en facteur VIII. Le temps de coagulation mesuré est directement fonction de l'activité du facteur VIII de l'échantillon.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité par rapport à un plasma commercial de référence (calibrateur), d'après la droite d'étalonnage établie pour les lots de réactifs (**Figure 14**).

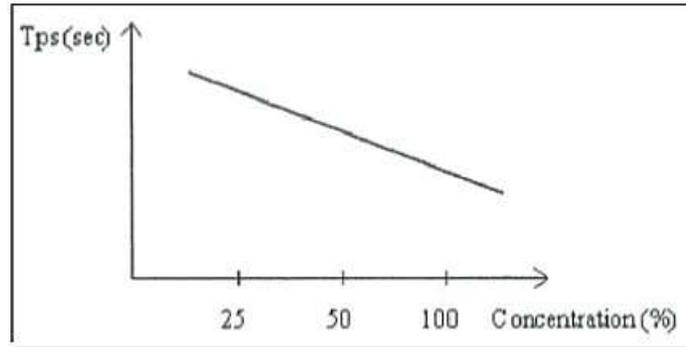


Figure 14: Droite d'étalonnage (Log/Log) de l'allongement de TCA [35]

**La méthode chromogénique (FVIII:C-Chr)** est une méthode, en deux temps, de mesure de l'activité du facteur VIII. Cette technique repose sur la capacité du FVIII d'agir comme un cofacteur dans l'activation du facteur X par le facteur IXa en présence de phospholipides et de calcium [35] (**figure15**). Le premier temps l'échantillon à tester est incubé en présence de phospholipides, de calcium et des facteurs IXa et X. Du facteur Xa est alors généré en quantité proportionnelle à la concentration de facteur VIII contenue dans l'échantillon. En deuxième temps, la quantité de FXa produite est mesurée par l'ajout d'un substrat chromogène et la coloration est mesurée à 405 nm. L'intensité de la coloration est alors proportionnelle au taux de FVIII du plasma à tester.

Les résultats du dosage sont habituellement exprimés en pourcentages (plus rarement en UI/ml : 1 UI/ml=100%).

**Valeurs de référence :** 50 à 150 % (0,50 à 1,50 UI/ml) chez l'adulte et l'enfant. Ces valeurs peuvent être changées dans des circonstances physiologiques, à la naissance le taux du FVIII compris entre 50 et 200, alors que pendant la grossesse peut augmenter jusqu'à 500 pour parer à l'hémorragie de l'accouchement.

5% des sujets avec d'hémophilie A ont une activité plasmatique de FVIII indétectable, car leur FVIII est non fonctionnel, mais ils présentent en revanche un taux normal de FVIII circulant. Ces patients sont dits « cross-reactive material (CRM) positive » [36] car ils expriment un FVIII, certes inactif, mais présent dans la circulation, contrairement aux patients dits CRM-négatifs qui n'expriment pas du tout de FVIII.

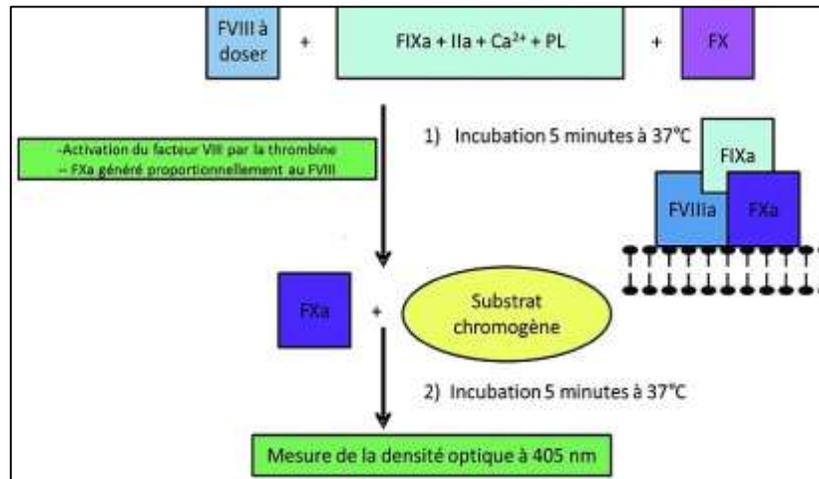


Figure 15: Principe de la mesure du FVIII par méthode chromogénique [35]

Le plasma à tester est incubé en présence de FIXa, de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), de phospholipides (PL) et de facteur X. Le facteur VIII de l'échantillon est activé par la thrombine. Lors de cette étape, du FXa est généré de manière proportionnelle à la quantité de facteur VIII de l'échantillon à tester. Dans un deuxième temps, la quantité de FXa produite est mesurée par l'ajout d'un substrat chromogène et la coloration est mesurée à 405 nm. L'intensité de la coloration est alors proportionnelle au taux de FVIII du plasma à tester.

### 3 Anomalies génétiques du FVIII responsables de l'hémophilie A

Au cours de son expression, le gène F8 subit de nombreuses mutations au long de ses exons aboutissant à l'arrêt de synthèse de la protéine anti-hémophilique A, certaines mutations sont trouvées aussi dans les régions introniques, il s'agit de l'inversion de l'intron 1 et l'intron 22. Les mécanismes mutationnels associés à l'hémophilie A sont multiples : la délétion, la duplication, l'insertion, l'inversion, l'insertion/délétion ainsi que la substitution, ces mécanismes sont à l'origine de différents types de mutations, comme le décalage d'une séquence de lecture, insertion d'un codon stop ou mutation faux-sens [37].

Les derniers résultats de la liste des mutations issue du *CDC Hemophilia A Mutation Project (CHAMP)* ont répertorié plus de 2542 types de mutations isolées chez les hémophiles [38], avec 48,7% de mutations faux-sens, 24% de décalage et environ 11% de mutations non-sens (**tableau 5**), et les mutations non-sens générant habituellement des formes sévères, les mutations faux-sens, générant des formes modérées ou mineures. Un

autre type de mutation plus fréquent dans les formes sévères est l'inversion de l'intron 22, il s'agit d'une recombinaison intrachromosomique entre le gène F8A et l'un de ses homologues près du télomère. Il en résulte une absence d'épissage entre l'exon 22 et l'exon 23 [39].

Ces types de mutations sont distribuées au long des exons du gène F8 codant les domaines de la protéine. Les mutations non-sens et de type de décalage sont réparties sur l'ensemble des domaines FVIII. Cependant, les mutations faux-sens sont dispersées tout au long des domaines à l'exception du domaine B où elles sont relativement rares (**figure 16**).

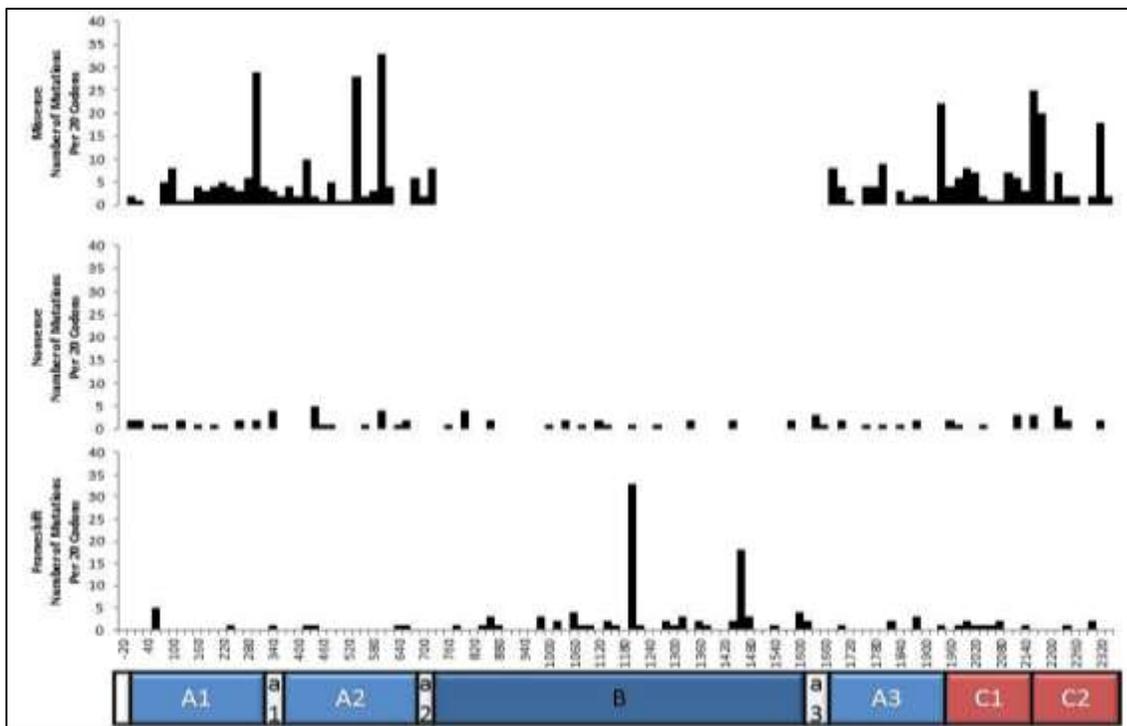


Figure 16: Distribution sur les différents domaines du FVIII des mutations ponctuelles [38]

Tableau 5: Liste des mutations responsables d'HA répertoriées dans la CHAMP database mise à jour Mars 2013 <http://www.cdc.gov/ncbddd/hemophilia/champs.html>.

