UNIVERSITE MOHAMMED V-RABAT
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE -RABAT-

ANNEE:2018 *THESE N°: 85*

TITRAGE DES INHIBITEURS ANTI FACTEUR VIII DANS L'HÉMOPHILIE A: À PROPOS DE 28 CAS

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le :……

PAR
Mlle EL AISSAOUI YOUSRA
Née le 28 Janvier 1991 à Safi
Pharmacienne ex-Interne et Résidente au CHU Ibn Sina de Rabat

Pour l'Obtention du Doctorat en pharmacie

MOTS CLES : Hymophilie A, Anticorps anti Facteur VIII, méthode de Nijmegen

JURY

Pr. S. BENKIRANE Professeur d'hématologie biologique	**PRESIDENTE**
Pr. A. MASRAR Professeur d'hématologie biologique	**RAPPORTEUR**
Pr. M. NAZIH Professeur d'hématologie biologique	**JUGES**
Pr. A. DAMI Professeur de biochimie	

بسم الله الرحمن الرحيم

UNIVERSITE MOHAMMED V DE RABAT
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE - RABAT

DOYENS HONORAIRES :
1962 – 1969 : Professeur Abdelmalek FARAJ
1969 – 1974 : Professeur Abdellatif BERBICH
1974 – 1981 : Professeur Bachir LAZRAK
1981 – 1989 : Professeur Taieb CHKILI
1989 – 1997 : Professeur Mohamed Tahar ALAOUI
1997 – 2003 : Professeur Abdelmajid BELMAHI
2003 – 2013 : Professeur Najia HAJJAJ - HASSOUNI

ADMINISTRATION :
Doyen : Professeur Mohamed ADNAOUI
Vice Doyen chargé des Affaires Académiques et estudiantines
Professeur Mohammed AHALLAT
Vice Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération
Professeur Taoufiq DAKKA
Vice Doyen chargé des Affaires Spécifiques à la Pharmacie
Professeur Jamal TAOUFIK
Secrétaire Général : Mr. Mohamed KARRA

1- ENSEIGNANTS-CHERCHEURS MEDECINS ET PHARMACIENS

PROFESSEURS :

Décembre 1984

Pr. MAAOUNI Abdelaziz	Médecine Interne – ***Clinique Royale***
Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi	Anesthésie -Réanimation
Pr. SETTAF Abdellatif	pathologie Chirurgicale

Novembre et Décembre 1985

Pr. BENSAID Younes	Pathologie Chirurgicale

Janvier, Février et Décembre 1987

Pr. CHAHED OUAZZANI Houria	Gastro-Entérologie
Pr. LACHKAR Hassan	Médecine Interne
Pr. YAHYAOUI Mohamed	Neurologie

Décembre 1988

Pr. BENHAMAMOUCH Mohamed Najib	Chirurgie Pédiatrique

Pr. DAFIRI Rachida	Radiologie

Décembre 1989

Pr. ADNAOUI Mohamed	Médecine Interne –***Doyen de la FMPR***
Pr. CHAD Bouziane	Pathologie Chirurgicale
Pr. OUAZZANI Taïbi Mohamed Réda	Neurologie

Janvier et Novembre 1990

Pr. CHKOFF Rachid	Pathologie Chirurgicale
Pr. HACHIM Mohammed*	Médecine-Interne
Pr. KHARBACH Aîcha	Gynécologie -Obstétrique
Pr. MANSOURI Fatima	Anatomie-Pathologique
Pr. TAZI Saoud Anas	Anesthésie Réanimation

Février Avril Juillet et Décembre 1991

Pr. AL HAMANY Zaîtounia	Anatomie-Pathologique
Pr. AZZOUZI Abderrahim	Anesthésie Réanimation –***Doyen de la FMPO***
Pr. BAYAHIA Rabéa	Néphrologie
Pr. BELKOUCHI Abdelkader	Chirurgie Générale
Pr. BENCHEKROUN Belabbes Abdellatif	Chirurgie Générale
Pr. BENSOUDA Yahia	Pharmacie galénique
Pr. BERRAHO Amina	Ophtalmologie
Pr. BEZZAD Rachid	Gynécologie Obstétrique
Pr. CHABRAOUI Layachi	Biochimie et Chimie
Pr. CHERRAH Yahia	Pharmacologie
Pr. CHOKAIRI Omar	Histologie Embryologie
Pr. KHATTAB Mohamed	Pédiatrie
Pr. SOULAYMANI Rachida	Pharmacologie – ***Dir. du Centre National PV***
Pr. TAOUFIK Jamal	Chimie thérapeutique ***V.D à la pharmacie+Dir du CEDOC***

Décembre 1992

Pr. AHALLAT Mohamed	Chirurgie Générale V.D Aff. Acad. et Estud
Pr. BENSOUDA Adil	Anesthésie Réanimation
Pr. BOUJIDA Mohamed Najib	Radiologie
Pr. CHAHED OUAZZANI Laaziza	Gastro-Entérologie
Pr. CHRAIBI Chafiq	Gynécologie Obstétrique
Pr. DEHAYNI Mohamed*	Gynécologie Obstétrique
Pr. EL OUAHABI Abdessamad	Neurochirurgie
Pr. FELLAT Rokaya	Cardiologie
Pr. GHAFIR Driss*	Médecine Interne
Pr. JIDDANE Mohamed	Anatomie
Pr. TAGHY Ahmed	Chirurgie Générale
Pr. ZOUHDI Mimoun	Microbiologie

Mars 1994

Pr. BENJAAFAR Noureddine	Radiothérapie

Pr. BEN RAIS Nozha	Biophysique
Pr. CAOUI Malika	Biophysique
Pr. CHRAIBI Abdelmjid	Endocrinologie et Maladies Métaboliques ***Doyen de la FMPA***
Pr. EL AMRANI Sabah	Gynécologie Obstétrique
Pr. EL BARDOUNI Ahmed	Traumato-Orthopédie
Pr. EL HASSANI My Rachid	Radiologie
Pr. ERROUGANI Abdelkader	Chirurgie Générale- ***Directeur CHIS***
Pr. ESSAKALI Malika	Immunologie
Pr. ETTAYEBI Fouad	Chirurgie Pédiatrique
Pr. HADRI Larbi*	Médecine Interne
Pr. HASSAM Badredine	Dermatologie
Pr. IFRINE Lahssan	Chirurgie Générale
Pr. JELTHI Ahmed	Anatomie Pathologique
Pr. MAHFOUD Mustapha	Traumatologie – Orthopédie
Pr. RHRAB Brahim	Gynécologie –Obstétrique
Pr. SENOUCI Karima	Dermatologie

Mars 1994

Pr. ABBAR Mohamed*	Urologie
Pr. ABDELHAK M'barek	Chirurgie – Pédiatrique
Pr. BELAIDI Halima	Neurologie
Pr. BENTAHILA Abdelali	Pédiatrie
Pr. BENYAHIA Mohammed Ali	Gynécologie – Obstétrique
Pr. BERRADA Mohamed Saleh	Traumatologie – Orthopédie
Pr. CHAMI Ilham	Radiologie
Pr. CHERKAOUI Lalla Ouafae	Ophtalmologie
Pr. JALIL Abdelouahed	Chirurgie Générale
Pr. LAKHDAR Amina	Gynécologie Obstétrique
Pr. MOUANE Nezha	Pédiatrie

Mars 1995

Pr. ABOUQUAL Redouane	Réanimation Médicale
Pr. AMRAOUI Mohamed	Chirurgie Générale
Pr. BAIDADA Abdelaziz	Gynécologie Obstétrique
Pr. BARGACH Samir	Gynécologie Obstétrique
Pr. CHAARI Jilali*	Médecine Interne
Pr. DIMOU M'barek*	Anesthésie Réanimation
Pr. DRISSI KAMILI Med Nordine*	Anesthésie Réanimation
Pr. EL MESNAOUI Abbes	Chirurgie Générale
Pr. ESSAKALI HOUSSYNI Leila	Oto-Rhino-Laryngologie
Pr. HDA Abdelhamid*	Cardiologie -***Directeur HMI Med V***
Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed	Urologie
Pr. OUAZZANI CHAHDI Bahia	Ophtalmologie
Pr. SEFIANI Abdelaziz	Génétique

Pr. ZEGGWAGH Amine Ali	Réanimation Médicale

Décembre 1996

Pr. AMIL Touriya*	Radiologie
Pr. BELKACEM Rachid	Chirurgie Pédiatrie
Pr. BOULANOUAR Abdelkrim	Ophtalmologie
Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan	Chirurgie Générale
Pr. GAOUZI Ahmed	Pédiatrie
Pr. MAHFOUDI M'barek*	Radiologie
Pr. OUADGHIRI Mohamed	Traumatologie-Orthopédie
Pr. OUZEDDOUN Naima	Néphrologie
Pr. ZBIR EL Mehdi*	Cardiologie

Novembre 1997

Pr. ALAMI Mohamed Hassan	Gynécologie-Obstétrique
Pr. BEN SLIMANE Lounis	Urologie
Pr. BIROUK Nazha	Neurologie
Pr. ERREIMI Naima	Pédiatrie
Pr. FELLAT Nadia	Cardiologie
Pr. HAIMEUR Charki*	Anesthésie Réanimation
Pr. KADDOURI Noureddine	Chirurgie Pédiatrique
Pr. KOUTANI Abdellatif	Urologie
Pr. LAHLOU Mohamed Khalid	Chirurgie Générale
Pr. MAHRAOUI CHAFIQ	Pédiatrie
Pr. TAOUFIQ Jallal	Psychiatrie
Pr. YOUSFI MALKI Mounia	Gynécologie Obstétrique

Novembre 1998

Pr. AFIFI RAJAA	Gastro-Entérologie
Pr. BENOMAR ALI	Neurologie – ***Doyen de la FMP Abulcassis***
Pr. BOUGTAB Abdesslam	Chirurgie Générale
Pr. ER RIHANI Hassan	Oncologie Médicale
Pr. BENKIRANE Majid*	Hématologie
Pr. KHATOURI ALI*	Cardiologie

Janvier 2000

Pr. ABID Ahmed*	Pneumophtisiologie
Pr. AIT OUMAR Hassan	Pédiatrie
Pr. BENJELLOUN Dakhama Badr.Sououd	Pédiatrie
Pr. BOURKADI Jamal-Eddine	Pneumo-phtisiologie
Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Al Montacer	Chirurgie Générale
Pr. ECHARRAB El Mahjoub	Chirurgie Générale
Pr. EL FTOUH Mustapha	Pneumo-phtisiologie
Pr. EL MOSTARCHID Brahim*	Neurochirurgie
Pr. ISMAILI Hassane*	Traumatologie Orthopédie- ***Dir. Hop. Av. Marr.***

Pr. MAHMOUDI Abdelkrim*	Anesthésie-Réanimation ***Inspecteur du SSM***
Pr. TACHINANTE Rajae	Anesthésie-Réanimation
Pr. TAZI MEZALEK Zoubida	Médecine Interne

Novembre 2000

Pr. AIDI Saadia	Neurologie
Pr. AJANA Fatima Zohra	Gastro-Entérologie
Pr. BENAMR Said	Chirurgie Générale
Pr. CHERTI Mohammed	Cardiologie
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Selma	Anesthésie-Réanimation
Pr. EL HASSANI Amine	Pédiatrie ***Directeur Hop. Cheikh Zaied***
Pr. EL KHADER Khalid	Urologie
Pr. EL MAGHRAOUI Abdellah*	Rhumatologie
Pr. GHARBI Mohamed El Hassan	Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Pr. MAHASSINI Najat	Anatomie Pathologique
Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae	Pédiatrie
Pr. ROUIMI Abdelhadi*	Neurologie

Décembre 2000

Pr. ZOHAIR ABDELAH*	ORL

Décembre 2001

Pr. BALKHI Hicham*	Anesthésie-Réanimation
Pr. BENABDELJLIL Maria	Neurologie
Pr. BENAMAR Loubna	Néphrologie
Pr. BENAMOR Jouda	Pneumo-phtisiologie
Pr. BENELBARHDADI Imane	Gastro-Entérologie
Pr. BENNANI Rajae	Cardiologie
Pr. BENOUACHANE Thami	Pédiatrie
Pr. BEZZA Ahmed*	Rhumatologie
Pr. BOUCHIKHI IDRISSI Med Larbi	Anatomie
Pr. BOUMDIN El Hassane*	Radiologie
Pr. CHAT Latifa	Radiologie
Pr. DAALI Mustapha*	Chirurgie Générale
Pr. DRISSI Sidi Mourad*	Radiologie
Pr. EL HIJRI Ahmed	Anesthésie-Réanimation
Pr. EL MAAQILI Moulay Rachid	Neuro-Chirurgie
Pr. EL MADHI Tarik	Chirurgie-Pédiatrique
Pr. EL OUNANI Mohamed	Chirurgie Générale
Pr. ETTAIR Said	Pédiatrie ***Directeur. Hop.d'Enfants***
Pr. GAZZAZ Miloudi*	Neuro-Chirurgie
Pr. HRORA Abdelmalek	Chirurgie Générale
Pr. KABBAJ Saad	Anesthésie-Réanimation
Pr. KABIRI EL Hassane*	Chirurgie Thoracique
Pr. LAMRANI Moulay Omar	Traumatologie Orthopédie

Pr. LEKEHAL Brahim	Chirurgie Vasculaire Périphérique
Pr. MAHASSIN Fattouma*	Médecine Interne
Pr. MEDARHRI Jalil	Chirurgie Générale
Pr. MIKDAME Mohammed*	Hématologie Clinique
Pr. MOHSINE Raouf	Chirurgie Générale
Pr. NOUINI Yassine	Urologie ***Directeur Hôpital Ibn Sina***
Pr. SABBAH Farid	Chirurgie Générale
Pr. SEFIANI Yasser	Chirurgie Vasculaire Périphérique
Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia	Pédiatrie

Décembre 2002

Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane*	Anatomie Pathologique
Pr. AMEUR Ahmed *	Urologie
Pr. AMRI Rachida	Cardiologie
Pr. AOURARH Aziz*	Gastro-Entérologie
Pr. BAMOU Youssef *	Biochimie-Chimie
Pr. BELMEJDOUB Ghizlene*	Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Pr. BENZEKRI Laila	Dermatologie
Pr. BENZZOUBEIR Nadia	Gastro-Entérologie
Pr. BERNOUSSI Zakiya	Anatomie Pathologique
Pr. BICHRA Mohamed Zakariya*	Psychiatrie
Pr. CHOHO Abdelkrim *	Chirurgie Générale
Pr. CHKIRATE Bouchra	Pédiatrie
Pr. EL ALAMI EL FELLOUS Sidi Zouhair	Chirurgie Pédiatrique
Pr. EL HAOURI Mohamed *	Dermatologie
Pr. FILALI ADIB Abdelhai	Gynécologie Obstétrique
Pr. HAJJI Zakia	Ophtalmologie
Pr. IKEN Ali	Urologie
Pr. JAAFAR Abdeloihab*	Traumatologie Orthopédie
Pr. KRIOUILE Yamina	Pédiatrie
Pr. LAGHMARI Mina	Ophtalmologie
Pr. MABROUK Hfid*	Traumatologie Orthopédie
Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss*	Gynécologie Obstétrique
Pr. OUJILAL Abdelilah	Oto-Rhino-Laryngologie
Pr. RACHID Khalid *	Traumatologie Orthopédie
Pr. RAISS Mohamed	Chirurgie Générale
Pr. RGUIBI IDRISSI Sidi Mustapha*	Pneumophtisiologie
Pr. RHOU Hakima	Néphrologie
Pr. SIAH Samir *	Anesthésie Réanimation
Pr. THIMOU Amal	Pédiatrie
Pr. ZENTAR Aziz*	Chirurgie Générale

Janvier 2004

Pr. ABDELLAH El Hassan	Ophtalmologie

Pr. AMRANI Mariam	Anatomie Pathologique
Pr. BENBOUZID Mohammed Anas	Oto-Rhino-Laryngologie
Pr. BENKIRANE Ahmed*	Gastro-Entérologie
Pr. BOUGHALEM Mohamed*	Anesthésie Réanimation
Pr. BOULAADAS Malik	Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
Pr. BOURAZZA Ahmed*	Neurologie
Pr. CHAGAR Belkacem*	Traumatologie Orthopédie
Pr. CHERRADI Nadia	Anatomie Pathologique
Pr. EL FENNI Jamal*	Radiologie
Pr. EL HANCHI ZAKI	Gynécologie Obstétrique
Pr. EL KHORASSANI Mohamed	Pédiatrie
Pr. EL YOUNASSI Badreddine*	Cardiologie
Pr. HACHI Hafid	Chirurgie Générale
Pr. JABOUIRIK Fatima	Pédiatrie
Pr. KHARMAZ Mohamed	Traumatologie Orthopédie
Pr. MOUGHIL Said	Chirurgie Cardio-Vasculaire
Pr. OUBAAZ Abdelbarre*	Ophtalmologie
Pr. TARIB Abdelilah*	Pharmacie Clinique
Pr. TIJAMI Fouad	Chirurgie Générale
Pr. ZARZUR Jamila	Cardiologie

Janvier 2005

Pr. ABBASSI Abdellah	Chirurgie Réparatrice et Plastique
Pr. AL KANDRY Sif Eddine*	Chirurgie Générale
Pr. ALLALI Fadoua	Rhumatologie
Pr. AMAZOUZI Abdellah	Ophtalmologie
Pr. AZIZ Noureddine*	Radiologie
Pr. BAHIRI Rachid	Rhumatologie
Pr. BARKAT Amina	Pédiatrie
Pr. BENYASS Aatif	Cardiologie
Pr. BERNOUSSI Abdelghani	Ophtalmologie
Pr. DOUDOUH Abderrahim*	Biophysique
Pr. EL HAMZAOUI Sakina*	Microbiologie
Pr. HAJJI Leila	Cardiologie *(mise en disponibilité)*
Pr. HESSISSEN Leila	Pédiatrie
Pr. JIDAL Mohamed*	Radiologie
Pr. LAAROUSSI Mohamed	Chirurgie Cardio-vasculaire
Pr. LYAGOUBI Mohammed	Parasitologie
Pr. NIAMANE Radouane*	Rhumatologie
Pr. RAGALA Abdelhak	Gynécologie Obstétrique
Pr. SBIHI Souad	Histo-Embryologie Cytogénétique
Pr. ZERAIDI Najia	Gynécologie Obstétrique

Décembre 2005

Pr. CHANI Mohamed	Anesthésie Réanimation

Avril 2006

Pr. ACHEMLAL Lahsen*	Rhumatologie
Pr. AKJOUJ Said*	Radiologie
Pr. BELMEKKI Abdelkader*	Hématologie
Pr. BENCHEIKH Razika	O.R.L
Pr. BIYI Abdelhamid*	Biophysique
Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine	Chirurgie - Pédiatrique
Pr. BOULAHYA Abdellatif*	Chirurgie Cardio – Vasculaire
Pr. CHENGUETI ANSARI Anas	Gynécologie Obstétrique
Pr. DOGHMI Nawal	Cardiologie
Pr. FELLAT Ibtissam	Cardiologie
Pr. FAROUDY Mamoun	Anesthésie Réanimation
Pr. HARMOUCHE Hicham	Médecine Interne
Pr. HANAFI Sidi Mohamed*	Anesthésie Réanimation
Pr. IDRISS LAHLOU Amine*	Microbiologie
Pr. JROUNDI Laila	Radiologie
Pr. KARMOUNI Tariq	Urologie
Pr. KILI Amina	Pédiatrie
Pr. KISRA Hassan	Psychiatrie
Pr. KISRA Mounir	Chirurgie – Pédiatrique
Pr. LAATIRIS Abdelkader*	Pharmacie Galénique
Pr. LMIMOUNI Badreddine*	Parasitologie
Pr. MANSOURI Hamid*	Radiothérapie
Pr. OUANASS Abderrazzak	Psychiatrie
Pr. SAFI Soumaya*	Endocrinologie
Pr. SEKKAT Fatima Zahra	Psychiatrie
Pr. SOUALHI Mouna	Pneumo – Phtisiologie
Pr. TELLAL Saida*	Biochimie
Pr. ZAHRAOUI Rachida	Pneumo – Phtisiologie

Octobre 2007

Pr. ABIDI Khalid	Réanimation médicale
Pr. ACHACHI Leila	Pneumo phtisiologie
Pr. ACHOUR Abdessamad*	Chirurgie générale
Pr. AIT HOUSSA Mahdi*	Chirurgie cardio vasculaire
Pr. AMHAJJI Larbi*	Traumatologie orthopédie
Pr. AOUFI Sarra	Parasitologie
Pr. BAITE Abdelouahed*	Anesthésie réanimation ***Directeur ERSM***
Pr. BALOUCH Lhousaine*	Biochimie-chimie

Pr. BENZIANE Hamid*	Pharmacie clinique
Pr. BOUTIMZINE Nourdine	Ophtalmologie
Pr. CHARKAOUI Naoual*	Pharmacie galénique
Pr. EHIRCHIOU Abdelkader*	Chirurgie générale
Pr. ELABSI Mohamed	Chirurgie générale
Pr. EL MOUSSAOUI Rachid	Anesthésie réanimation
Pr. EL OMARI Fatima	Psychiatrie
Pr. GHARIB Noureddine	Chirurgie plastique et réparatrice
Pr. HADADI Khalid*	Radiothérapie
Pr. ICHOU Mohamed*	Oncologie médicale
Pr. ISMAILI Nadia	Dermatologie
Pr. KEBDANI Tayeb	Radiothérapie
Pr. LALAOUI SALIM Jaafar*	Anesthésie réanimation
Pr. LOUZI Lhoussain*	Microbiologie
Pr. MADANI Naoufel	Réanimation médicale
Pr. MAHI Mohamed*	Radiologie
Pr. MARC Karima	Pneumo phtisiologie
Pr. MASRAR Azlarab	Hématologie biologique
Pr. MRABET Mustapha*	Médecine préventive santé publique et hygiène
Pr. MRANI Saad*	Virologie
Pr. OUZZIF Ez zohra*	Biochimie-chimie
Pr. RABHI Monsef*	Médecine interne
Pr. RADOUANE Bouchaib*	Radiologie
Pr. SEFFAR Myriame	Microbiologie
Pr. SEKHSOKH Yassine*	Microbiologie
Pr. SIFAT Hassan*	Radiothérapie
Pr. TABERKANET Mustafa*	Chirurgie vasculaire périphérique
Pr. TACHFOUTI Samira	Ophtalmologie
Pr. TAJDINE Mohammed Tariq*	Chirurgie générale
Pr. TANANE Mansour*	Traumatologie orthopédie
Pr. TLIGUI Houssain	Parasitologie
Pr. TOUATI Zakia	Cardiologie

Décembre 2007

Pr. DOUHAL ABDERRAHMAN	Ophtalmologie

Décembre 2008

Pr ZOUBIR Mohamed*	Anesthésie Réanimation
Pr TAHIRI My El Hassan*	Chirurgie Générale

Mars 2009

Pr. ABOUZAHIR Ali*	Médecine interne
Pr. AGDR Aomar*	Pédiatre
Pr. AIT ALI Abdelmounaim*	Chirurgie Générale

Pr. AIT BENHADDOU El hachmia	Neurologie
Pr. AKHADDAR Ali*	Neuro-chirurgie
Pr. ALLALI Nazik	Radiologie
Pr. AMINE Bouchra	Rhumatologie
Pr. ARKHA Yassir	Neuro-chirurgie
Pr. BELYAMANI Lahcen*	Anesthésie Réanimation
Pr. BJIJOU Younes	Anatomie
Pr. BOUHSAIN Sanae*	Biochimie-chimie
Pr. BOUI Mohammed*	Dermatologie
Pr. BOUNAIM Ahmed*	Chirurgie Générale
Pr. BOUSSOUGA Mostapha*	Traumatologie orthopédique
Pr. CHAKOUR Mohammed *	Hématologie biologique
Pr. CHTATA Hassan Toufik*	Chirurgie vasculaire périphérique
Pr. DOGHMI Kamal*	Hématologie clinique
Pr. EL MALKI Hadj Omar	Chirurgie Générale
Pr. EL OUENNASS Mostapha*	Microbiologie
Pr. ENNIBI Khalid*	Médecine interne
Pr. FATHI Khalid	Gynécologie obstétrique
Pr. HASSIKOU Hasna *	Rhumatologie
Pr. KABBAJ Nawal	Gastro-entérologie
Pr. KABIRI Meryem	Pédiatrie
Pr. KARBOUBI Lamya	Pédiatrie
Pr. L'KASSIMI Hachemi*	Microbiologie ***Directeur Hôpital My Ismail***
Pr. LAMSAOURI Jamal*	Chimie Thérapeutique
Pr. MARMADE Lahcen	Chirurgie Cardio-vasculaire
Pr. MESKINI Toufik	Pédiatrie
Pr. MESSAOUDI Nezha *	Hématologie biologique
Pr. MSSROURI Rahal	Chirurgie Générale
Pr. NASSAR Ittimade	Radiologie
Pr. OUKERRAJ Latifa	Cardiologie
Pr. RHORFI Ismail Abderrahmani *	Pneumo-phtisiologie

PROFESSEURS AGREGES :

Octobre 2010

Pr. ALILOU Mustapha	Anesthésie réanimation
Pr. AMEZIANE Taoufiq*	Médecine interne
Pr. BELAGUID Abdelaziz	Physiologie
Pr. BOUAITY Brahim*	ORL
Pr. CHADLI Mariama*	Microbiologie
Pr. CHEMSI Mohamed*	Médecine aéronautique
Pr. DAMI Abdellah*	Biochimie chimie
Pr. DARBI Abdellatif*	Radiologie
Pr. DENDANE Mohammed Anouar	Chirurgie pédiatrique
Pr. EL HAFIDI Naima	Pédiatrie
Pr. EL KHARRAS Abdennasser*	Radiologie
Pr. EL MAZOUZ Samir	Chirurgie plastique et réparatrice

Pr. EL SAYEGH Hachem	Urologie
Pr. ERRABIH Ikram	Gastro entérologie
Pr. LAMALMI Najat	Anatomie pathologique
Pr. MOSADIK Ahlam	Anesthésie Réanimation
Pr. MOUJAHID Mountassir*	Chirurgie générale
Pr. NAZIH Mouna*	Hématologie
Pr. ZOUAIDIA Fouad	Anatomie pathologique

Mai 2012

Pr. AMRANI Abdelouahed	Chirurgie Pédiatrique
Pr. ABOUELALAA Khalil*	Anesthésie Réanimation
Pr. BELAIZI Mohamed*	Psychiatrie
Pr. BENCHEBBA Driss*	Traumatologie Orthopédique
Pr. DRISSI Mohamed*	Anesthésie Réanimation
Pr. EL ALAOUI MHAMDI Mouna	Chirurgie Générale
Pr. EL KHATTABI Abdessadek*	Médecine Interne
Pr. EL OUAZZANI Hanane*	Pneumophtisiologie
Pr. ER-RAJI Mounir	Chirurgie Pédiatrique
Pr. JAHID Ahmed	Anatomie pathologique
Pr. MEHSSANI Jamal*	Psychiatrie
Pr. RAISSOUNI Maha*	Cardiologie

Février 2013

Pr. AHID Samir	Pharmacologie – Chimie
Pr. AIT EL CADI Mina	Toxicologie
Pr. AMRANI HANCHI Laila	Gastro-Entérologie
Pr. AMOUR Mourad	Anesthésie Réanimation
Pr. AWAB Almahdi	Anesthésie Réanimation
Pr. BELAYACHI Jihane	Réanimation Médicale
Pr. BELKHADIR Zakaria Houssain	Anesthésie Réanimation
Pr. BENCHEKROUN Laila	Biochimie-Chimie
Pr. BENKIRANE Souad	Hématologie
Pr. BENNANA Ahmed*	Informatique Pharmaceutique
Pr. BENSGHIR Mustapha*	Anesthésie Réanimation
Pr. BENYAHIA Mohammed*	Néphrologie
Pr. BOUATIA Mustapha	Chimie Analytique
Pr. BOUABID Ahmed Salim*	Traumatologie Orthopédie
Pr. BOUTARBOUCH Mahjouba	Anatomie
Pr. CHAIB Ali*	Cardiologie
Pr. DENDANE Tarek	Réanimation Médicale
Pr. DINI Nouzha*	Pédiatrie
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Mohamed Ali	Anesthésie Réanimation
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Najwa	Radiologie

Pr. ELFATEMI Nizare	Neuro-Chirurgie
Pr. EL GUERROUJ Hasnae	Médecine Nucléaire
Pr. EL HARTI Jaouad	Chimie Thérapeutique
Pr. EL JOUDI Rachid*	Toxicologie
Pr. EL KABABRI Maria	Pédiatrie
Pr. EL KHANNOUSSI Basma	Anatomie Pathologie
Pr. EL KHLOUFI Samir	Anatomie
Pr. EL KORAICHI Alae	Anesthésie Réanimation
Pr. EN-NOUALI Hassane*	Radiologie
Pr. ERRGUIG Laila	Physiologie
Pr. FIKRI Meryim	Radiologie
Pr. GHFIR Imade	Médecine Nucléaire
Pr. IMANE Zineb	Pédiatrie
Pr. IRAQI Hind	Endocrinologie et maladies métaboliques
Pr. KABBAJ Hakima	Microbiologie
Pr. KADIRI Mohamed*	Psychiatrie
Pr. LATIB Rachida	Radiologie
Pr. MAAMAR Mouna Fatima Zahra	Médecine Interne
Pr. MEDDAH Bouchra	Pharmacologie
Pr. MELHAOUI Adyl	Neuro-chirurgie
Pr. MRABTI Hind	Oncologie Médicale
Pr. NEJJARI Rachid	Pharmacognosie
Pr. OUBEJJA Houda	Chirurgie Pédiatrique
Pr. OUKABLI Mohamed*	Anatomie Pathologique
Pr. RAHALI Younes	Pharmacie Galénique
Pr. RATBI Ilham	Génétique
Pr. RAHMANI Mounia	Neurologie
Pr. REDA Karim*	Ophtalmologie
Pr. REGRAGUI Wafa	Neurologie
Pr. RKAIN Hanan	Physiologie
Pr. ROSTOM Samira	Rhumatologie
Pr. ROUAS Lamiaa	Anatomie Pathologique
Pr. ROUIBAA Fedoua*	Gastro-Entérologie
Pr. SALIHOUN Mouna	Gastro-Entérologie
Pr. SAYAH Rochde	Chirurgie Cardio-Vasculaire
Pr. SEDDIK Hassan*	Gastro-Entérologie
Pr. ZERHOUNI Hicham	Chirurgie Pédiatrique
Pr. ZINE Ali*	Traumatologie Orthopédie

Avril 2013

Pr. EL KHATIB Mohamed Karim*	Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
Pr. GHOUNDALE Omar*	Urologie
Pr. ZYANI Mohammad*	Médecine Interne

MARS 2014 ***Enseignants Militaires**

ACHIR ABDELLAH	Chirurgie Thoracique
BENCHAKROUN MOHAMMED	Traumatologie- Orthopédie
BOUCHIKH MOHAMMED	Chirurgie Thoracique
EL KABBAJ DRISS	Néphrologie
EL MACHTANI IDRISSI SAMIRA	Biochimie-Chimie
HARDIZI HOUYAM	Histologie- Embryologie-Cytogénétique
HASSANI AMALE	Pédiatrie
HERRAK LAILA	Pneumologie
JANANE ABDELLA TIF	Urologie
JEAIDI ANASS	Hématologie Biologique
KOUACH JAOUAD	Génécologie-Obstétrique
LEMNOUER ABDELHAY	Microbiologie
MAKRAM SANAA	Pharmacologie
OULAHYANE RACHID	Chirurgie Pédiatrique
RHISSASSI MOHAMED JMFAR	CCV
SABRY MOHAMED	Cardiologie
SEKKACH YOUSSEF	Médecine Interne
TAZL MOUKBA. :LA.KLA.	Génécologie-Obstétrique

***Enseignants Militaires**

DECEMBRE 2014

ABILKACEM RACHID'	Pédiatrie
AIT BOUGHIMA FADILA	Médecine Légale
BEKKALI HICHAM	Anesthésie-Réanimation
BENAZZOU SALMA	Chirurgie Maxillo-Faciale
BOUABDELLAH MOUNYA	Biochimie-Chimie
BOUCHRIK MOURAD	Parasitologie
DERRAJI SOUFIANE	Pharmacie Clinique
DOBLALI TAOUFIK	Microbiologie
EL AYOUBI EL IDRISSI ALI	Anatomie
EL GHADBANE ABDEDAIM HATIM	Anesthésie-Réanimation
EL MARJANY MOHAMMED	Radiothérapie
FE]JAL NAWFAL	ChirurgieRéparatrice et Plastique
JAHIDI MOHAMED	O.R.L
LAKHAL ZOUHAIR	Cardiologie
OUDGHIRI NEZHA	Anesthésie-Réanimation
Rami Mohamed	Chirurgie Pédiatrique
SABIR MARIA	Psychiatrie
SBAI IDRISSI KARIM	Médecine préventive, santé publique et Hyg.

Enseignants *Militaires

AOUT 2015

Meziane meryem	Dermatologie
Tahri latifa	Rhumatologie

JANVIER 2016

BENKABBOU AMINE	Chirurgie Générale
EL ASRI FOUAD	Ophtalmologie
ERRAMI NOUREDDINE	O.R.L
NITASSI SOPHIA	O.R.L

2- ENSEIGNANTS – CHERCHEURS SCIENTIFIQUES

PROFESSEURS / PRs. HABILITES

Pr. ABOUDRAR Saadia	Physiologie
Pr. ALAMI OUHABI Naima	Biochimie – chimie
Pr. ALAOUI KATIM	Pharmacologie
Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naïma	Histologie-Embryologie
Pr. ANSAR M'hammed	Chimie Organique et Pharmacie Chimique
Pr. BOUHOUCHE Ahmed	Génétique Humaine
Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz	Applications Pharmaceutiques
Pr. BOURJOUANE Mohamed	Microbiologie
Pr. CHAHED OUAZZANI Lalla Chadia	Biochimie – chimie
Pr. DAKKA Taoufiq	Physiologie
Pr. DRAOUI Mustapha	Chimie Analytique
Pr. EL GUESSABI Lahcen	Pharmacognosie
Pr. ETTAIB Abdelkader	Zootechnie
Pr. FAOUZI Moulay El Abbes	Pharmacologie
Pr. HAMZAOUI Laila	Biophysique
Pr. HMAMOUCHI Mohamed	Chimie Organique
Pr. IBRAHIMI Azeddine	Biologie moléculaire
Pr. KHANFRI Jamal Eddine	Biologie
Pr. OULAD BOUYAHYA IDRISSI Med	Chimie Organique
Pr. REDHA Ahlam	Chimie
Pr. TOUATI Driss	Pharmacognosie
Pr. ZAHIDI Ahmed	Pharmacologie
Pr. ZELLOU Amina	Chimie Organique

Mise à jour le 14/12/2016 par le
Service des Ressources Humaines

DEDICACES

TOUTES LES LETTRES NE SAURAIENT TROUVER LES MOTS QU'IL FAUT…

TOUS LES MOTS NE SAURAIENT EXPRIMER LA GRATITUDE,

L'AMOUR, LE RESPECT ET LA RECONNAISSANCE…

AUSSI, C'EST TOUT SIMPLEMENT QUE

JE DEDIE CETTE THESE A…

A TOUT D'ABORD, NOUS REMERCIONS LE DIEU, NOTRE CREATEUR DE NOS AVOIR DONNE LES FORCES, LA VOLONTE ET LE COURAGE AFIN D'ACCOMPLIR CE TRAVAIL MODESTE.

A MON TRÈS CHER PÈRE :

EL AISSAOUI HOUMMAD

Autant de phrases et d'expressions aussi éloquentes soit-elles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Tu as su m'inculquer le sens de la responsabilité, de l'optimisme et de la confiance en soi face aux difficultés de la vie. Tes conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite. Ta patience sans fin, ta compréhension et ton encouragement sont pour moi le soutien indispensable que tu as toujours su m'apporter. Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester ta fierté. Je voulais de tout mon cœur que tu sois ici parmi nous pour que tu couronne ces beaux moments par ton affection et ta bénédiction. Que Dieu le tout miséricordieux te bénis par sa clémence et te donne le report à ton âme, et que le paradis soit ton foyer eternel.

A MA TRÈS CHÈRE MÈRE :

KADA NAJAT

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes cotés pour me consoler quand il fallait. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçoit ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime. Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.

A MA TRES CHERE SŒUR SALIMA

En souvenir d'une enfance dont nous avons partagé les meilleurs et les plus agréables moments. Pour toute la complicité et l'entente qui nous unissent,
ce travail est un témoignage de mon attachement et de mon amour.

A MON CHER PETIT FRÈRE OMAR

Pour toute l'ambiance dont tu m'as entouré, pour toute la spontanéité et ton élan chaleureux, Je te dédie ce travail.
Puisse Dieu le tout puissant exhausser tous tes vœux.

A TOUS LES MEMBRES DE MA FAMILLE, PETITS ET GRANDS

Veuillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection

À MES CHER(E)S AMI(E)S :

Vous avez toujours fait la preuve d'attachement, de sincérité, et de considération envers ma personne. Je voudrais pouvoir vous apporter ici la chaleur de mon affection et de mon amour. Votre aide, votre générosité extrême, votre soutien, étaient pour moi une source de courage, de conscience et de patience. Puisse Dieu, le tout puissant, vous combler de santé, de bonheur et vous procurer longue vie.

SPECIALEMENT A :

❖ *MAMADE Hassane, EL YALAOUI Hilal,* ***AZDAD Anas****:*
Sans vous et votre grand effectives aides et soutiens, je ne pavanerai jamais à soutenir cette thèse !

❖ *AHMIDOUCH Ghizlane, BENÎCHE Rajaa, FARHANE Sanae, BOUHLALA Nadia, HOUARI Mouna:*
Depuis l'enfance, passant par l'adolescence et arrivant à la jeunesse mature, vous m'avez accompagné et soutenez. Que le bon Dieu vous bénisse et protège notre amitié pour le bon !

❖ *À tous mes amis les Pharmaciens Internes et Résidents de Rabat et membres de notre association que je préside : l'APIRR ;*
Je vous remercie pour votre soutien je vous souhaite la réussite et tout le bonheur du monde

A tous ceux que je n'ai pas mentionnés mais qui sont toujours présents en mon esprit.

REMERCIEMENTS

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENTE DE THESE

MADAME LE PROFESSEUR SOUAD BENKIRANE

PROFESSEUR D'HEMATOLOGIE BIOLOGIQUE

Nous avons eu le privilège de vous avoir Présidente de ce travail. Votre sérieux, votre compétence et votre sens du devoir nous ont énormément marqués. Veuillez trouver ici l'expression de notre respectueuse considération et notre profonde admiration pour toutes vos qualités scientifiques et humaines. Ce travail est pour nous l'occasion de vous témoigner notre profonde gratitude.

NOTRE MAITRE ET RAPPORTEUR DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR AZLARAB MASSRAR

PROFESSEUR D'HEMATOLOGIE BIOLOGIQUE

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

À NOTRE MAITRE ET JUGE DE THESE
MADAME LE PROFESSEUR MONA NAZIH
PROFESSEUR D'HEMATOLOGIE BIOLOGIQUE

Votre assistance parmi les membres de notre jury de thèse nous honore. Croyez chère professeur en notre sincère gratitude et pour l'estime qu'on vous porte. Nous vous exprimons nos plus vifs remerciements et nous vous prions de trouver, ici le témoignage de notre reconnaissance et notre profond respect.

À NOTRE MAITRE ET JUGE DE THESE MONSIEUR LE PROFESSEUR ABDALLAH DAMI PROFESSEUR DE BIOCHIMIE

Votre assistance parmi les membres du jury de thèse nous honore beaucoup. Votre qualité d'enseignante nous a énormément imprégné, votre sympathie et votre gentillesse nous encouragent et nous incitent d'avantage à vouloir puiser de votre savoir. Permettez-nous chère professeur de vous exprimer nos remerciements les plus sincères.

ABREVIATIONS

Ac: Anticorps

ACC : l'anticorps circulant

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADP : adénosine diphosphate

AFSSAPS : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé

AMM : Autorisation de mise sur le marchez

ANN : Anticorps non neutralisants

ARN : Acide Ribonucléique

ARNm : Acide Ribonucléique messager

ATIII : Antithrombine

CANAL : Concerted Action on Neutralizing Antibodies in Severe Haemophilia A

CHIS : Centre Hospitalier Ibn Sina

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CTLA-4 : cytotoxic T lymphocyte antigen-4

EUHASSa : European HAemophilia Safety Surveillance

FAH : Facteur anti hémophilique A

FIIa : Facteur II activé ou la thrombine activé

FIX : Facteur IX

FT : Facteur Tissulaire

FVa : Facteur V activé

FVIIa : Facteur VII activé

FVIII : Facteur VIII

FVIII a : Facteur VIII activé

FVIIIh : FVIII humain

FXa : Facteur X activé

FXIa : Facteur XI activé

FXIIIa : Facteur XIII activé

HAA : Hémophilie A acquise

IgG : Immunoglobuline G

IR : Indice de Rosner

ISTH : International Society on Thrombosis and Haemostasis

ITI : Induction de la tolérance immune

JCPA : journées cumulées en présence de l'antigène

kDa : kilo Dalton

LRP1: low density lipoproteine receptor-relatedprotein 1

M : Molaire

PCa : Protéine C activé

PDF : Produits de Dégradation de la Fibrine

PFA : Platelet Function Analyzer

pFVIIIh : plasmatiques de FVIII humains

PLs : Phospholipides

PUPs : previously untreated patients

rFVIII : FVIII recombinant

RODIN : Research of Determinants of Inhibitor Development

rVIIa : facteur VII recombinant

SA: semaines d'aménorrhé

TCA : Temps de Céphaline avec Activateur

TNF : tumour necrosis factor

TP : Taux de prothrombine

t-**PA** : L'activateur tissulaire du plasminogène

TQ : Temps de Quick

TS : Temps de saignement

UB : Unité Bethésda

UKHCDO: United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation

V et vol : Volume

VWF : Facteur Willebrand

WFH: World Federation of Hemophilia

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Répartition des inhibiteurs positifs selon les différentes tranches d'âge. 17
Tableau II: Répartition de 73 patients selon leurs taux résiduel en FVIIIa..... 19
Tableau III: Classification de l'hémophilie 52
Tableau IV: Conduite à tenir devant une hémarthrose ou un hématome chez un hémophile compliqué par la présence d'un inhibiteur..... 100
Tableau V: Fréquences des inhibiteurs dans les études internationales : 104
Tableau VI: Fréquence des forts répondeurs dans des études internationales 106

LISTE DES FIGURES

Figure 1: arbre décisionnelle lors d'un allongement de TCA 7
Figure 2: Droite théorique de l'unité Bethesda. 12
Figure 3: Droite théorique de l'unité Bethesda en mettant le point sur des dilutions qui encadrent 50%. 14
Figure 4 : Représentation de différentes tranches d'âge des patients. 16
Figure 5: Représentation des différents âges des hémophiles inhibiteurs positifs. 17
Figure 6:Résultat du dépistage des inhibiteurs chez les hémophiles A (série de 73 hémophiles) 18
Figure 7: répartition de 73 hémophiles A selon leur degré de sévérité..... 19
Figure 8: répartition de 46 hémophiles sévère selon leur développement d'inhibiteurs..... 20
Figure 9: sévérité de l'hémophilie chez les inhibiteurs positifs..... 20
Figure 10: Représentation des taux d'inhibiteurs chez les patients inhibiteurs positifs en %. 21
Figure 11: Répartition des inhibiteurs faibles et forts répondeur..... 21
Figure 12: Taux d'inhibiteur en UB/ml chez les forts répondeurs 22
Figure 13: Taux d'inhibiteur en UB/ml chez les faibles répondeurs 22
Figure 14: Répartition des forts et faibles répondeurs chez les hémophiles A sévères 23
Figure 15: évolution de la cinétique de développement d'inhibiteur chez certains **14** hémophiles positifs 24
Figure 16: cinétique des patients forts répondeurs..... 25
Figure 17: cinétique des patients forts répondeurs..... 25
Fig**u**re **18**: cinétique des patients ayant changé le titrage de leurs inhibiteurs ... 26
Figure 19: schéma montrant les différents intervenants dans l'agrégation..... 30
Figure 20: Phase d'initiation de la coagulation [23]. 31
Figure 21: Phase d'amplification de la coagulation [23]. 33
Figure 22: inhibiteurs de la coagulation et fibrinolyse [21]. 35
Figure 23 : Gène du facteur VIII (FVIII). [32] 37

Figure 24: Schéma récapitulatif de la structure et des étapes de la maturation protéique du FVIII. Les glycosylations et les sulfatations des tyrosines ne sont pas représentées. [27] 41
Figure 25: Schéma des interactions du FVIII avec les autres composants de l'hémostase pendant les processus d'activation et d'inactivation du FVIII. [27]. 47
Figure 26 :La coagulation chez l'hémophile [65] 51
Figure 27: droite d'étalonnage (Log/Log) de l'allongement de TCA..... 58
Figure 28 : Transmission de l'hémophilie (mère conductrice).[68] 61
Figure 29: Schématisation du niveau de risque selon le fond génétique et les risques environnementaux surajoutés. [106]..... 79
Figure 30: Comparaison des profils cinétiques des inhibiteurs de type 1 (a) et de type 2 (b). Les fractions sous les lignes correspondent aux dilutions plasmatiques. D'après Green D et al, Haemophilia 2011. [27]..... 89

SOMMAIRE

INTRODUCTION 1

MATERIELS ET METHODES 3

1. CONTEXTE 4

2.INTERROGATOIRE Erreur ! Signet non défini.

3.PRE-ANALYTIQUE 4

4. PHASE ANALYTIQUE : 5

4.1 Tests de diagnostic de l'hémophilie : 5

4.1.1 Temps de céphaline et activateur (TCA) : 5

4.1.2 Dosage spécifique des facteurs anti-hémophiliques : 6

4.2.Protocole de dépistage et titrage des inhibiteurs anti FVIII pratiquée au laboratoire d'Hématologie centrale d'Avicenne Rabat : 6

4.2.1 Détection de l'effet inhibiteur : 6

4.2.2-Dépistage et Titrage des inhibiteurs : quelle méthode d'analyse ? 8

4.2.3-Le protocole de dépistage et de titrage tel pratiqué au laboratoire : 10

RESULTATS *15*

1. Répartition des patients selon les tranches d'âge : 16

2. Répartition selon la présence ou l'absence d'inhibiteurs : Résultat du dépistage 18

3. Répartition selon le degré de sévérité de l'hémophilie : 18

4. Taux des inhibiteurs et pourcentage d'inhibition : 21

5. Cinétique et suivie des inhibiteurs : 23

DISCUSSION *27*

I-PHYSIOLOGIE DE LA COAGULATION [19] **28**

1-Hémostase primaire 28

1.1-Le temps vasculaire : 28

1.2-Le temps plaquettaire : 29

1.3-L'activation plaquettaire: 29

1.4-L'agrégation plaquettaire : 29

2-Hémostase secondaire : La coagulation [22, 23] 30

3-Inactivation de la coagulation et Fibrinolyse 34

II. LE FACTEUR VIII _____36
1-Le gène du FVIII et son ARN messager _____36
2- Structure du FVIII_____36
3-Sécrétion du FVIII _____38
4-Interaction du FVIII avec les autres composants de l'hémostase_____41
4.1-Interaction du FVIII avec son transporteur : Facteur Von Willebrand41
4.2-Interaction du FVIII au sein du complexe tenase intrinsèque _____43
5- Régulation de l'activité du FVIII _____44
5.1-Activation du FVIII _____44
5.2-Inactivation du FVIII _____46
6- Clairance du facteur VIII _____48
III-HEMOPHILIE A _____49
1- Définition et épidémiologie de l'hémophilie A_____49
2- Physiopathologie de l'hémophilie A_____49
3-Signes cliniques et complications de l'hémophilie A _____52
4-Diagnostique biologique de l'hémophilie A _____56
4.1-Test de routine : Allongement du TCA _____56
4.2-Dosage spécifique du facteur de coagulation (FVIII) _____57
4.3-Diagnostic génétique _____60
4.4-Dépistage des conductrices _____64
4.5-Diagnostic prénatal _____65
4.6-Diagnostic différentiels _____66
5- Traitement de l'hémophilie A_____67
5.1-FVIII d'origine plasmatique _____68
5.2- FVIII d'origine recombinante_____69
IV- COMPLICATIONS LIEES AU TRAITEMENT ANTI-HEMOPHILIQUE _____69
1-Complications infectieuses _____69
2- Développement d'inhibiteurs _____70
2.1- Conséquences cliniques des anticorps anti-FVIII_____70
2.2- Epidémiologie des inhibiteurs dans l'hémophilie A _____72
2.3- Facteurs de risques de développement d'inhibiteurs dans l'hémophilie A _____72
2.3.1-Facteurs de risque génétiques _____73
2.3.2-Facteurs de risque non génétiques _____75

2.4 Caractéristiques immunologiques des inhibiteurs du FVIII _____80
2.4.1-Isotypes et sous-classes des anticorps anti-FVIII _____80
2.4.2-La classification des inhibiteurs anti-FVIII _____81
2.4.3-Mécanismes d'action des inhibiteurs anti-FVIII _____81
2.5-Cinétique des inhibiteurs anti-FVIII _____88
2.6-Test de dépistage et de titrage des inhibiteurs anti-FVIII _____90
2.6.1-Méthode de Bethesda_____91
2.6.2-Méthode de Bethesda avec la modification de Nijmegen _____93
2.6.3-Autres techniques _____94
2.7-Traitement des patients hémophiles A avec inhibiteurs anti-FVIII __97
2.7.1-Traitement substitutif de référence par concentrés de FVIII ____97
2.7.2-Agents bypassants _____98
2.7.3-Traitement prophylactique_____100
2.7.4-Induction de la tolérance immune (ITI)_____101
DISCUSSION DE LA PRESENTE ETUDE_____103
CONCLUSION _____111
RESUMES _____113
REFERENCES _____117

INTRODUCTION

L'hémophilie est une maladie hémorragique constitutionnelle à transmission récessive liée au chromosome X. Le diagnostic biologique est porté sur un allongement du TCA avec un déficit en facteur IX pour l'hémophilie B et en facteur VIII pour l'hémophilie A qui est la plus fréquente.

La thérapeutique substitutive (l'injection du facteur VIII) est la seule option existante dans les stratégies du traitement préventif comme dans les stratégies du traitement curatif lors des épisodes hémorragiques, ce qui permet entre autres de prolonger la durée de vie des hémophiles et de mieux gérer les complications surtout orthopédiques.

Néanmoins, les complications de ce traitement substitutif est d'un double danger : les complications infectieuses et la survenue des inhibiteurs dirigés contre le facteur VIII rendant le traitement substitutif inefficace.

Alors que la sécurité des fractions anti-hémophiliques vis-à-vis des agents infectieux connus semble à peu près bien établie et que le risque de transmission d'agents infectieux dits « non conventionnels » n'est abordé que dans un cadre hypothétique, la survenue d'un inhibiteur dirigé contre le facteur VIII est considérée actuellement comme une des plus sérieuses complications du traitement substitutif de l'hémophilie A. [1]

Le diagnostic de cette complication est biologique et se base sur des principes simples qu'est le dépistage et le titrage de ces inhibiteurs par la méthode de référence de Bethésda-Nijmegen. Ce diagnostic permet aussi d'adapter les modalités de traitement.

Dans notre étude, nous mettons le point sur le développement des inhibiteurs chez Les hémophiles A au Maroc, étudions sa prévalence et discutons le suivie de certains patients.

MATERIELS ET METHODES

1. CONTEXTE

Le Centre Hospitalier Ibn Sina (CHIS) de Rabat est une structure constituée de 10 établissements hospitaliers de soins et d'hospitalisation. Son Laboratoire Central d'Hématologie traite les diverses demandes d'analyses dans les domaines de l'hématologie biologique provenant de ces différents hôpitaux. Le même laboratoire satisfait aussi des demandes externes.

Dans ce contexte, Il s'agit d'une étude rétrospective durant la période d'étude de 35 mois : Du 01/04/2014 au 01/03/2017. On a inclus tous les patients ayant bénéficié d'un dosage de facteur VIII avec mesure du taux d'inhibition et dosage des anti facteurs VIII. On a fait une étude de la cinétique des Anticorps chez les patients suivis au CHU avec des bilans avant et après traitement substitutif .la méthode de référence utilisée au laboratoire est celle de Bethésda-Nijmegen

2. INTERROGATOIRE

La fiche des patients contient les informations suivantes :

- Les caractéristiques épidémiologiques : nom, âge, poids.

- 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 effectués : TP, TCA, fibrinogène, dosage des FVIII, dosage des inhibiteurs et le pourcentage d'inhibition.

3. PRE-ANALYTIQUE

Le prélèvement sanguin est effectué par ponction veineuse franche dans des tubes sous vide contenant du citrate trisodique (0,109M) comme anticoagulant. Le mélange sang/anticoagulant (9V/1V) est assuré

immédiatement par retournements successifs et lents, pour éviter tout début de coagulation. Le délai entre le prélèvement et le traitement des échantillons doit être le plus court possible, environ 2 heures [2].

Le prélèvement subit deux centrifugations successives à 2500g pendant15min puis il est congelé à -80°C.

NB : Les échantillons congelés doivent être incubés, avant tout test, dans le bain marie pendant 10 minutes à 37°C et laisser pendant 10 min à température ambiante.

4. 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. Tous ces tests sont réalisés en utilisant la méthode optique: Sysmex CS-5100/ Siemens.

4.1 Tests de diagnostic de l'hémophilie :

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[3].

4.1.1 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, célite, citrate) et de chlorure de calcium. 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 rapport TCA malade/TCA témoin ; on admet comme normal, des valeurs inférieures ou égales à 1,2 chez l'adulte[4].

Des valeurs relatives à l'âge de l'enfant ont été rapportées.

NB: L'activation de la coagulation, liée à une ponction traumatique et/ou au maintien prolongé du garrot, conduit à une consommation des facteurs de coagulation et à un temps faussement allongement du TCA, notamment chez l'enfant.

4.1.2 Dosage spécifique des facteurs anti-hémophiliques :

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. Les résultats sont exprimés en pourcentage.

4.2. Protocole de dépistage et titrage des inhibiteurs anti FVIII pratiquée au laboratoire d'Hématologie centrale d'Avicenne Rabat :

4.2.1 Détection de l'effet inhibiteur :

Echantillons plasmatiques :

Après double centrifugation des prélèvements citratés à 2500g pendant 15mn, aliquoter dans 5 tubes eppendorff, 250µl de plasma pauvre en plaquettes par chaque eppendorff.

Réalisation de : TCA, TP, Fib, NFS et indice de Rosner (IR)

IR : TCA (P+T) – TCA (T) / TCA (P)

Indice de Rosner <12 : absence d'effet inhibiteur

12-15 : état douteux

> 15 : présence d'effet inhibiteur.

Réalisation des dosages des facteurs VIII (si urgence). (Figure 1)

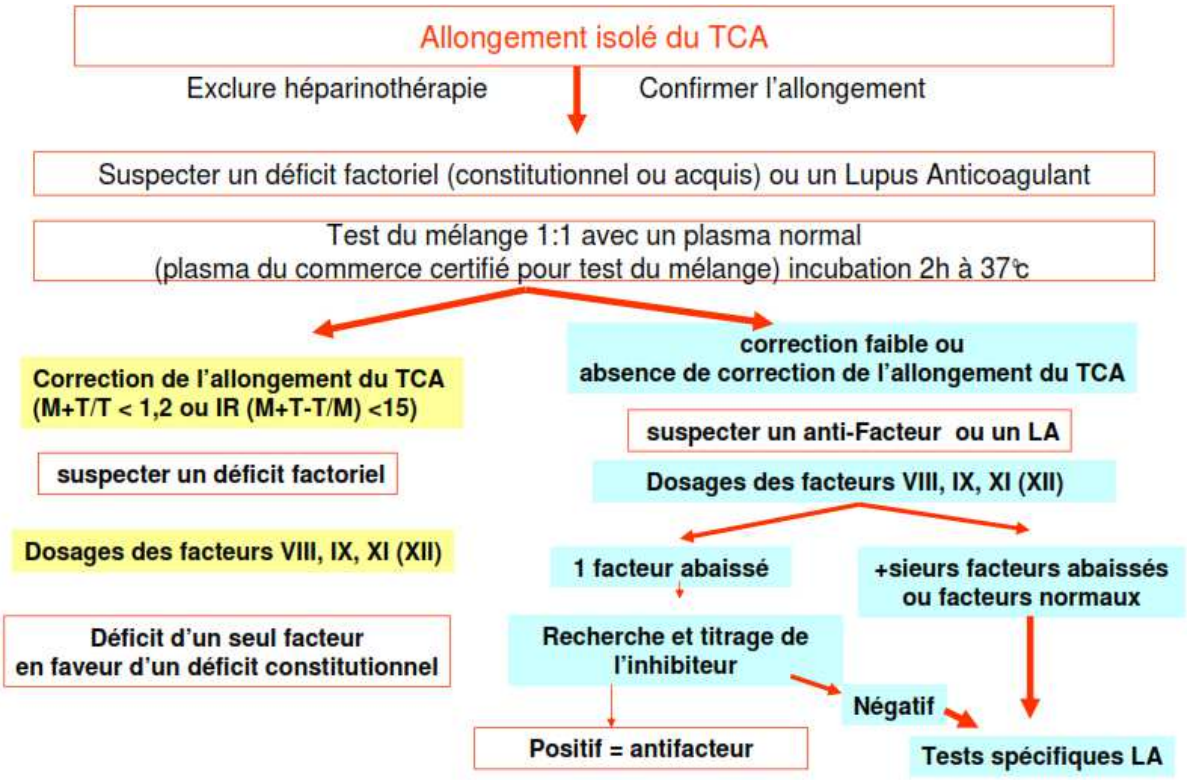


Figure 1: arbre décisionnelle lors d'un allongement de TCA[5]

Si les dosages sont différés, réaliser une congélation immédiate des échantillons à -80°C.

4.2.2-Dépistage et Titrage des inhibiteurs : quelle méthode d'analyse ?

Les inhibiteurs anti-FVIII neutralisent l'activité coagulante du FVIII selon une cinétique qui est fonction de la température et du temps [6, 7].

La plupart des inhibiteurs anti-FVIII de l'hémophile ont une cinétique de type 1 caractérisée par une inhibition linéaire, rapide et complète du FVIII avec un maximum d'inactivation atteint en 2 heures environ. Plus rarement, la cinétique est de type 2 avec une première phase de neutralisation rapide suivie d'une deuxième phase d'inactivation plus lente avec neutralisation incomplète du FVIII [7, 8].

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 (" 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). Le FVIII résiduel dans le mélange test est exprimé en % du taux mesuré dans le mélange contrôle [7, 9].

- Dans la méthode de Bethesda, 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). Pour être interprétable, le taux de FVIII résiduel dans le mélange test doit être compris entre 25% et 75% ce qui, en

dehors de ces fourchettes, nécessite des ajustements par dilution du plasma du malade.

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 [7, 10].

Si le plasma testé contient du FVIII (hémophile traité ou hémophile non sévère), il doit être chauffé 30 min à 56°C afin de détruire le FVIII circulant et de dissocier d'éventuels complexes antigène-anticorps[7, 11].

La comparaison historique des 2 méthodes demandée par l'ISTH a établi une relation de 1 unité Oxford pour 1,21 unité Bethesda [7, 12]. La méthode de Bethesda a dès lors été considérée comme la méthode de référence.

La méthode de Bethesda présentait toutefois deux écueils identifiés en 1995 par un groupe hollandais et susceptibles d'expliquer la fréquence élevée d'inhibiteurs de titre faible sans corrélation clinique constatée par les utilisateurs:

- Une élévation du pH dans le mélange plasmatique durant les 2 heures d'incubation avec comme conséquence une dégradation du FVIII,

- Une différence de concentration protéique entre le mélange " test " plasmatique et le mélange " contrôle " comportant 1 vol de tampon pour 1 vol de plasma.

La variante Nijmegen [7, 13] comprend donc deux modifications par rapport à la méthode Bethesda.

- Un tamponnement par l'imidazole du plasma normal utilisé comme source de FVIII dans le mélange " test " ou " contrôle ",

- Le recours à un plasma déplété en FVIII dans le mélange " contrôle " en remplacement du tampon imidazole.

La comparaison des deux méthodes (Bethesda/Nijmegen) faite en 1995, puis plus tard lors d'une large étude canadienne [7, 14], montre que des titres faibles d'inhibiteurs, dépistés par la méthode Bethesda (0.5-0.9 UB) et sans expression clinique apparente, ne sont pas détectés par la méthode Nijmegen. Cette dernière a dès lors été proposée comme la méthode de référence par l'ISTH en 1996. Des différences d'interprétation des titres d'inhibiteur ont cependant été mises en évidence avec la méthode Nijmegen selon la nature du plasma déplété en FVIII et en relation avec la présence ou non dans ce dernier de facteur Willebrand (VWF) [7, 15]. L'absence de VWF induit une instabilité du FVIII:C influençant les titres mesurés d'où la proposition de remplacer le plasma déplété en FVIII par une solution d'albumine à 4%, avec l'avantage en outre d'un moindre coût [7, 16].

En réalité, dans la mesure où la plupart des laboratoires utilisent comme source de plasma normal un plasma de référence lyophilisé tamponné lors de sa reconstitution, on peut admettre que la stabilité du pH du mélange plasma normal/plasma malade est assurée, ce qui améliore notablement la performance de la méthode de détection [7, 17].

4.2.3-Le protocole de dépistage et de titrage tel pratiqué au laboratoire :

Première étape : dépistage des anti FVIII

- Pour chaque patient, mélanger dans deux tubes à bouchons et à volume égale, 200µl de plasma patient (P) et 200µl de plasma témoin (T) à 100% de FVIII : P+T. (c'est le mélange test)

- En parallèle, réaliser en deux tubes à bouchons, un mélange de 200µl de plasma témoin et 200µl de plasma déficient FVIII : T1/2. (c'est le mélange contrôle)
- Incuber les mélanges 2heures à 37°C.
- Réaliser les dosages des activités FVIII sur les plasmas natifs, les mélanges P+T et sur T1/2.
- Interprétation des résultats : un dépistage des inhibiteurs est positif s'il y a un taux d'inhibition de 25% d'activité de FVIII du plasma témoin. C.-à-d. quand le FVIII résiduel « corrigé » (= taux FVIII mesuré dans le mélange test divisé par le taux FVIII mesuré dans le mélange contrôle) multiplié par 100, est inférieur à 75%[5]

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

Deuxième étape : titrage des anti FVIII

1 Unité Bethesda correspond à la quantité d'anticorps neutralisant 50% de facteur VIII dans un plasma en contenant 100%[18]

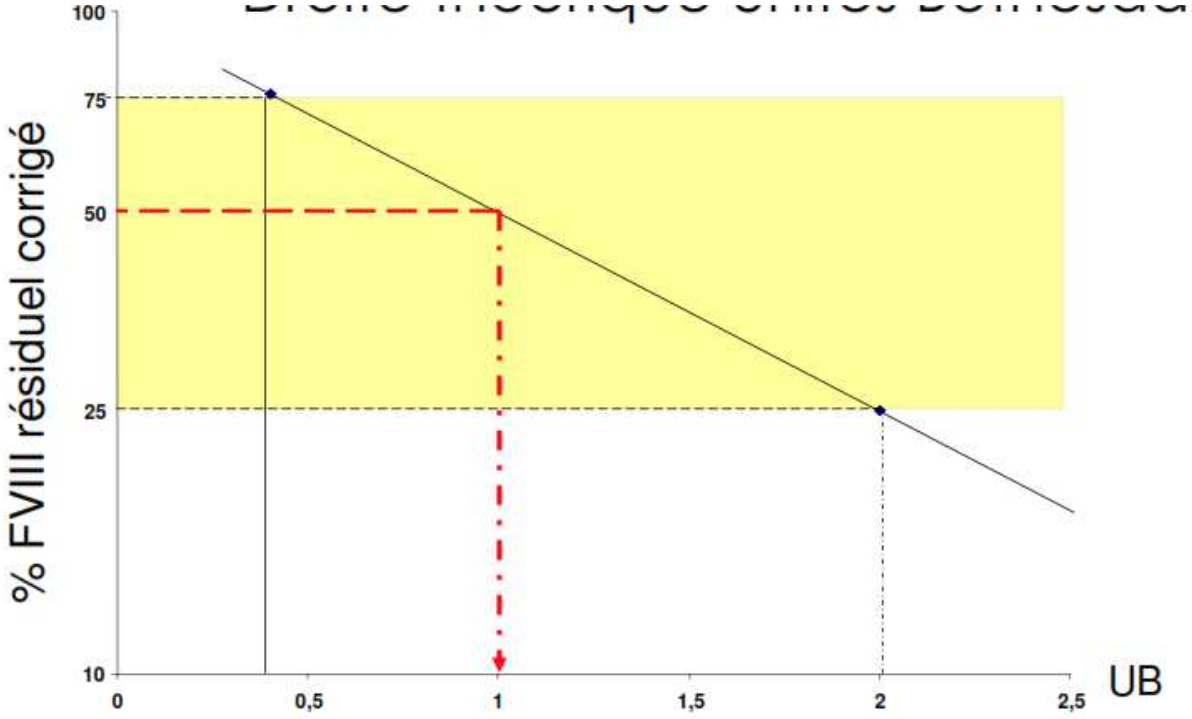


Figure 2: Droite théorique de l'unité Bethesda[5].

Lorsque le FVIII résiduel corrigé est < 75% le plasma à tester est dilué en tampon imidazole au 1/2, ¼, 1/8, 1/10 etc…

- Des mélanges volume à volume [référence 100% + dilution] sont incubés à 37°C 2 heures et les dosages de FVIII effectués sur les différents mélanges

-Le titre de l'anticorps correspond à l'inverse de la dilution du plasma dans lequel le FVIII résiduel corrigé = 50%[5]

Sur le plan pratique à notre laboratoire, on procède comme suit :

➢ ***Réactifs :***

- Plasma étalon 100% FVIII.
- Diluant : tampon Ph7, 35
- Plasma déficient FVIII.

➢ ***Protocole :***

- Mélanges tests: 200µl plasma étalon + 200µl plasma patient à différentes dilutions : pur, au 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 (P+T).
- >>>> Dilution du plasma patient est faite par le tampon pH7,35.
- Mélange témoin : 200µl plasma étalon + 200µl plasma déficient FVIII (T1/2).
- >>> NB : Le tampon peut être utilisé à la place du plasma déficient.
- Laisser incuber les mélanges 2H à 37°C.
- Dosage du FVIII des mélanges :
- FVIII des mélanges tests (P+T : patient à différentes dilutions + étalon) sont notés R2.
- FVIII du mélange T1/2 est noté R1.
- Taux FVIII résiduel: R2x100/R1.
- Choisir la dilution qui donne un taux FVIII résiduel voisin de 50%.
- Lire le nombre d'unité Bethesda/ml sur la courbe théorique d'étalonnage sachant que 50% de FVIII résiduel correspond à 1UB/ml.

Exemple : Titrage de l'anti FVIII :

- Mélange T1/2 : FVIII 40% R1.
- Mélanges tests R2 R2x100/R1
- Étalon + patient pur : FVIII 3%
- Étalon + patient au ½: FVIII 4%
- Étalon + patient au ¼ : FVIII 6%
- Étalon + patient au 1/8: FVIII 8% 27%
- Étalon + patient au 1/16: FVIII 12% 40%
- Étalon + patient au 1/32: FVIII 19% 63%

- Dilutions qui encadrent les 50% sont 1/16 et 1/32 :

- 1/16 >>> 40% de FVIII résiduel correspondant à 1,3x16: 20,8 UB/ml

- 1/32 >>> 63% de FVIII résiduel correspondant à 0,6x32 : 19,2 UB/ml

- Moyenne : 20UB/ml (Figure 3)

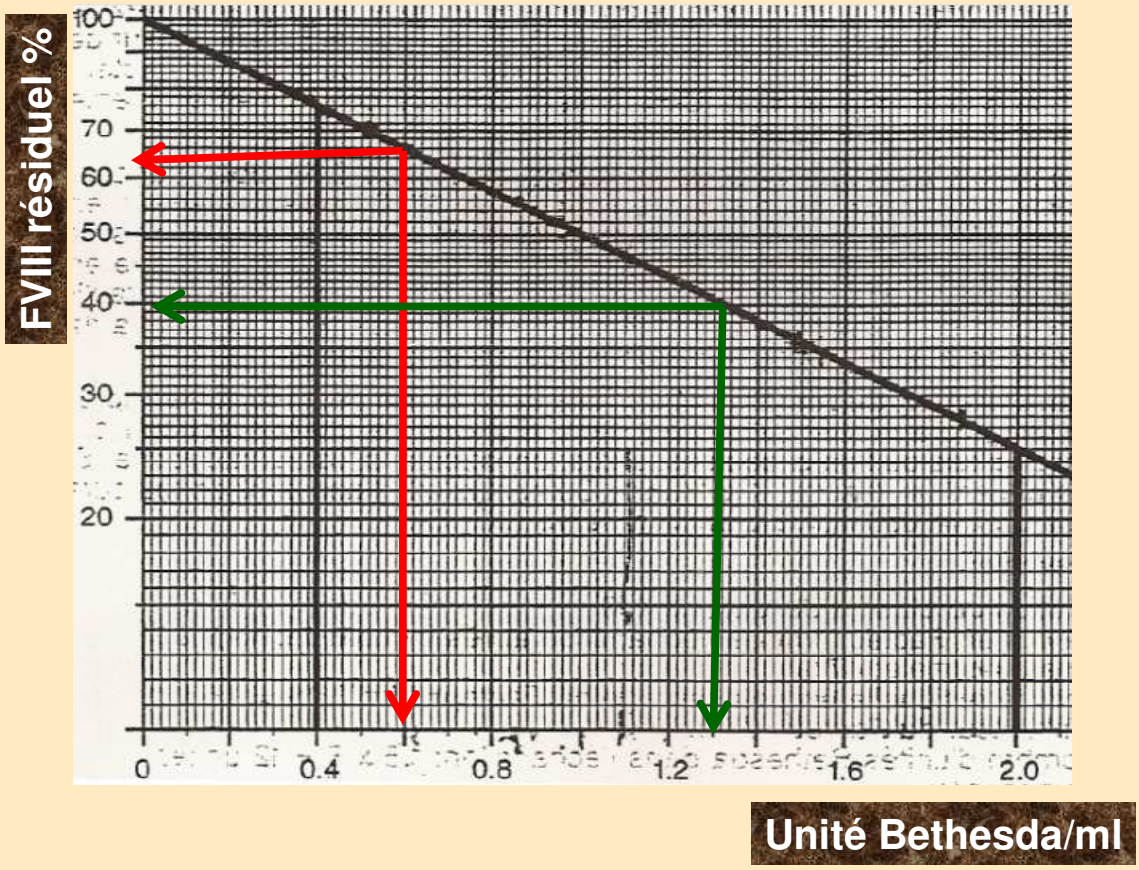


Figure 3: Droite théorique de l'unité Bethesda en mettant le point sur des dilutions qui encadrent 50%.

RESULTATS

1. REPARTITION DES PATIENTS SELON LES TRANCHES D'AGE :

L'étude a portée sur 73 hémophiles type A d'une tranche d'âge située entre 5 ans et 32 ans (âge moyen est entre 11 et 15 ans), répartis comme suit : (figure 4)

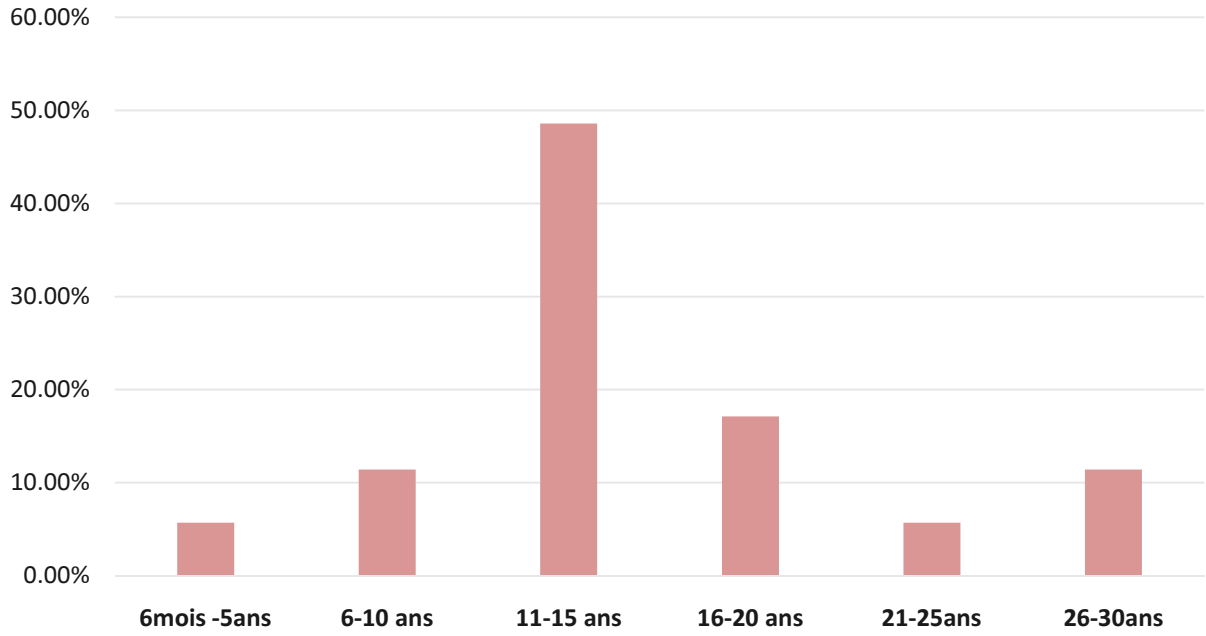


Figure 4 : Représentation de différentes tranches d'âge des patients.

Cependant les hémophiles révélés inhibiteurs positifs étaient répartis comme suit : (tableau 1 et figure 5)

Tableau I: Répartition des inhibiteurs positifs selon les différentes tranches d'âge.