Type de mutation	Nombre de mutations	Pourcentage %
<u>Mutations ponctuelles</u>	<b>1730</b>	<b>67,68</b>
Faux sens	1244	48,7
Nonsense	290	11,3
Au niveau de site d'épissage	196	7,7
<u>Mutations de type décalage de cadre de lecture</u>	<b>597</b>	<b>23,3</b>
Délétions	419	16,4
Duplications	129	5
Insertions	25	0,1
Délétions/Insertion	24	0,09
<u>Délétions</u>	<b>155</b>	<b>6</b>
Micro-délétions	<b>121</b>	<b>4,7</b>
Grandes délétions	<b>34</b>	<b>0,13</b>
<u>Insertions</u>	<b>13</b>	<b>0,05</b>
Petites insertions	<b>7</b>	<b>0,03</b>
Grandes insertions	<b>6</b>	<b>0,02</b>
<u>Duplications</u>	<b>26</b>	<b>0,1</b>
Petites duplications	<b>5</b>	<b>0,01</b>
Grandes duplications	<b>21</b>	<b>0,09</b>
<u>Autres mutations</u>	<b>21</b>	<b>0,09</b>
Mutations silencieuses	15	0,05
Au niveau du promoteur	6	0,04
<b>Total</b>	<b>2556</b>	<b>100</b>

#### 4 Manifestations cliniques de l'hémophilie A

La fréquence et l'intensité des manifestations hémorragiques de l'Hémophilie ne dépendent pas de son type mais de la sévérité du déficit en facteur de la coagulation (**tableau 4**).

### a. Forme majeure

Les hémorragies et leurs conséquences sont les signes essentiels de l'hémophilie en général qui sont aggravées et fréquentées inversement en fonction du taux du facteur de coagulation concerné, ainsi leur localisation est très caractéristique de l'hémophilie. D'après une étude rétrospective réalisée sur 131 patients hémophiles dont 93% sont des HA, les épisodes hémorragiques les plus répandues sont manifestées par des Hémarthroses (72%), suivies hématomes (55,7%) puis les hémorragies extériorisées (37,4%) (**figure 17**) [40].

#### - Les Hémarthroses :

Sont les hémorragies intra-articulaires atteignent en préférences les genoux, les chevilles, les coudes et les hanches. Elles sont caractérisées par de douleurs d'intensité croissante avec le temps et par de gonflement articulaire à la suite de l'épanchement du sang à l'intérieur de la synoviale qui résorbe les éléments hématiques, puis les synoviocytes et les chondrocytes se surchargent en fer et libèrent des enzymes lysosomiales responsables d'une synovite provoquant leur lyse [41].

Par ailleurs, l'altération du cartilage est secondaire à la libération intra-articulaire des produits de dégradation du sang, à l'hyperpression intra-articulaire [42] et à l'hyperplasie synoviale qui entraîne des érosions aux zones de réflexion de la synoviale. On distingue :

- Hémarthrose aiguë : régressive sous traitement et ne laisse pas de séquelles cliniquement décelables.
- Hémarthrose subaiguë : survenant après répétition des épisodes d'hémarthroses sur une même articulation qui ne récupère pas totalement, on décèle des saignements avec diminution de mobilité et gonflement articulaire dans lequel peuvent intervenir un épanchement liquidien articulaire chronique, une hypertrophie synoviale et des atteintes ligamentaires.
- Arthropathie chronique : avec déformations articulaires évoluant vers la destruction articulaire, caractérisée par atteinte synoviale avec synovite hypertrophique, constituant un pannus hypervascularisé favorisant la répétition des saignements et la destruction cartilagineuse.

### - Les Hématomes :

Se manifestent à l'occasion de traumatismes minimes ou spontanément où le muscle se gonfle et devient douloureux à l'intérieur duquel le sang exerce une pression pouvant provoquant la compression de nerfs et de vaisseaux ce qui crée de paralysie et d'ischémie rapidement irréversible. Les hématomes sont généralement localisés au pli du coude, à l'aîne, dans le psoas (nerf crural), au muscle fessier ou au mollet... [42].

On distingue les hématomes superficiels (muscles des membres ou de la paroi abdominale) des hématomes profonds (psoas-iliaque). Ainsi que chez le jeune enfant, la déperdition sanguine dans le muscle à grande gaine lâche (fessiers, psoas, cuisses, paroi abdominale) et l'obstruction ou compression des voies respiratoires et des axes vasculaires à destinée céphalique (langue, plancher de la bouche, cou) sont responsables aux hématomes faisant courir un risque vital par anémie aiguë différents aux hématomes à haut risque fonctionnel dans les muscles à petite gaine serrée, comme la loge antéro-externe de jambe (syndrome de loge), l'avant-bras et la main (syndrome de Volkmann).

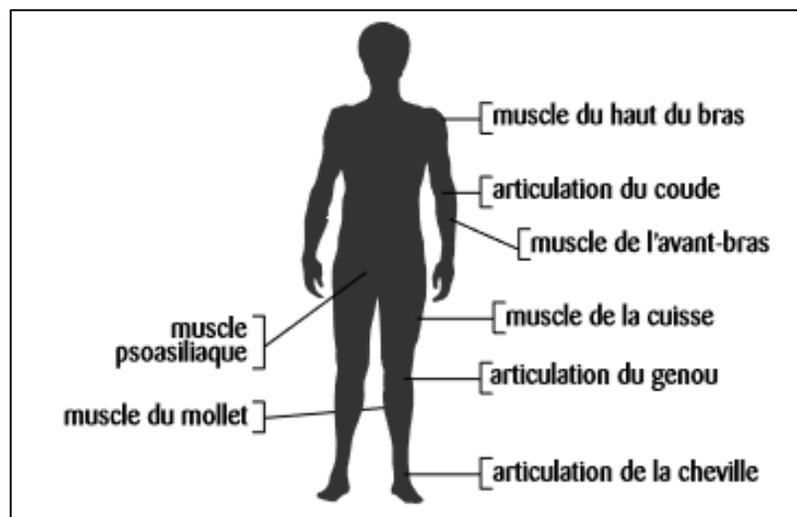


Figure 17:localisations des hémarthroses et des hématomes chez l'hémophile

### - Autres hémorragies

Les hémorragies intracrâniennes sont très rares, mais parfois révélateurs chez le nouveau-né.

Les hémorragies extériorisées ont de localisations variées, comprenant *les hémorragies viscérales* (hématuries qui sont généralement spontanées, récidivantes et moins fréquentes

et aussi hémorragies digestives), *les hémorragies cutanéomuqueuses* (Gingivorragies – Epistaxis- Ecchymoses) [15] et *les hémorragies post opératoire* (Lors d'une amygdalectomie, circoncision, extraction dentaire ou de toute intervention pratiquée, chez un hémophile non diagnostiqué d'où l'intérêt de pratiquer un bilan d'hémostase complet avant tout acte chirurgical) [43].

#### **b. Forme modérée et mineure**

Le tableau clinique peut se résumer aux hémorragies postopératoires ou suivant un traumatisme important.

### **5 Diagnostic biologique de l'hémophilie A**

#### **a. Diagnostic phénotypique**

Repose sur un interrogatoire minutieux à la recherche d'une histoire hémorragique personnelle et/ou familiale qui permettra d'identifier les accidents hémorragiques et les complications survenues dans certaines situations cliniques caractéristiques de la maladie, associé à un bilan d'hémostase, permettant la caractérisation du déficit en FVIII devant un allongement isolé du temps de céphaline activateur (TCA). Le temps de saignement, la numération plaquettaire, le temps de Quick (TQ) et le temps de thrombine sont normaux [21].

#### **b. Diagnostic d'orientation**

Les examens d'hémostase de première intention effectués chez un hémophile sont : TCA (L'hémophilie est suspectée devant un allongement isolé du TCA), TQ, taux de fibrinogène, temps de saignement, numération plaquettaire.

#### **c. Diagnostic de confirmation**

Ce diagnostic repose sur les dosages des activités FVIII, permettant aussi d'évaluer la sévérité du déficit. L'activité du FVIII mesurée est représentée par une droite d'étalonnage d'allongement du TCA.

#### **d. Diagnostic antigénique**

Le FVIII antigène (FVIII:Ag) peut être dosé par radio immunologie ou par une technique ELISA (ELISA FVIII ou ELISA FIX) [44]. Les patients chez lesquels le dosage

antigénique retrouve, même à l'état de traces, la présence du FVIII sont dits aussi « CRM+ » (Cross Reacting Material). Il s'agit d'une synthèse normale ou réduite d'une molécule de FVIII qualitativement anormale.

Habituellement le taux de FVIII : Ag est proche de taux de FVIII : C.

#### **e. Diagnostic génétique**

Permet l'identification des mutations responsables de l'anomalie, soit en mettant en évidence du défaut génétique en cause comme l'inversion de l'intron 22. Soit par l'association du défaut causal et de marqueurs polymorphes situés proximité ou sein gène F8, à partir de l'haplotype de l'X portant le gène muté (ADN des garçons malades) et de l'haplotype de l'X sain (ADN du sujet sain) [45].

Le screening des autres anomalies géniques se fait par RT-PCR sur RNAm des exons du gène FVIII excepté l'exon 14 dont la détection des anomalies nécessite une amplification du DNA par PCR. Dans le cas où la mutation n'aurait pas pu être identifiée au préalable, l'alternative est d'utiliser le séquençage automatique du gène FVIII [21].

## **6 Traitement de l'hémophilie A et ses complications**

La prise en charge de l'hémophilie repose sur l'administration par voie intraveineuse de concentrés du FVIII. Ce traitement substitutif est à visée curative (à la demande) ou prophylactique, permet de prolonger la durée de vie des hémophiles et de gérer les complications de la pathologie selon le principe qui consiste à augmenter le taux du facteur anti-hémophilique dans le sang des patients hémophiles de > 30%, entrepris par un service spécialisé. D'autres traitements à action anti fibrinolytique sont aussi utilisés notamment dans l'hémophilie A légère ou modérée comme la Desmopressine (DDAVP).

La modalité d'administration dépend du type et la sévérité de l'hémophilie, du type de complication hémorragique et du poids du patient. Le taux de récupération du produit injecté par voie intra-veineuse est d'une UI/Kg du poids corporel, l'injection d'1 UI/kg aboutit à l'augmentation d'environ 2% pour le FVIII (augmentation de l'activité coagulante du FVIII de 2 UI/dl). Le principe d'administration du FAH est le traitement à la demande d'un accident hémorragique administré au moment du saignement pour le

stopper, ou prophylactique pour but de prévenir les accidents hémorragiques. Ce dernier traitement substitutif consiste à donner régulièrement des concentrés de facteur FVIII en moyenne de 2 à 3 fois par semaine, d'une manière systématique en dehors des épisodes hémorragiques (**tableau 6**).