5 mois à 5 ans	6 -10 ans	11- 15 ans	16-20 ans	>20 ans
0	3	11	11	3

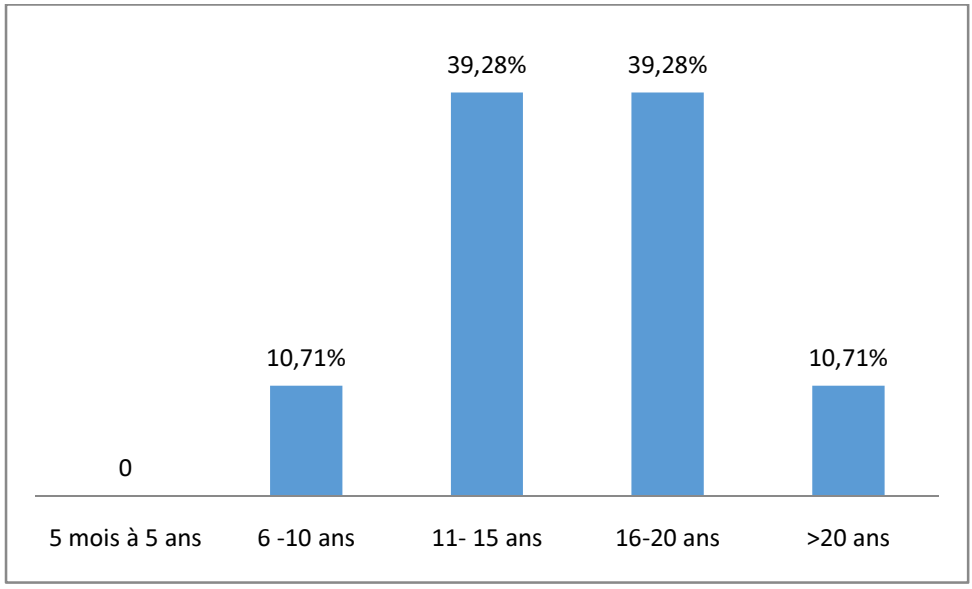


Figure 5: Représentation des différents âges des hémophiles inhibiteurs positifs.

2. REPARTITION SELON LA PRESENCE OU L'ABSENCE D'INHIBITEURS : RESULTAT DU DEPISTAGE

Parmi les 73 patients hémophiles A recueillis au service d'hématologie, 28 patients se sont dépistés inhibiteurs positifs, tant que 45 patients se sont dépistés négatifs. (Figure 6)

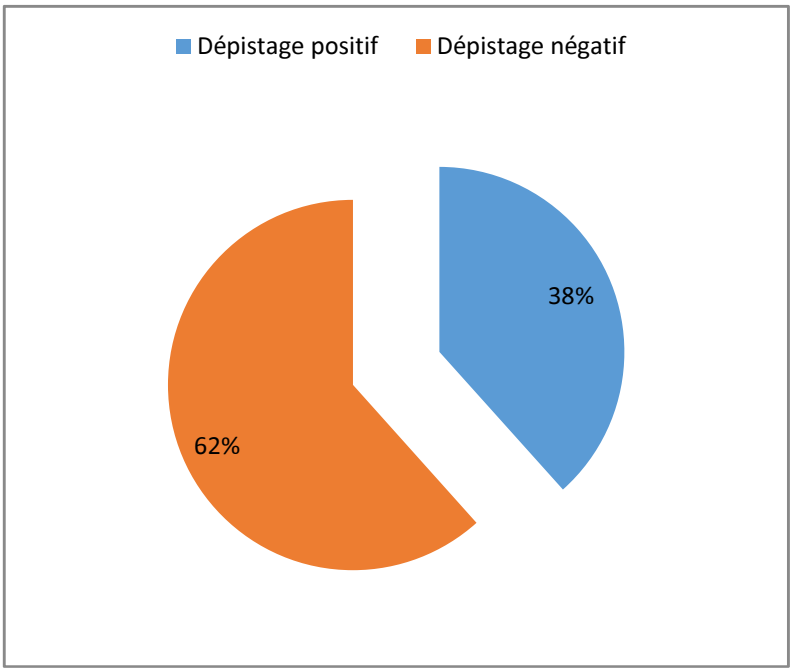


Figure 6:Résultat du dépistage des inhibiteurs chez les hémophiles A (série de 73 hémophiles)

3. REPARTITION SELON LE DEGRE DE SEVERITE DE L'HEMOPHILIE :

Au cours de cette période parmi tous les dosages du facteur VIII qui ont été adressés au service d'hématologie biologique un total de 73 patients a été recensé, et selon leur taux résiduel en FVIIIa on constate la répartition suivante :

Tableau II: répartition de 73 patients selon leurs taux résiduel en FVIIIa

Hémophilie A sévère FVIII< 1%	Hémophilie A non sévère FVIII>1%
46	22

Donc après ce résultat, le pourcentage du degré de sévérité est réparti comme suit (figure 7)

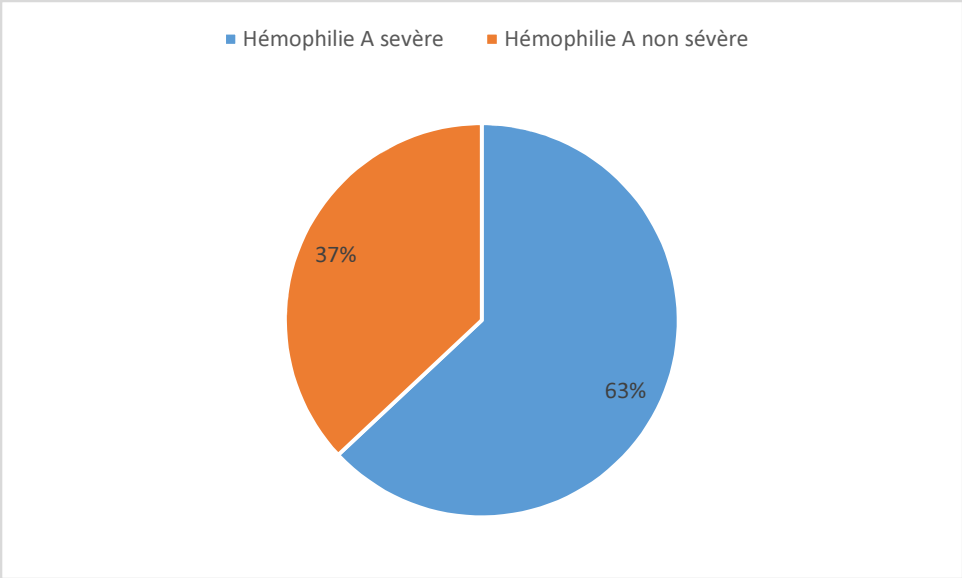


Figure 7: répartition de 73 hémophiles A selon leur degré de sévérité

Sur 46 hémophiles sévères, on a 26 hémophiles qui ont développé des anticorps anti-FVIII (figure 8)

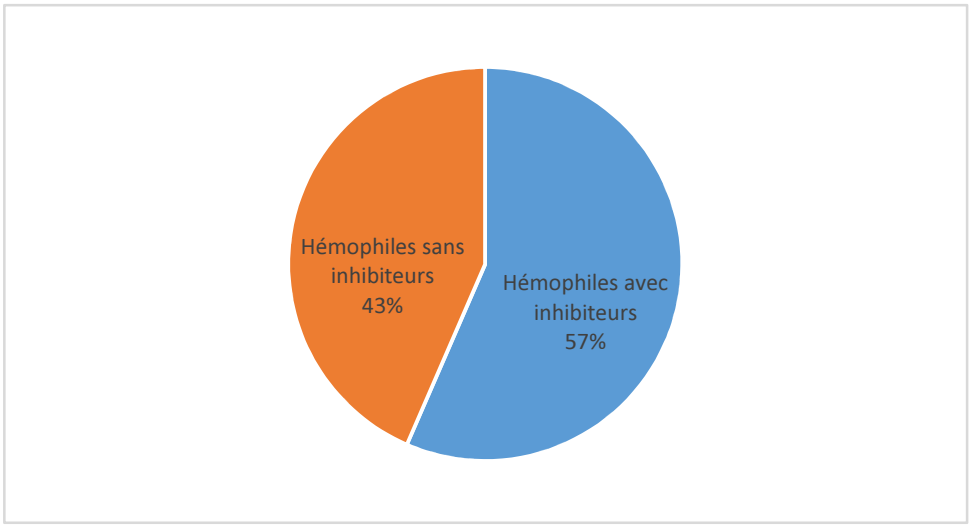


Figure 8: répartition de 46 hémophiles sévère selon leur développement d'inhibiteurs

Chez les inhibiteurs positifs, on révèle la présence dans notre série deux types d'hémophile en fonction du taux résiduel en FVIIIa : 26 hémophile A sévères et 1 hémophile A modérés, et aucun cas d'hémophile A mineur (figure 9)

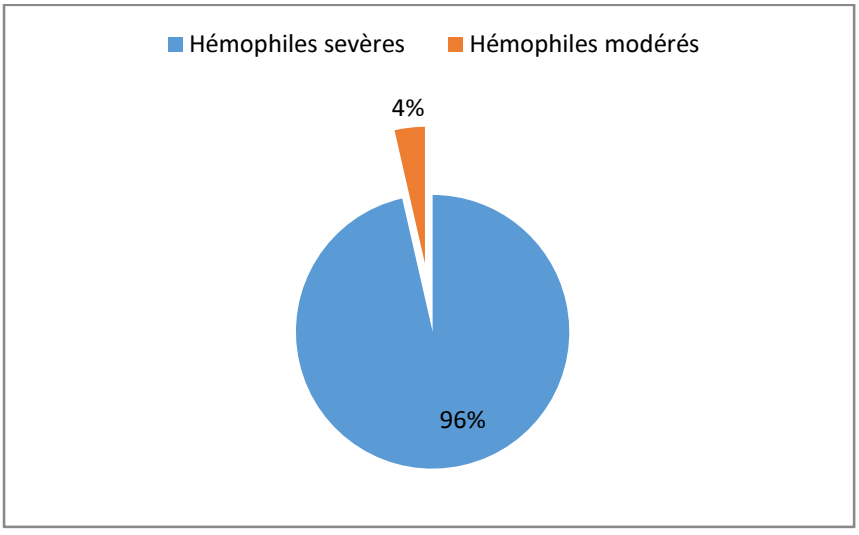


Figure 9: sévérité de l'hémophilie chez les inhibiteurs positifs

4. TAUX DES INHIBITEURS ET POURCENTAGE D'INHIBITION :

Le taux d'inhibiteurs était variable de 29,1 % à 99%. (figure 10)

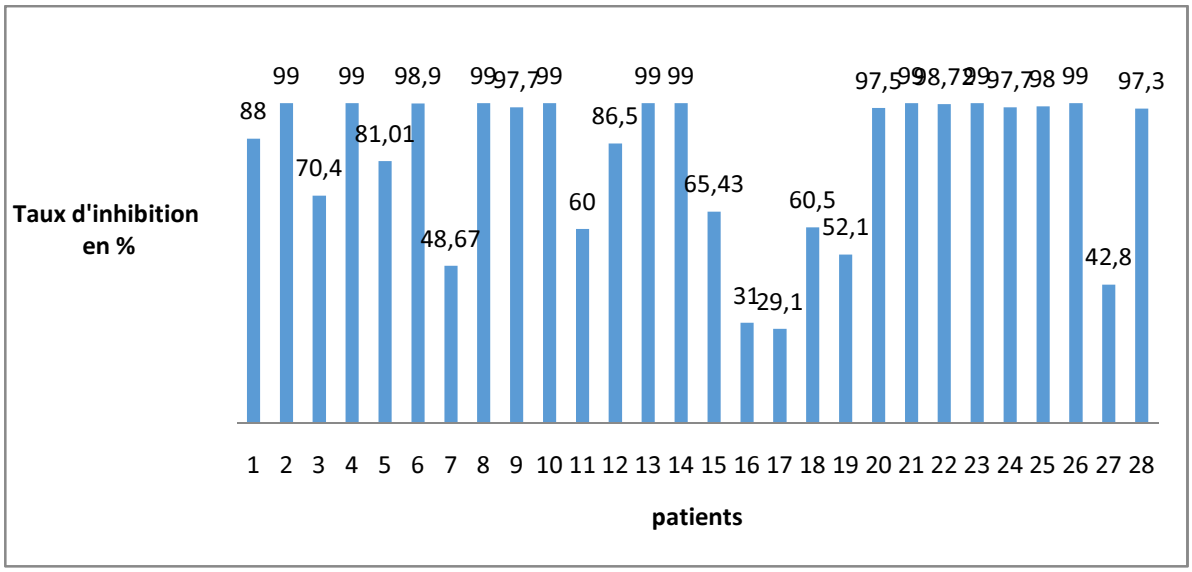


Figure 10: Représentation des taux d'inhibiteurs chez les patients inhibiteurs positifs en %.

Parmi ces patients inhibiteurs positifs, on a dépisté 9 cas d'inhibiteurs faibles répondeurs (<= 5UB/ml), et 17 cas d'inhibiteurs forts répondeurs (> 5 UB/ml), (figure 11)

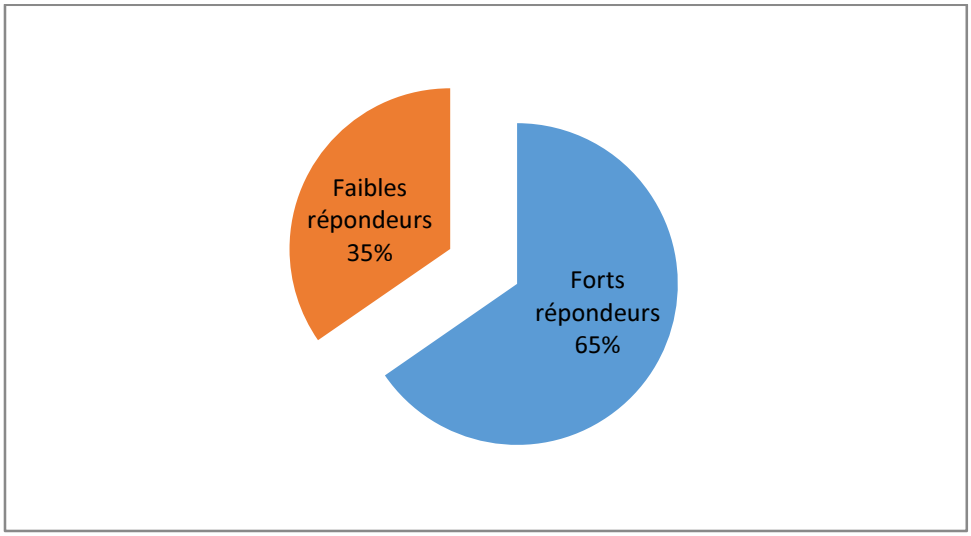


Figure 11: Répartition des inhibiteurs faibles et forts répondeur

L'étude de titrage des inhibiteurs nous mène à distinguer les différents taux d'inhibiteurs chez les deux catégories forts et faibles répondeurs : (figure 12 et 13)

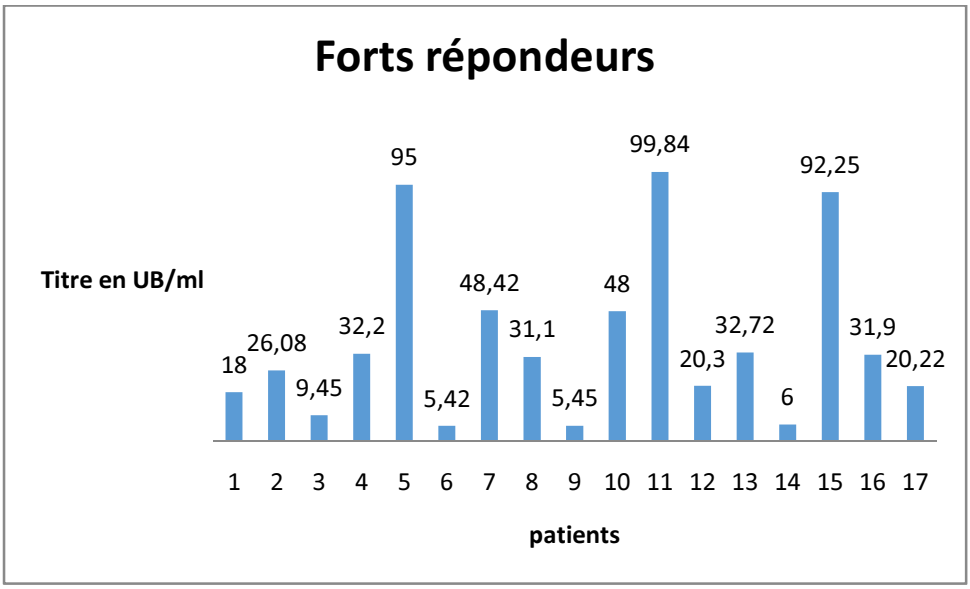


Figure 12: Taux d'inhibiteur en UB/ml chez les forts répondeurs

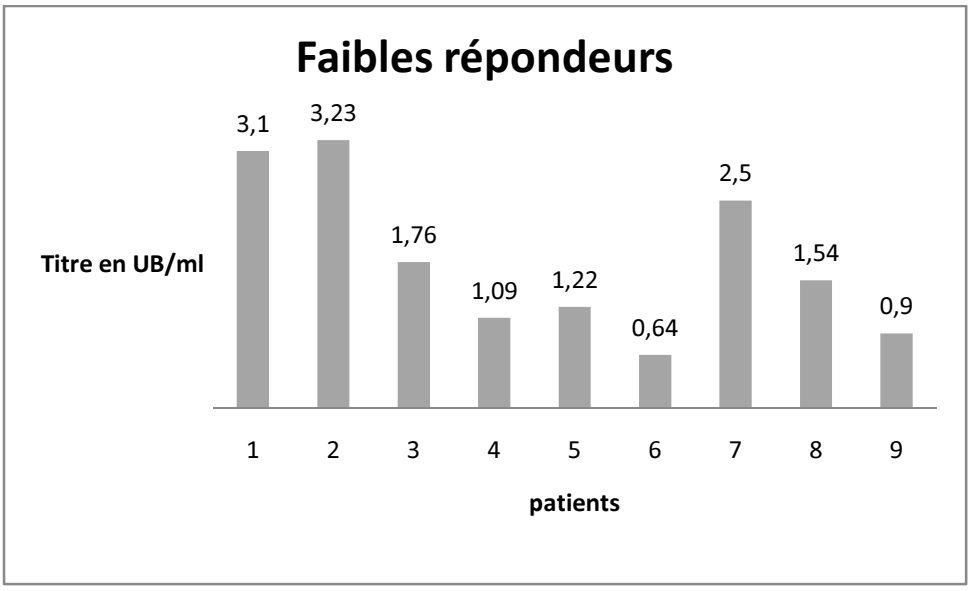


Figure 13: Taux d'inhibiteur en UB/ml chez les faibles répondeurs

En analysant les hémophiles A sévère, 17 patients sur 64 sont devenu des inhibiteurs fort répondeurs (figure 14)

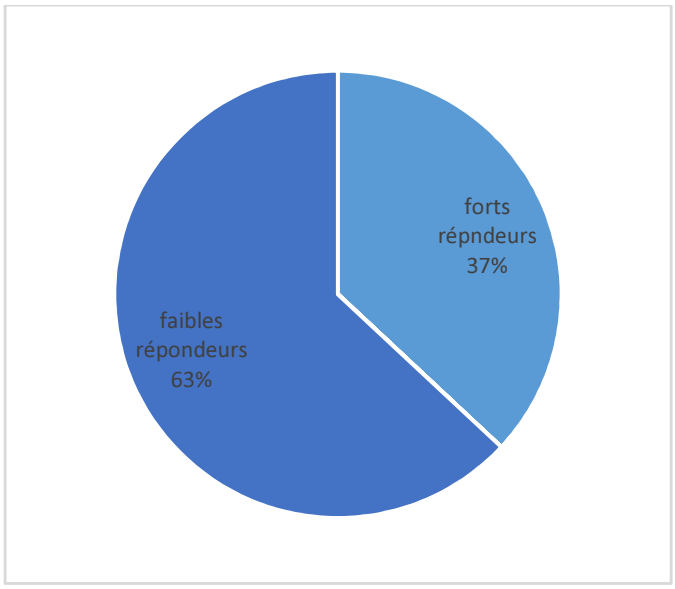


Figure 14: Répartition des forts et faibles répondeurs chez les hémophiles A sévères

5. CINETIQUE ET SUIVIE DES INHIBITEURS :

Du à la chronicité de la maladie et le recours permanant au dépistage des inhibiteurs, nous avons 14/28 patients inhibiteurs positifs ayant bénéficié de plus d'un dosage du facteur VIII et plus d'un titrage d'inhibiteurs, et ceci dans le but d'adapter leur traitement substitutif ultérieur (figure)

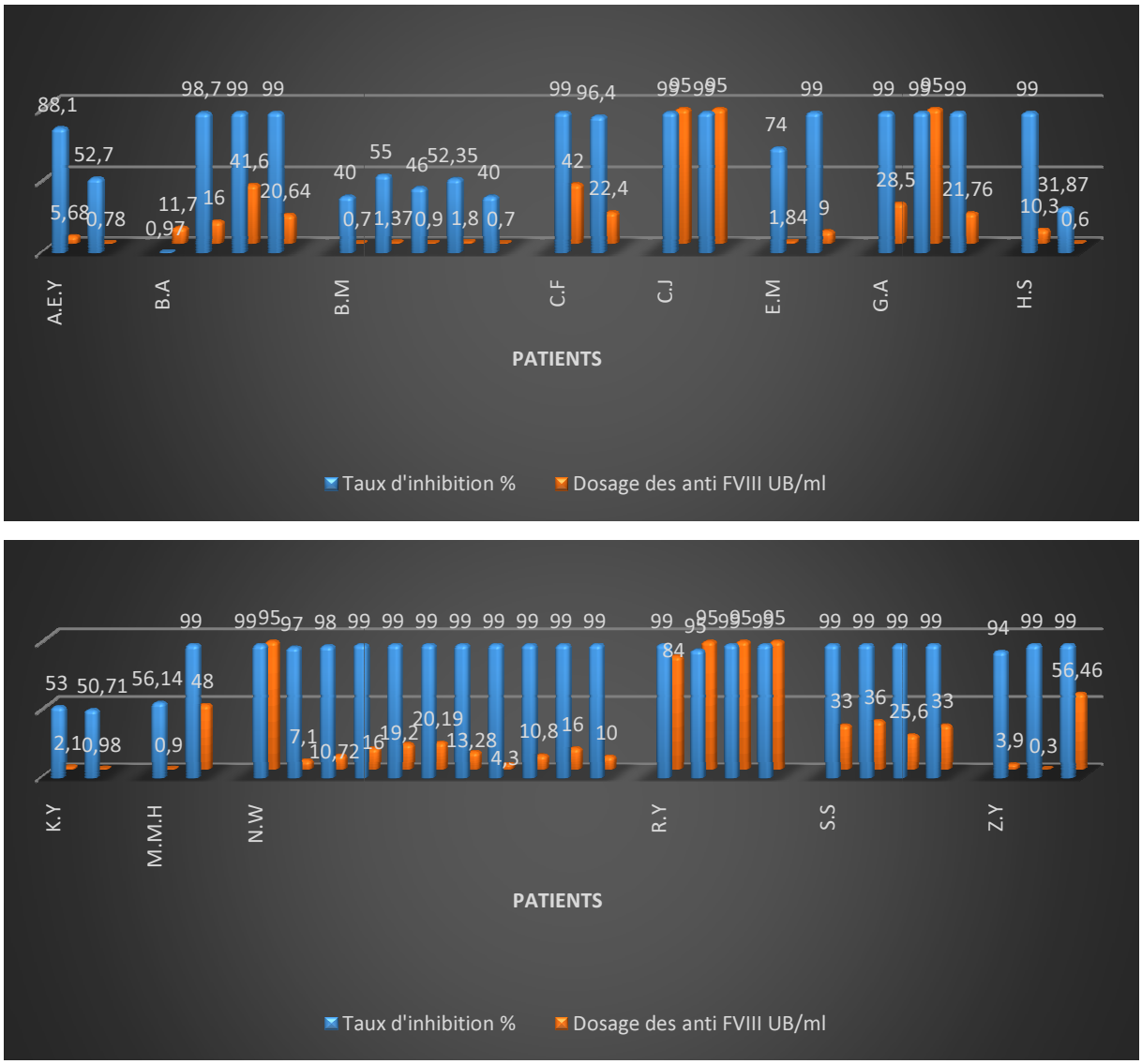


Figure 15: évolution de la cinétique de développement d'inhibiteur chez certains 14 hémophiles positifs

On peut distinguer 3 cinétiques d'évolution chez ces 14 patients en fonctions de leur titre en inhibiteurs :

- Patients fort répondeurs ayant un titrage en inhibiteurs toujours supérieur à 5 UB/ml, (figure 16) :

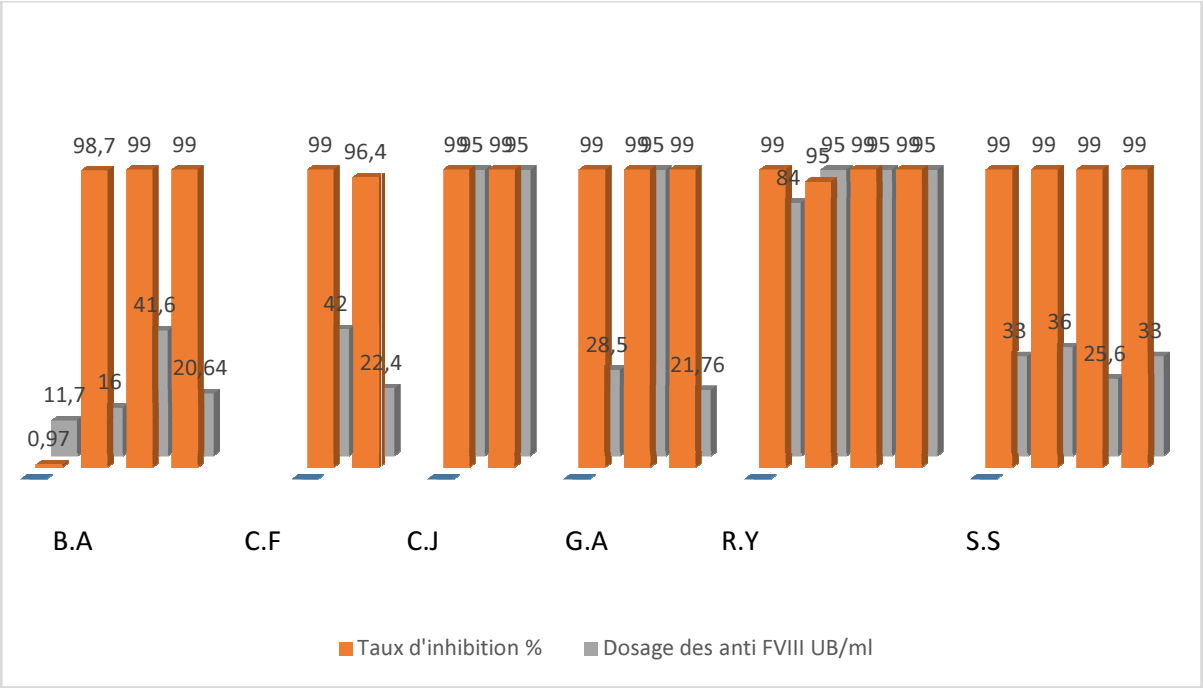


Figure 16: cinétique des patients forts répondeurs

- Patients faibles répondeurs ayant un titrage en inhibiteurs toujours inférieur à 5 UB/ml: (figure 17)

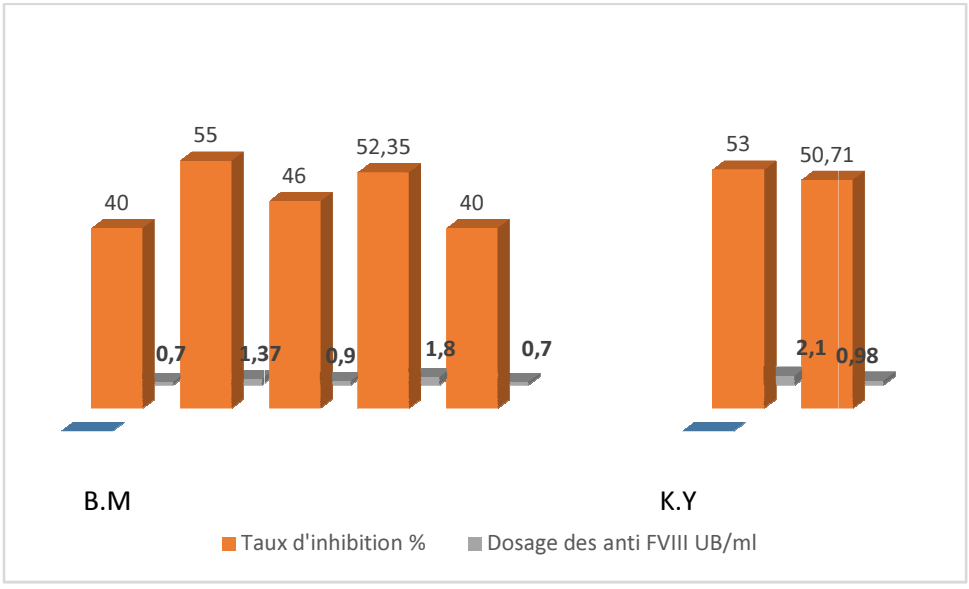


Figure 17: cinétique des patients forts répondeurs

-Patients ayant changé le titrage d'inhibiteurs de forts répondeurs en faibles répondeurs OU de faibles répondeurs en forts répondeurs : (figure 18)

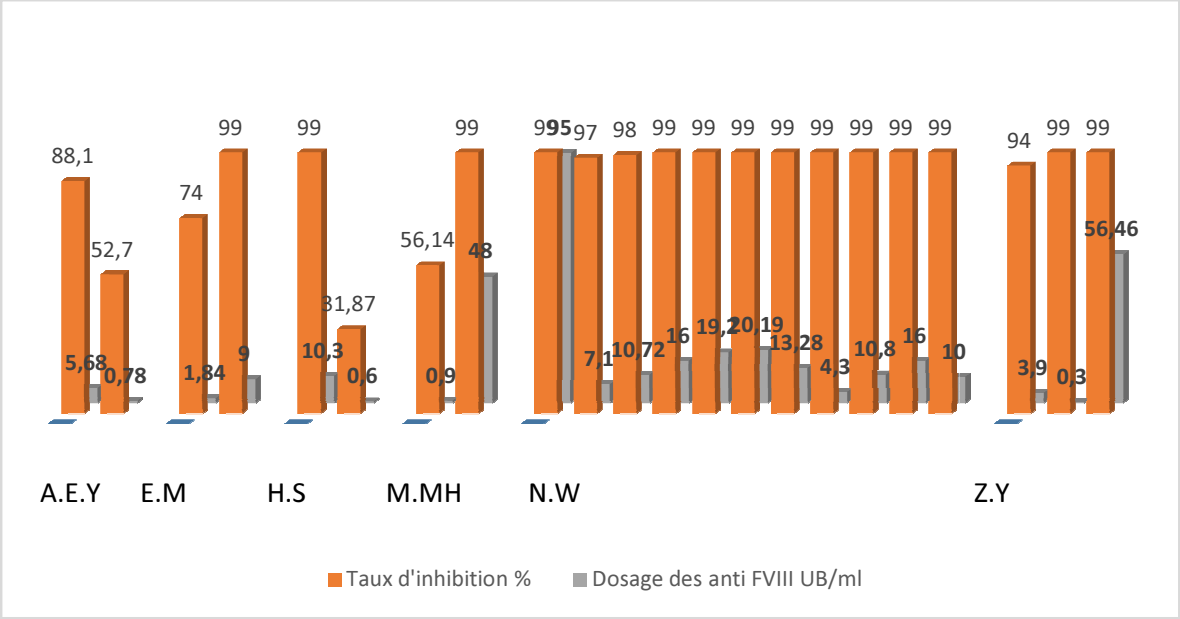


Figure 18: cinétique des patients ayant changé le titrage de leurs inhibiteurs

DISCUSSION

I-PHYSIOLOGIE DE LA COAGULATION [19]

La survenue d'une plaie vasculaire entraîne immédiatement une réaction de défense de l'organisme, visant à l'obturation de la brèche et le contrôle de l'hémorragie. L'hémostase comprend classiquement plusieurs étapes qui sont en fait étroitement intriquées [20]:

- l'hémostase primaire comportant deux temps : un temps vasculaire et un temps plaquettaire,
- la coagulation plasmatique aboutissant à la formation d'un caillot de fibrine insoluble,
- la fibrinolyse qui permet la dissolution du caillot de fibrine lorsque la plaie est cicatrisée.

1-Hémostase primaire

L'hémostase primaire met en œuvre une barrière hémostatique d'urgence par la constitution d'un clou plaquettaire ou thrombus blanc venant obstruer la brèche vasculaire. Au cours de cette étape quatre acteurs principaux qui interviennent : la paroi vasculaire, les plaquettes et deux protéines plasmatiques : le facteur Willebrand (FvW) et le fibrinogène. L'hémostase primaire peut être explorée globalement par le temps de saignement (TS).

1.1-Le temps vasculaire :

C'est l'étape initiale secondaire à la constitution de la brèche vasculaire, il en résulte une vasoconstriction réflexe réduisant le calibre vasculaire.

1.2-Le temps plaquettaire :

L'adhésion plaquettaire au sous-endothélium : s'effectue par l'intermédiaire du FvW, fixé sur son récepteur membranaire : la protéine GPIb. Ce phénomène est très rapide provoquant l'activation des plaquettes.

1.3-L'activation plaquettaire:

Les plaquettes activées changent de forme, se contractent et, par un mécanisme actif, expulsent les granules contenant des éléments ayant une action agrégeante: ADP, adrénaline, noradrénaline. Ces éléments vont provoquer l'activation d'autres plaquettes et l'agrégation plaquettaire. Un autre phénomène essentiel se déroule au cours de cette phase est le phénomène de « flip flop » membranaire permettant aux structures internes de la membrane de se repositionner vers l'extérieur en contact avec le plasma, cette modification permet la fixation des facteurs de la coagulation vitamine K-dépendants.

1.4-L'agrégation plaquettaire :

S'effectue en présence de calcium et sous l'influence des éléments sécrétés par les plaquettes lors de l'étape précédente. Les plaquettes s'agrègent entre elles par l'intermédiaire des molécules de fibrinogène qui se fixent sur un récepteur de la membrane plaquettaire la GPIIbllla. Cette étape devient rapidement irréversible sous l'action de la thrombine, générée par la coagulation plasmatique, elle-même déclenchée très rapidement après du vaisseau.

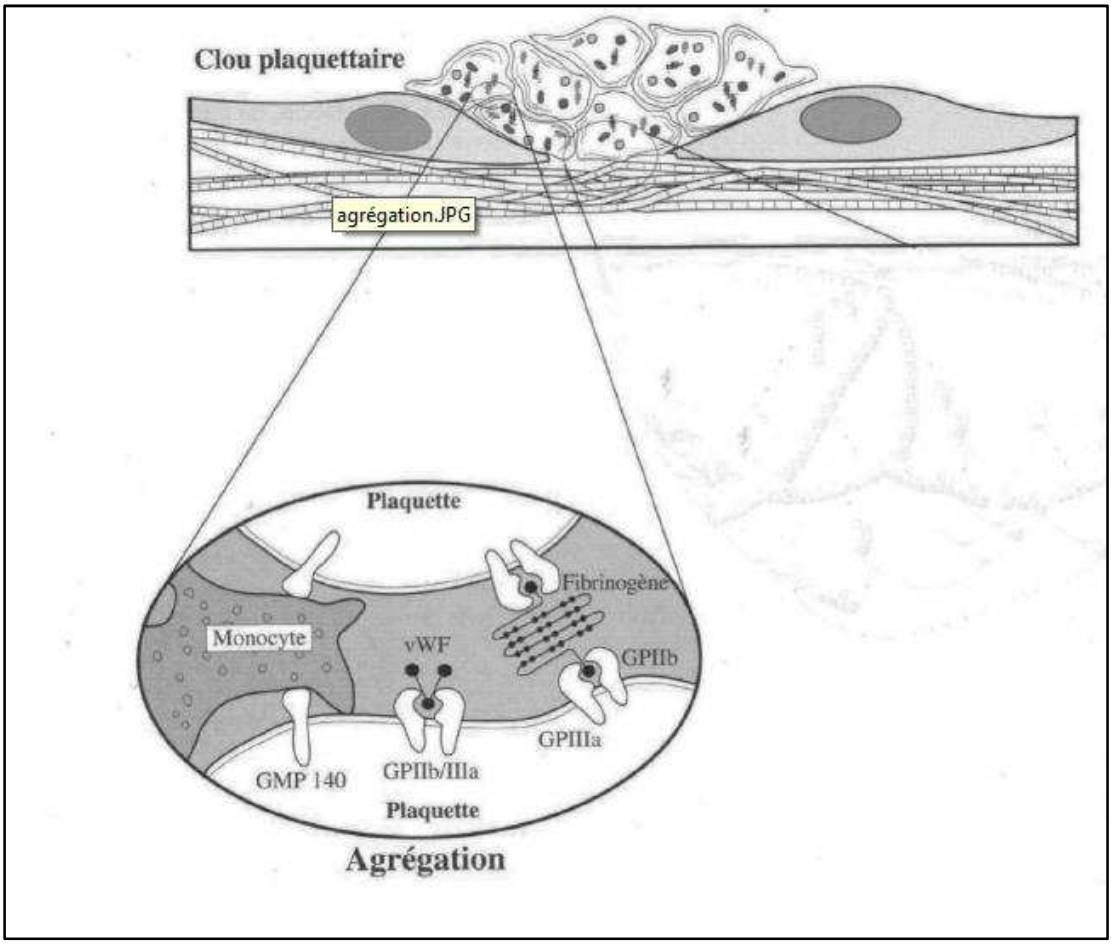


Figure 19: schéma montrant les différents intervenants dans l'agrégation

2-Hémostase secondaire : La coagulation [22, 23]

La coagulation qui vise à consolider le clou plaquettaire obtenu à la fin de l'hémostase primaire, a pour élément clé une enzyme, la thrombine (FIIa). La thrombine est l'enzyme qui clive le fibrinogène en fibrine. La fibrine se polymérise en créant réseau qui constitue la trame du caillot fibrinocruorique. Le processus de coagulation peut se décomposer en trois phases : une phase d'initiation, qui conduit à la génération de faibles traces de thrombine à la surface des cellules exprimant du facteur tissulaire (FT). Une phase d'amplification, qui aboutit à l'accumulation de facteurs activés à la surface des

plaquettes ; puis une phases de propagation comportant 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 [24, 25].

2.1-Phase d'initiation de la coagulation :

La coagulation est initiée par la liaison du facteur tissulaire et le FVII formant

le complexe [FT-FVII] [26]. Le FT est une glycoprotéine cellulaire qui s'exprime sur la surface de certaines cellules. Cette liaison génère le facteur VII activé (FVIIa). Le complexe [FT-FVIIa] peut activer le FIX et FX mais de façon insuffisante générant que des traces de thrombine qui ne suffit pas pour produire la fibrine nécessaire à la constitution du caillot, mais permet le déclenchement de la phase de propagation de la coagulation.

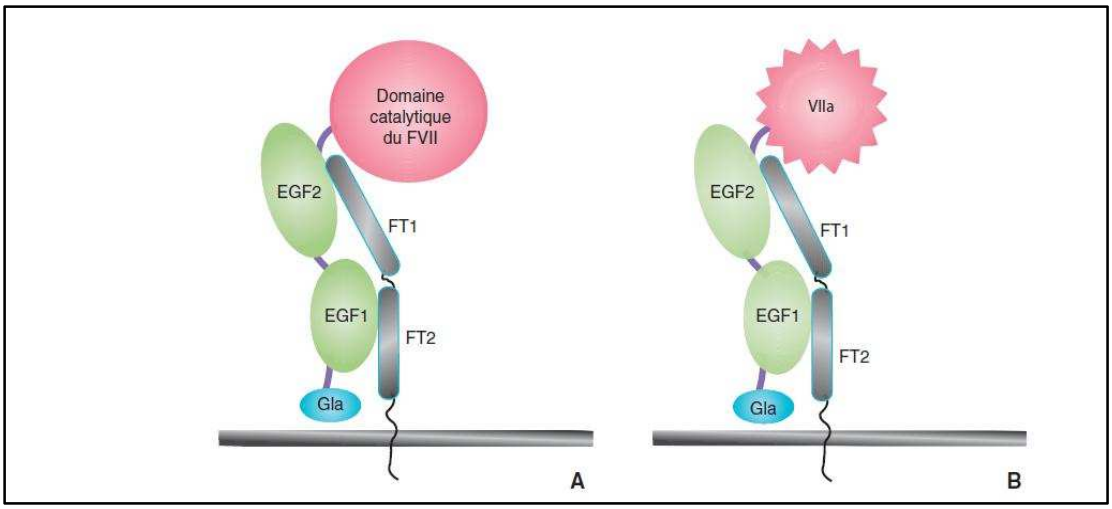


Figure 20: Phase d'initiation de la coagulation [23].

A : le facteur tissulaire (FT) est une protéine transmembranaire. La partie extracellulaire comporte deux sous-unités TF1 et TF2 qui interagissent avec le facteur VII (FVII). Le FVII est une pro-enzyme, comprenant un domaine Gla, deux sous-unités epidermal Growth Factor (EGF)-like puis un domaine catalytique.
B : l'interaction avec le FT induit une modification conformationnelle du FVII qui démasque son site catalytique, qui en résulte un complexe [FT-FVIIa] qui activera le FX.

2.2-Phase d'amplification de la coagulation :

L'activation du FVIII en FVIIIa se fait par la thrombine générée sur le site de coagulation et à moindre degré par le FXa. Le FVIIIa se sépare du vWF pour se lier aux phospholipides plaquettaires sur lesquels il est concentré. C'est donc sur la surface des plaquettes que se produit la phase d'amplification : le FIXa généré pendant la phase d'initiation est fixé de façon diffuse sur les plaquettes, où il se lie au FVIII a en présence de calcium. La liaison FIX-FVIII implique les domaines A2 et A3 du FVIIIa. Le complexe ainsi créé [FIXa-FVIIIa] s'appelle aussi tenase intrinsèque.

La thrombine a un autre impact, elle active le facteur V (FV) en facteur V activé (FVa) qui se fixe lui aussi sur la surface des plaquettes et qui forme avec le FXa un complexe [FXa-FVa] qui s'appelle complexe prothrombinase.

A la fin de cette phase se concentrent à la surface des plaquettes plusieurs facteurs activés dont le FXa, FIIa, FIXa, FVIIIa et le FVa.

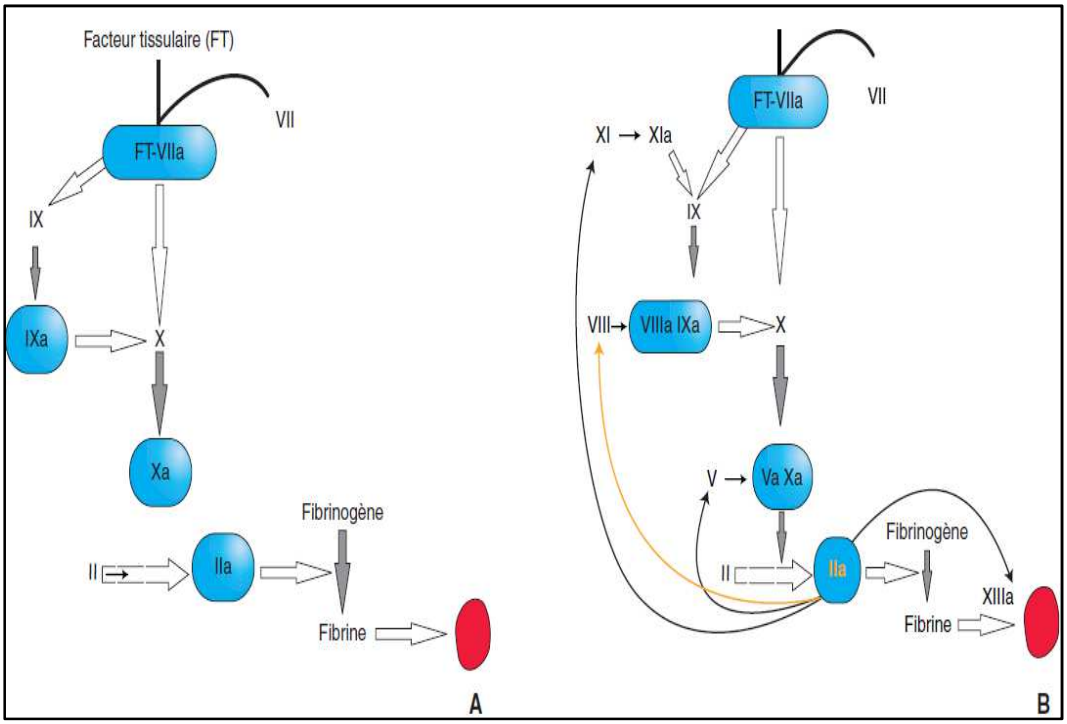


Figure 21: Phase d'amplification de la coagulation [23].

A : Le complexe [FT-FVIIa] peut activer le FX et le FIX. Le FIXa active lui aussi le FX. Le FXa active la prothrombine (FII) en thrombine (FIIa) ; la thrombine génère les premières traces de fibrine, trame du caillot. Cette réaction se déroule à la surface des plaquettes.
B : La thrombine transforme FVIII en FVIIIa. Le complexe [FIXa-FVIIIa] ou tenase intrinsèque induit une activation importante du FX. En outre la thrombine active le FV en FVa et le FXI en FXIa. A la fin de cette phase se concentrent à la surface des plaquettes plusieurs facteurs activés dont le FXa, FIIa, FIXa, FVIIIa et le FVa.

2.3-Phase de propagation de la coagulation :

A la surface des plaquettes, le complexe tenase 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 en thrombine, mais après la phase d'amplification, la présence à la surface des plaquettes de concentrations élevées de facteurs activés permet la génération « explosive » de quantités importantes de thrombine qui aura de multiples effets ; activation en boucle du 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 de réseau de fibrine qui structure le caillot. Ce caillot est consolidé par l'action du FXIII, lui-même activé par la thrombine.

3-Inactivation de la coagulation et Fibrinolyse

3.1-Inactivation de la coagulation

Les inhibiteurs physiologiques de la coagulation sont indispensables pour assurer un équilibre des réactions de l'hémostase. Ils agissent en contrôlant les phénomènes d'activation de la coagulation. L'antithrombine III (ATIII) inhibe essentiellement le facteur Xa et la thrombine. La protéine C et la protéine S forment un complexe inhibant les facteurs Va et Vllla. La protéine C est activée par la thrombine, après que celle-ci soit fixée sur son récepteur endothélial : la thrombomoduline. Il existe également des inhibiteurs de la fibrinolyse, qui sont en fait des anti-activateurs (anti tPA, anti urokinase...)

3.2-La fibrinolyse :

La formation d'un caillot de qualité va permettre de stopper l'hémorragie et la cicatrisation de la plaie vasculaire. Cette cicatrisation terminée, le caillot, devenu inutile, va être dissout par un mécanisme faisant intervenir d'autres facteurs, ce mécanisme est la fibrinolyse.

Les facteurs intervenants dans cette étape sont : le plasminogène, l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA), les facteurs de la phase contact : surtout le facteur XIIa, et l'urokinase. Sous l'action des activateurs (tPA, facteur XII, urokinase), le plasminogène présent entre les mailles du caillot, est transformé en plasmine. Cette plasmine formée permet la lyse du caillot de

fibrine en fragments qui seront ensuite éliminés dans la circulation. Ces fragments sont les produits de dégradation de la fibrine (PDF).

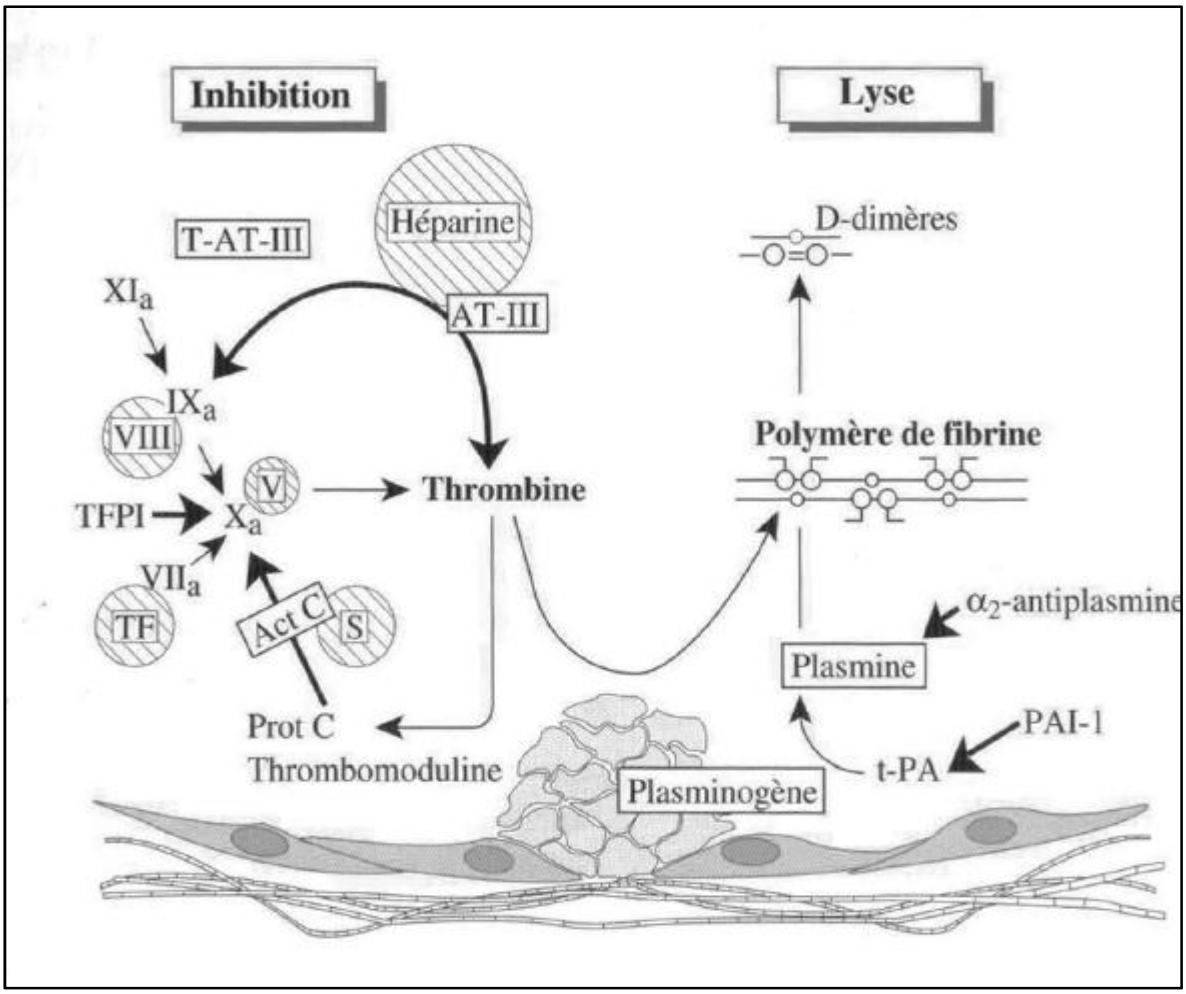


Figure 22: inhibiteurs de la coagulation et fibrinolyse [21].

II. LE FACTEUR VIII

Le FVIII, aussi appelé facteur antihémophilique A, est une protéine présente à l'état de trace dans le plasma humain. Son entité a été décrite dans le début des années 1980 après le clonage de son ADN complémentaire (ADNc) et purification de la protéine.

1-Le gène du FVIII et son ARN messager [27]

Le gène du FVIII, appelé *F8* ou *F8C*, est situé sur le bras long du chromosome X en position Xq28. Le gène *F8* a été cloné en 1984 [28]: il s'étend sur 186 kb, et comprends 26 exons de taille allant de 69 à 3106 paires de bases (bp), et 25 introns allant de 207 à 32400 bp. Représentant 0,1% du chromosome X, il est un des plus grands gènes du génome humain.

La transcription de ce gène produit à un ARN messager (ARNm) de 9 kb. L'ARNm du FVIII a été retrouvé dans plusieurs tissus : il est essentiellement synthétisé au niveau du foie, par les hépatocytes et les cellules sinusoïdales [29, 30], mais nous pouvons aussi le retrouver dans la rate, les reins, les lymphocytes ou même dans les cellules endothéliales vasculaires du poumon [31].

2- Structure du FVIII [32]

Le facteur VIII est une protéine de 2332 acides aminés [33], codée par un gène de 186 kb situé sur l'extrémité du bras long du chromosome X (Xq28) et comportant 26 exons et 25 introns et codant un acide ribonucléique messager (ARNm) de 9 kb 13 [28, 34]. Parmi ceux-ci, 24 exons font entre 69 et 262 paires de base, alors que l'exon 14 est composé de 3 106 paires de bases et que l'exon 26 en comporte 1 958. Cependant, une grande partie de l'exon 26 est dans l'extrémité 3', non transcrite, ce qui fait de l'exon 14 la plus grande séquence exonique qui code le domaine B de la molécule [23].

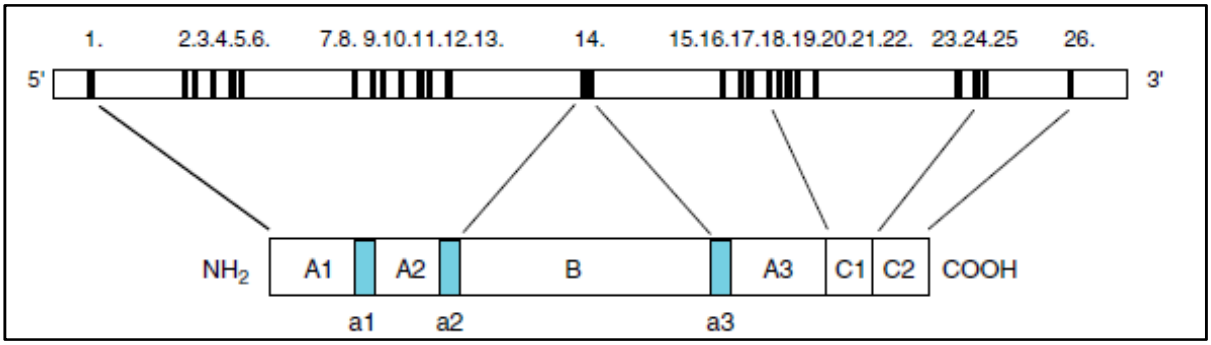


Figure 23 : Gène du facteur VIII (FVIII). [32]

Le facteur VIII est composé de plusieurs domaines contenant deux types de répétitions ; la première consiste en un module triplé, les domaines A (A1, A2 et A3).Une région acide a1 sépare les domaines A1 et A2. Une seconde région acide a2, relie A2 à un large domaine fortement glycosylé, le domaine B ; ceci conduit à une troisième région acide a3, qui connecte ce dernier au domaine A3.

La seconde répétition interne, une duplication, appelée domaine C (C1et C2), se trouve dans la partie C-terminale de la molécule. Au final, ces différentes régions sont assemblées dans l'ordre suivant : A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2. Le FVIII circule dans le plasma sous forme d'hétérodimères formés d'une chaine légère (a3-A3-C1-C2) de taille constante, et d'une chaine lourde de taille variable (A1-a1-A2-a2, avec différentes longueurs du domaine B). [33]

L'association entre les chaînes lourdes et légères est médiée par un cation divalent [23].

Il existe une grande homologie parmi les espèces pour les acides aminés des trois domaines A et des deux domaines C. Les trois domaines A, essentiels pour l'activité cofacteur, présentent une homologie avec ceux du facteur V de la

coagulation et de la céruloplasmine. Une grande partie du domaine B peut être délétée sans perte de l'activité [35, 36].

Le facteur VIII est produit essentiellement par les cellules endothéliales et les hépatocytes, mais les reins, la rate, le placenta et les ganglions lymphatiques peuvent également constituer des lieux de sécrétion.

Le FVIII est une coenzyme du FIXa, sans activité catalytique, son taux plasmatique est faible : 0,10 à 0,20 mg/l. [23]

3-Sécrétion du FVIII [27]

Comme la plupart des protéines extra cellulaires sécrétées, le FVIII va subir de nombreuses modifications post-traductionnelles.

Premièrement, dans le réticulum endoplasmique (RE), le peptide signal de 19 AA du FVIII est clivé (Figure 3). Le FVIII va aussi y subir des ajouts de N-glycosylations sur les résidus Arginine (Arg) : il existe plus de 20 sites de N-glycosylations dont seulement 5 sont situées en dehors du domaine B [37]. Ces glycosylations jouent un rôle dans la conformation intra cellulaire de la protéine et dans son cheminement dans la voie de sécrétion. D'abord elles constituent des sites d'ancrage pour des protéines de contrôle de qualité du repliement de la protéine du FVIII, telles que la calréticuline et la calnexine. La fraction de FVIII mal conformée se lie alors aux protéines de RE, appelées BiP, et est dégradée. Ensuite les glycosylations permettent la liaison à des protéines de transport intra cellulaires telles que la lectine mannose-binding protéine 1 (LMAN1) et la « multiple coagulation factor deficiency 2 » (MCFD2), qui agissent de concert pour le transport de la fraction de FVIII correctement conformée depuis le RE jusqu'à l'appareil de Golgi (AG).

Deuxièmement au niveau de l'AG, d'autres modifications post-traductionnelles sont observées avec notamment une modification des N-glycosylations et l'ajout de nombreuses O-glycosylations majoritairement sur le domaine B. Il existe aussi 6 sites de sulfatation des résidus Tyrosine (Tyr) dont voici les positions : 346 (domaine A1), 1664, 1680 (domaine A3) et 718,719 et 723 à l'extrémité C-terminale du domaine A2. Les tyrosines sulfatées, chargées négativement, ont une implication directe sur le taux d'activation du FVIII par la thrombine. Le polypeptide du FVIII subit aussi une protéolyse des liaisons covalentes entre sa chaine lourde et sa chaine légère, au niveau des Arg1313 et Arg1648, par une endoprotéase d'identité encore inconnue. La chaine lourde comporte les domaines A1-*a1*-A2-*a2*-B et mesure de 90 à 210 kDa approximativement en fonction de la taille du fragment de domaine B clivé par les protéases ; la chaine légère comporte les domaines *a3*-A3-C1-C2 pour une taille d'environ 80 kDa (Figure 3). Les chaines lourde et légère restent unies grâce à des liaisons ioniques divalentes (cuivre, calcium ou manganèse) non covalentes entre les domaines A1 et A3, formant ainsi un hétérodimère.

La fonction et la stabilité du FVIII dépendent des ions métalliques divalents, particulièrement les ions calcium (Ca2+) et les ions cuivre (Cu2+). Les ions Cu2+ de type I et les ions Cu de type II s'attachent de manière covalente au FVIII. Des expérimentations de mutagénèse dirigée et des expériences biophysiques suggèrent que les ions Cu2+ de type I se lient aux domaines A1 et A3, ce qui multiplierait l'affinité inter-chaîne par 100 [38] mais cet attachement aurait besoin d'un ion Ca2+ pour stabiliser la structure [39]. La position de cet ion Ca2+ n'est pas exactement connue mais deux sites de liaison pour les ions Ca2+ qui auraient deux affinités différentes [39] sont supposés : un de forte affinité au niveau d'une boucle des 8 résidus acides 110-126 du

domaine A1, et un de faible affinité dont la possible localisation a été récemment décrite par des études de cristallographie : un ion Ca2+ lierait le résidu Glu604 du domaine A1 avec le résidu Glu1908 du domaine A3 [40]. Les domaines A1 et A3 interagissent aussi via des interactions entre paires d'ions définies par certains de leurs résidus respectifs. En effet les résidus chargés des différents domaines se lient par des liaisons ioniques ou des liaisons hydrogènes. C'est ainsi que se lie le domaine A1 avec A2, et le domaine A2 avec A3. En revanche les domaines C ont peu de liaisons stabilisantes avec les domaines A.

Finalement, le FVIII est pauvrement sécrété dans le milieu extra cellulaire puisque sa concentration plasmatique chez l'humain est de 0,1 - 0,2 mg L-1.

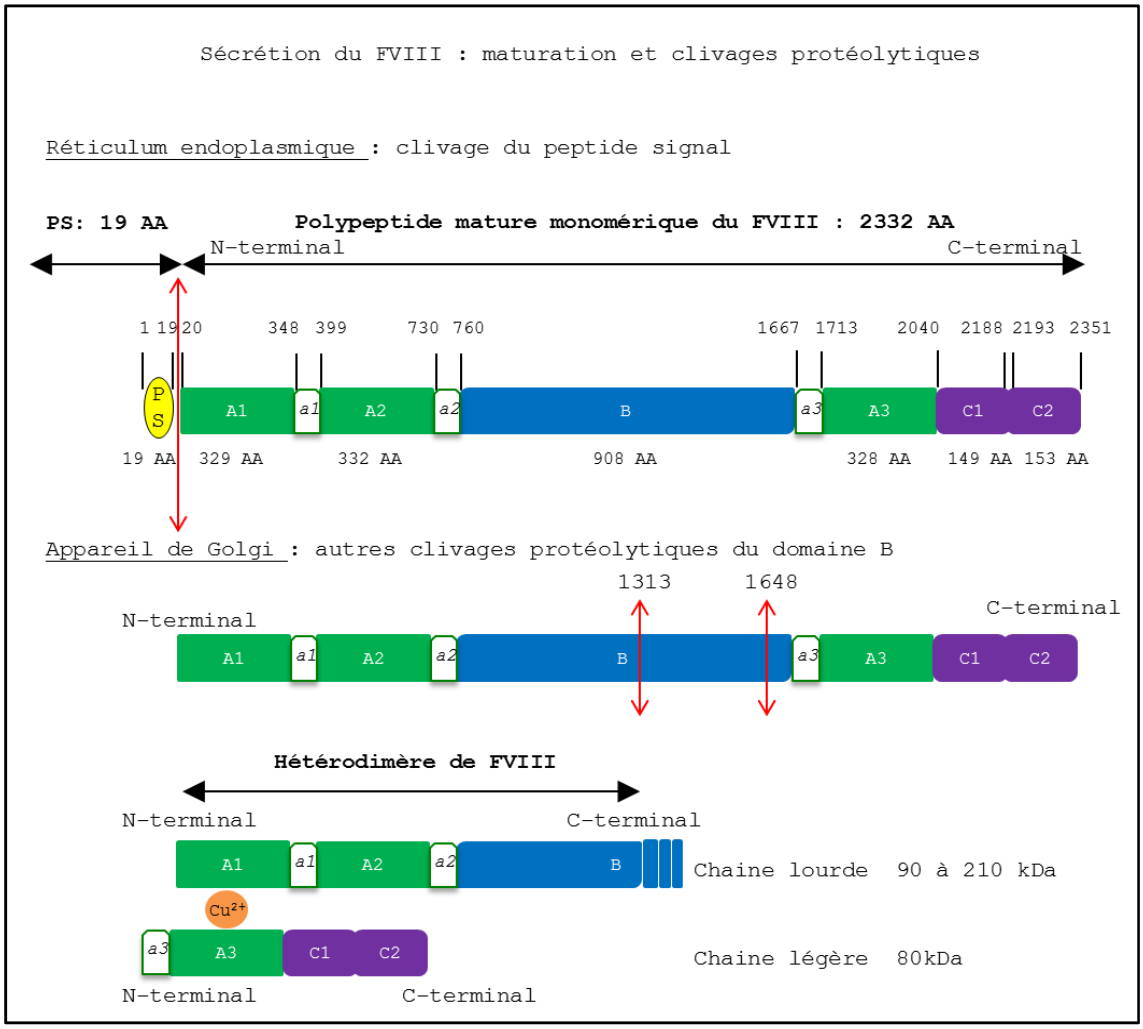


Figure 24: Schéma récapitulatif de la structure et des étapes de la maturation protéique du FVIII. Les glycosylations et les sulfatations des tyrosines ne sont pas représentées. [27]

4-Interaction du FVIII avec les autres composants de l'hémostase[27]

4.1-Interaction du FVIII avec son transporteur : Facteur Von Willebrand [27]

Une fois sécrété dans le plasma, 92 à 95% du FVIII se lie de façon non covalente au facteur Von Willebrand (vWF) et 5% de FVIII circule librement. Chaque monomère du multimère vWF peut lier une molécule de FVIII avec une

forte affinité (K<1 nM). *In vivo*, due à la faible concentration en FVIII dans le plasma, le ratio FVIII:vWF est de 1:50.

Deux régions de la chaine légère du FVIII agissent en synergie dans la liaison serrée au vWF [41, 42] (Figure 25) :

- Une à l'extrémité N-terminale de la chaine légère du FVIII, au niveau de la région acide *a3* : avec une très grande importance des résidus Arg1689 et Ser1690 et surtout du résidu Tyr1680 sulfaté,
- L'autre à l'extrémité C-terminale de la chaine légère du FVIII, où les 159 AA C-terminaux du FVIII sont importants pour la liaison au vWF, notamment entre les résidus 2303-2332 du domaine C2. Il semblerait que la présence du domaine C1 adjacent permette que cette liaison soit optimale, sans que le mécanisme exact ne soit connu.

La formation du complexe FVIII/vWF est cruciale pour maintenir des taux stables de FVIII dans le plasma et ce, grâce à plusieurs mécanismes :

- Le vWF module certaines interactions du FVIII avec d'autres effecteurs de la coagulation, notamment en prévenant la liaison prématurée entre le FVIII et les autres composants du complexe tenase intrinsèque :
- Le vWF prévient la liaison du FVIII au FIXa [43]. L'affinité du FVIII pour le vWF est 100 fois supérieure à celle du FVIII pour le FIXa mais le mécanisme d'inhibition exact de la liaison du FVIII au FIXa par le vWF n'est pas encore connu. Les deux molécules, vWF et FIXa, n'interagissant pas avec le même site de liaison de la chaine légère du FVIII, l'inhibition ne peut se faire par compétition mais probablement par encombrement stérique ou altération de la conformation du FVIII.

- Le vWF interfère avec la liaison du FVIII avec les surfaces phospholipidiques chargées négativement exposées à la surface des plaquettes activées [44].

Considérant que le vWF et les phospholpides (PLs) se lient au FVIII sur le domaine C2 au niveau de la région déterminée par les résidus 2303-2332, lorsque le FVIII est lié au vWF, il ne peut absolument pas se lier aux membranes lipidiques, et inversement

- Le vWF stabilise la structure hétérodimérique du FVIII [45] et protège de la dégradation protéolytique par les sérines protéases vitamine K dépendantes comme la protéine C activée [46] ou le FXa [47]. Ces derniers nécessitent en effet de pouvoir de s'assembler au FVIII sur des surfaces phospholipidiques membranaires pour une protéolyse efficace du FVIII.

- Le vWF empêche la capture du FVIII par les cellules [48, 49], limitant sa clairance.

En revanche le vWF ne protège pas le FVIII de la protéolyse par la thrombine ; cette dernière ayant une activité protéolytique indépendante des surfaces membranaires. Ainsi le clivage du FVIII par la thrombine provoque un détachement du FVIII et du vWF, associé à une conversion du FVIII dans sa forme active.

4.2-Interaction du FVIII au sein du complexe tenase intrinsèque [27]

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre «I.1. Physiologie de la coagulation », le FVIII activé par la thrombine se libère du vWF pour venir interagir comme cofacteur au sein du complexe tenase intrinsèque, associant FIXa, PLs membranaires des plaquettes activées et FX en présence de Ca2+.

Nous aborderons dans ce chapitre les interactions précises FVIII avec les acteurs de ce complexe (Figure 25).

Le FIXa se lie autant à la chaine légère qu'à la chaine lourde du FVIIIa :

•Les résidus 1811-1818 du domaine A3 constituent un site de liaison de haute affinité pour le domaine Gla du FIXa[37],

•tandis que les résidus 558-565 du domaine A2 se lient eux au domaine protéase du FIXa [50]. Il est supposé que cette liaison soit responsable de l'amélioration des capacités protéolytiques du FIXa.

Le FVIIIa, via sa chaine légère, se lie aux PLs chargés négativement, les phosphatidylsérines (PS), exposés à la membrane des plaquettes activées [51] et des microparticules. Un site de liaison pour la PS a été localisé au niveau des résidus 2303-2332 du domaine C2 [52]. En présence de PLs, 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 *a1*du FVIIIa, entre les résidus 337 et 372 [53].

5- Régulation de l'activité du FVIII

5.1-Activation du FVIII [27]

Dans ce chapitre seront décrits l'activation du FVIII puis l'assemblage de complexe d'activation du FX, le complexe tenase intrinsèque.

Pour que le FVIII puisse exercer son activité de cofacteur du FIXa, son activation protéolytique est nécessaire. Cette protéolyse est réalisée essentiellement par la thrombine qui clive le FVIII à 3 niveaux : aux résidus Arg372 et Arg740 de la chaine lourde et au résidu Arg1689 de la chaine légère [54]. Ces sites de protéolyse sont situés en partie C-terminale des régions acides, *a1*, *a2* et *a3*, respectivement. L'Arg372 est située au sein de la région acide *a1*

entre les domaines A1 et A2. La région acide *a1* joue le rôle de peptide d'activation en bloquant la formation du complexe FVIII -FIXa. Une fois le peptide *a1* clivé au niveau de l'Arg372, sa conformation change, en effet le segment peptidique Pro330-Arg372 dans la forme active restructure et relocalise complètement le domaine A1. Et cette réorganisation de conformation expose alors complètement un site cryptique de liaison entre le domaine A2 et permet la formation du complexe FVIIIa – FIXa [55]. Les clivages Arg372 et Arg1689 sont nécessaires pour une activité complète du FVIIIa.

L'activation du FVIII par protéolyse est aussi réalisée par le FXa au niveau de résidus communs avec la thrombine (résidus Arg372, Arg 740 et Arg1689) et au niveau de résidus qui constituent des sites de protéolyse spécifiques du FXa : Arg 336 au sein de la chaine lourde, et Arg1721 de la chaine légère [53].

L'activation du FVIII en FVIIIa par la thrombine expose de nombreux sites d'interactions pour les autres membres du complexe tenase intrinsèque: le FIXa, les PLs membranaires, et le substrat FX. En effet dès que la chaine légère du FVIII est clivée, son affinité pour le vWF diminue 1600fois, puisque la région *a3* contenant la Tyr1680 sulfatée est libérée. La dissociation induite du complexe FVIII-vWF libère le site de liaison du FIXa pour le FVIIIa. Le FVIIIa peut alors jouer le rôle de cofacteur non enzymatique en améliorant les capacités protéolytiques du FIXa d'environ 10 fois. Les surfaces phospholipidiques membranaires ont 2 rôles dans l'assemblage du complexe tenase intrinsèque : elles associent l'enzyme FIXa et le cofacteur FVIIIa sur le même site, et elles positionnent le complexe enzyme-cofacteur dans une conformation active.

5.2-Inactivation du FVIII [27]

Après activation par la thrombine, le FVIIIa se présente sous forme hétérotrimérique intrinsèquement instable dont l'activité cofacteur est rapidement perdue, avec une demi-vie d'environ 3 minutes. Il existe deux mécanismes d'inactivation du FVIIIa :

- Par dissociation spontanée du domaine A2, dépendante du pH. En effet la sous-unité A2 est responsable de l'activité du FVIIIa, et nécessite la présence du domaine A1. La perte du domaine A2 est attribuée à sa faible affinité vis-à-vis des domaines A1/A3-C1-C2 ;
- Par clivage protéolytique. La chaine lourde de FVIIIa est clivée sur différents sites par plusieurs protéases :

Par la protéine C activée (PCa) qui induit une double dégradation du FVIIIa intra- et inter moléculaire [37]. La PCa clive le FVIIIa au niveau des résidus Arg336 et Arg562 [56]. Le clivage en position Arg336 relargue la région *a1* ce qui diminue l'affinité entre le domaine A1 et le domaine A2 accélérant la dissociation spontanée du domaine A2 (dégradation intramoléculaire). Ce clivage entraine aussi une dégradation intermoléculaire en inhibant la liaison entre le FX et le FVIIIa. Le clivage en position Arg336 est aussi réalisé par le FIXa [57], le FXa [58] et la plasmine alors que le clivage en position Arg562 est spécifique de la PCa ; il inhibe la liaison entre le FIXa et le domaine A2. La protéolyse du FVIIIa par la PCa est augmentée en présence de son cofacteur la protéine S et du FV [59].

Par le FXa qui clive sur le même site que la PCa en position Arg336 mais aussi en position Lys36 du domaine A1 [58].

Par le FIXa qui est aussi capable de cliver le FVIIIa en position Arg336 et Arg 1719 (chaine légère) [57].