*Tableau 6:principe d'administration du FVIII [46]*

<b>Type du traitement</b>	<b>Définition</b>
<b>Traitement épisodique</b> « à la demande »	Traitement administré au moment du saignement.
<b>Prophylaxie continue</b> Prophylaxie primaire	Traitement continu régulier entamé avant la deuxième hémorragie des grosses articulations et administré avant l'âge de 3 ans.
Prophylaxie secondaire	Traitement continu régulier entamé après au moins deux hémorragies des grosses articulations, mais avant l'apparition d'une maladie articulaire.
Prophylaxie tertiaire	Traitement continu régulier entamé après l'apparition d'une maladie articulaire en vue de prévenir d'autres lésions.
<b>Prophylaxie intermittente</b> « périodique »	Traitement administré pendant de brèves périodes pour prévenir les saignements ; par exemple, pendant ou après une intervention chirurgicale.

Dans le traitement substitutif on utilise :

- ✓ Produits plasmatiques (pdFVIII) : préparer à partir d'un fractionnement du plasma humain, stabilisé par l'adjonction d'albumine humaine pasteurisée, puis subit d'inactivation virale pour prévenir le risque d'infection (utilisée essentiellement contre le VIH, l'HCV et l'HBV).

- ✓ Produits recombinants (rFVIII) : ces concentrés issus de la biotechnologie, ayant plus d'avantages par rapport le pdFVIII tel l'absence du risque infectieux et l'indépendance vis à vis du don du plasma.

Les principaux facteurs anti-hémophiliques plasmatiques et recombinants sont présentés dans le **tableau 7**

- ✓ FVIII à demi-vie prolongée : sont la dernière génération des rFVIII, pégylé de façon dirigée en introduisant des cystéines dans des séquences du FVIII au niveau des zones qui n'interagissent pas ses ligands physiologiques (vWF, FIX, FX ou la thrombine), ou bien fusionnés avec le fragment Fc d'une immunoglobuline humaine IgG [rFVIII Fc] qui le protège d'une dégradation catalytique. L'exemple d'un rFVIII Fc thérapeutique est celui de l'efmoroctocog (Eloctate), produit dans une lignée de cellules rénales embryonnaires humaines (HEK) et indiqué dans le traitement et la prophylaxie des épisodes hémorragiques chez les hémophiles A.

Ce traitement a été utilisé au Maroc dans une étude observationnelle sur 52 patients hémophiles dont 43 sont hémophiles A pour une durée de 12 mois, a montré une efficacité et une tolérance pour des différentes doses sans effets indésirables notés [47].

*Tableau 7: Exemples de FAH plasmatiques et recombinants*

	Type de produit	Nom commercial	Lignée cellulaire (a)	Inactivation virale (b)	Disponibilité au Maroc
<b>Facteur VIII</b>	Plasmatique	Factane		SD, nanofiltration	Disponible
		Octanate		SD, chauffage	Disponible
	Recombinant	Advate	CHO	SD, chromatographie IA	Disponible
		Helixate nexgen	BHK	SD, chromatographie IA	-
		Kogenate Bayer	BHK	SD, chromatographie IA	Disponible
		Refacto	CHO	SD, chromatographie IA	Disponible

<b>Facteur IX</b>		Betafact		SD, nanofiltration	Disponible
		Mononine		SD, UF, chromatographie IA	-
		Octafix		SD, nanofiltration	Disponible
		Benefix	CHO	Chromatographie, nanofiltration	Disponible
<b>Facteurs activés</b>	Recombinant	Novoseven	BHK	TritonX, chromatographie IA	Disponible
<b>Facteurs activés</b>	Plasmatisque	FEIBA		Chauffage	Enregistré

*a : lignée cellulaire à partir desquelles sont fabriqués les produits recombinés ; CHO : chinese hamster ovary ; BHK : baby hamster kidney*

*b : procédés d'inactivation virale, ici les principales étapes concernant la sécurité virale à l'exclusion des chromatographies échangeuses d'ions, utilisées dans la plupart des procédés de fabrication ; SD : solvant-détergent ; UF : ultrafiltration ; chromatographie IA : chromatographie d'immunoaffinité.*

La complication du traitement par des concentrés d'origine plasmatisque est le risque infectieux par : Infection à VIH et à l'hépatite B et C, cette complication est rendue quasi négligeable en raison des procédés d'inactivation virale lors des étapes de fabrication et de purification.

La deuxième complication liée au traitement de l'hémophilie est l'allo-immunisation, c'est à dire la survenue des anticorps inhibiteurs de l'activité du concentré FVIII:c diminue l'efficacité du traitement et augmente le risque hémorragique entraînant en conséquence une morbidité significative, y compris une détérioration articulaire sévère, une incapacité accrue et une qualité de vie diminuée, plus une augmentation marquée des coûts de santé.

Ce majeur problème est pris en charge par l'amélioration des agents hémostatiques comme l'induction de la tolérance immunitaire et les agents by bypassing.

## 7 Le développement des inhibiteurs anti-facteur VIII chez les Hémophiles A

### a. Définition et classification des anticorps anti-facteur VIII

Chez environ 15 à 33 %, le développement des anticorps inhibant l'activation procoagulante du FVIII considérée comme la majeure complication du traitement anti-hémophilique. Il s'agit d'une réponse immunitaire déclenchée par l'organisme neutralisant le FVIII thérapeutique, capable d'inactiver ses fonctions, elle est due à la fois aux facteurs liés au patients et d'autres liés au traitement conditionnant l'immunogénicité du FVIII. Ces anticorps sont habituellement augmentés chez les patients avec la forme sévère de l'hémophilie au cours des premières dizaines de journées de traitement, mais généralement apparaissent dans les 10 à 50 (au maximum 100) premiers jours d'exposition au produit (**JCPA** : journées cumulées en présence de l'antigène) [48]. Le risque devient faible (mais non nul) au-delà du 100<sup>ème</sup> jour de traitement.

Les anticorps sont principalement des IgG (sous classe IgG1, 3 et 4), parfois les IgG4 sont associés à des auto-anticorps IgM et IgA, ces anticorps agissent sur plusieurs épitopes localisés au niveau des domaines de la chaîne et la chaîne légère de la protéine anti-hémophilique et rendent compte sa fonction procoagulante bloquée via plusieurs mécanismes selon l'épitope reconnu, en perturbant l'interaction aux ses partenaires (vWF, PLs, FIX ou FX) (**figure 18**) [49]. Selon le comité scientifique et de la normalisation de la société internationale de thrombose et d'hémostase (ISTH), les anticorps anti-FVIII sont classés en inhibiteurs faible ou fort répondeurs suivant la valeur de leur titre. Si le titre d'anticorps < 5 UB, l'inhibiteur est considéré comme faible répondeur, alors il est considéré fort répondeur si le titre dépasse 5 UB [50].

Une unité de Bethesda (UB) par définition est la quantité d'Ac contenue dans 1 ml de plasma réduisant l'activité du FVIII contenu dans 1 ml de plasma témoin par 50%.

Chez les personnes saines, le FVIII endogène a été reconnu par des isotypes IgG3 et IgA chez environ 19% des donneurs sans immunisation délibérée, présentant de faibles affinités de liaison au FVIII [51]. Cette reconnaissance est associée à une régulation impliquant des anticorps anti-idiotypiques [52-53], ce qui suggère que le développement des inhibiteurs neutralisant le FVIII chez les HA résulte d'une incapacité de l'organisme à développer une

réponse anti-inflammatoire et/ou immunitaire tolérogène spécifique du FVIII qui contrebalancerait la réponse neutralisante déclenchée et non à l'activation exacerbée du système immunitaire lors de l'administration du FVIII [54].

Cependant, inhibant la liaison au FXa (C5, ESH8), au FIXa (mab413, CLB-Cag A), au vWF ou aux PLs (Le2E9, Bo2C11), ces anticorps peuvent être inhibés eux même par des anticorps anti-idiotypiques comme l'anticorps murin 14C12 qui inhibe Bo2C11 anti-C2 humain.

En fonction de leur cinétique, on distingue les inhibiteurs de type I et de type II :

- Ceux du premier type se voient dans l'hémophilie A constitutionnelle sévère, ils inhibent complètement l'activité du FVIII de manière dose-dépendante (inhibition linéaire) en rentrant en compétition avec le vWF. Ils reconnaissent des régions antigéniques essentielles à l'activité procoagulante de la protéine.
- Tandis que les inhibiteurs du type II sont observés chez les hémophiles modérés et dans l'hémophilie acquise, ils inactivent incomplètement le FVIII [55].

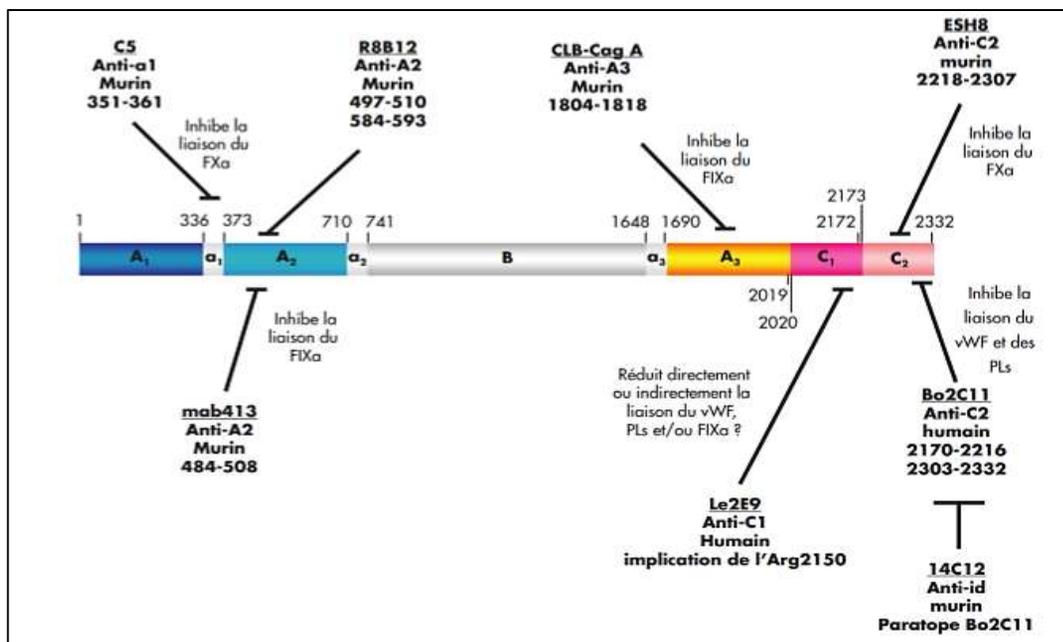


Figure 18: Les principaux représentants des anticorps (Acs) anti-FVIII et leurs mécanismes d'inhibition..