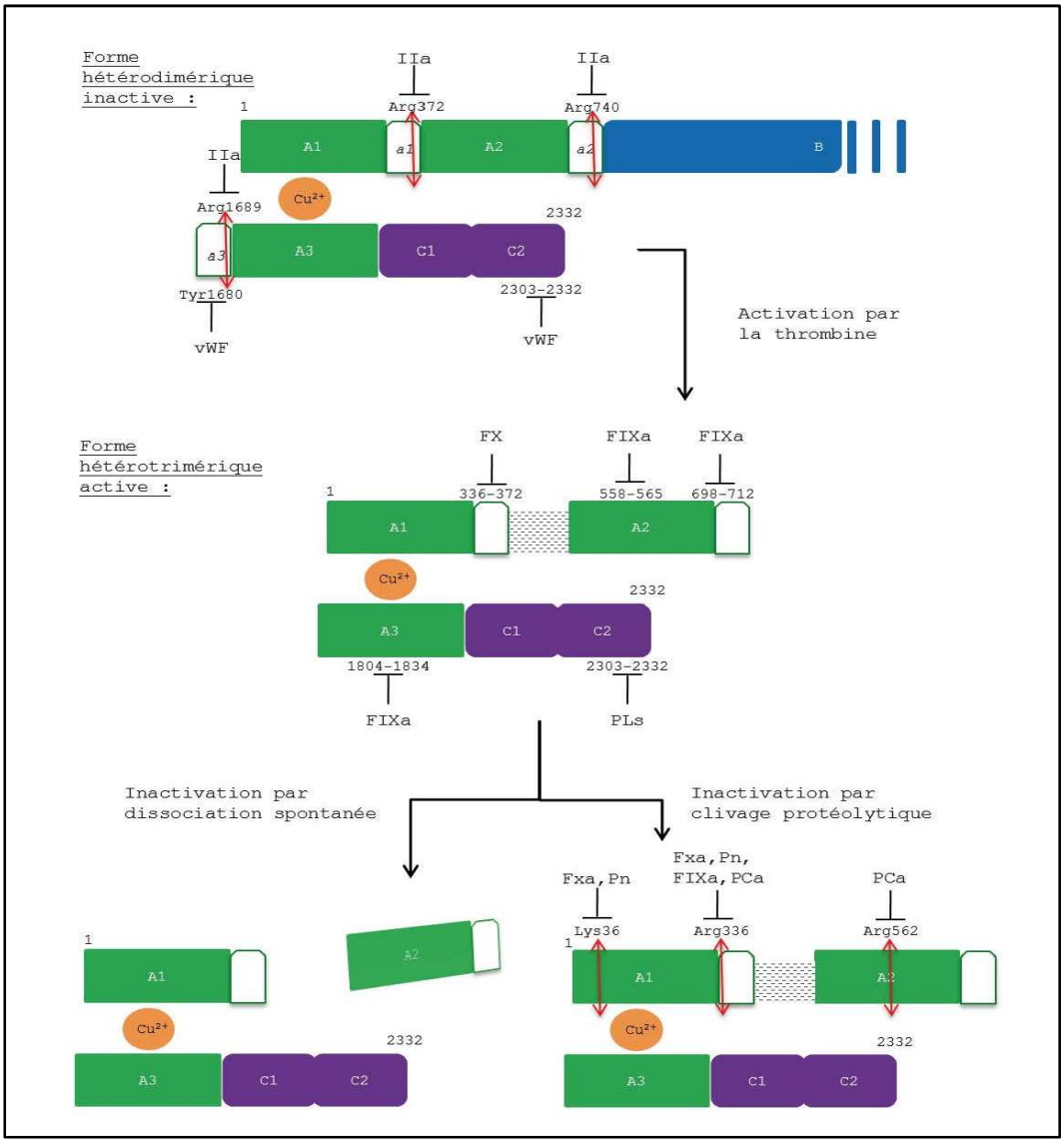


Figure 25: Schéma des interactions du FVIII avec les autres composants de l'hémostase pendant les processus d'activation et d'inactivation du FVIII. [27]

6- Clairance du facteur VIII [27]

Le FVIII non activé est éliminé de la circulation via une interaction entre le complexe FVIII-vWF et les protéoglycanes d'héparines sulfatées membranaires des hépatocytes, qui concentrent ces complexes à leur surface, permettant une clairance par les récepteurs LRP1 (« low density lipoproteine receptor-relatedprotein 1 ») [37] . Le LRP1 participe à la capture et au transport du FVIII vers les voies de dégradation intracellulaire. Il existe un site de liaison pour le LRP1 au sein des résidus Arg484-Phe509 du domaine A2 [60], exposé après une étape protéolytique ; et 3 sites de liaison au niveau de la chaine légère du FVIII, entre les résidus Lys1804-Phe1838, Lys2065 ouLys2092 et Ser2173-Tyr2332, protégés par le vWF. La liaison FVIII - LRP1 est spécifique avec une constante de dissociation variant de K 60 nM à 116 nM selon les études [48, 60]. Elle est aussi réversible et dose-dépendante. Le LRP1 pourrait fonctionner en synergie avec le récepteur du LDL[61, 62]. Après endocytose par le LRP1, s'en suit une dégradation lysosomale du FVIII.

Le vWF inhibe la liaison FVIII - LRP1 de manière dose-dépendante sans savoir par quel mécanisme exactement [48] puisque le vWF ne suit pas le FVIII dans l'endocytose par le LRP et que la liaison du FVIII au LRP1 ne se fait pas sur le même site de liaison que le vWF.

Le LRP1 reconnaît d'autres protéines responsables de la coagulation et de la fibrinolyse : le complexe thrombine - antithrombine ou thrombine - cofacteur de l'héparine de type 2, le complexe FXa - α2-macroglobuline, la protéase nexine 1, le TFPI, les activateurs du plasminogène, la thrombospondine, le FXa et participe à la régulation négative de l'expression du FT à la surface des monocytes [48].

III-HEMOPHILIE A

1- Définition et épidémiologie de l'hémophilie A [27]

L'hémophilie A est une maladie hémorragique constitutionnelle, caractérisée par un déficit en FVIII de la coagulation. C'est une maladie liée à des anomalies au niveau du gène FVIII, situé au niveau du chromosome X ; elle est donc de transmission récessive liée au sexe, c'est-à-dire que généralement, les garçons sont atteints et les femmes sont dites « conductrices » [63].

Il s'agit d'une maladie rare, dont la prévalence estimée varie de 105 à 160 par million d'habitants mâles. On compterait plus de 500 000 hémophiles au niveau mondial (Hémophilie A et hémophilies B confondues). L'hémophilie concerne tous les groupes ethniques de façon équivalente et touche 1 enfant sur 5000 naissances de sexe masculin. D'après le dernier rapport annuel en 2012 de la World Federation of Hemophilia (WFH), sur 109 pays ayant participé au recueil de données (91% de couverture) 142 205 patients étaient hémophiles A [64]. L'hémophilie A est 5 à 6 fois plus fréquente que l'hémophilie B, qui elle est caractérisée par un déficit en FIX de la coagulation.

2- Physiopathologie de l'hémophilie A [19]

Les deux facteurs anti-hémophiliques FVIII et FIX sont très différents. Le FIX a une activité enzymatique, forte lorsqu'elle est dans sa forme active, il est vitamine k-dépendant et n'a aucune homologie avec le facteur VIII. Le FVIII n'a pas d'activité enzymatique, c'est un cofacteur, non vitamine k-dépendant. Néanmoins, le déficit congénital en l'un de ces deux facteurs crée la même pathologie, l'hémophilie. 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 entraine 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 apparait ainsi essentiellement comme un défaut de la génération de thrombine à la surface des plaquettes, entrainant 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.

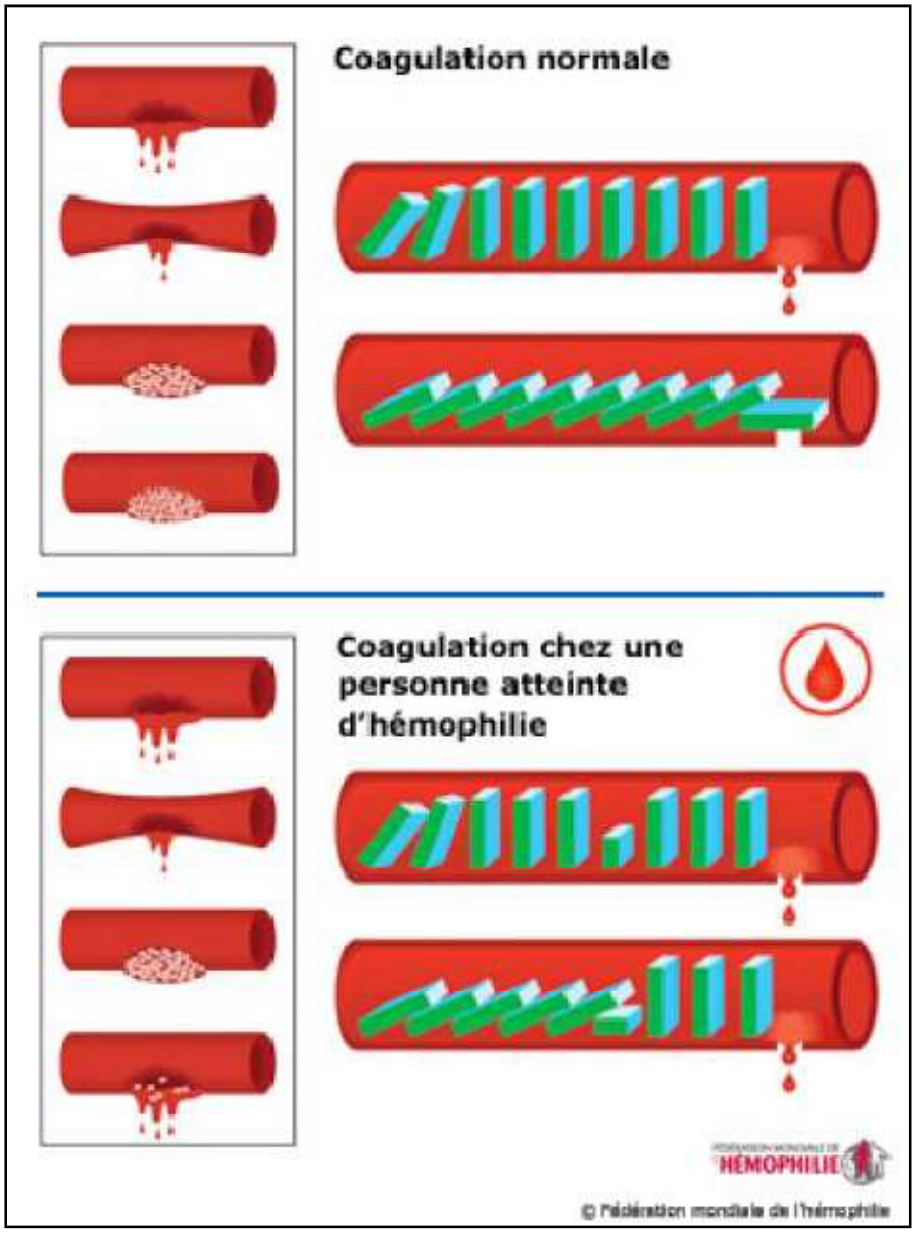


Figure 26 :La coagulation chez l'hémophile [65]

3-Signes cliniques et complications de l'hémophilie A

L'hémophilie est classée suivant la concentration mesurée de l'activité du facteur spécifique ; elle peut donc être mineure, modérée ou sévère (Tableau 3). Cette classification permet de corréler le plus souvent la concentration biologique en facteur spécifique avec le phénotype hémorragique du patient. Elle permet de déterminer le risque hémorragique, de guider la stratégie thérapeutique, de prédire les évènements et de prévenir les complications. Il est à noter que la sévérité clinique est la même chez tous les membres d'une même famille, et reste stable au cours du temps. [27]

Tableau III: Classification de l'hémophilie [27, 66]

Concentration en facteur (VIII:C	Classification	Symptomatologie clinique
<0,01 UI/mL (<1% de la normale)	Sévère	Hémarthroses et hématomes musculaires spontanés, saignements post-traumatiques (accidents, chirurgie)
0,01-0,05 UI/mL (1-5% de la normale)	Modérée	Hémarthroses et hématomes musculaires après traumatismes légers ; saignements excessifs après chirurgie et extraction dentaire
>0,05-0,40 UI/mL (>5% de la normale)	Mineure	Normalement pas de saignement spontané ; saignements après chirurgie, extraction dentaire et accidents

Les manifestations cliniques de l'hémophilie sont en fonction de l'intensité du déficit en facteur (sévère, modérée ou mineure) et non du type d'hémophilie [67]. Les manifestations hémorragiques dans l'hémophilie sévère sont fréquentes, spontanées ou secondaires à un traumatisme minime ou faire suite à

un effort prolongé (longue marche, pratique d'un sport, port d'une charge importante...), et surviennent tôt dans la vie [68].

Dans les formes modérées, les saignements sont moins fréquents, apparaissent plus tardivement et sont secondaire à un traumatisme [68].

Dans les formes mineures, les épisodes hémorragiques sont beaucoup plus rares et ne perturbent que rarement la vie quotidienne; surviennent uniquement à la suite d'une blessure grave ou dans le cadre d'une intervention chirurgicale. De ce fait, ces formes peuvent être longtemps silencieuses et ne se révéler qu'à un âge avancé. [68]

En fonction de leur localisation, plusieurs types d'hémorragies peuvent être distingués.

3.1- Hémorragies non extériorisées

3.3.1- Les hémarthroses

Les hémarthroses représentent 70% à 80% des accidents hémorragiques chez l'hémophile [69]. Ce sont des hémorragies intra articulaires pathognomoniques de l'hémophilie sévère, elles se manifestent en général à l'apprentissage de la marche où le système locomoteur est très sollicité, toutes les articulations des membres supérieurs et inférieurs peuvent être touchées. Cependant, plus de 80% des hémarthroses surviennent dans les articulations soumises à des pressions importantes (chevilles, genoux,) ou peu protégées (coudes). [70, 71]. En cas d'hémophilie sévère et en l'absence de traitement, les patients peuvent présenter jusqu'à plus de 30 hémarthroses par an [72]. Sur base de la présentation clinique, on distingue divers tableaux d'hémarthrose

- L'hémarthrose aiguë : débute par une sensation de gêne et de limitation modérée du mouvement, elle entraîne rapidement une douleur vive, un gonflement, une augmentation de la température cutanée et une impotence

fonctionnelle totale de l'articulation touchée [73]. L'administration d'un traitement substitutif à ce stade précoce permet la régression de l'hémarthrose. En l'absence de traitement substitutif, l'hémarthrose persiste plusieurs jours, voire plusieurs semaines avant de se résorber au prix d'une importante inflammation de la synoviale, d'altérations cartilagineuses et d'atrophie musculaire consécutive à l'immobilisation ; cette impotence fonctionnelle entraîne une amyotrophie favorisant les récidives hémorragiques [68, 72, 74].

- Les hémarthroses subaiguës surviennent après la répétition des épisodes d'hémarthrose au niveau d'une même articulation [72]. Les épisodes hémorragiques répétés au niveau d'une articulation endommagent durablement l'articulation et les os, pouvant entraîner des déformations, engendrant une synovite chronique proliférative et destructrice, désignée sous le terme d'arthropathie hémophilique [70, 72].

3.3.2- Les hématomes

Un hématome est une collection sanguine apparaissant à l'intérieur d'un tissu après une hémorragie survenue à la suite d'un traumatisme minime ou important, il se manifeste le plus souvent par une douleur et un gonflement de la zone concernée, il représente 10 à 20% des accidents hémorragiques [74] . Il peut s'agir:

- D'hématomes superficiels, localisés au niveau du tissu sous cutané souvent accompagnés d'ecchymoses; ce sont les plus fréquents et sans gravité puisqu'ils se résorbent spontanément plus ou moins vite ex: face antérieure de la jambe, face externe du bras ... etc.

- D'hématomes profonds, intra- musculaires, post-traumatiques, [74] Leur gravité est liée :

- Soit à leur volume, La taille de l'hématome dépend souvent de la région anatomique dans laquelle il se développe, ex: un hématome d'une loge musculaire large (fessier, mollet) peut atteindre une taille importante car le saignement se produit dans un espace extensible [68, 72]

- Soit à leur localisation (figure 12), Certains hématomes mettent en jeu Le pronostic vital: comme l'hématome laryngé et du plancher de la bouche (une asphyxie aigue), hématome intracérébral ou rétro-péritonéal...Le pronostic fonctionnel: comme les hématomes compressifs des membres avec compression vasculaire (risque ischémique) ou nerveuse (médian et cubital à la loge antérieure de l'avant-bras (risque de syndrome de Volkmann), sciatique à la fesse ou au creux poplité, hématome péri-rachidien, rétro ou périorbitaire avec risque de cécité ... etc. [72, 75, 76]. L'hématome du psoas droit est parfois difficile à évoquer peut simuler une appendicite aiguë; une échographie permet de confirmer le diagnostic. [73]

3.3.3- Les autres hémorragies intro tissulaire

Les hémorragies intra-pleurales, cérébro-méningées, rétiniennes, intra-péritonéales sont rares [75]. Les hémorragies du système nerveux central: le risque d'hémorragie intracrânienne (HIC) est 20 à 50 fois plus élevé chez le patient hémophile par rapport à la population normale, l'une de leurs complications est la survenue de crises d'épilepsie [76].

3.2- Hémorragies extériorisées

Elles sont de localisations variées (digestive, ORL...etc.), souvent de diagnostic aisé mais inquiétantes pour le patient, elles représentent 10 à 20 % des accidents hémorragiques [68].

3.2.1-. Hémorragies cutanéo-muqueuses

- Hémorragies cutanées: sont abondantes, difficiles à contrôler et siègent au niveau du front, arcades sourcilières, cuir chevelu ... etc [75, 76].

- Hémorragies buccales: sont le plus souvent post traumatiques, plaie du frein de la langue, brossage des dents trop intense. ..etc.

- Épistaxis: à l'occasion d'un rhume ou après une exposition prolongée au soleil [74, 75]

3.2.2- Hémorragies viscérales

Les hématuries: sont en général spontanées, récidivantes et moins fréquentes [76].

Les hémorragies digestives: se traduisent, par des hématémèses ou mélénas et sont souvent révélatrices de lésions sous-jacentes du tube digestif (ulcère gastrique, polype intestinal...) [74].

3.2.3- 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. [75]

4-Diagnostique biologique de l'hémophilie A

4.1-Test de routine : Allongement du TCA [66]

Il mesure le temps de coagulation à 37 °C d'un plasma dépaquetée, décalcifié en présence de phospholipides (céphaline), d'un activateur de la phase contact (Kaolin, acide ellagique, célite ...) et de calcium [77]. Le résultat est exprimé en secondes par rapport au temps d'un plasma témoin, valeur moyenne varie entre 20 et 40 sec, ou en ratio [temps du malade/temps du témoin], un

rapport supérieur à 1,2 chez l'adulte et à 1,3 chez l'enfant, confirme un allongement du TCA [77].

Le TCA explore la voie intrinsèque (KHPM, PK, VIII, IX, XI) et la voie commune (I, Il, V, X). [34]

- Taux de plaquettes normal
- TS normal.
- TP normal.
- TCA allongé de manière isolée

Test de correction

TCA du mélange (volume à volume plasma malade, plasma Témoin).

Incubation à 37°C pendant 2 h des 3 tubes (M, T et M+T). Elle améliore la sensibilité du test.

Le résultat du test est exprimé par l'indice de Rosner

IR = (([TCA M+T] - [TCA T])/TCA M) x 100

V' Avec TCA du malade (M), TCA du témoin (T) et TCA du mélange (M+T)

UN IR < 12 est en faveur de l'existence d'un déficit factoriel.

12< IR <15 douteux.

UN IR> 15 est en faveur de la présence d'un anticoagulant circulant.

4.2-Dosage spécifique du facteur de coagulation (FVIII)

Le dosage du facteur (FVIII) permet de préciser le degré ou la sévérité de l'hémophilie. Il existe plusieurs techniques de dosage des facteurs de la coagulation. Certaines d'entre elles permettent d'apprécier l'activité coagulante du FVIII (FVIII:C). D'autres permettent de mesurer les FVIII antigènes (FVIII: Ag) [78]

4.2.1-Mesure de l'activité coagulante par dosage chronométrique [66]

b. Principe : TCA effectué sur un mélange dilué de plasma à tester et d'un plasma réactif déficient en facteur que l'on veut doser (VIII) contenant tous les autres facteurs en concentration normale.[79]

Dans ces conditions l'allongement du TCA observé est directement proportionnel aux concentrations circulantes du facteur concerné. [79]

c. Les résultats sont exprimés en pourcentages par rapport à une droite d'étalonnage (Log/Log). Les Valeurs normales : 60-150%.[79]

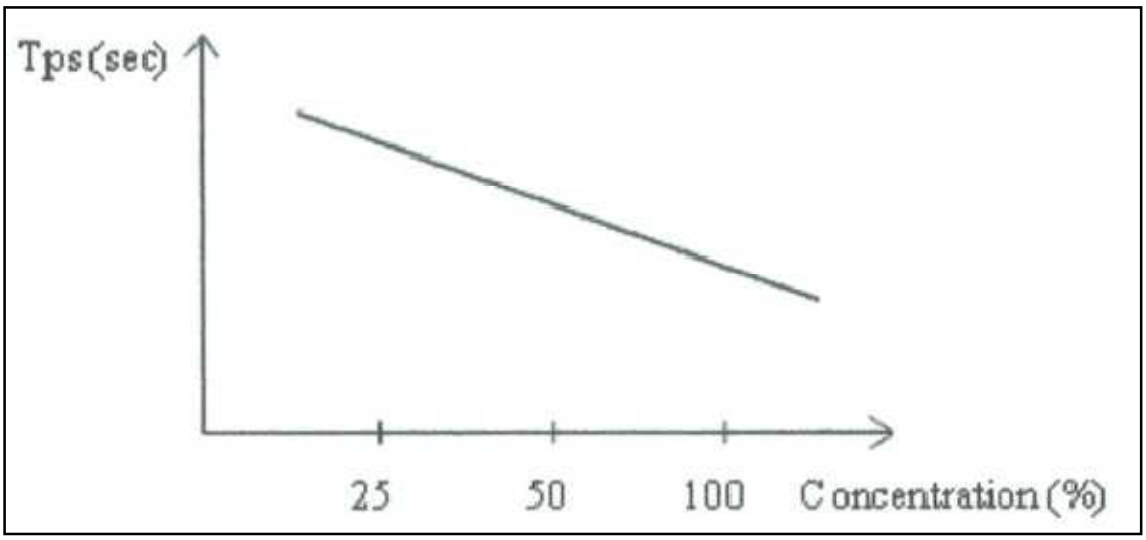


Figure 27: droite d'étalonnage (Log/Log) de l'allongement de TCA

d. Prudence: Les droites d'étalonnage sur la majorité des automates ne sont pas linéaires de O à 100%. Deux types de gammes doivent donc être effectués, gamme « large » 25-100% et gamme fine (0- 25%) ; sur les gammes fines un

blanc réactif doit être systématiquement passé car les plasmas déficients réactifs peuvent contenir des traces du facteur.[79]

4.2.2-Mesure de l'activité coagulante par dosage chromogénique [27]

La méthode chromogénique de mesure d'activité FVIII:C, est la méthode de référence pour la mesure de l'activité FVIII:C dans le plasma et dans les concentrés de FVIII. Le mélange réactionnel consiste en l'association de FIXa purifié, du FX purifié, des PLs, du Ca2+ et de la thrombine pour activer le FVIII ; la source de FVIII est le plasma de patient. Ce mélange est incubé 5 min à 37°C. La thrombine va activer le FVIII en FVIIIa, qui va pouvoir former le complexe tenase intrinsèque en se liant avec le FIXa, le Ca2+ et les PLs. L'activation du FX en FXa par le FIXa est alors accélérée par le FVIIIa, approximativement 100 000 fois [80, 81] ; et la génération de FXa est directement proportionnelle à la concentration de FVIII:C contenue dans le plasma du patient. Ensuite, un troisième réactif est ajouté : il contient un inhibiteur de la thrombine pour stopper la coagulation et un substrat chromogénique du FXa. Ce mélange est de nouveau incubé pendant 5 min à 37°C, où le FXa hydrolyse son substrat chromogénique spécifique, libérant le groupe chromophorique para-Nitro Aniline. L'extinction du signal lumineux, lue par un photomètre à 405 nm, est directement proportionnelle à la concentration de FVIII.

Si la méthode chromogénique est plus coûteuse, ses avantages sont multiples. Contrairement à la méthode coagulométrique, elle n'est ni sensible à l'héparine ni aux ACC de type lupique, présentant alors un intérêt tout particulier pour distinguer les ACC lupiques des inhibiteurs spécifiques du FVIII. De plus, la méthode chromogénique n'est pas influencée par des réactifs

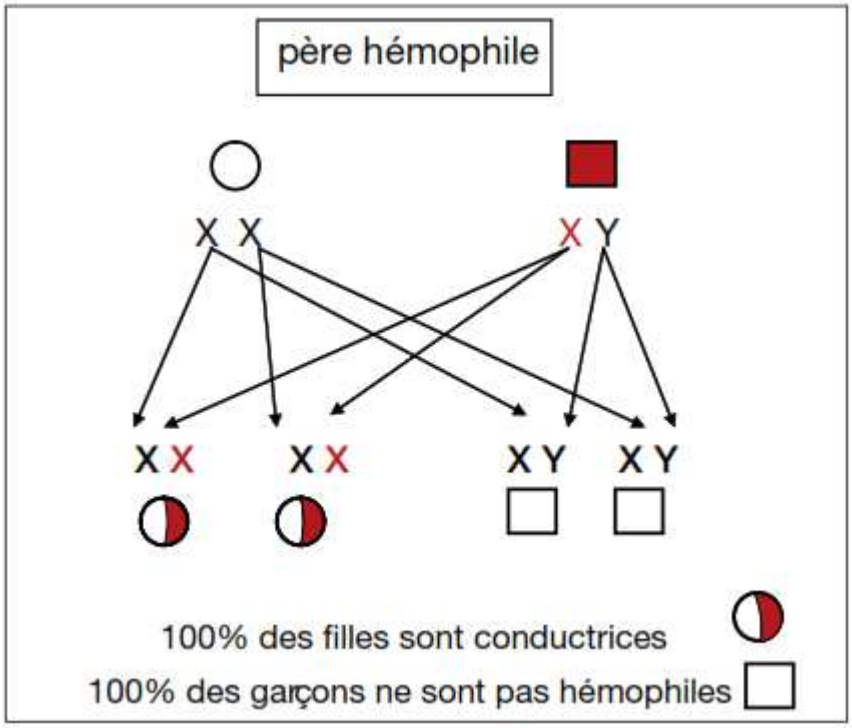
tels que la céphaline ou le plasma déficient en FVIII. Elle présente une variation analytique moindre pour les valeurs basses [82]

4.2.3-Mesure de l'activité antigénique [66]

Le FVIII antigène (FVIII:Ag) peut être dosé par radio immunologie ou par une technique ELISA (ELISA FVIII ou ELISA FIX) [83]. 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. Le risque de développer un inhibiteur est probablement plus faible chez ces patients que chez les sujets CRM- [84]. Habituellement le taux de FVIII : Ag est proche de taux de FVIII: C.

4.3-Diagnostic génétique [85]

L'hémophilie est une maladie constitutionnelle dont la transmission est récessive, situé sur le bras long du chromosome X: Xq28. Ce sont donc les garçons qui présentent des saignements alors que la maladie est transmise par les femmes, appelées conductrices ou porteuses. [86, 87]



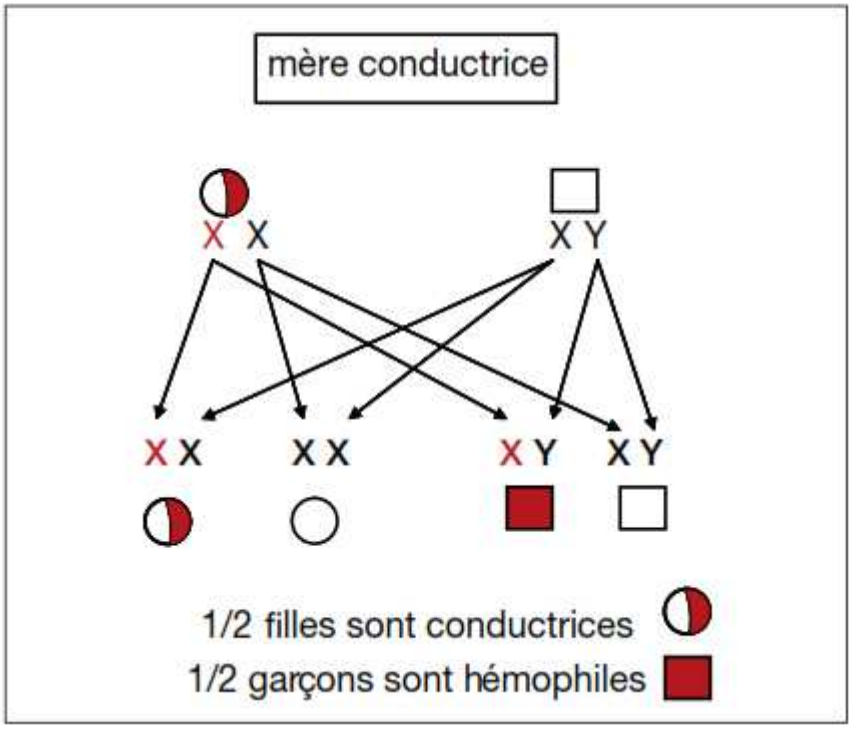


Figure 28 : Transmission de l'hémophilie (mère conductrice).[68]

Dans 30 à 45 %, aucun antécédent d'hémophilie n'est retrouvée dans la famille, on parle alors d'hémophilie sporadique. La "néo-mutation" peut avoir lieu dans l'ovule de la mère ou dans le spermatozoïde du père ou plus tard chez le fœtus lui-même, cette mutation, bien que spontanée va se transmettre de façon héréditaire à la descendance du patient [86, 88]. Les antécédents familiaux sont déterminants pour détecter les conductrices obligatoires et potentielles :[83]

• Conductrice obligatoire : Une fille née d'un père hémophile. La mère d'un enfant hémophile avec une histoire familiale évocatrice, ou La mère d'au moins deux garçons hémophiles (non jumeaux homozygotes), [79]

• Conductrice potentielle : La fille d'une conductrice. La sœur d'un hémophile. La nièce d'un hémophile ou la mère d'un enfant hémophile sans histoire familiale évocatrice [79].

L'hémophilie féminine existe, mais elle est exceptionnelle; les femmes peuvent être atteintes d'hémophilie, les causes pouvant en être:

- Les filles "double hétérozygotes" pour l'hémophilie nées de père hémophile et de mère conductrice [83, 86].

- Une lyonisation extrême inactivant la majorité des chromosomes porteurs du gène.

- Un syndrome de Turner (X0).

- Une translocation X-autosome.

- une disornie 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 [75].

Les anomalies génétiques responsables de la maladie incluent de larges délétions dans le gène du F VIII, des inversions de séquence, la présence de codons «stop», de mutations non-sens et de petites délétions dans le gène [89].

- Les délétions partielles ou totales du gène [90]: ces délétions représentent 5% des anomalies génétiques dans l'hémophilie A (92 délétions de 1 à 210 kb ont été décrites dans l'hémophilie A sévère). Les délétions larges sont responsables de déficits sévères en FVIII. Les conséquences des délétions de fragments plus petits sont variables. Une délétion, même minime, d'un nombre de nucléotides non multiple de 3 engendre un décalage du cadre de lecture (mutation frameshift) à l'origine d'une protéine aberrante, voire de l'apparition d'un codon stop prématuré, responsable d'un déficit très sévère. À l'inverse, la délétion en phase d'un ou de plusieurs codons triplets pourra n'entraîner qu'un déficit partiel.

- Les insertions rares ou les duplications : (2 cas décrits : insertion de 2.1 ou 3.1 kb de séquence de type LINE). [91, 92]

- Les mutations ponctuelles : De nombreuses mutations ponctuelles ont été décrites, touchant pratiquement tous les exons. Un tiers de ces mutations ponctuelles surviennent dans des zones à haut risque de mutations (hot spot), au niveau d'un doublet CpG, du fait de l'instabilité des cytosines méthylées. Les conséquences des mutations ponctuelles sont variables selon leur localisation. Les mutations non-sens sont habituellement sévères (elles sont retrouvés dans la très grande majorité chez les hémophiles A sévères), alors que les mutations faux-sens peuvent avoir différents degrés de sévérité mais sont le plus souvent modérées. Les mutations impliquant les sites d'épissage de l'ARN revêtent des aspects de sévérité variable selon la position de la mutation par rapport à la jonction exon-intron [91].

- Un phénomène d'inversion[90]: plus fréquente, ou recombinaison

intrachromosomique au niveau de l'intron 22 [93]. Cette dernière anomalie rend compte de plus de la moitié des cas d'hémophilie A sévère. L'intron 22

renferme 2 gènes appelés F8A et F8B. Dans le cas de l'inversion de l'intron 22, il y a une recombinaison entre le gène F8Aet l'un de ses homologues près du télomère. Il en résulte une absence d'épissage entre l'exon 22 et l'exon 23. Une autre forme d'inversion a été décrite, portant sur l'intron 1, liée à une recombinaison avec une zone télomérique. Elle est à l'origine de 3% à 5% des déficits sévères en FVIII [94].

4.4-Dépistage des conductrices

Il permet d'évaluer le risque encouru de mettre au monde un enfant hémophile, la reconnaissance de leur statut est importante, pour cela le dosage systématique de FVIII ou de FIX est nécessaire [83].

Taux de facteur VIII chez les conductrices :

• Le plus souvent modérément abaissé (30-50%) ou normal sans que cela écarte la possibilité que la femme soit effectivement conductrice [86].

• Dans 1/3 des cas taux bas pouvant entraîner un syndrome hémorragique (phénomène amplifié par lyonisation de l'X) [79].

Diagnostic phénotypique :

Il repose sur le dosage du FVIII:C couplé au dosage VWF:Ag. Un rapport FVIII:C/VWF:Ag<0,7 retrouvé à plusieurs reprises en dehors de toute grossesse est évocateur du statut de conductrice, néanmoins, certaines conductrices présentent un rapport normal rendant impossible le diagnostic phénotypique. Une analyse génétique doit alors être envisagée [83].

Diagnostic génotypique :

L'analyse génotypique permet l'identification de la mutation responsable de l'anomalie, elle se fait selon deux approches : Directe par la mise en évidence du défaut génétique en cause comme, par exemple, l'inversion de l'intron 22 dans

l'hémophilie A, Cette analyse est difficile pour FVIII (gène = 26 exons 186Kb). Indirecte par l'association du défaut causal et de marqueurs polymorphes situés à proximité ou au sein du gène. (à partir des ADN garçons malades (définition de l'haplotype de l'X porteur du gène muté) et des ADN garçons sains (fournit l'haplotype sain) [79].

Seule, une forme sévère peut justifier une étude génotypique. L'étude de l'ADN du chromosome X est faite à l'aide de sondes géniques, les familles détectées de cette manière sont dites informatives [73, 83].

4.5-Diagnostic prénatal

Il est réalisée par ponction de sang fœtal au 2ème trimestre de la grossesse (18ème SA) en évitant la contamination du sang par le liquide amniotique qui peut stimuler et activer FVIII:C [95, 96]. Lorsque la mutation causale (de type inversion de l'intron 22 du gène du FVIII) a été identifiée dans la famille, le diagnostic est réalisé par ponction des villosités trophoblastiques avant la 10ème SA (dès les 8-9ème SA) pour une étude de l'ADN. Lorsqu'elle n'a pas été identifiée, la stratégie diffère selon qu'il s'agit d'une hémophilie avec antécédents familiaux ou d'une hémophilie sporadique [96].

• Si la femme n'est pas informative pour aucun des polymorphismes testés et si le fœtus est de sexe masculin : un prélèvement de sang foetal à la 18ème SA est recommandé.

• Si la femme est informative pour au moins un marqueur, un diagnostic sur ADN trophoblastique peut être tenté à la 11éme SA [96].

NB: Les couples doivent être informés des possibilités diagnostiques offertes et des risques associés [96].

Il est également possible de faire un diagnostic préimplantatoire (DPI) dans le cadre d'une fécondation in vitro [96].

4.6-Diagnostic différentiels

Les diagnostics différentiels de l'hémophilie A avec déficit en FVIII sont :

- Déficit constitutionnel en FIX de l'hémophilie B. Un dosage de FIX:C permet de faire le diagnostic d'hémophilie B ;

- Déficit en FVIII de l'hémophilie acquise, par développement d'auto-anticorps anti-FVIII. Le contexte est souvent évocateur : femme enceinte, personne âgée, antibiothérapie récente, maladie auto-immune associée, cancer [27]; Pour le diagnostic, Le TCA est constamment allongé et non corrigé par l'apport de plasma témoin normal avec un IR > 15 [97].

- Déficit combiné en FVIII et FV : le TCA et le temps de Quick seront allongés [27] ;

- La maladie de Willebrand de type 1, 2A, 2B, 2M, 3 : La transmission de la maladie est autosomale dominante, le syndrome hémorragique n'est pas comparable. Sur la plan biologique, allongement du TS, du VWF: RCo, une diminution du VWF: Ag [98].

- Maladie de Willebrand 2N (Normandie) : Cette maladie se caractérise par la présence de variant du VWF ayant une affinité faible pour la liaison au FVIII, le diagnostic différentiel avec l'hémophilie A mineure repose sur l'étude de la liaison FVIII—VWF qui est normale dans l'hémophilie A et diminuée dans le Willebrand type 2N [98, 99].

5- Traitement de l'hémophilie A [27]

Aujourd'hui, il n'y a pas de traitement curatif de l'hémophilie A. La prise en charge de l'hémophilie sévère repose sur le traitement substitutif, c'est-à-dire l'administration de concentrés du FVIII.

Les traitements peuvent être donnés lorsque les saignements surviennent, nous parlons de traitement « à la demande » ; ou régulièrement, pour prévenir l'apparition d'épisode hémorragique qu'il soit spontanés ou provoqués, et en cas de geste invasif prévu (exemple : chirurgie), nous parlons alors de «prophylaxie ». L'administration prophylactique des facteurs de la coagulation est aujourd'hui recommandée comme traitement de référence par la World Federation of Hemophilia (WFH) et l'Organisation Mondiale de la santé (OMS).

L'administration des concentrés de FVIII se fait par voie intraveineuse stricte.

Les modalités du traitement substitutif tiennent compte :

- De deux paramètres pharmacocinétiques de la molécule thérapeutique de FVIII:

Le taux de récupération du produit injecté : quels que soient les produits utilisés, il est théoriquement de 200% pour le FVIII. En pratique, l'injection d'1 UI kg-1 de FVIII entraîne une augmentation d'environ 2% (2 UI dL-1) du taux de FVIII circulant (FVIII:C). L'augmentation souhaitée du FVIII se calcule de la manière suivante : FVIII (UI dL-1) x poids (kg) x 1/n (avec n=taux de récupération observé du produit à injecter)

La demi-vie de la molécule : environ 12 h pour le FVIII en conditions pharmacocinétiques de repos.

- Du taux de FVIII C à atteindre : les doses perfusées et les durées de substitution dépendent de l'indication thérapeutique qui est fonction du site

hémorragique, de la gravité de l'hémorragie constituée [100] et du risque hémorragique.

Quelques produits existent actuellement sur le marché, obtenus par fractionnement du plasma, ce sont les produits plasmatiques, ou par génie génétique, ce sont les produits recombinants.

5.1-FVIII d'origine plasmatique [27]

Avant 1940, seules les transfusions de sang total et de plasma frais étaient utilisées pour le traitement des hémophiles mais leur faible contenance en FVIII faisait persister la morbidité à long terme par la récurrence de saignements majeurs. Les cryoprécipités, riches en FVIII et Fg sont apparus en 1964. C'est vers la fin des années 1960 qu'ont été commercialisés les premiers concentrés plasmatiques de FVIII humains (pFVIIIh), obtenus à partir d'un pool de plus de 20 00 donneur [101, 102]. Outre l'augmentation de l'espérance de vie grâce à l'avènement de ces produits, évoluant progressivement de 27 à 60 ans de 1940 à 1980 [103], ils ont permis de traiter efficacement les épisodes hémorragiques et de développer des programmes d'auto-infections à domicile. Pour optimiser la sécurité vis-à-vis de la transmission d'agents infectieux, il a été mis en place une sélection stricte avec un dépistage sérologique des donneurs, des étapes de purification par chromatographie et deux étapes d'inactivation virale. Aujourd'hui encore, les concentrés de pFVIIIh sont prescrits pour leur efficacité, leur relative sécurité et leur coût inférieur. Certains concentrés de pFVIIIh contiennent une faible quantité de vWF.

5.2- FVIII d'origine recombinante [27]

Le développement de concentrés de FVIII recombinant (rFVIII) (Tableau 5) a été permis après la réussite du clonage et du séquençage du FVIII humain (FVIIIh) en 1984. Le premier essai clinique ayant établi l'efficacité du premier rFVIII fût publié en 1990 [104], et les concentrés de rFVIII commerciaux furent disponibles à partir de 1992. Le rFVIII humain (rFVIIIh) peut seulement être produit par des cellules mammifères, capables d'assurer des modifications post-traductionnelles indispensables à l'activité cofacteur du FVIII. L'intensification de la production et les procédés de purification permirent la construction de rFVIIIh de premières générations dites « full-lenght » qui avaient besoin de sérum humain ou bovin pour leur production et surtout pour leur stabilisation dans le produit final. Avec les rFVIIIh de seconde génération, le sérum était enlevé du produit final. Aujourd'hui, les rFVIIIh de troisième génération sont dépourvus de sérum, que ce soit lors de la production ou dans le produit final ; les molécules stabilisantes sont synthétiques ou créées par génie génétique. Le processus de purification enlèvent les impuretés provenant du milieu et des cellules en culture, et concentrent les molécules de rFVIIIh grâce à différentes étapes de chromatographie (par immuno-affinité et par échangeuse d'ion).

IV- COMPLICATIONS LIEES AU TRAITEMENT ANTI-HEMOPHILIQUE

1-Complications infectieuses

Parmi les risques induits par le traitement substitutif (notamment plasmatique) chez un hémophile est le risque infectieux (surtout VIH, hépatites C et B), bien qu'il soit devenu aujourd'hui très faible, mais non nul. Avec l'avènement des FAH recombinants; le risque de transmission de virus humain

est quasi nul cela est due à l'introduction des étapes de purification et d'inactivation ou d'élimination virale dans le processus de fabrication et de l'importance du contrôle d'assurance qualité [83, 98, 105].

2- Développement d'inhibiteurs

Les inhibiteurs sont des auto-anticorps pathologiques circulants dirigés contre le facteur déficitaire et capables d'inactiver ses fonctions. Leur survenue est un évènement iatrogène fréquent, est actuellement la complication la plus grave du traitement par facteur VIII chez les patients atteints d'hémophilie A, puisque ce denier devient inefficace et incapable de cerner les périodes hémorragiques. Les inhibiteurs, habituellement détectés au cours des premières dizaines de journées de traitement, peuvent compromettre gravement son efficacité. Les PUPs (previously untreated patients) représentent la population la plus appropriée pour étudier ce risque [106].

2.1- Conséquences cliniques des anticorps anti-FVIII [106]

Selon le niveau maximal du potentiel inhibiteur plasmatique de l'anticorps mesuré à son pic historique, on distingue des réponses immunes de type fort répondeur (> 5UB) et faible répondeur (= 5UB) [107]. Cette classification correspond à une différence significative en termes d'impact clinique.

En effet, les inhibiteurs de type fort répondeur induisent les plus grandes difficultés thérapeutiques alors que ceux dits faible répondeur, parfois mis en évidence lors d'un dépistage biologique fortuit, sont le plus souvent sans retentissement très significatif sur la clinique ou la prise en charge thérapeutique.

Dans le cas des inhibiteurs fort répondeurs, la production d'anticorps est de nouveau stimulée lors des réexpositions à l'antigène FVIII (relance

anamnestique) et il n'y a pratiquement aucune chance d'acquisition spontanée d'une tolérance immune. Leur survenue justifie le recours à un médicament alternatif au FVIII (facteur VII activé recombinant, concentré de facteurs du complexe prothrombique activé) pour le traitement et la prévention des saignements. Cette situation fait aussi porter l'indication de mise en œuvre de protocoles d'induction de tolérance immune particulièrement lourds et onéreux qui peuvent aboutir à l'éradication de l'inhibiteur. En revanche, les traitements immunosuppresseurs ou immunomodulateurs, classiquement utilisés pour des pathologies auto-immunes incluant l'hémophilie acquise, n'ont pas montré de bénéfice avec un niveau de preuve suffisant pour préconiser leur utilisation à ce jour [108, 109].

Chez les patients faibles répondeurs dont l'inhibiteur peut être saturé par l'antigène, le traitement substitutif conventionnel par concentrés de FVIII conserve habituellement une certaine efficacité, le titre d'inhibiteur restant peu influencé par les nouvelles administrations de FVIII. Dans une proportion non négligeable de cas, ces inhibiteurs disparaissent spontanément en quelques semaines ou mois. Ils sont qualifiés de transitoires et n'ont pas d'impact sur le traitement à long terme. Il peut arriver que le titre d'un inhibiteur, dit faible répondeur, augmente secondairement de manière importante, le transformant en fort répondeur.

Il existe enfin une autre catégorie d'anticorps dits non neutralisants mis en évidence par des techniques immunologiques. Ceux-ci ne s'accompagnent pas d'inhibition de l'activité coagulante du FVIII et n'altèrent pas l'efficacité thérapeutique du traitement substitutif conventionnel. La fréquence de ces anticorps moins étudiés que les inhibiteurs est largement sous-estimée et leur

éventuel impact sur l'apparition ultérieure d'un inhibiteur est mal connu [110, 111].

2.2- Epidémiologie des inhibiteurs dans l'hémophilie A

Le développement que les hémophiles B (1,5-3%) [112, 113], et davantage chez les hémophiles A sévères (environ 20%) que chez les hémophiles A modérés (8%) ou mineurs (5%) [114]. En absence de traitement, Le risque de décès est 5 fois plus important chez un hémophile avec inhibiteurs que sans inhibiteurs [83].

2.3- Facteurs de risques de développement d'inhibiteurs dans l'hémophilie A [106]

En général les inhibiteurs apparaissent tôt, dans les 10 à 50 premiers jours d'exposition au produit de substitution, les cohortes nationales et internationales s'intéressent tout particulièrement à la période des JCPA (journées cumulées en présence de l'antigène) égales aux 50 à 75, au maximum 100 premières journées d'exposition aux concentrés de FVIII. Le risque d'inhibiteur est environ quatre fois plus élevé en cas d'hémophilie A sévère qu'en cas d'hémophilie modérée ou mineure.

Pour l'hémophilie A sévère, il existe plusieurs catégories de facteurs de risque d'inhibiteur qui ont été identifiées. Les premiers facteurs documentés et admis, de nature génétique sont intrinsèques au patient et ils sont par définition non modifiables. De ce fait, leur connaissance, intéressante sur le plan fondamental, laisse peu de place à d'éventuelles mesures de prévention lors de la mise sous traitement. On peut cependant recommander une vigilance toute particulière chez les patients qui présentent un risque génétique élevé. Parmi les facteurs non génétiques, plus récemment étudiés et pour beaucoup d'entre eux

encore controversés, on différencie ceux dits environnementaux, en rapport avec les conditions qui accompagnent la mise en œuvre du traitement, et ceux directement liés au concentré de FVIII. C'est par une intervention sur ces facteurs non génétiques que l'on peut imaginer moduler le risque d'inhibiteur et donc la fréquence, la gravité et/ou l'évolution de cette complication.

2.3.1-Facteurs de risque génétiques [106]

Parmi les caractéristiques inhérentes au patient et intangibles, les premiers facteurs de risque qui ont été rapportés concernent le génotype de l'hémophilie (mutation ou remaniement du gène du FVIII/gène F8), l'ethnie et les antécédents familiaux d'inhibiteurs [115, 116].

Les anomalies décrites sur le gène F8 sont classées selon le risque plus ou moins grand associé au développement d'un inhibiteur. On distingue ainsi dans un premier groupe d'anomalies les défauts moléculaires très délétères sur le plan fonctionnel (mutations nulles) tels que les grandes délétions, mutations non-sens et inversions dans les introns1 ou 22, d'une part, qui entraînent une absence totale d'activité de la protéine. D'autres anomalies génétiques telles que les mutations faux-sens ou celles qui touchent le site d'épissage préservent, au moins en partie, la synthèse de protéine et induisent une perte partielle de sa fonction coagulante. L'incidence des inhibiteurs est très différente dans ces deux groupes variant de 21—88 % pour les mutations nulles à moins de 10 % pour les mutations faux-sens [116, 117].

Parmi les caractéristiques génétiques, l'ethnie a été identifiée de longue date comme un facteur de risque important. La prévalence d'inhibiteurs est deux fois plus élevée dans les populations afro-américaines par rapport aux populations caucasiennes alors qu'un risque intermédiaire a été rapporté chez les

sujets hispano-américains [116, 118]. Des travaux récents ont évoqué le lien possible entre l'existence de différents types sauvages de molécules de FVIII en rapport avec des polymorphismes du gène F8 et le développement d'inhibiteurs.

Le sur-risque d'inhibiteur dans les populations noires pourrait être en rapport avec une situation de mismatch induite par la discordance entre les haplotypes majoritaires dans la population noire et ceux qui sont à l'origine des FVIII thérapeutiques [119, 120].

Une grande étude internationale a fait suspecter le rôle de facteurs de risque génétiques autres que ceux liés au gène F8 en analysant la discordance des profils vis-à-vis de la survenue d'inhibiteur dans des groupes homogènes de patients au regard du génotypage de l'hémophilie (notamment inversion de l'intron 22 qui représente environ 40 à 45 % des patients). Les analyses ont été particulièrement utiles au sein de fratries discordantes [121]. L'implication de certains allèles du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II avait été suggérée par des publications relativement anciennes, mais en l'absence de cohérence des résultats dans l'analyse de séries successives, ces résultats sont restés controversés [121, 122]. Du fait de l'implication des cytokines et molécules de costimulation dans la production d'anticorps et de leur rôle déterminant dans la réponse immune, Astermark a orienté ses travaux vers un screening large dans le domaine de l'immunogénétique. Cette recherche de facteurs de risque candidat s'est avérée fructueuse, permettant l'identification de plusieurs polymorphismes d'intérêt par leur impact sur le risque de survenue d'inhibiteur. C'est ainsi qu'a été identifié l'impact de polymorphismes des gènes codant pour l'interleukine 10, le tumour necrosis factor-_ (TNF-_), le cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) [123, 124].

2.3.2-Facteurs de risque non génétiques [106]

Sur un terrain génétique particulier, reflet d'un risque basal propre au patient, les circonstances de réalisation du traitement et l'éventuelle différence d'immunogénicité des concentrés de FVIII créent une interaction complexe. (Fig. 30). Pour l'identification de facteurs de risque non génétiques pour la survenue d'un inhibiteur dans l'hémophilie A sévère, la rareté de l'évènement liée à l'épidémiologie de cette affection rend particulièrement difficile l'aboutissement d'études randomisées. Dans ce contexte, la réalisation d'analyses multivariées au sein de larges cohortes représente une alternative utile, même si la mise en évidence de risques relatifs faibles reste difficile. Il est intéressant d'observer que dans cette situation, des études coopératives nationales et internationales conduites à partir de registres et suivis de cohortes ont apporté des résultats essentiels au cours des dernières années en surmontant au moins en partie les difficultés méthodologiques attendues.

a-Facteurs de risque environnementaux [106]

Les principaux facteurs non génétiques de risque d'inhibiteur identifiés au cours des dernières années sont liés aux modalités et circonstances de mise en œuvre du traitement, principalement dans sa phase initiale.

L'implication de l'âge au moment du premier traitement substitutif a été suspectée un temps lors d'analyses univariées qui avaient montré une fréquence plus élevée d'inhibiteur chez les enfants traités le plus précocement dans des séries conséquentes [125, 126]. L'imputabilité du jeune âge lors de la première exposition au FVIII a finalement été infirmée dans d'autres publications et c'est l'étude internationale CANAL (Concerted Action on Neutralizing Antibodies in Severe Haemophilia A), qui a permis de montrer dans le cadre d'une analyse multivariée, que certaines modalités de réalisation du traitement, notamment un

traitement initial intensif représentaient un facteur de confusion chez les très jeunes enfants traités [127, 128].

Les traitements intensifs ont été identifiés comme facteurs de risque, non seulement lorsqu'ils constituent le premier traitement, mais aussi lorsqu'ils sont administrés dans la période des 50 premières journées de traitement [129]. La réalisation d'une intervention chirurgicale précoce a aussi été identifiée comme un facteur de risque d'inhibiteur dans les mêmes études. L'effet délétère des traitements intensifs précoces, intuitivement attendu d'un point de vue physiopathologique, selon la perspective d'un modèle de charge antigénique, a été confirmé par le groupe international PedNet/RODIN (Research of Determinants of Inhibitor Development) chez les jeunes enfants nés entre 2000 et 2010 [130].

L'inflammation qui accompagne la présentation du FVIII substitutif au système immunitaire lors du traitement intensif d'épisodes hémorragiques sévères ou situation chirurgicale représente une hypothèse privilégiée pour expliquer le risque majoré d'inhibiteur. On a ainsi utilisé le concept du « signal de danger » pour caractériser ces situations d'administration du FVIII en contexte inflammatoire, que la situation soit hémorragiques (hématome) ou chirurgicale (plaie opératoire) [131]. De manière analogique aux situations de saignement tissulaire et de plaie opératoire, l'exposition extravasculaire accidentelle au FVIII lors d'injections a pu être évoquée comme potentiel facteur de risque sans que ceci puisse être montré par des études cliniques à ce jour.

Les études récentes tendent à montrer à l'opposé que les régimes prophylactiques débutés précocement pourraient avoir un rôle protecteur vis-à-vis du risque d'inhibiteur. Des résultats en ce sens ont été rapportés dans le

cadre des cohortes observationnelles internationales CANAL et RODIN, mais aussi par l'équipe de Milan à l'issue d'une étude cas-témoin [130, 132, 133]. Dans l'analyse la plus récente (RODIN), c'est seulement après la période des 20 premières journées d'exposition aux concentrés de FVIII qu'apparaît l'effet protecteur de la prophylaxie, et ce plus particulièrement chez les patients dont le génotypage est classé dans les formes à faible risque d'inhibiteur.

b-Facteurs de risque liés aux concentrés de FVIII [106]

Depuis l'apparition de concentrés de FVIII purifié dans l'arsenal thérapeutique des patients atteints d'hémophilie A, l'excès d'inhibiteur induit par tout nouveau produit a toujours été une crainte majeure. La survenue d'excès majeurs d'inhibiteurs lors de l'introduction de certains concentrés a été rapportée. Ceci avait été particulièrement bien documenté lors de l'utilisation en Belgique d'un concentré de pFVIII rendu très immunogène après un procédé de double inactivation virale comportant une étape de pasteurisation [134]. Les concentrés recombinants ont apporté dès leur mise à disposition dans le début des années 1990 un caractère innovant certain par rapport aux produits d'origine plasmatique. En revanche, dès l'arrivée des rFVIII s'est posée la question de l'existence ou non d'un risque accru de survenue d'inhibiteur par rapport aux pFVIII [135-137]. L'hypothèse d'un caractère protecteur des concentrés de pFVIII a été tout particulièrement évoquée pour ceux dits riches en facteur Von Willebrand (FVW), alors que cette glycoprotéine de transport et de protection du FVIII est absente des produits recombinants. Le FVW pourrait jouer un rôle protecteur vis-à-vis du risque d'immunisation, par exemple en masquant certains épitopes immunogènes. Malgré les arguments issus des travaux chez l'animal et des études in vitro, la démonstration de ces hypothèses n'a pas été confirmée en clinique humaine à ce jour. Si aucune étude n'a permis à ce jour de valider de

manière définitive un moindre risque d'inhibiteur chez les PUPs traités par pFVIII, on rapporte le plus souvent, soit un différentiel de risque favorable aux concentrés plasmatiques, soit l'impossibilité de mettre en évidence une différence significative entre les deux types de produits. Ainsi, les résultats d'études en faveur de ce caractère protecteur, notamment au Royaume-Uni et en France, se sont heurtés aux résultats contradictoires d'autres études, notamment ceux des cohortes internationales CANAL et RODIN [118, 132, 138-140]. Il faut toutefois noter que jusqu'à une période très récente, les études ont été réalisées en considérant de manière dogmatique l'hypothèse d'un risque homogène pour les différents types de concentrés de rFVIII. En fait, des résultats récents d'études ayant comparé les rFVIII entre eux dans des cohortes de PUPs atteints d'hémophilie A sévère pourraient expliquer le caractère contradictoire des études préalables en montrant un risque inhomogène au sein du groupe des rFVIII. L'étude RODIN a montré cette différence pour la première fois dans une analyse multivariée prenant en compte tous les principaux facteurs de risque identifiés jusque-là.

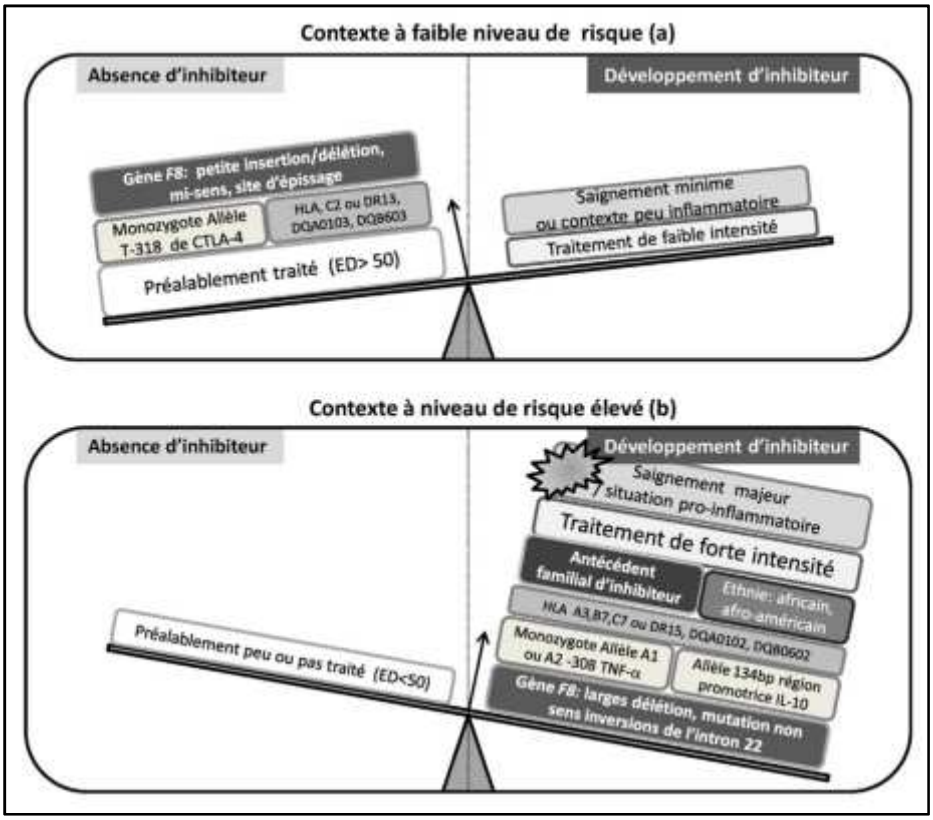


Figure 29: Schématisation du niveau de risque selon le fond génétique et les risques environnementaux surajoutés. [106]

Schématisation des différents éléments du risque de développement d'un inhibiteur basé sur un statut génétique « protecteur » (a) ou « exposant » (b), dans lequel interviennent comme facteurs surajoutés l'éventuel impact des challenges immunitaires, notamment liés au contexte plus ou moins inflammatoire d'une manifestation hémorragique (signaux de danger) et la présentation de l'antigène FVIII lors du traitement substitutif pour atteindre ou non le « seuil interdit », nécessaire au développement d'inhibiteur. [106]

2.4 Caractéristiques immunologiques des inhibiteurs du FVIII [33]

2.4.1-Isotypes et sous-classes des anticorps anti-FVIII

La majorité des anti-FVIII est constituée d'anticorps d'isotypes IgG. Les travaux de Gilles et al [110], étudiant des préparations polyclonales d'anti-FVIII, ont montré que la distribution isotypique des anti-FVIII présente une prédominance pour la sous-classe des IgG4, puis à un moindre degré des IgG1 [141, 142]. La contribution prédominante des IgG4 parmi le répertoire des inhibiteurs s'expliquerait par les administrations répétées de FVIII. En effet, une exposition prolongée aux allergènes s'accompagne d'une formation préférentielle d'anticorps de la sous-classe des IgG4 [143].

En 2007, Healey et al. [144] ont montré, à partir d'un modèle murin, que les anticorps reconnaissant le domaine A2 étaient préférentiellement issus de la sous-classe des IgG1, alors que ceux reconnaissant le domaine C2 étaient préférentiellement issus des IgG2a. Ainsi, Van Helden et al. ont identifié, lors d'une étude longitudinale, les sous-classes d'IgG des inhibiteurs présents chez 14 patients en cours d'ITI. Ils ont montré que la contribution relative des sous-classes d'IgG était similaire dans la majorité des patients analysés ; et que le taux d'anticorps anti-FVIII de classes IgG1 et IgG4 étaient bien corrélés avec les titres d'inhibiteurs mesurés par la méthode Bethesda. Chez les patients avec de faibles titres d'inhibiteurs, les anticorps anti-FVIII sont essentiellement de classe IgG1, alors que ceux des classes IgG4 sont plus importants chez les patients forts répondeurs [145]. Ces résultats suggèrent que le contexte immunologique et/ou l'intensité du traitement peuvent accroitre le changement de classe des anticorps anti-FVIII vers le type IgG4.

2.4.2-La classification des inhibiteurs anti-FVIII [33]

On distingue deux types d'inhibiteurs en fonction de leur cinétique. Les inhibiteurs de cinétique type I inhibent complètement, de manière dose-dépendante, l'activité du FVIII, alors que les inhibiteurs de type II présentent une inactivation du FVIII incomplète [146]. Cette différence s'expliquerait par une spécificité épitopique différente. Les inhibiteurs de type I reconnaitraient des régions antigéniques essentielles à l'activité procoagulante tandis que les types II reconnaitraient des épitopes distants de ces mêmes régions. Le mécanisme responsable du profil cinétique des anticorps de type II s'expliquerait par une compétition entre le vWF et l'inhibiteur [146]. En l'absence de vWF, la majorité des inhibiteurs de type II se comporterait comme des types I. cependant, certains d'entre eux inhiberaient partiellement le FVIII même en l'absence de vWF [147], et d'autres inhiberaient le FVIII seulement s'il est associé au vWF [148]. Par conséquent, la population des anticorps de type II apparaît très hétérogène. En pratique, les inhibiteurs de type I sont le plus souvent observés chez des hémophiles congénitaux sévères, les inhibiteurs de type II étant observés préférentiellement chez les hémophiles modérés ou dans l'hémophilie acquise [149]. La réponse thérapeutique au FVIII est meilleure avec les inhibiteurs de type I.

2.4.3-Mécanismes d'action des inhibiteurs anti-FVIII [33]

Les inhibiteurs bloquent la fonction procoagulante du FVIII en perturbant sa liaison à l'un de ses partenaires : phospholipides, vWF, FIX, ou FX. Il est établi, à l'échelle moléculaire, que les épitopes essentiellement reconnus par les inhibiteurs sont localisés au niveau des domaines A2, C2 et A3, et que cette réponse est additive [150, 151]. En fonction de leur localisation épitopique,

plusieurs mécanismes permettant de rendre compte de leur activité inhibitrice sur l'activité procoagulante du FVIII ont été décrits.

a-Les inhibiteurs anti-domaine A2 :

Ces inhibiteurs affectent l'interaction entre le domaine A2 et le FIX activé (FIXa) de manière non compétitive, la résultante est donc la formation d'un complexe FVIIIa /FIXa/Phospholipides et FX inactif [152, 153]. L'épitope majoritairement reconnu par ces anticorps anti-domaine A2 est principalement localisés dans la région Arg484-Ile508 et le représentant de ces anticorps est l'anticorps murin 413 [154]. Certains inhibiteurs se lient au domaine A2, ce qui bloque par gène stérique le site de clivage de la thrombine, situé entre les domaines A1 et A2 [155, 156].

b-Les inhibiteurs anti-domaineC2 :

En fonction de leur localisation épitopique, deux mécanismes d'inactivation sont possibles.

Le premier est fondé sur l'inhibition de la liaison FVIIIa /vWF [157] et celle du FVIIIa avec les phospholipides [52]. L'un des représentants de cette catégorie est l'anticorps Bo2C11 [158]. L'étude cristallographique de l'anticorps Bo2C11 avec le domaine C2 a permis de mieux comprendre ce mécanisme d'inactivation [159]. L'anticorps Bo2C11 reconnaît un épitope discontinu, constitué de résidus localisés dans la partie N-terminale du domaine C2, ainsi que dans la partie C-terminale, épitope qui chevauche le site de liaison aux phospholipides. Notamment, les quatre résidus hydrophobes (Met2199, Phe2200, Leu2251 et Leu2252) impliqués dans cette liaison sont enfuis dans le paratope de l'anticorps de sorte que la majorité des résidus clés de la liaison aux phospholipides est séquestrée par l'anticorps Bo2C11, ainsi le FVIIIa est incapable de se lier aux phospholipides. Nogami et al ont montré que la

substitution de l'Ile2317et la Met2321, essentielles à la liaison aux phospholipides, diminue à plus de 90% l'effet inhibiteur de l'anticorps [160] et que le peptide 2315-2330 neutralisait les inhibiteurs [161]. D'autres inhibiteurs dirigés contre le domaine C2 sont exclusifs de la liaison FVIIIa-vWF. Ils sont représentés par un anticorps monoclonal murin ESH8 qui reconnaît un épitope localisé au niveau des résidus 2218-2307 [162, 163]. L'anticorps ESH8 est capable de ralentir la dissociation du FVIIIa au vWF, empêchant ainsi indirectement la liaison du FVIIIa aux phospholipides [164]. Lors de l'activation par la thrombine, l'élimination de la région acide a3 entraine un changement conformationnel au niveau du domaine C2, qui engendre la perte de la liaison au vWF [165, 166]. La liaison de l'anticorps ESH8, avant l'activation par la thrombine activée, empêche ce changement de conformation par suite le FVIIIa conserve alors son affinité pour le vWF [166]. On observe un retard dans la libération du FVIIIa au vWF qui est suffisant pour que l'inactivation du FVIIIa (par dissociation de la sous-unité A2-a2 du dimère) s'enclenche avant sa participation dans le complexe tenace. Jusqu'ici, cet épitope était peu représenté parmi les épitopes majoritairement reconnus par les inhibiteurs de patients traités. Toutefois, depuis les travaux récents de l'équipe de Lollar, la connaissance de la réponse épitopique dirigée contre le domaine C2 a été approfondie. En effet, il semblerait que de nombreux sites épitopiques soient des cibles possibles reconnus par des inhibiteurs développés par les patients.

c-Les inhibiteurs anti-domaine A3 :

L'unique épitope identifié dans le domaine A3 est localisé dans la région 1811-1818 [167, 168]. Plusieurs observations suggèrent que ces inhibiteurs neutralisent l'activité procoagulante du FVIII en l'empêchant d'interagir avec le FIXa. On a montré qu'un inhibiteur alloanticorps humain, reconnaissant la

région 1778-1823, interférait avec la liaison du FIXa à la chaine légère. D'autres alloanticorps anti-domaine A3, ainsi que le monoclonal CLB-Cag A, dont l'épitope est compris entre les résidus 1804-1818 [61], sont capable d'inhiber la liaison FVIIIa-FIXa à plus de 90% [168].

d-Les inhibiteurs anti-régions acides a1 et a3 :

Plusieurs mécanismes d'action des inhibiteurs anti-région a1 sont possibles, étant donné le rôle stratégique de cette région ; qui est encadrée par deux sites de clivages : celui de la thrombine (IIa) ou du FXa après l'Arg372 qui active le FVIII et celui de la IIa, la protéine Ca et le FXa après l'Arg336 qui inactive le FVIII [169]; cette région a1 permet l'association de la sous-unité A2-a2 au dimère et donc participe à la formation du trimère actif [170]; elle constitue aussi l'une des composantes du site de liaison du FXa [171]. La liaison des anticorps à cette région peut soit bloquer stériquement le site de clivage de la IIa soit le rendre inaccessible par une induction de changements conformationnels au niveau du FVIII. Parallèlement, d'autre mécanismes d'inactivation doivent exister car l'anticorps monoclonal C5, représentatif des anti-a1, incubé avec du FVIII radiomarqué et en présence de IIa, ne perturbe nullement le profil de digestion [172], n'interfère pas avec le clivage par la IIa, et doit plutôt agir en perturbant l'interaction du FVIII à d'autres facteurs de la coagulation, éventuellement la liaison au FX, qui dispose d'un site de liaison au niveau des résidus Met337-Arg372 [171]. Les inhibiteurs dirigés contre la région acide a3, qui sont faiblement représentés, ont un mécanisme d'action fondé sur l'inhibition de la liaison FVIII-vWF. En effet, la région acide a3 contient le second site de liaison au vWF [165].

e-Les inhibiteurs anti anti-domaine C1 :

Très peu d'anticorps anti-FVIII dirigés contre le domaine C1 ont été rapportés. Toutefois, certains d'entre eux ont été principalement retrouvés chez des patients hémophiles A modéré [173]. Les inhibiteurs dirigés spécifiquement contre des épitopes dans le domaine C1 sont reconnus mais leur mécanisme d'action sur le FVIII reste encore inconnu. Les caractéristiques de cet anticorps sont les suivantes :

− il inhibe à 85% l'activité procoagulante d'un FVIII exogène dans un test fonctionnel

− il n'inhibe pas le FVIII endogène du patient qui possède la mutation Arg2150His dans le domaine ; en revanche, il se lie au niveau du domaine C1 du FVIII sauvage qui ne possède pas la mutation. Ainsi on a suggéré que l'Arg2150 participerait directement ou indirectement à la liaison du FVIII et du vWF.

f- Les anticorps catalytiques :

Le concept selon lequel certains anticorps pourraient posséder une activité enzymatique a été énoncé pour la première fois par Linus Pauling en 1942, selon lui [174], si la structure des sites de liaison des anticorps à l'antigène était produite de manière aléatoire, on pourrait alors trouver des anticorps dont les sites de liaison ressemblent aux sites actifs d'enzymes et envisager que ces anticorps soient dotés d'une activité enzymatique. Il fallut attendre les travaux de Kohler et Milstein[175] permettant la production d'anticorps monoclonaux pour confirmer cette hypothèse : les premiers anticorps catalytiques, ou «abzymes », furent produits en 1986. Des abzymes sont produits de manière naturelle par le système immunitaire, en l'absence d'immunisation délibérée. Il a été proposé que les anticorps catalytiques naturels puissent participer directement à l'élimination des débris qu'engendre le métabolisme de

l'organisme dans les conditions physiologiques. La présence dans le lait humain d'anticorps catalytiques dotés d'une activité protéine kinase et d'anticorps à activité DNase suggère un rôle protecteur des abzymes dans les conditions physiologiques. Lacroix-Desmazes et al [176] ont décrit la présence d'anticorps capables d'hydrolyser le FVIII chez les patients hémophiles A sévères qui développent des inhibiteurs. Ils ont montré que ces anticorps sont présents chez plus de 50% des hémophiles sévères ayant des inhibiteurs. Les paramètres cinétiques de l'hydrolyse du FVIII par les anticorps anti-FVIII, leur quantité et leur demi-vie, suggèrent que la réponse immunitaire catalytique pourrait jouer un rôle dans l'inactivation du FVIII in vivo. Au sein d'un mélange polyclonal d'allo-anticorps anti-FVIII différant par leurs propriétés fonctionnelles, les anticorps catalytiques pourraient neutraliser l'activité du FVIII à des vitesses supérieures à celles des anticorps inhibiteurs non catalytiques. Les anticorps catalytiques anti-FVIII constituent le premier exemple dans lequel l'hydrolyse de la molécule cible par des anticorps protéolytiques pourrait être directement impliquée dans l'étiologie de la maladie [177]. Les IgG purifiées semblaient capables d'hydrolyser le FVIII de manière significative par rapport à des IgG de donneurs. Ces données préliminaires suggèrent que l'hydrolyse du FVIII par les IgG participe au moins en partie à l'inactivation du FVIII endogène.

La cinétique de dégradation du FVIII par ces anticorps hydrolysant semble compatible avec un rôle pathogénique de ces anticorps catalytiques. Ces anticorps présentent de multiples sites de clivage sur le FVIII et hydrolysent préférentiellement les liaisons peptidiques contenant des acides aminés basiques [178].

g-Les anticorps anti-FVIII « non fonctionnels » ou « non neutralisants » (ANN) :

Certains auteurs ont décrit la présence d'anticorps anti-FVIII qui n'interagissent pas avec les propriétés fonctionnelles du FVIII et sont donc non détectables par la technique Bethesda [179, 180]. Ces anticorps dénués d'activité inhibitrice et dirigés contre des épitopes dits « non fonctionnels », sont mis en évidence, entre autre, par la technique ELISA et peuvent exister chez des patients hémophiles avec ou sans inhibiteurs [180, 181]. Les anticorps dirigés contre des épitopes du domaine B font partie de cette catégorie. Certains auteurs [181] ont déjà évoqué leur rôle sur l'augmentation de la clairance plasmatique du FVIII en augmentant la capture de complexes immuns (FVIII-immunoglobulines) par les cellules du système macrophagique. Dans un travail préliminaire, Lavigne et al [180] se sont intéressés aux anticorps anti-FVIII, plus particulièrement ceux dirigés contre le domaine B. En immunisant des souris Xenomouse avec du Kogenate*, 12 anticorps monoclonaux humains dirigés contre ce rFVIII ont été produits. Six d'entre eux avaient la capacité de se lier in vitro au rFVIII entier mais pas au FVIII délété du domaine B, suggérant ainsi que leurs épitopes pouvaient être localisés au niveau de ce domaine. Trois de ces épitopes reconnaissaient un épitope linéaire avec une liaison indépendante des sites de glycosylation. La présence de ces anticorps dans la réponse immunitaire anti-FVIII laisse suspecter qu'ils jouent un rôle probablement non négligeable. Cependant leurs mécanismes d'action restent à élucider et la détection de tels anticorps n'entraine à ce jour aucune modification dans la prise en charge thérapeutique du patient.

h-Les anticorps anti-idiotypes :

Chez les patients sains [182], comme chez les patients en cours d'ITI [183], la neutralisation des anticorps anti-FVIII semble reposer sur la présence d'anticorps anti-idiotypiques. Ces anticorps sont dirigés contre la partie variable des anticorps « pathogéniques ». Sakurai et al [184] ont montré que ces anticorps anti-idiotypes existent non seulement chez les patients dont l'ITI est réussie, mais également chez les patients en échec de sensibilisation. Les auteurs avancent qu'il existerait donc un mécanisme d'ITI associé au développement d'anti-idiotypes. Partant du principe que la majorité des anticorps anti-FVIII réagissent avec le domaine C2, et en immunisants des souris contre l'anticorps le plus représentatif de cette catégorie, l'anticorps B02C11, Gilles et al ont produit un anticorps anti-idiotypes, l'Ac14c12. Ce dernier prévient la liaison de l'anticorps B02C11 au domaine C2 de façon spécifique et neutralise complètement ses propriétés inhibitrices. Cet anticorps neutralise aussi plus de 50% d'anticorps anti-C2 polyclonaux [185]. Ces résultats très encourageants apportent des arguments intéressants sur la possibilité de neutralisation de l'activité inhibitrice des anti-FVIII par un cocktail d'anticorps anti-idiotypes spécifique.