## 8 Mécanisme d'action des anti-facteur VIII

### a. Anti-domaine A2

Ces anticorps reconnaissent des épitopes localisés au niveau de la région 484-508, interfèrent avec la liaison du domaine A2 et le FIXa de manière non compétitive en formant complexe FVIII/FIXa/PLs et FXa inactif. Le paratope est l'anticorps monoclonal murin 413 (mab 413).

Certains Acs en se liant au domaine A2, bloquent par gêne stérique le site de clivage de la thrombine (FIIa) situé entre les domaines A1 et A2 [56-57].

L'anticorps R8B12 est un anticorps monoclonal murin reconnaît un épitope conformationnel localisé dans les régions 497-510 différent de l'épitope de la région 484-508 et dirigé contre la partie C terminale de A2 [58].

### **b. Anti-domaine C2**

L'inactivation du FVIII par les anti-domaine C2 est représentée par un anticorps monoclonal humain et un autre murin avec des mécanismes et localisations antigénique différentes.

Le Bo2C11 (Ac humain) inhibe la liaison avec les PLs et aussi l'interaction FVIII/vWF [59], il reconnaît un épitope conformationnel constitué des résidus localisés dans la partie N-terminale du domaine C2 (2170-2216) ainsi qu'un épitope dans la partie C-terminale (2303-2332) qui chevauche le site de liaison aux PLs. Ce paratope Bo2C11 lui-même inhibé par un anticorps anti-idiotypique murin, le 14C12.

D'autres inhibiteurs anti-C2 dirigés contre la liaison FVIIIa-vWF sont représentés par un anticorps monoclonal murin ESH8. In vitro, cet anticorps est utilisé pour identifier du peptide antigénique de résidus 2218-2307 du domaine C2 du FVIII, son mécanisme d'action se base sur la dissociation du FVIII du vWF clivée par la thrombine, ce qui réduit la liaison du fVIII aux PLs [60]. D'après Shanon et al. ESH8 inhibe aussi de façon marquée l'activation du FVIII par le FXa en présence et en absence du vWF [61].

### **c. Anti-domaine A3**

Les anti-A3 inhibent l'activité procoagulante du FVIII en l'empêchant d'interagir avec le FIXa, certains allo-anticorps reconnaissent l'épitope compris dans les résidus 1804-1818 comme le monoclonal CLB-Cag A [62], ainsi qu'un anticorps humain interfère avec la liaison FVIII-FIXa au niveau de la région 1778-1823 [63].

### **d. Anti-domaine C1**

Leur mécanisme d'action sur le FVIII reste encore inconnu et sont caractérisés par inhibition l'activité procoagulante d'un FVIII exogène dans un test fonctionnel à 85%. Ces inhibiteurs sont principalement retrouvés dans l'hémophilie A modérée comme l'Ac **Le2E9** [64].

Dans une étude récente *in vivo*, il a été révélé à l'instar du domaine C1 l'importance du domaine C2 pour l'endocytose et la présentation antigénique du FVIII aux lymphocytes T CD4+ par les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) [65].

#### e. Anti-régions acides a1 et a3

Les mécanismes d'action des inhibiteurs anti-région a1 sont multiples, l'anticorps monoclonal C5 représentatif de ces inhibiteurs agit en perturbant l'interaction du FVIII avec le FXa qui dispose un site de liaison au niveau des résidus de la régions Met337-Arg372. Un autre mécanisme des anti-régions a1 est fondé sur l'encombrement stérique dont ils interfèrent avec l'activation du FVIII par la thrombine en masquant les épitopes fonctionnels du FVIII (site de clivage de la IIa) ou en induisant de changements conformationnels ce qui rend le site inaccessible [66].

Etant donné que la région a3 contient le second site de liaison au vWF [67], le mécanisme d'action des inhibiteurs anti-a3 est fondé alors sur le blocage de liaison VIII-vWF.

#### f. Anticorps catalytiques

Ces Acs sont présents chez plus de 50% des hémophiles sévères ayant des inhibiteurs, ils sont capables d'hydrolyser le FVIII [68], et pourraient neutraliser l'activité du FVIII à des vitesses supérieures à celles des anticorps inhibiteurs non catalytiques.

En présentant de multiples sites de clivage sur le FVIII et en hydrolysant préférentiellement les liaisons peptidiques contenant des acides aminés basiques, la cinétique de l'hydrolyse du FVIII par ces inhibiteurs semble compatible avec un rôle pathogénique des anticorps catalytiques [68].

#### g. Anticorps anti-FVIII "non fonctionnels"

La catégorie de ces inhibiteurs est dirigée contre des épitopes dits "non fonctionnels", sont mis en évidence, entre autres, par la technique ELISA, et peuvent exister chez des patients hémophiles avec ou sans inhibiteurs comme les anticorps dirigés contre des **épitopes du domaine B**.

Ils ont comme effet d'augmenter la clairance plasmatique du FVIII en augmentant la capture de **complexes immuns** (FVIII-immunoglobulines) par les cellules du système macrophagique [69].

## 9 Les facteurs de risque d'apparition des anti-facteurs VIII

En général les inhibiteurs apparaissent tôt, dans les 10 à 50 premiers jours d'exposition au produit de substitution,

– le premier facteur de risque c'est le type et le degré de sévérité de l'hémophilie ; les HA développent beaucoup plus d'inhibiteurs que les HB, ainsi la présence des inhibiteurs est plus fréquente dans les formes sévères de la maladie (15 à 33% dans HA et 1 à 5% dans HB) [70-71].

- l'incidence d'inhibiteurs chez les sujets d'ethnie noir est beaucoup plus grande que celle observée chez les autres races [72]. Sur une cohorte de patients hémophiles américains Miller et al., ont démontré après une analyse génotypique que le risque de formation d'inhibiteurs est plus accru chez les patients d'origine africaine ou hispanique [73]. Le mécanisme explicatif est encore flou.

– L'anomalie génétique du F8 [71] : les plus importants facteurs de risque du développement d'inhibiteurs, sont les mutations du F8 notamment les mutations nulles ne produisant pas de protéine FVIII ; la présence de l'inversion de l'intron 22, large délétion impliquant plusieurs domaines et les mutation non-sens, avec 21 à 88% de la proportion globale de formation d'inhibiteurs dans l'HA sévère [74-75]. D'autres types de mutations, non-nulles conservant une certaine production du FVIII et entraînant la perte de son activité sont aussi impliqués dans le développement d'inhibiteurs anti-FVIII avec un faible risque ; mutation faux-sens, mutations d'épissage et de petites délétions ou insertions de poly-A dans les segments [75].

– Développement d'inhibiteurs chez un autre hémophile de la famille [70].

– Il a également été démontré que les polymorphismes dans les régions promotrices des gènes immunomodulateurs comme, par exemple, ceux contrôlant l'interleukine 10 (IL-10), le TNF-alpha et CTL4, augmentent le risque de développement d'inhibiteurs. Le polymorphisme HLA : les haplotypes HLA-DR15 et HLA-DQ6 ayant le risque de développer d'inhibiteurs 2 fois plus élevé [76].

- **Facteurs de risque liés au traitement :**

– le type de produit de substitution utilisé dans le traitement, sa pureté ainsi que l'exposition à une multiplicité de produits [77].

- L'intensité du traitement et de la première exposition : le risque accru de formation d'inhibiteurs après un traitement intensif lors d'une intervention chirurgicale ou un traitement à haute fréquence, a été rapportée par [78].

### 10 Dépistage et titrage des inhibiteurs du FVIII

La détection des inhibiteurs anti-FVIII s'effectue soit par la surveillance de routine en laboratoire à intervalles réguliers au cours de 50 premiers jours d'exposition au traitement [79], ou suivant une présentation clinique lorsqu'un patient présente des saignements ne répondant pas adéquatement à un traitement hémostatique [80].

Les méthodes les plus couramment utilisées pour le dépistage ou le titrage des inhibiteurs est celles de méthode Bethesda ou méthode Bethesda modifiée par Nijmegen.

Ces méthodes dépistent uniquement les anticorps inhibiteurs qui réduisent l'activité du FVIII en utilisant des dilutions en série d'un patient qui est incubé avec des volumes égaux de plasma du plasma normal pendant 2h à 37 °C en même temps qu'un mélange contrôle (1 vol plasma normal/1 vol tampon imidazole). Le taux résiduel de facteur VIII des mélanges d'incubation est mesuré. Un résultat positif est lorsqu'il y a une diminution significative du FVIII résiduel. Les dilutions et le facteur VIII résiduel sont tracés les uns contre les autres et le titre d'inhibiteur est obtenu par régression linéaire [81].

D'autres méthodes sont disponibles afin d'étudier la réponse anti-FVIII et peuvent avoir amélioré la détection des inhibiteurs à faible titre, comme la technique immuno-enzymatique (ELISA) possède une bonne spécificité et sensibilité et permet de détecter à la fois les anticorps inhibiteurs et les anticorps non neutralisants [82].

### 11 Prise en charge des hémophiles A avec inhibiteurs

La prise en charge de l'hémophilie A avec inhibiteurs est basée sur deux aspects : l'éradication d'inhibiteur et la gestion des saignements

Pour faire, plusieurs approches étaient établies, y compris l'induction de la tolérance immune, les agents hémostatiques (FVIII, les agents by passing).

### **Traitement substitutif par concentrés du FVIII :**

Chez les hémophiles A développant d'inhibiteurs à faible titre et à faible réponse (<5 UB), la prise en charge des saignements aigus par l'administration des doses plus élevées du FVIII peut assurer une hémostase optimale en saturant l'inhibiteur [83]. Le traitement est administré soit par des concentrés ou parfois en apport massif des Cryoprécités ou des plasmas frais congelés [84].

### **Les Agents by- passing (agents de contournement) :**

Les patients avec des inhibiteurs à titre élevé / à haute réponse doivent être traités avec des agents by-passing qui contournent essentiellement le besoin des facteurs VIII en générant de la thrombine par d'autres mécanismes. Deux types d'agents disponibles sont *le concentré de complexe prothrombinique activé (aPCC) et le facteur VII activé recombinant (rFVIIa) (tableau 8)*. Les agents by-passing peuvent être utilisés dans le traitement des saignements musculosquelettiques et dans la prophylaxie chirurgicale majeure ou mineure [85].

*L'aPCC* est un complexe dérivé du plasma commercialisé sous le nom **FEIBA (Factor Eight Inhibitor By-passing Activity)**, contient des zymogènes du complexe prothrombinique (FII, FVIIa, FIX et FX) qui stimulent la formation du clôt et l'arrêt du saignement en générant plus rapidement la thrombine (FIIa) par augmentation du taux des protéases (FIXa et FXa) même en l'absence de FVIII ou FVIIIa.

*Le rFVIIa* produit et commercialisé par NovoNordisk (Danemark), sous le nom de **NovoSeven®** induit l'hémostase au niveau de la brèche vasculaire indépendamment de la présence des FAH en formant des complexes avec le facteur tissulaire (FT) à la surface des cellules endothéliales. Le complexe rFVIIa-FT génère une petite quantité de thrombine permettant l'activation des plaquettes. En outre, le rFVIIa active directement le FX en FXa à la surface des plaquettes activées qui permet alors l'activation de la prothrombine (FII) en thrombine (FIIa) qui va alors transformer le fibrinogène en fibrine, permettant ainsi la formation d'un caillot de fibrine stable au niveau du site de la lésion vasculaire [86-87].

Tableau 8:avantages et inconvénients des agents by-passing

	<b>Régime typique pour traiter les saignements</b>	<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
<b>FEIBA</b>	50-100 UI/kg toutes les 6 à 12 heures (max. 200 UI/kg/ jour)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dure plus longtemps (versus rFVIIa)</li> <li>• Peut être donné toutes les 6 à 12 heures</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dérivés du plasma</li> <li>• Grand volume</li> <li>• 30 à 45 minutes pour l'administration</li> <li>• Ne pas administrer avec de l'acide tranexamique</li> <li>• Contient du FVIII</li> <li>• Taux de thrombose plus élevé si elle est administrée concomitamment à des doses élevées pendant &gt;1 jour chez les patients sous émicizumab.</li> </ul>
<b>rFVIIa</b>	2-3 doses de 90 µg/kg par 2 à 3 heures Ou Dose unique de 270 µg/kg	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Recombinant</li> <li>• Faible volume</li> <li>• Peut durer de 2 à 5 minutes</li> <li>• Peut être administré avec de l'acide tranexamique</li> <li>• Semble plus sécuritaire lorsqu'il est administré combinaison avec émicizumab</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ne dure pas très longtemps</li> <li>• Doit être administré plus fréquemment</li> </ul>

### **L'induction de la tolérance immune :**

Le Traitement de fond de l'inhibiteur par induction de tolérance immune (ITI) permet d'éradiquer un inhibiteur anti-facteur par de fortes doses de facteur anti-hémophilique injectées de façon régulière pour plusieurs mois voire années pour but d'induire une tolérance immune spécifique par excès de l'antigène FVIII. La posologie varie largement et 3 régimes peuvent être individualisés

- Fortes doses > 100 à 300 UI/kg/jour
- Faibles doses  $\geq 50$  UI/kg 3 fois par semaine
- Doses intermédiaires = 50 à 100 UI/kg/jour

Un récent essai clinique randomisé a démontré qu'un régime à forte dose (200 U / kg par jour) permettait d'obtenir une tolérance plus rapidement et avec moins de saignements par rapport à un régime à une faible dose (50 U / kg trois fois / semaine) [88].

**Emicizumab** : un anticorps monoclonal humanisé de type IgG4 (commercialisé sous nom Hemlibra), indiqué en prophylaxie pour prévenir les épisodes hémorragiques chez les patients atteints d'hémophilie A développant d'inhibiteurs anti-facteur VIII et également chez les hémophiles A sévères sans inhibiteurs.

Emicizumab restaure la fonction du facteur VIII activé, nécessaire pour une hémostase efficace en se liant au FIXa et FX. Il est administré par voie sous-cutanée à une dose recommandée de 3 mg/kg une fois par semaine pendant les 4 premières semaines, ensuite avec une dose hebdomadaire de 1,5 mg/kg [89-90].

**Nouveau Traitement :**

**Rituximab** : est un anticorps anti-CD20 qui inhibe les cellules B et interfère avec la production d'IgG [91].

## **II. DISCUSSION DES RESULTATS :**

Bien que la maladie de l'hémophilie A est rare ainsi que sa prévalence au Maroc, le dépistage des anti-FVIII chez les hémophiles A est très rare que la pathologie elle-même. L'objectif de notre travail est de rapporter la prévalence du développement des inhibiteurs du FVIII chez les sujets hémophiles A suivi au CHUIS de Rabat.

Nos résultats révèlent que sur 267 hémophiles, 67 ont développé d'inhibiteurs avec prévalence de 25%, ces résultats sont compatibles avec ceux de Fischer et al., 2015 23,2% 69/297 [92] par rapport aux résultats d'une étude nationale de Y. El Aissaoui portée sur 73 hémophiles A dont la prévalence du développement d'inhibiteurs est de 38% soit 28/73 patients [84].

L'âge des patients est plus étudié comme facteur de risque de l'apparition des inhibiteurs, l'âge du diagnostic chez la population étudiée développant d'inhibiteurs varie entre 2 mois et 59 ans avec une prédominance de la tranche d'âge située entre 5 et 10 ans en proportion de 25% alors que les résultats de Y. El Aissaoui montrent la prédominance de deux tranches d'âge situées entre 11-15 ans et 16-20 ans (environ 39,28% pour chaque tranche).

Le degré de sévérité de l'hémophilie est le facteur de risque intrinsèque le plus largement analysé lors du dépistage des inhibiteurs. En effet, la plupart des hémophiles qui développent des inhibiteurs sont des hémophiles A sévères, ce qui explique l'orientation des chercheurs dans leurs études vers les formes sévères de la pathologie. Nous avons trouvé dans notre étude, parmi la totalité des patients développant d'inhibiteurs, 94% sont des hémophiles sévères soit (63/67), 2% modérés (1/67) et 4% (3/67) sont des hémophiles mineurs. Ces résultats sont proches de ceux de Y. Aissaoui 96% des hémophiles sévères et 4% étaient des hémophiles modérés, contre 77,78% hémophiles sévères et 22,22% hémophiles modérés dans l'étude de F. Zizi [83]. La répartition des patients développant d'inhibiteurs en fonction du degré de sévérité de la maladie est de 63/181 hémophiles sévères soit 34,8% ceci est proche de résultats de FranceCoag publiés en 2019 qui est de 322/1109 soit 29,0% [93], de 1/35 hémophiles modérés soit 2,8% et de 3/51 soit 5,8% hémophiles mineurs.

Le taux d'inhibiteurs était entre 29,1 et 99,1% et le titre d'inhibiteurs était variable entre 0,6 et 99,84 UB/ml. Chez ces patients inhibiteurs positifs, nous avons dépisté un faible titre qui est inférieur ou égale à 5 UB/ml chez 47,8% soit 32 cas, et la fréquence des forts répondeurs qui ont fort titre d'inhibiteurs > 5 UB/ml était de 52,2% soit 35 cas, ces résultats sont différents de ceux de Y. El Aissaoui (65% forts répondeurs et 35% faibles répondeurs) ; notre résultat est proche des résultats de l'analyse combinée effectuée par FranceCoag dont la fréquence des forts répondeurs était de 59,6% (192/322) [93].

Chez les forts répondeurs varie de 6,3 à 99,84 UB/ml, 34 entre eux sont des hémophiles A sévères ce qui présente une fréquence de 97,1% et 1 patient hémophile A mineur soit 2,9% ( $\neq$ 100% hémophiles A sévères dans l'étude de Y. El Aissaoui), alors que chez les faibles répondeurs le titre était entre 0,6 et 5 UB/ml dont 29 sont des hémophiles A sévères soit 90,62%, 1 hémophile A modéré soit 3,12% et 2 hémophiles A mineures soit 6,25% ( $\neq$  77,77% hémophiles A sévères, 11,11% hémophile A modérés et 11,11% hémophiles A mineures dans l'étude de Y. El Aissaoui).

Nous avons rapporté également dans notre étude, la cinétique d'inhibiteurs chez 37 patients ayant bénéficié plus d'un dosage des anti-facteur VIII repartis de manière suivante :

- 19 patients n'ont pas changé leur type de réponse en taux d'inhibiteurs : 13 parmi eux sont restes forts répondeurs, alors que 6 sont restes toujours faibles répondeurs.
- 18 patients ayant changé leur type de réponse en taux d'inhibiteurs : 8 ont inversé leur réponse de forts en faible répondeurs, et 10 ont changé leur titre de faible en fort répondeurs.

On constate que les titres des inhibiteurs peuvent se changent. Selon la littérature on trouve les trois cas de figures :

- Les patients « forts répondeurs » ayant un titre d'inhibiteur qui s'élève rapidement après apport de facteur VIII, cette élévation débutant 4 à 7 j après le début de l'exposition et atteignant son maximum 2 à 3 semaines plus tard ; le titre est élevé et en l'absence de nouvelle stimulation ce titre diminue progressivement, et ceci ne

signifie pas que l'inhibiteur a disparu car une nouvelle exposition au facteur VIII sera suivie aussitôt d'une nouvelle et forte augmentation. Ces anticorps n'ont pratiquement aucune chance de disparaître spontanément et sont ceux qui induisent les plus grandes difficultés thérapeutiques [94].