2.5-Cinétique des inhibiteurs anti-FVIII [27]

Les inhibiteurs de l'hémophilie, caractérisés en 1963, sont de deux types : ceux qui se développent chez les patients hémophiles exposés à du FVIII exogènes (allo-anticorps) et ceux qui apparaissent chez des personnes ayant un gène *F8* normal (auto-anticorps) dans le cadre de l'hémophilie acquise. L'inactivation du FVIII par les inhibiteurs est dépendante du temps, de la température, et du pH [142]. Les études cinétiques distinguent deux types

d'Anticorps : les inhibiteurs de type 1 et les inhibiteurs de type 2. Pour étudier les réactions cinétiques, du FVIII est incubé avec le plasma supposé contenir les inhibiteurs et le mode de disparition du FVIII (mesuré comme l'activité FVIII:C résiduelle) est observé. Les plus fréquents sont les inhibiteurs de type 1 [146]. Ils inactivent le FVIII rapidement et montrent une réaction cinétique simple [8] avec une relation linéaire entre le log de l'activité FVIII:C résiduelle et le temps (Figure 31). Si l'inhibiteur est suffisamment fort, tout le FVIII sera inactivé, et il n'y aura plus d'activité résiduelle. En corollaire, une activité inhibitrice faible, < 5 UB mL-1, peut parfois être saturée par des apports importants et répétés de concentrés de FVIII.

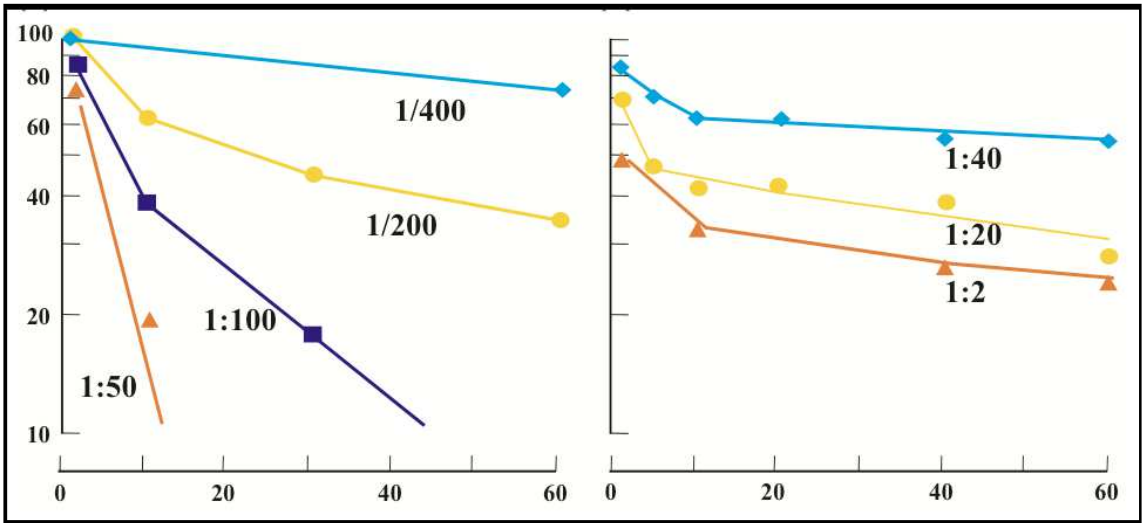


Figure 30: Comparaison des profils cinétiques des inhibiteurs de type 1 (a) et de type 2 (b). Les fractions sous les lignes correspondent aux dilutions plasmatiques. D'après Green D et al, Haemophilia 2011. [27]

A l'inverse, les inhibiteurs de type 2 ont une relation cinétique non linéaire complexe envers le FVIII, avec une première phase de neutralisation rapide du FVIII suivie d'une deuxième phase d'inactivation plus lente et incomplète [146] (Figure 31). Même présents en excès, ils ne peuvent

totalement inactiver le FVIII. De fait, une petite quantité de FVIII:C peut être détectée chez des patients hémophiles avec inhibiteurs. Aussi, ils sont plus difficiles à neutraliser par des augmentations de doses de concentrés de FVIII. Tous les inhibiteurs de type 2 ne réagissent pas de la même façon. Certains études supposaient que le vWF joue un rôle protecteur pour le FVIII vis-à-vis des inhibiteurs de type 2, de manière dose-dépendante, grâce à un encombrement stérique au sein du complexe FVIII-vWF. Ainsi après dissociation du FVIII de son complexe avec le vWF, les inhibiteurs de type 2 pouvaient récupérer une cinétique semblable à celle des inhibiteurs de type 1 [146]. Au contraire, une étude japonaise récente évaluant la génération de thrombine *in vitro* d'un mélange de plasma déficient en FVIII contenant des anti-C2 de type 1, des anti-C2 de type 2 ou des anti-A2 issus de patients hémophiles A sévères japonais, avec des concentrés de FVIII ou de complexe équimolaire FVIII - vWF, montrait la relation inverse : la présence de vWF dans le plasma mélange limitait la diminution de la génération de thrombine par les anti-C2 de type 1 mais ne semblait pas avoir de rôle sur les anti-A2 de type 1 ni les anti-C2 de type 2. Cependant dans cette étude, les anti-C2 de type 2 ne modifiaient pas de manière significative la génération de thrombine des plasmas substitués en FVIII seul [186].

2.6-Test de dépistage et de titrage des inhibiteurs anti-FVIII

La recherche d'inhibiteurs anti-FVIII est à faire régulièrement et fréquemment chez le jeune hémophile sévère dès lors que les premiers traitements par FVIII ont été administrés. Selon le rapport de l'AFSSAPS de 2006, il est recommandé de rechercher les inhibiteurs chez les hémophiles sévères régulièrement tous les 5 à 10 jours d'exposition (ED) jusqu'au 50ème

ED (ou à défaut tous les 3 mois), puis tous les 3 mois jusqu'au 100ème ED, puis tous les 6 à 12 mois ; ainsi que ponctuellement, avant et après tout traitement intensif (plus de 6 jours consécutifs de traitement), après tout changement de concentré de FVIII (après environ 10-20 jours d'exposition), et après un délai de 3 jours au moins succédant la dernière injection de FVIII. Pour l'hémophilie modérée et mineure, la recherche d'inhibiteur est à faire systématiquement après tout traitement intensif, et 2 à 3 semaines après la dernière injection de FVIII. [27]

2.6.1-Méthode de Bethesda [18]

Au laboratoire, le diagnostic biologique d'un Ac anti-FVIII est en général basé sur la mise en évidence de son effet inhibiteur sur les fonctions procoagulante du FVIII. Le premier test à réaliser est un temps de céphaline avec activateur (TCA). Ce test sera naturellement allongé chez un hémophile A. En revanche, un TCA allonge chez une personne ayant toujours eu un TCA normal (et d'autant plus qu'il existe une symptomatologie hémorragique acquise), en dehors de tout traitement anticoagulant, devra faire évoquer de principe le diagnostic d'Hémophilie A acquise (HAA). L'épreuve du mélange est un test simple, disponible dans tous les laboratoires, permettant de donner une orientation sur l'étiologie de l'allongement du TCA. Pour aider à l'interprétation de ce mélange, l'indice de Rosner sera systématiquement calcule : il correspond au [(TCA mélange – TCA témoin) / TCA patient x 100], les temps étant exprimés en secondes. Un indice de Rosner inferieur a 12 évoque un déficit en facteur. Un indice de Rosner supérieur a 15 évoque un inhibiteur (anticoagulant lupique, Acs anti-facteur…). Entre 12 et 15, l'indice de Rosner

est douteux. Chez un hémophile, une absence de correction doit systématiquement faire évoquer et rechercher un inhibiteur.

Le dosage du FVIII coagulant (FVIIIc) peut également être informatif. En effet, les hémophiles avec inhibiteur ont généralement un taux de FVIIIc < 1 %, malgré le traitement substitutif. En raison de la cinétique (de type 2) des Auto-Acs anti-FVIII, les taux plasmatiques de FVIII résiduel varient d'un taux indétectable a 15 % en moyenne en cas d'HAA.

La détection et le titrage de l'inhibiteur sont réalisés par la méthode Nijmegen. Cette méthode est dérivée de la méthode Bethesda. C'est en 1975 que Kasper*et al.* ont décrit la méthode Bethesda [10]. Cette méthode, longtemps considérée comme la méthode de référence, est basée sur le mélange 1:1 du plasma du patient avec un pool de plasma normal (utilise comme source de FVIII) *(figure 4)*. Un mélange 1:1 du pool normal avec un tampon imidazole est utilisé comme référence. Une étape de chauffage de 90 minutes à 58 °C du plasma du patient est réalisée avant le test afin d'inactiver le FVIII résiduel du plasma du patient (le FVIII est thermolabile alors que les Acs anti-FVIII ne le sont pas) et ainsi éviter au maximum les faux négatifs. Ces mélanges sont ensuite incubes 2 heures à 37 °C afin de faciliter la liaison des Acs au FVIII. Un dosage de FVIIIc est réalisé sur ces mélanges. Le taux de FVIII résiduel est alors exprime selon la formule suivante : FVIII résiduel = (FVIII mélange patient-tampon/FVIII mélange contrôle).

En cas de FVIII résiduel < 25 %, des pré-dilutions supplémentaires sont nécessaires. Le titrage de l'inhibiteur est exprimé en unité Bethesda (UB). Une unité Bethesda correspond à la quantité d'Acs capable d'inhiber 50 % du FVIII dans 1 ml de plasma. Ce titrage est calculé à l'aide d'une courbe, en reportant la valeur du FVIII résiduel, en tenant compte de la pré-dilution. Le seuil de

positivité actuellement admis est de 0,6 UB/mL. Les Acs sont classes en faibles répondeurs ou forts répondeurs selon que leur titre est inférieur ou supérieur à 5 UB/mL.

2.6.2-Méthode de Bethesda avec la modification de Nijmegen [18]

Dans les années 1990, en raison d'une recherche plus intensive des inhibiteurs liée au développement des FVIII recombinants, une optimisation de la méthode Bethesda a été apportée : il s'agit de la méthode Nijmegen, décrite en 1995 [13]. Cette méthode modifie la méthode Bethesda afin d'en améliorer la sensibilité et la spécificité. Les principales modifications sont les suivantes : le pH du plasma normal est tamponne a 7,4 et le tampon imidazole du mélange contrôle est remplacée par du plasma déficient en FVIII *(figure 4)*. Les mélanges sont ensuite incubes 2 h à 37 °C puis un dosage du FVIII est ensuite réalisé. De la même manière que pour la technique Bethesda, l'inhibiteur est titre selon la pré-dilution et le taux de FVIII résiduel. La méthode Nijmegen est actuellement considérée comme la méthode de référence par le sous-comité scientifique FVIII/FIX de l'*International society on thrombosis and haemostasis*[187]. Des recommandations pratiques sont fournies dans le *tableau II*.

Les méthodes Nijmegen ou Bethesda possèdent néanmoins certaines limites. Le principal diagnostic différentiel d'un inhibiteur anti-FVIII est la présence d'un anticoagulant lupique. En cas de doute, la recherche de cet anticoagulant lupique doit être systématiquement explorée, selon les recommandations internationales [188]. En cas de présence d'un anticoagulant lupique, la recherche d'Acs anti-FVIII pourra être réalisée en changeant la méthode de dosage du FVIIIc par une méthode chromogenique. En effet, la

méthode chromogenique n'est *a priori* pas perturbée par la présence d'un anticoagulant lupique [189].

Les résultats des contrôles de qualité internationaux montrent que ces méthodes de détections des Acs anti-FVIII souffrent encore d'une forte variabilité. Des mesures de standardisation sont encore nécessaires afin d'optimiser le diagnostic des Acs anti-FVIII. De nouvelles méthodes de recherche de ces Acs existent ou sont en cours de développement. Certaines d'entre elles seront peut-être prochainement disponibles dans les laboratoires d'analyses spécialisées.

2.6.3-Autres techniques [18]

Il existe d'autres techniques disponibles afin d'étudier la réponse humorale anti-FVIII. Ces techniques, parfois complexes, sont généralement disponibles dans de rares laboratoires de recherche. Elles permettent de mieux comprendre la physiopathologie de cette réponse humorale et de précisément caractériser les Acs anti-FVIII.

Quelques-unes de ces techniques, parfois innovantes, seront présentées ci-dessous. Cette liste ne se veut pas exhaustive mais représente plutôt un aperçu des outils permettant une analyse plus fine au niveau moléculaire des Acs anti-FVIII.

- La technique ELISA (*enzyme-linked immuno sorbent assay*) est une technique largement répandue dans de nombreux laboratoires. Certains kits de dosages ont été développés afin de détecter les Acs anti-FVIII [190]. Cette méthode possède une bonne sensibilité et spécificité ainsi qu'une bonne valeur prédictive négative. Elle permet de détecter à la fois les inhibiteurs et les Anticorps non neutralisants (ANN). Elle est néanmoins difficilement applicable

en routine dans les laboratoires en raison de sa consommation relativement élevée en plasma. Elle n'appartient pas, à ce jour, aux recommandations pour la recherche d'anti-FVIII mais il existe des études cliniques en cours visant à évaluer son intérêt en pratique clinique. De plus, la technique ELISA n'apporte que peu d'information supplémentaire car elle ne permet pas de caractériser de manière fine les épitopes reconnus par les Acs anti-FVIII.

- Les techniques d'immuno-empreinte ou d'immun-précipitation ont permis les premières études sur la spécificité épitopique des Acs anti-FVIII [191]. L'utilisation de fragments du FVIII génères suite aux clivages par la thrombine ou l'utilisation de fragments recombinants des différents domaines du FVIII ont permis de cartographier de manière précise des épitopes reconnus par les Acs anti-FVIII [192]. Cependant, ces techniques ne permettent pas d'identifier des épitopes conformationnels (ou discontinus), représentant 90 % des épitopes reconnus par les Acs. Elles possèdent également certaines limites quant a la résolution de l'analyse épitopique en raison de l'absence de dissociation de la chaine légère par la thrombine, par exemple.
- L'utilisation d'hybrides FVIII porcin/FVIII humain a également permis une localisation fine des épitopes au sein du FVIII [193]. En effet, ces constructions chimériques basées sur le remplacement systématique de séquences homologues du FVIII humain par celles du FVIII porcin ont pour but d'identifier les résidus responsables de différences antigéniques. Cependant, en raison des homologies de séquence entre le FVIII humain et le FVIII porcin, cette technique ne permet pas l'identification complète du répertoire épitopique du FVIII. De plus, cette technique n'est envisageable qu'au prix d'un lourd investissement matériel et de longues étapes de préparation des mutants, de purifications, la rendant, en pratique, peu accessible en routine.

- La technique Spot a été développé dans les années 1990. Elle est basée sur l'utilisation d'une membrane de cellulose sur laquelle est fixée un grand nombre de peptides, généralement synthétisés à partir de la séquence peptidique de la protéine d'intérêt [194]. Ces peptides sont ensuite immerges par une solution contenant les anticorps anti-FVIII et la liaison des Acs est révélée par un Acs marque. Cet outil a permis l'identification de nombreux épitopes continus au sein du FVIII, reconnus à la fois par des inhibiteurs et des ANN. En revanche, cette technique ne permet pas la caractérisation d'épitopes discontinus et nécessite une quantité importante de plasma.

- La technique de phage display consiste à faire exprimer par des phages des peptides aléatoires. Cette technique est très performante pour identifier d'éventuels épitopes conformationnels [195]. Elle est bien adaptée au criblage d'épitopes reconnus par des anticorps monoclonaux. Néanmoins, elle est relativement longue et n'est pas très bien adaptée à l'étude des Acs polyclonaux contenus dans le plasma de certains patients hémophiles.

- La technique Luminex est également utilisée afin de rechercher et de caractériser les Acs anti-FVIII [196]. Cette technique est basée sur l'utilisation de microbilles magnétiques possédant chacune une combinaison spécifique de marqueurs fluorescents. A la surface de ces billes, il est possible de coupler chimiquement des protéines d'intérêt (Acs, FVIII, peptides). Elle utilise le principe de la cytométrie en flux : un premier laser reconnait le codage fluorescent de la bille et un second laser reconnait l'anticorps secondaire marqué a la phycoerythrine. Cette technique autorise également un multiplexage permettant théoriquement l'analyse d'environ 100 analytes différents. Cette technique possède de nombreux avantages : sa rapidité (< 2 h), sa faible consommation de plasma (< 100 µL), ses capacités de multiplexage. Elle est

donc particulièrement adaptée à la recherche et à la caractérisation des Acs anti-FVIII. Elle permet la détection et l'étude de la spécificité épitopique des ANN [111] et permet également la caractérisation d'épitopes discontinus au sein du FVIII [197]. En revanche, cet outil ne permet pas de distinguer le caractère inhibiteur ou non-inhibiteur d'un Acs. Du fait de la diffusion de plus en plus importante de la technologie Luminex dans les laboratoires de biologie médicale, cette technique pourrait s'avérer un outil intéressant pour une détection rapide des Acs anti-FVIII. Malheureusement a ce jour, il n'existe pas de kit standardise, commercialise et dédié à la détection des Acs anti-FVIII.

2.7-Traitement des patients hémophiles A avec inhibiteurs anti-FVIII

La prise en charge de l'hémophile avec anticoagulants circulants nécessite le traitement efficace du syndrome hémorragique d'une part et la suppression de la réponse immune par les immunosuppresseurs d'autre part. Le traitement du syndrome hémorragique dépend du titre de l'anticorps circulant (ACC), de la gravité de l'hémorragie et de la durée prévisible du traitement. [32]

2.7.1-Traitement substitutif de référence par concentrés de FVIII

Ce type de traitement concerne les patients faibles répondeurs (< 5 UB), pour lesquels le traitement substitutif de référence par concentrés de FAH reste habituellement efficace, sous réserve d'utiliser une posologie plus forte, avec une dose de charge initiale destinée à saturer l'anticorps. [32] L'étude des paramètres pharmacocinétiques tel que la récupération et la durée de demi-vie du facteur anti hémophilique permet d'adapter le traitement pour parvenir à une hémostase optimale dans ce contexte. [32]

Ce traitement est basé sur la saturation de l'anticorps par un apport de fortes quantités de FVIII ajoutée à une dose hémostatique, La dose neutralisante peut être calculée comme suit :

P X 45 X n X 0.5 unités de FVIII [66]

Avec: 45 ml/Kg = Volume plasmatique

n= Titre de l'inhibiteur

P = Poids de sujet en Kg.

Le traitement d'entretien est équivalent au total de la dose de saturation ajoutée à la dose hémostatique répartie en 24 heures [32]. L'apport d'unités de FVIII se fait par des concentrés, sinon par des cryoprécipités ou des plasmas frais congelés. Rappelons que ces deux derniers nécessitent un apport massif, et exposent à des complications sévères. Lorsque l'hémorragie est étendue et/ou lorsque les tentatives de saturation s'avèrent inefficace, on peut avoir recours à une épuration des anticorps par échange plasmatique ou immuno-adsorption et l'utilisation éventuelle de produits activés (AUTOPLEX*, FEIBA*) [198].

2.7.2-Agents bypassants

Ce type de traitement concerne les patients forts répondeurs (>5 UB) dont la réponse immune est plus puissante [32]. Dans ce cas le traitement par FAH devient totalement inefficace et doit être relayé par un médicament capable d'induire la coagulation en l'absence de facteur VIII ou IX [32]. Deux types de produits dits de « by-pass », le complexe prothrombique activé (FEIBA*) et le facteur VII activé recombinant (rVIIa, Novoseven*) utilisé à forte dose sont actuellement disponibles dans cette indication [32].

Le concentré de complexe prothrombique activé, le Factor Eight Inhibitor By-passing Activity FEIBATM (Baxter Biosciences, Vienne, Autriche) est couramment employé depuis la fin des années 1970 pour gérer les hémorragies chez les patients avec inhibiteurs [199]. Son mécanisme d'action semble dépendre essentiellement de son contenu en prothrombine et FXa, mais seulement en présence de FVa [200]. Par contre, le FEIBATM est un médicament dérivé du plasma, qui contient des traces de FVIII qui peuvent relancer les inhibiteurs chez certains hémophiles A.

Le rFVIIa (NovoSeven®, Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Danemark) possède deux mécanismes d'action distincts : un, classique, qui est dépendant du facteur tissulaire (FT) et l'autre, indépendant du FT, qui aboutit à la génération de FXa et de FIXa à la surface des plaquettes activées lorsque les doses de rFVIIa sont plus élevées [201, 202]. Le rFVIIa augmente la stabilité du caillot formé en le rendant moins perméable et plus résistant à la fibrinolyse par diminution du diamètre des fibres de fibrine [203], et en inhibant la fibrinolyse par activation du TAFI [204]. Il a récemment été démontré que le rFVIIa et le FEIBATM activent directement le FVIII par un mécanisme protéolytique, même en présence d'inhibiteurs anti-FVIII [186, 204].

Chacun de ces agents baypassants peut être utilisé combiné ou séparé pour traiter les épisodes hémorragiques chez les hémophiles :

- En cas de complications hémorragiques, le Novoseven® est recommandé en première intention, le FEIBA® étant associé à un risque de relance de l'inhibiteur, est à réserver aux cas d'échec du Novoseven® [205].
- Il est possible, en cas d'inefficacité clinique avérée avec l'un de ces traitements de recourir à l'autre en respectant un délai d'au moins 2 à 3 heures en

cas de relais NovoSeven® vers FEIBA® et de 6 à 7 heures en cas de relais FEIBA® vers NovoSeven® [205].

Tableau IV: Conduite à tenir devant une hémarthrose ou un hématome chez un hémophile compliqué par la présence d'un inhibiteur [206]..

	FEIBA®	NovoSeven®
Hémarthroses ou hématomes d'importance minime ou modéré	70-80 UI/kg /12h selon évolution	270 µg/kg 1 injection Ou 90 µg/kg/3h (3 injections)
Hémarthroses sévères ou hématomes volumineux	70-80 UI/kg / 12h selon évolution	90 µg /kg / 2-3 h selon évolution

2.7.3-Traitement prophylactique [66]

La prophylaxie est largement utilisé depuis plus de trente ans, elle a pour but de maintenir constant dans l'organisme un taux minimum du FAH déficient afin d'éviter l'arthropathie hémophilique, source d'handicap majeur, elle est classée en deux types principaux: [207]

a- La prophylaxie primaire est instaurée dès le plus jeune âge à la suite de la première hémarthrose; de préférence avant l'âge de deux ans et avant le deuxième épisode de saignement; plus la mise en place du traitement prophylactique est retardée après le premier épisode de saignement et plus grand est le risque de développer une arthropathie. [207]

b- La prophylaxie secondaire est instaurée plus tardivement lorsqu'il y a eu plus de deux manifestations hémorragiques voire de complications articulaires avérées, avant un risque hémorragique connu tel qu'une intervention chirurgicale, après un traumatisme pour éviter le risque de saignement ou en fin de façon périodique lors d'hémarthroses répétées notamment au niveau d'une articulation cible [208].

La prophylaxie (I aire ou II aire) est conduite selon le même schéma thérapeutique:

Schéma Suédois: la prophylaxie est initiée à la dose de 25 à 40 Ul/kg trois fois par semaine pour le FVIII et deux fois par semaine pour le FIX, ce protocole qui est le gold standard est très onéreux.

Schéma Canadien: les doses de perfusion varient de 15 à 30 Ul/kg trois fois par semaine pour le FVIII et deux fois par semaine pour le FIX. Ce modèle présente un rapport coûts/bénéfices positif, il semble le plus approprié et est à recommander en Algérie [209, 210].

2.7.4-Induction de la tolérance immune (ITI) [27]

Certains inhibiteurs peuvent être éradiqués par des régimes d'induction de tolérance immune (ITI), comportant des injections régulières de concentrés de FVIII pendant une longue période [211, 212]. Les facteurs favorisants le succès de ce traitement sont : un titre faible d'inhibiteurs avant la mise en place de l'ITI, un pic maximal du titre d'inhibiteurs faible, un intervalle de moins de 2 ans entre l'apparition des inhibiteurs et le démarrage de l'ITI, un programme d'ITI non interrompu, et possiblement les régimes de hautes doses [213, 214]. Cette approche qui coûte cher, est contraignante pour l'enfant et la famille, avec notamment la fréquente nécessité d'un accès veineux central. Comme la plupart des inhibiteurs se développent chez les enfants jeunes, et parce que les conséquences des hémarthroses peuvent être catastrophiques sur le long terme, l'investissement qu'est l'ITI est finalement coût-efficient, d'autant plus que ces régimes sont efficaces dans 60-80% des cas chez les hémophiles A avec inhibiteurs [215]. Une seule spécialité détient l'AMM dans cette indication à ce jour : il s'agit du Factane® (LFB Biomédicaments, Courtaboeuf, France), qui est

un concentré de FVIII d'origine plasmatique contenant du vWF. Il semblerait que les concentrés de FVIII contenant du vWF favorisent le succès de l'ITI, mais cette éventualité doit être vérifiée par des études randomisées prospectives telle que les études RESIST (http://www.itistudy-resist.com).

DISCUSSION DE LA PRESENTE ETUDE

Dans notre pays la recherche au sujet du développement d'inhibiteurs chez l'hémophile A est aussi rare que la pathologie elle-même : la première étude concernait l'observation d'un cas isolé d'apparition d'inhibiteur publiée en 1999 (M. EL KHORASSANI , N. BENKIRANE)[198]. Néanmoins, l'étude de série menée par F. ZIZI et encadrée par le Professeur A. MASRAR, en 2010 qui a porté sur 121 hémophiles sur une période d'une année et demi (Avril 2008-juillet 2009)[32], constitue la première analyse de cette complication au Maroc. Notre étude est donc la deuxième qui essai de témoigner de l'augmentation du taux des patients hémophiles développant les inhibiteurs anti-FVIII, après la rétrospection des données des patients pendant une période de presque 3 ans : 38% des hémophiles A ont développé des inhibiteurs anti-FVIII à les comparant à 11% cas enregistré lors de l'étude de F. ZIZI en 2010.

La comparaison aux études internationales :

Les études qui ont été récemment analysées de larges cohortes de PUPs retrouvent en fait des données épidémiologiques très homogènes en ce qui concerne la fréquence de survenue des inhibiteurs (Tableau 5) :

Tableau V: fréquences des inhibiteurs dans les études internationales :

L'étude	Fréquence des inhibiteurs
RODIN [138]	177/574 (32,4 %)
FranceCoag[216]	114/303 (37,6 %)
UKHCDO[217]	118/407 (29,0 %)
EUHASSa[218]	70/297 (23,6 %)

Nous constatons donc que les résultats de notre étude concordent avec les données de littérature avec beaucoup de similitude à l'étude RODIN et France Coag.

Parmi les facteurs de risque externes de survenu d'inhibiteur les plus étudiés est l'âge des patients. La population hémophile étudiée était de différents âges entre 6 mois et 33 ans. Cependant, il y'avait une prédominance de la tranche d'âge située entre 11 ans et 15 ans avec une proportion de 48%. Pour les hémophiles qui ont développés des inhibiteurs, ils étaient de différents âges entre 6 et 33 ans avec une moyenne de 18 ans, et la grande partie (39,28%) était située entre les deux intervalles d'âge de 11-15 ans et 16-20 ans, soit 50% au-delà de 15 ans.

Ces résultats diffèrent avec les autres études puisque F. ZIZI a apporté un pic d'inhibition de 33,33% chez les enfants entre 9 et 10 ans. Quant aux autres études internationales, on trouve une grande étude rétrospective menée au Royaume-Uni qui souligne que chez 469 patients avec inhibiteur sur 7250 hémophiles ont un jeune âge de survenue des inhibiteurs, puisque cette complication est neuf fois plus fréquente chez les enfants de moins de cinq ans par rapport aux sujets de plus de quinze ans[219].

Le degré de l'hémophilie est largement analysé comme facteur intrinsèque d'apparition d'inhibiteurs. D'une façon générale les patients de notre étude étaient répartis selon la sévérité de l'hémophilie en 63% hémophiles sévères, ce qui est proche de la littérature qui détermine le pourcentage des hémophiles sévères en 50% [89] Chez nous on trouve que l'apparition des inhibiteurs est 2 fois plus dans les formes sévères par rapports aux formes non sévères, par contre on trouve dans d'autres études que cette complication est quatre fois plus dans les formes sévères par rapport aux formes non sévères[106].

Parmi les hémophiles sévères, 57% ont développés des inhibiteurs, ces résultats dépassent ce qui a été annoncé dans la littérature y compris l'étude de

F. ZIZI (13,11%) et qui détermine que les allo-anticorps inhibiteurs apparaissent chez 15 à 30% des hémophiles sévères [33].

Donc parmi la totalité des hémophiles qui ont développés des inhibiteurs, 4% étaient des hémophiles modérés et 96% étaient des hémophiles sévères contre 22,22% hémophiles modérés et 77,78% hémophiles sévères chez F. ZIZI, ceci montre que la plupart des hémophiles qui développent des inhibiteurs sont les hémophiles sévères, et explique pourquoi les chercheurs orientent la plus part de ces études vers la population des hémophiles sévères.

Le taux d'inhibiteurs était variable 29,1 % à 99%. Le titrage d'inhibiteurs aussi était variable de 0,64 UB/ml à 99 UB/ml.

Parmi ces patients inhibiteurs positifs, on a dépisté 9 cas d'inhibiteurs faibles répondeurs (<= 5UB/ml) ce qui présente un pourcentage de 35% (≠ 44,44% chez F. ZIZI) ; et 17 cas d'inhibiteurs forts répondeurs (> 5 UB/ml), ce qui présente un pourcentage de 65% (≠ 55,56% chez F. ZIZI); notre résultat est donc proche de la littérature. (tableau 6)

Tableau VI: la fréquence des forts répondeurs dans des études internationales

L'étude	Fréquence des forts répondeurs
RODIN [138]	116/177 (65,53 %)
FranceCoag[216]	63/114 (55,26 %)
UKHCDO[217]	60/118 (50,84 %)
EUHASSa[218]	40/70 (57,14 %)

Chez les forts répondeurs le titre d'inhibition est très variable de 6 UB/ml à 99 UB/ml. 100% d'entre eux sont des hémophiles A sévères, tandis que chez les inhibiteurs faibles répondeurs, le titre d'inhibition ne dépasse pas 4 UB/ml (entre

0,64 et 3,23 UB/ml). Par ailleurs, 7 patients étaient des hémophiles A sévères, 1 patient était hémophile A modéré et 1 patient hémophile A mineure.

63% des patients hémophiles sévères ont développés des inhibiteurs fort répondeurs, ces résultats paraissent un peu loin de la littérature qui détermine que 10% à 20% des hémophiles sévères développent un inhibiteur de titre élevé [220].

Avec le constat d'une certaine augmentation de l'incidence des inhibiteurs dans les séries les plus récentes comparée aux séries historiques, se pose la question de la réalité de cette augmentation peut être liée à la plus grande sensibilité des tests biologiques et à l'intensification des analyses de dépistage optimisant respectivement le diagnostic des inhibiteurs de faible titre et des inhibiteurs transitoires[106].

Si l'augmentation de l'incidence des inhibiteurs s'avérait réelle, elle pourrait être due à des transformations modifiant l'immunogénicité des concentrés. Parmi les hypothèses, on peut citer dans ce domaine, des modifications de la structure glycoprotéique du FVIII, la présence de résidus de production ou de purification ou plus simplement une différence de rapport entre la concentration protéique et l'activité coagulante de certains lots de concentrés [221].

Les incidences apparemment élevées dans les séries récentes pourraient provenir du fait que les cohortes en vie réelle permettent de s'affranchir des biais d'inclusion classiquement décrits dans les études PUPs effectuées au cours des stades précoces du développement du médicament et qui restent pour autant indispensables. En effet, il est reconnu que certaines catégories de patients à haut risque d'inhibiteur se trouvent d'emblée exclus de ces études et qu'à l'inverse des patients à risque moindre tels que les patients atteints d'une forme

modérée d'hémophilie avec taux basal de FVIII à 1 % peuvent être éligibles [106].

Quant à notre étude, l'augmentation d'incidence d'inhibiteurs peut être expliquée par le biais de sélections choisies : la plupart des patients sont des hémophiles A sévères mais le taux basale élevé trouvé chez certains indique que ce sont des hémophiles en cours de leurs traitement substitutif et que le bilan d'hémostase a était demandé en routine avant chaque intervention d'ordre invasif.

Notre étude rapporte également le suivie de la cinétique de 14 patients hémophiles ayant bénéficié du titrage d'anticorps anti-FVIII, chez qui on trouve la répartition suivante :

-8 patients qui n'ont pas changé leur réponse en taux d'inhibiteurs : 6 sont restés forts répondeurs (B.A, C.F, C.J, G.A, R.Y, S.S) alors que 2 hémophiles sont restés faibles répondeurs (B.M et K.Y)

-5 patients qui ont changé leur réponse en taux d'inhibiteurs : 2 ont inversé leur réponse de fort en faible répondeur (A.E.Y et H.S), et 3 ont augmenté leur taux de faible en fort répondeurs (E.M, M.M.H et Z.Y)

- Il reste un seul cas spécial (N.W) qui est toujours fort répondeur quoi qu'il ait diminué très considérablement son titre en inhibiteur (de 95 UB/ml à une valeur ne dépassant pas 21UB/ml)

Après cette observation, on peut constater que les titres d'inhibiteurs peuvent changer. 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 (supérieur ou égal à 5 UB pouvant atteindre plusieurs centaines

d'unités) ; en l'absence de nouvelle stimulation ce titre diminue progressivement (en quelques semaines à quelques mois) et peut même devenir indétectable ; 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 (réponse anamnestique) ; ces anticorps n'ont pratiquement aucune chance de disparaître spontanément et sont ceux qui induisent les plus grandes difficultés thérapeutiques [1];

- 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 anamnestique); ces anticorps ne gênent que peu ou pas le traitement substitutif par concentrés de facteur VIII ; certains de ces anticorps détectés primitivement à un titre faible peuvent cependant dans certaines situations augmenter de façon importante transformant ainsi le patient de faible répondeur en fort répondeur [1];

- certains inhibiteurs sont également dits « transitoires » : il s'agit d'inhibiteurs disparaissant spontanément sans qu'il soit nécessaire de mettre en place des traitements spécifiques ; ces inhibiteurs sont en général de titre faible et ne sont détectés que durant une période brève (quelques semaines à quelques mois) ; contrairement cependant à l' avis du sous-comité de standardisation F VIII/F IX de l'ISTH (international society of thrombosis and haemostasis) de fixer à 5 UB la limite des forts et faibles répondeurs (voir le site http ://www.med.unc.edu/isth), il n'y a pas encore d'accord unanime sur la définition des inhibiteurs transitoires ; il est en effet difficile d'exclure totalement la possibilité que certains de ces inhibiteurs ne réapparaissent ultérieurement dans certaines circonstances[1].

La recherche d'inhibiteurs anti-FVIII est donc à faire régulièrement et fréquemment chez le jeune hémophile sévère dès lors que les premiers traitements par FVIII ont été administrés. L'avantage d'une détection précoce est de permettre le cas échéant la mise en place rapide d'un protocole d'induction de tolérance immune. L'UKHCDO recommande ainsi de rechercher un inhibiteur anti-FVIII tous les 5 jours d'exposition au FVIII, ou tous les 3 mois jusqu'au vingtième JCPA, puis tous les 6 à 12 mois[7, 222]. Les études prospectives les plus récentes recherchent un inhibiteur anti-FVIII tous les 3-4 jours d'exposition jusqu'au 20ème JCPA, puis tous les 10 jours d'exposition jusqu'au 50ème JCPA, puis tous les 3 mois durant au minimum 2 ans [7, 223]. Une injection récente de FVIII peut suffire à saturer un anticorps de faible titre ; dans ces conditions la recherche d'inhibiteur est à faire au minimum 72 heures après la dernière injection de FVIII (soit environ 3 demi-vies). En cas de doute, la recherche d'inhibiteur peut être complétée par une mesure de la récupération, voire de la demi-vie du FVIII.[7]

CONCLUSION

L'apparition d'anticorps dirigés contre le FVIII est l'une des complications les plus graves du traitement de l'hémophilie, notamment chez les jeunes enfants atteints d'hémophilie A sévère. Pour remédier à cette complication, tous les efforts se dirigent vers trois volets essentiels :

- Le premier se manifeste dans la recherche des facteurs influençant l'apparition de ce type d'anticorps ; le but étant de bien cerner la complication et la prévenir dans un premier temps chez les hémophiles à haut risques.