- Les patients « faibles répondeurs » gardent des titres bas (inférieurs à 5 UB) faiblement influencés par l'exposition au facteur VIII (pas ou peu de réponse anamnestic) ; ces anticorps ne gênent que peu ou pas le traitement substitutif par concentrés de facteur VIII ; certains de ces anticorps détectés en première fois avec un titre faible peuvent cependant dans certaines situations augmenter de façon importante transformant ainsi le patient de faible répondeur en fort répondeur [94].
- Certains inhibiteurs sont également dits « transitoires » : disparition spontanée de ces d'inhibiteurs sans qu'il soit nécessaire de mettre en place des molécules thérapeutiques spécifiques ; ces inhibiteurs sont généralement de titre faible et ne sont détectés que durant une période brève (quelques semaines à quelques mois).

Pour une meilleure prise en charge des hémophiles A avec développement d'inhibiteurs, une étude approfondie sur l'analyse de différents autres facteurs de risque responsables du développement des anti-FVIII à savoir les facteurs génétiques, le type de traitement administré et sa durée d'exposition et les mécanismes de la réponse immunitaire contre le FVIII, serait idéale afin de mieux comprendre les mécanismes de la survenue de ces inhibiteurs.

# CONCLUSION

## CONCLUSION

Le développement des anticorps anti-facteur VIII, est une grave complication liée au traitement de l'hémophilie A, notamment chez les petits enfants hémophiles A sévères. Cette complication est influencée par plusieurs facteurs de risque intrinsèques et extrinsèques, principalement les anomalies génétiques touchant le gène F8, le degré de sévérité de l'hémophilie, ainsi que l'intensité et période d'exposition au traitement.

Pour remédier cette complication, les efforts se dirigent vers l'étude des facteurs influençant dans le but de prévenir la complication chez les patients à haut risque, et l'appui sur la recherche et le développement d'un traitement définitif efficace que le traitement substitutif : induction de la tolérance immune, thérapie génique et traitement par anticorps monoclonaux.

Notre étude d'un ensemble de patients hémophiles A développant d'inhibiteurs Anti-Facteur VIII consiste à étudier leur prévalence de l'apparition des anticorps dirigés contre le FVIII, sans autant étudier les autres facteurs de risques donnant lieu à la survenue de cette complication. Les paramètres étudiés dans cette étude sont le taux du FVIII, le pourcentage de l'inhibition et le dosage des inhibiteurs anti-FVIII.

Les résultats révèlent que 67 hémophilies A parmi les 267 ont développé d'inhibiteurs soit 25% des cas, ces résultats sont compatibles avec la littérature qui décrit la fréquence de développement des inhibiteurs était entre 15 et 33%. 52,2% de ces patients ont développé des inhibiteurs forts répondeurs et 47,8% sont des inhibiteurs faibles répondeurs, avec un pourcentage de l'inhibition variable entre 29,1 à 99,9%. Ainsi la majorité de ces patients qui ont développé des inhibiteurs sont des hémophiles A sévères (94%).

Pour une meilleure prise en charge des hémophiles A avec développement d'inhibiteurs, une étude approfondie sur l'analyse de différents autres facteurs de risque responsables du développement des anti-FVIII à savoir les facteurs génétiques, le type de traitement administré et sa durée d'exposition et les mécanismes de la réponse immunitaire contre le FVIII, serait idéale afin de mieux comprendre les mécanismes de la survenue de ces inhibiteurs.

## **RESUME**

**Auteur :** Mamad Hassane

**Titre :** Monitoring de l'hémophilie A au Maroc

L'hémophilie A est un trouble héréditaire de coagulation à transmission récessive résultant d'un déficit constitutionnel en facteur VIII de coagulation dont le gène F8 est situé sur le chromosome X. La stratégie thérapeutique de l'hémophilie A repose sur le traitement substitutif par le facteur VIII manquant. Néanmoins, la complication la plus grave du traitement anti-hémophilique est le développement des anticorps anti facteur VIII qui rendent ce traitement inefficace et détériorent l'état de santé des patients.

Dans cette étude, nous avons étudié la prévalence du développement des inhibiteurs anti-FVIII chez les hémophiles A ayant bénéficié d'un dosage de facteur VIII avec mesure du taux d'inhibition et dosage des anti facteurs VIII, au laboratoire d'hématologie du Centre Hospitalo-Universitaire Ibn Sina (CHUIS) dans la période allant du 01/01/2016 au 30/11/2020.

Les résultats montrent que parmi les 267 hémophiles A qui ont bénéficié d'un dosage de facteur VIII avec mesure du taux d'inhibition et dosage des anti facteurs VIII, 67 patients ont présenté d'inhibiteurs soit 25% des cas. 52,2 de ces patients sont des inhibiteurs forts répondeurs et 47,8% sont des inhibiteurs faibles répondeurs, avec un pourcentage d'inhibition variable entre 29,1 et 99,9%.

Notre étude détermine la prévalence des inhibiteurs anti-FVIII au Maroc, doit être complétée par une analyse approfondie de différents facteurs de risque à amenant l'apparition de cette complication.

**Mots clés :** Hémophilie A - Facteur VIII - Inhibiteurs - Prévalence - Population

## **ABSTRACT**

**Author:** Mamad Hassane

**Title:** Monitoring of hemophilia A in Morocco

The hemophilia A is an inherited recessive bleeding disorder resulting from a constitutional deficiency of coagulation factor VIII in which the gene is located on the X chromosome.

The therapeutic strategy for hemophilia A is based on replacement with missing factor VIII.

Nevertheless, the most serious complication of hemophilia treatment is the development of anti-factor VIII antibodies which render the treatment ineffective and deteriorate the state of health of the patients.

In this study, we studied the prevalence of the hemophiliacs A having benefited a factor VIII assay with inhibition rate and anti-factor VIII assay in the hematology laboratory of the Ibn Sina University Hospital Center in the period from 01/01/2016 to 30/11/2020.

The results show that among the 267 hemophiliacs A who benefited a factor VIII assay with inhibition rate and anti-factor VIII assay, 67 patients presented with inhibitors i.e. 25% of cases. 52,2% of these patients are strong responder inhibitors and 47,8% are the low responder inhibitors, with a variable inhibition percentage of 29,1 to 99,9%.

Our study determines the prevalence of anti-factor VIII inhibitors in Morocco, must be completed by a depth analysis of various risk factors leading to the occurrence of this complication.

**Key words:** Hemophilia A - Factor VIII - Inhibitors – Prevalence – Population

## ملخص

المؤلف: ماماد حسن

العنوان: رصد الناعور أ في المغرب

الناعور أ هو اضطراب وراثي متنحي لتخثر الدم ناتج عن نقص بيبوي في عامل التخثر الثامن، حيث يقع الجين F على الكروموسوم X. وتستخدم الاستراتيجية العلاجية للناعور أ على حقن العامل المفقود. ومع ذلك، فإن أخطر مضاعفات علاج الناعور أ هو تطوير الأجسام المضادة للعامل الثامن، مما يجعل العلاج غير فعال ويؤدي إلى تدهور حالة المرضى.

في هذه الدراسة، رصدنا انتشار تطور مثبطات مضادات العامل الثامن لدى مرضى الناعور أ بعد قياس العامل الثامن وتحديد معدلات تثبيطه، وذلك في مختبر أمراض الدم المركزي بالمستشفى الجامعي ابن سينا، في الفترة من 2016/01 إلى 2020/11/30.

أظهرت النتائج أنه من بين 267 مصابًا بالناعور أ الذين استفادوا من مقايضة العامل الثامن مع تحديد معدل تثبيطه، تم إيجاد 67 مريضًا لديه مثبطات، أي 25٪ من الحالات. 52.2٪ من هؤلاء المرضى لديهم مثبطات قوية الاستجابة و47.8٪ لديهم مثبطات ضعيفة الاستجابة، مع نسبة تثبيط تتراوح بين 29.1٪ و99.9٪.

دراستنا تحدد مدى انتشار مثبطات مضادات عامل التخثر الثامن في المغرب، والتي يجب استكمالها بتحليل متعمق لعوامل الخطر المختلفة التي تؤدي إلى ظهور هذه المضاعفات.

**الكلمات المفتاحية:** الناعور أ ، العامل الثامن ، المثبطات ، الانتشار ، السكان

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. (AFSAPS), A.s.d.s.d.p.d.s., Développement des inhibiteurs et prise en charge chez les patients hémophiles traités par Facteur VIII ou IX d'origine plasmatique ou recombinante. 2006.
- [2]. Rizza, C. and R. Biggs, The Treatment of Patients who have Factor-VIII Antibodies. *British journal of haematology*, 1973. **24**(1): p. 65-82.
- [3]. Kasper, C., et al., Proceedings: A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thrombosis et diathesis haemorrhagica*, 1975. **34**(2): p. 612.
- [4]. Austen, D., et al., A comparison of the Bethesda and New Oxford methods of factor VIII antibody assay. *Thrombosis and haemostasis*, 1982. **47**(1): p. 72-75
- [5]. Verbruggen, H., et al., The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII: C inhibitors: improved specificity and reliability. 1995.
- [6]. Lebreton, A. and G. Lavigne, Les anticorps anti-FVIII et anti-FIX. *Revue francophone des laboratoires*, 2012. **2012**(443): p. 55-62.
- [7]. Delahousse, B., Diagnostic Biologique d'un inhibiteur (acquis) d'un facteur de coagulation, cours DES 2012
- [8]. T. de Revel, K. Doghmi. *The Normal Haemostatic Process*. EMC-Dentisterie 1 (2004) 71–81 doi: 10.1016/S1762-5661(03)00007-2
- [9]. Benkirane S, Benjelloun I, Najimi H, Souieh M, Zerrou A, Masrar A. Concept actuel de la coagulation. *Maroc Médical*, tome 31 n°4, décembre 2009
- [10]. Hoffman M, Monroe DM. Coagulation 2006: a modern view of hemostasis. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2007 Feb; 21(1):1-11
- [11]. Chakour M, Messaoudi N, et al. Conduite à tenir devant un syndrome hémorragique. *Maroc Médical*, tome 30 n°2, juin 2008
- [12]. Nassar K, Janani S, Rachidi W, Mkinsi O. Hémophilie Acquisée. *Revue Marocaine de Rhumatologie* 2014; 28 :18.23
- [13]. Collins P W, Hirsch S, Baglin T P, Dolan G, Honley J, Makris M et al. Acquired Hemophilia A in the United Kingdom: a 2-years National Surveillance Study by the

- United Kingdom Haemophilia Center Doctor's Organisation. *Blood* 2007; 109: 1870-7
- [14].Erdem O, Ayyediz O, Aybak M. Acquired Inhibitors to Coagulation Factors in Male Patient with Systemic Lupus Erythematosus: A case Report and Review of the Literature. *Mod Rhumatol* 2008; 18:511-5
- [15].Z. Tlamçani, H. Biougnach , M. Elaj , A. Elmouali , L. Kabbaj , N. Marzak , R. Noureddine , H. Ouahmane , R. Seddik , H. Zeghli , M. Elkhorassani , A. Kili , S. Benkirane A. Masrar. Diagnostic biologique de l'hémophilie. *Maroc Médical, tome 31 n°4, décembre 2009*
- [16].World Federation of Hemophilia. Report on the Annual Global Survey 2016 [Internet]. World Federation of Hemophilia; 2017 [cited 2017 Nov 5]. Available from: <http://www1.wfh.org/publications/files/pdf-1690.pdf>
- [17].Lorio A, Stonebrajer J, Chambost H, Etal. Establishing the Prevalence and Prevalence at Birth of Hemophilia in Males. *American College of Physicians. Annals of InternalMedicine. 2019;1 -8.*
- [18].Gitschier, J., et al., Characterization of the human factor VIII gene. *Nature*, 1984. 312(5992): p. 326-330.
- [19].Anonarakis SE. Molecular Genetics of coagulation factor VIII Gene and hemophilia A. *Thromb Haemost*, 1995; 74: 322-328
- [20].Peters MF, Ross AC. Isolation of a 40-kDa Huntingtin-associated protein. *The Journal of biological chemistry* 276: 3188-3194, 2001
- [21].Masrar A, Benkirane Agoumi N. Aspects biologiques et moléculaires de l'hémophilie A. *Maroc Médical, tome 27 n°3: 192-196, Septembre 2005*
- [22].Do, H., Healey, J.F., Waller, E.K., and Lollar, P. (1999). Expression of factor VIII by murine liver sinusoidal endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 274, 19587–19592
- [23].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.

- [24].Saenko, E.L., et al., Factor VIII—novel insights into form and function. *British journal of haematology*, 2002. 119(2): p. 323-331.
- [25].Ngo J C K, Huang M, Roth D A, Furie B C and Furie Bruce. Crystal Structure of Human Factor VIII: Implications for the Formation of the Factor IXa-factor VIIIa Complex. *Structure* 16, 597–606, April 2008 Elsevier Ltd. DOI/ 10.1016/j.str.2008.03.003
- [26].Pittman, D.D., Wang, J.H., and Kaufman, R.J. (1992). Identification and functional importance of tyrosine sulfate residues within recombinant factor VIII. *Biochemistry (Mosc.)* 31, 3315–3325
- [27].Medzihradzky KF, Besman MJ, Burlingame AL. Structural characterization of sitespecific N-glycosylation of recombinant human factor VIII by reversed-phase highperformance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem* 1997; 69: 3986–94.
- [28].Kaufman, R.J., Wasley, L.C., and Dorner, A.J. (1988). Synthesis, processing, and secretion of recombinant human factor VIII expressed in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 263, 6352–6362.
- [29].Callaghan M.U., Kaufman R.J. (2008) Synthesis and Secretion of Coagulation Factor VIII. *Recent Advances inThrombosis and Hemoastasis 2008*. ISBN : 978-4-431-78846-1
- [30].Lenting, P., O. Christophe, and P. Gueguen, The disappearing act of factor VIII. *Haemophilia*, 2010. 16(102): p. 6-15.
- [31].Fay, P.J., et al., Factor VIIIa A2 subunit residues 558-565 represent a factor IXa interactive site. *Journal of Biological Chemistry*, 1994. 269(32): p. 20522-20527.
- [32].Nesheim, M., et al., The binding of 35S-labeled recombinant factor VIII to activated and unactivated human platelets. *Journal of Biological Chemistry*, 1988. 263(31): p. 16467-16470.
- [33].Foster, P.A., et al., Synthetic factor VIII peptides with amino acid sequences contained within the C2 domain of factor VIII inhibit factor VIII binding to phosphatidylserine. *Blood*, 1990. 75(10): p. 1999-2004

- [34].Nogami, K., et al., Localization of a pH-dependent, A2 subunit-interactive surface within the factor VIIIa A1 subunit. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2004. 1701(1): p. 25-35.
- [35].Mourey G & Poret E. Mise en place de la mesure de l'activité du facteur VIII par méthode chromogénique au laboratoire d'hémostase de l'Etablissement Français du Sang de Besançon. Comparaison avec la méthode chromométrique en un temps. *Spectra Biologie* n° 208 Mai 2014
- [36].Amano, K., Sarkar, R., Pemberton, S., Kemball-Cook, G., Kazazian, H.H., and Kaufman, R.J. (1998). The molecular basis for cross-reacting material-positive hemophilia A due to missense mutations within the A2-domain of factor VIII. *Blood* 91, 538–548.
- [37].Tuddenham, E G D et al. Haemophilia A: Database of Nucleotide Substitutions, Deletions, Insertions and Rearrangements of the Factor VIII Gene, second edition. *Nucleic acids Res.* 22, 3511-3533 (1994).
- [38].Amanda B. Payne, Connie H. Miller, Fiona M. Kelly, J. Michael Soucie, and W. Craig Hooper. The CDC Hemophilia A Mutation Project (CHAMP) Mutation List: a New Online Resource. *HUMAN MUTATION Database in Brief 34: E2382-E2392 (2013)* doi: 10.1002/humu.22247
- [39].Lakich, D., et al., Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nature genetics*, 1993. 5(3): p. 236-241.
- [40].Kechnaoui S. (2019). Les aspects épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques de l'hémophilie dans la région de Marrakech. Thèse de médecine.
- [41].Klukowska A, Czyrny Z, Laguna P, Brzewski M, Serafin- KrolMA, Rokicka-Milewska R. Correlation between clinical, radiological and ultrasonographical image of knee joints in children with haemophilia. *Haemophilia* 2001; 7:286–292.
- [42].Alcalay M. Complications musculaires de l'hémophilie. Elsevier Masson SAS. 2008.
- [43].J., G., Le Manuel du Résident, Hématologie II, chap Hémophilie, 13021-B-10. 1997: Elsevier Masson SAS.

- [44].Dossier du CNHIM. Facteurs antihémophiliques: traitement substitutif de l'hémophilie A et B, Évaluation clinique, Évaluation pharmacoéconomique, Évaluation Thérapeutique. Revue d'évaluation sur le médicament. Publication Juin-juillet 2003, XXIV, 3-4.
- [45].F.A.M., FVIII anti hémophilique A. 90-20-0045. . 2004.
- [46].Fédération mondiale de l'hémophilie, 2014. Qu'est-ce que la prophylaxie ?
- [47].Slimani S. les Facteurs Anti-Hémophiliques à Demi-Vie Prolongée : Etude prospective à propos de 52 cas avec revue de littérature. *Thèse du doctorat en Médecine 2018. Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat*
- [48].Evaluation de l'incidence de survenue des inhibiteurs anti-facteur VIII dans l'hémophilie. Sang Thrombose Vaisseaux. Volume 13, 31-7, Supplément, Mars 2001, Session 2. Hémophilie et maladie de Willebrand
- [49].Ibrahim U A, Ahmed S G. Determinants and Modifiers of Bleeding Phenotypes in Haemophilia A: General and Tropical Perspectives. Egypt J Med Hun Genet. 2018; 19: 171-8.
- [50].White, G., Rosendaal, F. 2<sup>nd</sup>, Aledort, L., Lusher, J., Rotshchild, C. and Ingerslev, J. (2001) Definitions in hemophilia. Recommendation of the scientific subcommittee in factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* 85: 560.
- [51].Whelan SFJ, Hofbauer CJ, Horling FM, et al. Distinct characteristics of antibody responses against factor VIII in healthy individuals and in different cohorts of hemophilia A patients. Blood 2013 ; 121 : 1039-48
- [52].Sakurai Y, Shina M, Tanaka I et al., Association of Anti-idiotypic Antibodies with Immune Tolerance Induction for the Treatment of Hemophilia A with Inhibitors. Haematologica, 2004; 89: 696-703
- [53].Gilles, J.G. and J.-M. Saint-Remy, Healthy subjects produce both antifactor VIII and specific anti-idiotypic antibodies. J Clin Invest 1994. 94: 1496-505.

- [54].Bou Jaoudeh,M, Delignat S, Varthaman A, Lacroix-Desmazes S. Origine et nature de la réponse immunitaire neutralisante contre le facteur VIII thérapeutique. *Méd sci(Paris)*. 2020 Apr; 36(4) : 341-347
- [55].Ghosh K, Shetty S. Immune response to FVIII in hemophilia A: an overview of risk factors. *Clin Rev Allergy Immunol* 2009;37:58-66.
- [56].Foster, P.A., Fulcher, C.A., Houghten, R.A., De Graaf Mahoney, S., and Zimmerman, T. S. Localization of the binding regions of a murine monoclonal anti-factor viii antibody and a human anti-factor viii alloantibody, both of which inhibit factor viii procoagulant activity, to amino acid residues threonine351-serine365 of the factor viii heavy chain. *Journal of Clinical Investigation* 82, 1 (1988), 123.
- [57].Lubahn, B., et al., Identification of a F. VIII epitope recognized by a human hemophilic inhibitor. *Blood*, 1989. 73(2): p. 497-499.
- [58].Ansong, C. Miles,S.M. and Fay, P.J. Epitope mapping factor VIII A2 domain by affinity-directed mass spectrometry: residues 497-510 and 584-593 comprise a discontinuous epitope for the monoclonal antibody R8B12. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 4: 842-487. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.01831.x>
- [59].Spiegel P C, Jacquemin M, Saint-Remy J M, Stoddard B L and Pratt K P. (2001). Structure of a Factor VIII C2 Domain-Immunoglobulin G4kappa Fab Complex: Identification of an Inhibitory Antibody Epitope on the Surface of Factor VIII. *Blood* 98, 13-19.
- [60].Scandella, D., Gilbert, G., Shima, M., Nakai, H., Eagleson, C., Felch, M., Prescott, R., Rajalakshmi, K., Hoyer, L., and Saenko, E. Some factor viii inhibitor antibodies recognize a common epitope corresponding to c2 domain amino acids 2248 through 2312, which overlap a phospholipid-binding site. *Blood* 86, 5 (1995), 1811–1819.
- [61].Meeks SL, Healey JF, Parker ET, Barrow RT, and Lollar P. Non-Classical Anti-C2 domain antibodies are present in patients with factor VIII inhibitors. *Blood* 2008, 112(4): 1151-3.
- [62].Zhong D, Saenko EL, Shima M, Felch M, Scandella D. Some humain inhibitor antibodies interfere with factor VIII binding to factor IX. *Blood* 1998; 92 : 136-142

- [63].Fijnvandraat, K., Celie, P. H., Turenhout, E. A., Jan, W., van Mourik, J. A., Mertens, K., Peters, M., and Voorberg, J. A human alloantibody interferes with binding of factor IXa to the factor VIII light chain. *Blood* 91, 7 (1998), 2347–2352.
- [64].Jacquemin, M., Benhida, A., Peerlinck, K., Desqueper, B., Vander Elst, L., Lavend'homme, R., d'Oiron, R., Schwaab, R., Bakkus, M., Thielemans, K., et al. A human antibody directed to the factor VIII C1 domain inhibits factor VIII cofactor activity and binding to von Willebrand factor. *Blood* 95, 1 (2000), 156–163.
- [65].Gangadharan B, Mathieu I, Delignat S, Peyron I, Teyssandier M, Kaveri S V and Lacroix-Desmazes. The C1 and C2 Domains of Blood Coagulation Factor VIII Mediate its Endocytosis by Dendritic Cells. *Haematologica* 2017; 102(2): 271-281. *doi:10.3324/haematol.2016.148502*
- [66].Lazarchick, J., Ashby, M. A., and Sens, D. Mechanism of factor viii inactivation by human antibodies. iv. antibody binding prevents factor viii proteolysis by thrombin. *Annals of Clinical & Laboratory Science* 16, 6 (1986), 497–501.
- [67].Saenko, E. L., and Scandella, D. The acidic region of the factor viii light chain and the c2 domain to get her form the high affinity binding site for von Willebrand factor. *Journal of Biological Chemistry* 272, 29 (1997), 18007–18014.
- [68].Lacroix-Desmazes, S., Wootla, B., Dasgupta, S., Delignat, S., Bayry, J., Reinbolt, J., Hoebeke, J., Saenko, E., Kazatchkine, M. D., Friboulet, A., et al. Catalytic igg from patients with hemophilia a inactivate therapeutic factor viii. *The Journal of Immunology* 177, 2 (2006), 1355–1363
- [69].Kazatchkine, M., Sultan, Y., Burton-Kee, E., and Mowbray, J. Circulating immune complexes containing anti-viii antibodies in multi-transfused patients with haemophilia a. *Clinical and experimental immunology* 39, 2 (1980), 315.
- [70].C. Rothschild. Hopital Necker, Paris. Le jeune hémophile, les inhibiteurs et la tolérance immune ; *Maladies de l'hémostase ; Transfus Clin Biol* 1999 ; 6 : 191-4.
- [71].Witmer C, Young G. Factor VIII inhibitors in hemophilia A: rationale and latest evidence. *Therapeutic Advances in Hematology*. February 2013:59-72.

- [72].Addiego JE, Kasper C, Abildgaard C. Lusher J. Hilgartner M. Glader, et al. Increased frequency of inhibitors in African American hemophilia A patients. *Blood* 1994 ; 84, Suppl I : 943a
- [73].Miller, C H et Benson J, Ellingsen D, Driggers J, Payne A, Kelly FM, Soucie JM, Craig Hooper W. F8 and F9 mutations in US haemophilia patients: correlation with history of inhibitor and race/ethnicity. *Haemophilia: the official journal of the World Federation of Hemophilia* vol. 18,3 (2012): 375-82. doi: 10.1111/j.1365-2516.2011.02700.x
- [74].Schwaab R. Brackmann HH. Meyer C. Seehafer J, Kirchgesser M. Haack A. et al. Haemophilia A. Mutation Type determines Risk of inhibitor Formation. *Thromb Haemost* 1995 ; 74 : 1402-6.
- [75].Oldenburg, J., Schroder, J., Brackmann, H., Muller-Reible, C., Schwaab, R., Tuddenham, E. (2004) Environmental and genetic factor influencing inhibitor development. *Semin Hematol* 41 (1 Suppl 1.): 82 – 88.
- [76].Oldenburg, J., Picard, J., Schwaab, R., Brackmann, H., Tuddenham, E., Simpson, E. (1997) HLA genotype of patients with severe haemophilia A due to intron 22 inversion with and without inhibitors of factor VIII. *Thromb Haemost* 77 : 238–242.
- [77].Moreau A, Lacroix-Desmazes S, Stieltjes N, Saenko E, Kaveri SV, d'Oiron R, Sultan Y, Scandella D, Kazatchkine M. Antibodies to the light chain that neutralize F VIII procoagulant activity are present in plasma of nonresponder patients with severe haemophilia A and in natural polyclonal human IgG. *Blood* 2000; 95: 3435-1.
- [78].Gouw, S., van der Bom, J., Marijke van den Berg, H. (2007) Treatment-related risk factors of inhibitor development in previously untreated patients with hemophilia A: the CANAL cohort study. *Blood* 109: 4648–4654
- [79].Kempton, C., White, G.,II, ( 2009 ) How we treat a hemophilia A patient with a factor VIII inhibitor. *Blood* 113: 11-17.
- [80].Char Witmer, Guy Young (2012) Factor VIII inhibitors in A hemophilia A: rationale and latest evidence. *Therapeutic Advances in Hematology* 4 (1). 59-72 <http://tah.sagepub.com>

- [81].Lee, C., Berntorp, E. and Hoots,W. (2005) Textbook of Hemophilia. *1<sup>st</sup> edn.* Malden, MA: Blackwell Publishing.
- [82].Martin, P., et al., Evaluation of a novel ELISA screening test for detection of factor VIII inhibitory antibodies in haemophiliacs. *International Journal of Laboratory Hematology*, 1999. 21(2): p. 125-128.
- [83].ZIZI FZ. Dépistage des inhibiteurs dans l'hémophilie : Etude rétrospective à propos de 121 cas. Thèse N° 77 ; (2010) Faculte de Medecine et de Pharmacie -Rabat
- [84].EL AISSAOUI Y. Titrage des inhibiteurs anti-facteur VIII dans l'hémophilie A: à propos de 28 cas. (2018) These N° : 85 ; Faculte de Medecine et de Pharmacie - Rabat
- [85].World Federation of Hemophilia. Inhibitors in Hemophilia A Primer. Fifth Edition, November 2018 N° 7.
- [86].Hedner U. Mechanism of action of recombinant activated factor VII: an update. *Semin Hematol* 2006;43 (Suppl 1): 105-7
- [87].Boyer-Neuman.C, Mercier. F-J, Veyradier.A. Facteur VII active recombinant (NovoSeven) : indications et limites. *Réanimation* 15 (2006) 576–583.
- [88].Hay, C., DiMichele, D. International Immune Tolerance Study. (2012) The principal results of the International Immune Tolerance Study: a randomized dose comparison. *Blood*, 119, 1335 - 1344.
- [89].Kotani N, Yoneyama K, Kawakami N, et al. Relative and Absolute Bioavailability Study of Emicizumab to Bridge Drug Products and Subcutaneous Injection Sites in Healthy Volunteers. *Clin Pharmacol Drug Dev.* 2018;
- [90].Nogami K, Shima M. New therapies using nonfactor products for patients with hemophilia and inhibitors. *Blood.* 2019;133(5):399–406.
- [91].Leissinger, C., Kruse-Jarres, R., Granger, S., Konkle, B., Ragni, M., Journeycake, J. (2011b) Essai de phase II du rituximab dans le traitement des inhibiteurs de l'hémophilie congénitale A : résultats de l'étude RICH. *Blood (Résumés de la réunion annuelle de l'ASH)* 118: 27.
- [92].Fischer, K., Lassila, R., Peyvandi, F. et al. (8 more authors) (2015) Inhibitor development in haemophilia according to concentrate Four-year results from the

European Haemophilia Safety Surveillance (EUHASS) project. *THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS*, 113 (5). pp. 968-975. ISSN 0340-6245

- [93].Volkers, P., Hanschmann, K. M., Calvez, T., Chambost, H., Collins, P. W., Demiguel, V., Hart, D. P., Hay, C., Goudemand, J., Ljung, R., Palmer, B. P., Santagostino, E., van Hardeveld, E. M., van den Berg, M., & Keller-Stanislawski, B. (2019). Recombinant factor VIII products and inhibitor development in previously untreated patients with severe haemophilia A: Combined analysis of three studies. *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia*, 25(3), 398–407.
- [94].Goudemand, J., Les anticorps anti-facteur VIII chez l'hémophile. *Hématologie*, 2001. Volume 7 (3): p. 170-83.