- Le deuxième volet se voit dans le dépistage et le titrage de ces anticorps afin de bien comprendre l'état hémorragie du patient et de lui adapter et suivre son traitement, la méthode de référence Bethésda-Nejemejen a prouvé sa validité au sien des autres méthodes.

- Le troisième volet se projette dans le futur, c'est la recherche constante d'un traitement plus efficace et moins couteux, ce qui consiste à trouver d'autres types de traitements substitutifs –surtout d'origine recombinant- mais aussi le développement de traitements définitifs de cette complication : la tolérance immune et la thérapie génique.

Notre étude est une analyse rétrospective de l'ensemble des hémophiles marocains, qui consiste à analyser la prévalence de survenue des inhibiteurs de FVIII chez cette catégorie de patients, sans autant s'approfondir dans les facteurs génétiques et/ou environnementaux donnants lieu à cette complication. L'étape prochaine serai donc de mieux comprendre les mécanismes de survenue de ces anticorps, en analysant de plus près les différents facteurs de risque : l'idéal c'est de mener une autre étude plus approfondie dans ce sens, ayant le but de la meilleur compréhension pour une meilleure prise en charge des hémophiles dans notre payes.

RESUMES

RESUME

Titre : Titrage des inhibiteurs anti facteur VIII dans l'hémophilie A: à propos de 28 cas

Auteur : EL ISSAOUI Yousra

Mots clés : Hymophilie A, Anticorps anti Facteur VIII, méthode de Nijmegen

Introduction : L'hémophilie A est une maladie hémorragique constitutionnelle à transmission récessive liée au chromosome X. Le diagnostic biologique est porté sur un allongement du TCA avec un déficit en facteur VIII. La thérapeutique substitutive par le facteur manquant est la seule option dans les stratégies du traitement préventif et curatif.

Néanmoins, la complication la plus dangereuse de ce traitement est la survenue des inhibiteurs dirigés contre le facteur VIII rendant le traitement substitutif inefficace.

Notre étude, est la deuxième qui met le point sur le développement des inhibiteurs chez les hémophiles A au Maroc, étudie sa prévalence avec discussion et suivie de certains patients.

Matériel et méthodes : dépistage des inhibiteurs à l'aide de la méthode de Nijmegen chez 73 hémophiles type A durant la période d'étude de 35mois : Du 01/04/2014 au 01/03/2017. On a inclus tous les patients 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 Hospitalier Ibn Sina (CHIS)

Résultats : 28 cas sur 73 hémophiles A ont présenté des inhibiteurs soit 38% des cas. 65% de ces patients ont développés des inhibiteurs forts répondeurs et 35% des inhibiteurs faibles répondeurs, avec un pourcentage d'inhibition variable de 29, % à 99% %.

Discussion : Les résultats obtenus ressemblent en grande partie à beaucoup d'études internationales (RODIN et FranceCoag). Notre étude est une mesure de prévalence des inhibiteurs anti FVIII au Maroc, qu'il faut la compléter par une analyse approfondie de différents facteurs de risques amenant à la survenue de cette complication.

SUMMARY

Title: Titration of anti-factor VIII inhibitors in hemophilia A: about 28 cases
Autor: El AISSAOUI Yousra
Key words: Hymophilia A, Anti-Factor VIII Antibody, Nijmegen Method

Introduction: The hemophilia A is a constitutional hemorrhagic disease of recessive transmission linked to X chromosome. The biological diagnosis is based on prolongation of TCA with factor VIII deficiency. Replacement therapy with the missing factor is the only option in strategies of preventive and curative treatment.
Nevertheless, the most dangerous complication of this treatment is the occurrence of inhibitors directed against factor VIII rendering the replacement treatment ineffective.
Our study is the second one that focuses on the development of inhibitors in hemophilia A in Morocco, studies its prevalence with discussion and following some patients.
Materials and methods: detection of inhibitors using the Nijmegen method in 73 hemophiliacs type A during the study period of 35 months: From 01/04/2014 to 01/03/2017. All patients who received a factor VIII assay with inhibition rate and anti-factor VIII assay were included in the hematology laboratory of the Ibn Sina Hospital Center (CHIS).
Results: 28 out of 73 patients with hemophilia A presented with inhibitors, i.e. 38% of cases. 65% of these patients developed strong responder inhibitors and 35% of low responder inhibitors, with a variable inhibition percentage of 29% to 99%.
Discussion: The results obtained are largely similar to many international studies (RODIN and FranceCoag). Our study is a measure of the prevalence of anti FVIII inhibitors in Morocco, which must be supplemented by a depth analysis of various risk factors leading to the occurrence of this complication.

ملخص

العنوان: معايرة مثبطات العامل VIII في الناعورأ، دراسة 28 حالة.

الكاتبة: العيساوي يسرا

الكلمات الأساسية: الناعور أ، مثبطات عامل الثختر VIII ، طريقةNijmegen

مقدمة: الناعورأ هو مرض نزفي وراثي متنحي مرتبط بـالكروموزوم X ,التشخيص البيولوجي هو إطالة لTCA مع نقص عامل التخثر الثامن . يتم العلاج البديل عن طريق حقن العامل المفقود الذي يبقى الخيار الوحيد في الإستراتيجيات الوقائية والعلاجية .ومع ذلك، فإن أخطر مضاعفات هذا العلاج هو حدوث مثبطات موجهة ضد عامل التخثر الثامن مما يجعل العلاج البديل غير فعال.

دراستنا ، هي الدراسة الثانية التي تركز على تكون مثبطات في الناعور أ في المغرب ، وتدرس انتشاره مع مناقشة وتتبع حالات بعض من المرضى.

الآليات و الأساليب: اكتشافنا مثبطات عامل التخثر الثامن باستخدام طريقة Nijmegen لدى 73 مصاب بالناعور أ خلال فترة 35 شهرا من الدراسة: من 2014/04/01 إلى 2017/03/01. جميع المرضى الذين حصلوا على فحص ومقايسة عامل التخثر الثامن مع معدل تثبيط أدرجوا في مختبر أمراض الدم في مركز مستشفى ابن سينا.

النتائج: 28 من أصل 73 مرضى الناعور أ يعانون من مثبطات عامل التخثر الثامن، أي 38 ٪ من الحالات. 65٪ من هؤلاء المرضى طوروا مثبطات قوية الاستجابة و 35٪ طوروا مثبطات ضعيفة الاستجابة ، مع نسبة تثبيط مختلفة من 29٪ إلى 99٪.

المناقشة: النتائج التي تم الحصول عليها مشابهة إلى حد كبير للعديد من الدراسات الدولية (FranceCoagو .RODIN) دراستنا هي مقياس لانتشار مثبطات عامل التخثر الثامن في المغرب ، والتي يجب أن تستكمل بتحليل متعمق لعوامل الخطر المختلفة التي تؤدي إلى حدوث هذا النوع من المضاعفات.

REFERENCES

1. Goudemand, J., Les anticorps anti-facteur VIII chez l'hémophile. Hématologie, 2001. **Volume 7 (3)**: p. 170-83.
2. Sampol J, A.D., Boutière B. , Manuel d'hémostase, ed. Paris : Éditions Scientifiques et Médicales Elsevier. 1995.
3. Wiesel., D.M.-L. and Hémophilie : diagnostic, génétique, complications et traitement. Maladies du Sang et Transfusion. Item 339, 2006.
4. Nathan N., J.A. and Trouble de l'hémostase aux urgence. EMC. (Elsevier Masson SAS, Paris), Médecine d'urgence, 25-080-A-20., 2007.
5. Delahousse, B., Diagnostic Biologique d'un inhibiteur (acquis) d'un facteur de coagulation, cours DES 2012
6. Biggs, R. and E. Bidwell, A method for the study of antihaemophilic globulin inhibitors with reference to six cases.British journal of haematology, 1959. **5**(4): p. 379-395.
7. (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.
8. Biggs, R., et al., The mode of action of antibodies which destroy factor VIII. British journal of haematology, 1972. **23**(2): p. 137-155.
9. Rizza, C. and R. Biggs, The Treatment of Patients who have Factor-VIII Antibodies. British journal of haematology, 1973. **24**(1): p. 65-82.
10. Kasper, C., et al., Proceedings: A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. Thrombosis et diathesis haemorrhagica, 1975. **34**(2): p. 612.

11. Allain, J.-P. and D. Frommel, Antibodies to factor VIII. I. Variations in stability of antigen-antibody complexes in hemophilia A. Blood, 1973. **42**(3): p. 437-444.
12. 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.
13. Verbruggen, H., et al., The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII: C inhibitors: improved specificity and reliability. 1995.
14. Giles, A.R., et al., A detailed comparison of the performance of the standard versus the Nijmegen modification of the Bethesda assay in detecting factor VIII: C inhibitors in the haemophilia A population of Canada. Thrombosis and haemostasis, 1998. **80**(04): p. 872-875.
15. Verbruggen, B., et al., The type of factor VIII deficient plasma used influences the performance of the Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII inhibitors. Thrombosis and haemostasis, 2001. **85**(06): p. 1435-1439.
16. Verbruggen, B., et al., A 4% solution of bovine serum albumin may be used in place of factor VIII: C deficient plasma in the control sample in the Nijmegen Modification of the Bethesda factor VIII: C inhibitor assay. Thrombosis and haemostasis, 2002. **88**(02): p. 362-364.
17. Reber, G., et al., Inter-laboratory variability of the measurement of low titer factor VIII: C inhibitor in haemophiliacs: improvement by the Nijmegen modification of the Bethesda assay and the use of common lyophilized plasmas. Haemophilia: the official journal of the World Federation of Hemophilia, 1999. **5**(4): p. 292.

18. Lebreton, A. and G. Lavigne, Les anticorps anti-FVIII et anti-FIX. Revue francophone des laboratoires, 2012. **2012**(443): p. 55-62.
19. ASMAE, E.A., aspect clinico-biologique, thérapeutique et évolutif de l'hémophilie chez l'enfant (à propos de 37 cas). 2015, UNIVERCITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE FEZ
20. T. de revel , K.d., Physiologie de l'hémostase, in Encyclopédie médico-chirurgicale. 2004.
21. Hillman, R.S., K.A. Ault, and H.M. Rinder, Hématologie en pratique clinique: guide de diagnostic et de traitement. 2007: Médecine-Sciences Flammarion.
22. N. Nathan, A.J., Trouble de l hémostase aux urgences. Elsevier Masson SAS, Paris, 2007.
23. Schved, J., Hémophilie: physiopathologie et bases moléculaires.Elsevier Masson SAS, Paris, 2008.
24. Butenas, S., C. van't Veer, and K.G. Mann, "Normal" thrombin generation. Blood, 1999. **94**(7): p. 2169-2178.
25. Mann, K.G., Biochemistry and physiology of blood coagulation. Thrombosis and haemostasis, 1999. **82**(2): p. 165-174.
26. Scheved JF, G.-b.M., Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor: from fundamental to clinic. pathophysiological, clinical and laboratory aspects of thromboembolic disease. Proceedings of the 8th advanced teaching course of the european Thrombosis Research Organization 2001: p. P. 81-6.

27. Sandra, L.Q., LE FACTEUR VIII PORCIN RECOMBINANT CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS D'HEMOPHILIE A AVEC INHIBITEURS.2014.
28. Gitschier, J., et al., Characterization of the human factor VIII gene. Nature, 1984. **312**(5992): p. 326-330.
29. Wion, K.L., et al., Distribution of factor VIII mRNA and antigen in human liver and other tissues. Nature, 1985. **317**(6039): p. 726-729.
30. Hollestelle, M.J., et al., Tissue distribution of factor VIII gene expression in vivo-a closer look. Thrombosis and haemostasis, 2001. **86**(3): p. 855-861.
31. Jacquemin, M., et al., FVIII production by human lung microvascular endothelial cells.Blood, 2006. **108**(2): p. 515-517.
32. Zizi, F.Z., Dépistage des inhibiteurs dans l'hémophilie: étude rétrospective à propos de 121 cas. 2010.
33. Lapalud, P., et al., Les anticorps anti-FVIII: caractérisation, mécanismes d'action et méthodes de détection.Hématologie, 2008. **14**(6): p. 453-466.
34. Toole, J.J., et al., Molecular cloning of a cDNA encoding human antihaemophilic factor. Nature, 1984. **312**(5992): p. 342-347.
35. Saenko, E.L., et al., Factor VIII–novel insights into form and function. British journal of haematology, 2002. **119**(2): p. 323-331.
36. Peake, I., The molecular basis of haemophilia A. Haemophilia: the official journal of the World Federation of Hemophilia, 1998. **4**(4): p. 346-349.
37. Lenting, P., O. Christophe, and P. Gueguen, The disappearing act of factor VIII. Haemophilia, 2010. **16**(102): p. 6-15.

38. Wakabayashi, H., et al., Metal ion-independent association of factor VIII subunits and the roles of calcium and copper ions for cofactor activity and inter-subunit affinity. Biochemistry, 2001. **40**(34): p. 10293-10300.
39. Wakabayashi, H., K.M. Schmidt, and P.J. Fay, Ca2+ binding to both the heavy and light chains of factor VIII is required for cofactor activity. Biochemistry, 2002. **41**(26): p. 8485-8492.
40. Venkateswarlu, D., Structural investigation of zymogenic and activated forms of human blood coagulation factor VIII: a computational molecular dynamics study. BMC structural biology, 2010. **10**(1): p. 7.
41. Lollar, P., C.G. Parker, and R.P. Tracy, Molecular characterization of commercial porcine factor VIII concentrate. Blood, 1988. **71**(1): p. 137-143.
42. Leyte, A., et al., The interaction between human blood-coagulation factor VIII and von Willebrand factor. Characterization of a high-affinity binding site on factor VIII. Biochemical Journal, 1989. **257**(3): p. 679-683.
43. Lenting, P., et al., Identification of a binding site for blood coagulation factor IXa on the light chain of human factor VIII. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(10): p. 7150-7155.
44. Nesheim, M., et al., The effect of plasma von Willebrand factor on the binding of human factor VIII to thrombin-activated human platelets. Journal of Biological Chemistry, 1991. **266**(27): p. 17815-17820.
45. Weiss, H.J., I.I. Sussman, and L.W. Hoyer, Stabilization of factor VIII in plasma by the von Willebrand factor: studies on posttransfusion and dissociated factor VIII and in patients with von Willebrand's disease. Journal of Clinical Investigation, 1977. **60**(2): p. 390.

46. Fay, P.J., T. Smudzin, and F. Walker, Activated protein C-catalyzed inactivation of human factor VIII and factor VIIIa. Identification of cleavage sites and correlation of proteolysis with cofactor activity. Journal of Biological Chemistry, 1991. **266**(30): p. 20139-20145.
47. KOEDAM, J.A., et al., The effect of von Willebrand factor on activation of factor VIII by factor Xa. The FEBS Journal, 1990. **189**(2): p. 229-234.
48. Lenting, P.J., et al., The light chain of factor VIII comprises a binding site for low density lipoprotein receptor-related protein. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(34): p. 23734-23739.
49. Dasgupta, S., et al., VWF protects FVIII from endocytosis by dendritic cells and subsequent presentation to immune effectors. Blood, 2007. **109**(2): p. 610-612.
50. 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.
51. 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.
52. 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.
53. 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.

54. Pittman, D.D. and R.J. Kaufman, Proteolytic requirements for thrombin activation of anti-hemophilic factor (factor VIII). Proceedings of the National Academy of Sciences, 1988. **85**(8): p. 2429-2433.
55. Fay, P.J., M. Mastri, and M.E. Koszelak, Factor VIIIa cofactor activity shows enhanced ionic strength sensitivity in the absence of phospholipid. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 2001. **1548**(1): p. 159-168.
56. Varfaj, F., H. Wakabayashi, and P.J. Fay, Residues surrounding Arg336 and Arg562 contribute to the disparate rates of proteolysis of factor VIIIa catalyzed by activated protein C. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(28): p. 20264-20272.
57. Fay, P.J., et al., Model for the Factor VIIIa-dependent Decay of the Intrinsic Factor Xase role of subunit dissociation and factor IXa-catalyzed proteolysis. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(11): p. 6027-6032.
58. Nogami, K., H. Wakabayashi, and P.J. Fay, Mechanisms of factor Xa-catalyzed cleavage of the factor VIIIa A1 subunit resulting in cofactor inactivation. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(19): p. 16502-16509.
59. Shen, L. and B. Dahlbäck, Factor V and protein S as synergistic cofactors to activated protein C in degradation of factor VIIIa. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(29): p. 18735-18738.
60. Saenko, E.L., et al., Role of the low density lipoprotein-related protein receptor in mediation of factor VIII catabolism. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(53): p. 37685-37692.

61. Vormittag, R., et al., Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 polymorphism 663 C> T affects clotting factor VIII activity and increases the risk of venous thromboembolism. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2007. **5**(3): p. 497-502.
62. Cunningham, N., et al., Low-density lipoprotein receptor-related protein polymorphisms in patients with elevated factor VIII coagulant activity and venous thrombosis. Blood coagulation & fibrinolysis, 2005. **16**(7): p. 465-468.
63. Bolton-Maggs, P.H. and K.J. Pasi, Haemophilias a and b. The lancet, 2003. **361**(9371): p. 1801-1809.
64. Peyvandi, F., et al., Rare bleeding disorders. Haemophilia, 2012. **18**(s4): p. 148-153.
65. l'hémophilie, F.m.d., Hémophilie en images. 2005.
66. AISSOUF Siham, M.F., ÉTUDE ÉPIDÉMIOLOGIQUE DE L'HÉMOPHILIE AU CHU TLEMCEN. . 2013, UNIVERSITE ABOLJ BEKR BELKAÎD FACULTE DE MEDECINE DR. B. BENZERDJEB - TLEMCEN
67. TOBELEM, L.J.P.G.S.M.G.M.C., Hémostase et thrombose-4e Ed. . Simarre Ed. JOUE LES TOURS., 1994.
68. Guérois, C., L'hémophilie aujourd'hui: hemophilia today. Kinésithérapie, la revue, 2009. **9**(88): p. 32-36.
69. R, Y., Troubles de la coagulation et de l'hémostase -Chapitre 25. Risques médicaux au cabinet dentaire en pratique quotidienne. 2010.
70. Pr Jenny G, P.Y.L., Association Française des Conseillers en Génétique,Association Française des Hémophiles. L'hémophilie A et B., in ncyclopédie Orphanet Grand Public. 2006.

71. Gazengel, C., C. Rothschild, and M.-F. Torchet, Apport des nouvelles technologies au traitement substitutif des hémophilies. Revue Francaise des Laboratoires, 1995. **1995**(275): p. 121-125.
72. Sébastien L, C.H., La prise en charge des hémarthroses chez les patients hémophiles. Partie 1: pathophysiologie et diagnostic. Partie 2: Traitement. Ortho-20 Rhumato, 2012. **VOL 10, N°1-2,**.
73. Alcalay, M. and A. Deplas, Prise en charge rhumatologique de l'hémophilie (première partie: manifestations articulaires). Revue du rhumatisme, 2002. **69**(9): p. 868-876.
74. Dossier du CNHIM (Centre National -Algérien- Hospitalier d'Information sur le Médicament).Facteurs antihémophiliques: traitement substitutif de l'hémophilie A et B, Évaluation clinique, Évaluation pharmaco-économique, Évaluation Thérapeutique. Revue d'évaluation sur le médicament. , 2003. **XXIV**: p. 3-4.
75. J., G., Le Mannuel du Résident, Hématologie Il, chap Hémophilie, 13-021-B-10. 1997: Elsevier Masson SAS.
76. G., L.J.P.G.S.M.G.M.C.T., Hémostase et thrombose-4e Ed. . Simarre Ed. JOUE LES TOURS., 1994.
77. Lévy J-P, V.J.-P.B.C.F.L.f.A.B.M.-C.G.P.p.l.P.J. and Bernar, Hématologie et Transfusion. P. Édition masson ISBN 2-294-00995-0 PARIS ed. 2001.
78. N, C., Le traitement de l'hémophilie : des dérivés du plasma à la thérapie génique, Hématologie. . Vol. Volume 2, Numéro 1, . Janvier - Février 1996. .
79. F.A., M., FVIII anti hémophilique A. 90-20-0045. . 2004.

80. Mann, K.G., Thrombin formation. CHEST Journal, 2003. **124**(3_suppl): p. 4S-10S.
81. Fay, P.J., Activation of factor VIII and mechanisms of cofactor action. Blood reviews, 2004. **18**(1): p. 1-15.
82. Tripodi, A. and P.M. Mannucci, Factor VIII activity as measured by an amidolytic assay compared with a one-stage clotting assay.American journal of clinical pathology, 1986. **86**(3): p. 341-344.
83. Dossier du CNHIM (Centre National Hospitalier d'Information sur le Médicament). Facteurs antihémophiliques: traitement substitutif de l'hémophilie A et B, Évaluation clinique, Évaluation pharmaco-économique, Évaluation Thérapeutique. Revue d'évaluation sur le médicament. Publication Juin-juillet 2003, XXIV, 3-4.
84. R., Y., Troubles de la coagulation et de l'hémostase Risques médicaux au cabinet dentaire en pratique quotidienne. Vol. -Chapitre 25. 2010. Pages 367-395.
85. S., G., Hématologie Clinique et Biologique. CHU Nord-Marseille Arnette..
86. Pr Jenny G, P.Y.L., Association Française des Conseillers en Génétique, Association Française des Hémophiles. L'hémophilie A et B in Encyclopédie Orphanet Grand piblic. 2006.
87. Sébastien L, C.H., La prise en charge des hémarthroses chez les patients hémophiles. Partie 1: pathophysiologie et diagnostic. Partie 2: Traitement. Ortho-20 Rhumato. Vol. VOL 10, N°1-2. 2012.
88. J., G., L'hémophilie. Fédération mondiale de l'hémophilie. L'histoire de l'hémophilie. http://www.wffi.orgin Encyclopédie Orphanet Grand Public. 2006.

89. Lacroix-Desmazes, S., et al., Activité hydrolytique des anticorps anti-F VIII inhibiteurs chez les patients hémophiles A. Hématologie, 2003. **8**(6): p. 422-6.
90. BASSA., M.M.h., Diagnostic biologique de l'hémophilie:Enquête prospective à propos de 124 cas. 2009.
91. Wiesel., D.M.-L., Hémophilie : diagnostic, génétique, complications et traitement. Maladies du Sang et Transfusion. 2006. p. Item 339
92. ChristineVinciguerra., ChristineVinciguerra. Laboratoire hémostase, Hopital Edouard Herriot. BASES MOLECULAIRES DES HEMOPHILIES, 2008. . 2008.
93. 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.
94. Bagnall, R.D., et al., Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. Blood, 2002. **99**(1): p. 168-174.
95. Esther M, B.B., Recommandations pour le traitement de l'hémophilie. , in Schweizerische Hàmophilie-Gesellschaft. L'Association Suisse des Hémophiles (Società Svizzera Emofilia Siège social A.S.H). 2012. .
96. G., J., Hémophilie. Hématologie 2007. **[13-021-B-10]**
97. W., M.-L., Maladies du Sang et Transfusion.
98. É., C., diagnostic étiologique /pratique. 2009: Communication de Gilles Grateau, lors des Journées Internationales de Biologie, Paris.
99. S., S., The immunologic character of acquired inhibitors of antihemophilic globutin (Factor VIII) and the kinetics of their interaction with factor VIII. J Clin lnvest 1967: p. 147-56.

100. RICKARD, K.A., Guidelines for therapy and optimal dosages of coagulation factors for treatment of bleeding and surgery in haemophilia. Haemophilia, 1995. **1**(S1): p. 8-13.
101. Brinkhous, K.M., et al., A new high-potency glycine-precipitated antihemophilic factor (AHF) concentrate: treatment of classical hemophilia and hemophilia with inhibitors. Jama, 1968. **205**(9): p. 613-617.
102. Webster, W.P., et al., Clinical use of a new glycine-precipitated antihemophilic fraction. The American journal of the medical sciences, 1965. **250**(6): p. 643-651.
103. Evatt, B., The tragic history of AIDS in the hemophilia population, 1982–1984. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2006. **4**(11): p. 2295-2301.
104. Schwartz, R.S., et al., Human recombinant DNA–derived antihemophilic factor (factor VIII) in the treatment of hemophilia A. New England Journal of Medicine, 1990. **323**(26): p. 1800-1805.
105. santé, A.f.d.s.s.d.p.d., Développement des inhibiteurs et prise en charge chez les patients hémophiles traités par facteur VIII ou IX d'origine plasmatique ou recombinante. Saint Denis: AFSSAPS; 2006.
106. Chambost, H., et al., Actualité sur le risque de survenue d'inhibiteur à l'initiation du traitement par concentré de facteur VIII dans l'hémophilie A sévère.Revue d'Oncologie Hématologie Pédiatrique, 2015. **3**(2): p. 78-87.
107. White GC, R.I., Aledort F, Lusher LM, Rothschild JM, Ingerslev CJ., Definitions in hemophilia: recommendation of the Scientific Subcommittee on factor VIII and factor IX of the Scientific and

Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Thromb Haemost, 2001. **85**: p. 560.

108. Hay, C.R. and D.M. DiMichele, The principal results of the International Immune Tolerance Study: a randomized dose comparison. Blood, 2012. **119**(6): p. 1335-1344.
109. Laros-van Gorkom, B.A.P., C. Falaise, and J. Astermark, Immunosuppressive agents in the treatment of inhibitors in congenital haemophilia A and B–a systematic literature review. European Journal of Haematology, 2014. **93**(s76): p. 26-38.
110. Gilles, J., et al., Anti-factor VIII antibodies of hemophiliac patients are frequently directed towards nonfunctional determinants and do not exhibit isotypic restriction. Blood, 1993. **82**(8): p. 2452-2461.
111. Lebreton, A., et al., Prevalence and epitope specificity of non-neutralising antibodies in a large cohort of haemophilia A patients without inhibitors. Thrombosis and haemostasis, 2011. **105**(6): p. 954-961.
112. Lloyd Jones, M., et al., Control of bleeding in patients with haemophilia A with inhibitors: a systematic review. Haemophilia, 2003. **9**(4): p. 464-520.
113. D., L., The molecular basis of haemophilia B. Haemoph Off J World Fed Hemoph 4(4):350–7, 1998.
114. Boekhorst, J., et al., Factor VIII genotype and inhibitor development in patients with haemophilia A: highest risk in patients with splice site mutations. Haemophilia, 2008. **14**(4): p. 729-735.
115. Gill, J.C., The role of genetics in inhibitor formation. Thrombosis and haemostasis, 1999. **82**(2): p. 500-504.

116. Goodeve, A.C. and I.R. Peake. The molecular basis of hemophilia A: genotype-phenotype relationships and inhibitor development. in Seminars in thrombosis and hemostasis. 2003. Copyright© 2003 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA. Tel.:+ 1 (212) 584-4662.
117. Gouw, S.C., et al., F8 gene mutation type and inhibitor development in patients with severe hemophilia A: systematic review and meta-analysis. Blood, 2012: p. blood-2011-09-379453.
118. Goudemand, J., et al., Influence of the type of factor VIII concentrate on the incidence of factor VIII inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A. Blood, 2006. **107**(1): p. 46-51.
119. Viel, K.R., et al., Inhibitors of factor VIII in black patients with hemophilia. New England Journal of Medicine, 2009. **360**(16): p. 1618-1627.
120. Lochan, A., et al., Genetic factors influencing inhibitor development in a cohort of South African haemophilia A patients. Haemophilia, 2014. **20**(5): p. 687-692.
121. Oldenburg, J., et al., HLA genotype of patients with severe haemophilia A due to intron 22 inversion with and without inhibitors of factor VIII. Thrombosis and haemostasis, 1997. **77**(2): p. 238-242.
122. Hay, C., et al., HLA class II profile: a weak determinant of factor VIII inhibitor development in severe haemophilia A. UKHCDO Inhibitor Working Party. Thrombosis and haemostasis, 1997. **77**(2): p. 234-237.
123. Astermark, J., et al., Polymorphisms in the IL10 but not in the IL1beta and IL4 genes are associated with inhibitor development in patients with hemophilia A. Blood, 2006. **107**(8): p. 3167-3172.

124. Astermark, J., et al., Polymorphisms in the CTLA-4 gene and inhibitor development in patients with severe hemophilia A. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2007. **5**(2): p. 263-265.
125. Lorenzo, J.I., et al., Incidence of factor VIII inhibitors in severe haemophilia: the importance of patient age. British journal of haematology, 2001. **113**(3): p. 600-603.
126. van der Bom, J.G., et al., Age at first treatment and immune tolerance to factor VIII in severe hemophilia. Thrombosis and haemostasis, 2003. **89**(3): p. 475-479.
127. Chalmers, E., et al., Early factor VIII exposure and subsequent inhibitor development in children with severe haemophilia A. Haemophilia, 2007. **13**(2): p. 149-155.
128. Gouw, S.C., J.G. van der Bom, and H.M. Van Den Berg, Treatment-related risk factors of inhibitor development in previously untreated patients with hemophilia A: the CANAL cohort study. Blood, 2007. **109**(11): p. 4648-4654.
129. Gouw, S., et al., Treatment characteristics and the risk of inhibitor development: a multicenter cohort study among previously untreated patients with severe hemophilia A. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2007. **5**(7): p. 1383-1390.
130. Gouw, S., et al., PedNet and Research of Determinants of INhibitor development (RODIN) Study Group. Intensity of factor VIII treatment and inhibitor development in children with severe hemophilia A: the RODIN study. Blood, 2013. **121**(20): p. 4046-4055.
131. Gallucci, S. and P. Matzinger, Danger signals: SOS to the immune system. Current opinion in immunology, 2001. **13**(1): p. 114-119.

132. Rivard, G., et al., Can activated recombinant factor VII be used to postpone the exposure of infants to factor VIII until after 2 years of age? Haemophilia, 2005. **11**(4): p. 335-339.
133. Santagostino, E., et al., Environmental risk factors for inhibitor development in children with haemophilia A: a case–control study. British journal of haematology, 2005. **130**(3): p. 422-427.
134. Peerlinck, K., et al., Factor VIII inhibitors in previously treated haemophilia A patients with a double virus-inactivated plasma derived factor VIII concentrate. Thrombosis and haemostasis, 1997. **77**(1): p. 80-86.
135. Iorio, A., et al., Rate of inhibitor development in previously untreated hemophilia A patients treated with plasma-derived or recombinant factor VIII concentrates: a systematic review. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2010. **8**(6): p. 1256-1265.
136. Scharrer, I., G. Bray, and O. Neutzling, Incidence of inhibitors in haemophilia A patientsa review of recent studies of recombinant and plasma-derived factor VIII concentrates. Haemophilia, 1999. **5**: p. 145-154.
137. Wight, J. and S. Paisley, The epidemiology of inhibitors in haemophilia A: a systematic review. Haemophilia, 2003. **9**(4): p. 418-435.
138. Gouw, S.C., et al., Factor VIII products and inhibitor development in severe hemophilia A. New England Journal of Medicine, 2013. **368**(3): p. 231-239.
139. Yee, T., et al., Absence of inhibitors in previously untreated patients with severe haemophilia A after exposure to a single intermediate purity factor VIII product. Thrombosis and haemostasis, 1997. **78**(3): p. 1027-1029.

140. Gouw, S.C., et al., Recombinant versus plasma-derived factor VIII products and the development of inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A: the CANAL cohort study. Blood, 2007. **109**(11): p. 4693-4697.
141. Algiman, M., et al., Natural antibodies to factor VIII (anti-hemophilic factor) in healthy individuals. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992. **89**(9): p. 3795-3799.
142. Shapiro, S.S., The immunologic character of acquired inhibitors of antihemophilic globulin (factor VIII) and the kinetics of their interaction with factor VIII. Journal of Clinical Investigation, 1967. **46**(2): p. 147.
143. Aalberse, R.C., R. Van der Gaag, and J. Van Leeuwen, Serologic aspects of IgG4 antibodies. I. Prolonged immunization results in an IgG4-restricted response. The Journal of Immunology, 1983. **130**(2): p. 722-726.
144. Healey, J., et al., The humoral response to human factor VIII in hemophilia A mice. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2007. **5**(3): p. 512-519.
145. van Helden, P.M., et al., IgG subclasses of anti-FVIII antibodies during immune tolerance induction in patients with hemophilia A. British journal of haematology, 2008. **142**(4): p. 644-652.
146. Gawryl, M.S. and L.W. Hoyer, Inactivation of factor VIII coagulant activity by two different types of human antibodies. Blood, 1982. **60**(5): p. 1103-1109.
147. Jacquemin, M., et al., A human antibody directed to the factor VIII C1 domain inhibits factor VIII cofactor activity and binding to von Willebrand factor. Blood, 2000. **95**(1): p. 156-163.

148. Peerlinck, K., et al., Antifactor VIII antibody inhibiting allogeneic but not autologous factor VIII in patients with mild hemophilia A. Blood, 1999. **93**(7): p. 2267-2273.
149. Peerlinck, K., et al., A higher than expected incidence of factor VIII inhibitors in multitransfused haemophilia A patients treated with an intermediate purity pasteurized factor VIII concentrate. THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS-STUTTGART-, 1993. **69**: p. 115-115.
150. Lee, C., et al., The natural history of the immune response to exogenous factor VIII in severe haemophilia A. Haemophilia, 1998. **4**(4): p. 546-551.
151. Scandella, D., Human Anti-Factor VIII Antibodies: Epitope Localization and Inhibitory Function. Vox sanguinis, 1996. **70**(s1): p. 9-14.
152. Fay, P.J., K. Koshibu, and M. Mastri, The A1 and A2 subunits of factor VIIIa synergistically stimulate factor IXa catalytic activity. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(22): p. 15401-15406.
153. Scandella, D., Epitope specificity and inactivation mechanisms of factor VIII inhibitor antibodies. Vox sanguinis, 1999. **77**(Suppl. 1): p. 17-20.
154. Healey, J.F., et al., Residues 484-508 contain a major determinant of the inhibitory epitope in the A2 domain of human factor VIII. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(24): p. 14505-14509.
155. Foster, P.A., et al., 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, 1988. **82**(1): p. 123.
156. Lubahn, B., et al., Identification of a F. VIII epitope recognized by a human hemophilic inhibitor. Blood, 1989. **73**(2): p. 497-499.

157. Saenko, E.L., et al., A role for the C2 domain of factor VIII in binding to von Willebrand factor. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(15): p. 11601-11605.
158. Jacquemin, M.G., et al., Mechanism and kinetics of factor VIII inactivation: study with an IgG4 monoclonal antibody derived from a hemophilia A patient with inhibitor. Blood, 1998. **92**(2): p. 496-506.
159. Spiegel, P.C., et al., Structure of a factor VIII C2 domain–immunoglobulin G4κ Fab complex: identification of an inhibitory antibody epitope on the surface of factor VIII. Blood, 2001. **98**(1): p. 13-19.
160. Nogami, K., et al., Relationship between the binding sites for von Willebrand factor, phospholipid, and human factor VIII C2 inhibitor alloantibodies within the factor VIII C2 domain. International journal of hematology, 2007. **85**(4): p. 317-322.
161. Nogami, K., et al., Identification of a factor VIII peptide, residues 2315–2330, which neutralizes human factor VIII C2 inhibitor alloantibodies: requirement of Cys2326 and Glu2327 for maximum effect. British journal of haematology, 1999. **107**(1): p. 196-203.
162. Scandella, D., et al., 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, 1995. **86**(5): p. 1811-1819.
163. Villard, S., et al., Low molecular weight peptides restore the procoagulant activity of factor VIII in the presence of the potent inhibitor antibody ESH8. Journal of biological chemistry, 2002. **277**(30): p. 27232-27239.

164. Saenko, E.L., et al., Slowed release of thrombin-cleaved factor VIII from von Willebrand factor by a monoclonal and a human antibody is a novel mechanism for factor VIII inhibition. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(44): p. 27424-27431.
165. Saenko, E.L. and D. Scandella, The acidic region of the factor VIII light chain and the C2 domain together form the high affinity binding site for von willebrand factor. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(29): p. 18007-18014.
166. Saenko, E.L., et al., Activation of factor VIII by thrombin increases its affinity for binding to synthetic phospholipid membranes and activated platelets. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(43): p. 27918-27926.
167. Lenting PJ, V.d.L.J., Donath Mish, van Mourik JA, and M. K., the sequence Glu 1811 of human blood coagulation factor VIII comprises a binding site for activated factor IX. . J Biol Chem, 1996. **271**: p. 1935-40.
168. Zhong, D., et al., Some human inhibitor antibodies interfere with factor VIII binding to factor IX. Blood, 1998. **92**(1): p. 136-142.
169. Eaton, D., H. Rodriguez, and G.A. Vehar, Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity. Biochemistry, 1986. **25**(2): p. 505-512.
170. Pittman, D., et al., A2 domain of human recombinant-derived factor VIII is required for procoagulant activity but not for thrombin cleavage. Blood, 1992. **79**(2): p. 389-397.

171. Lapan, K.A. and P.J. Fay, Localization of a factor X interactive site in the A1 subunit of factor VIIIa. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(4): p. 2082-2088.
172. Foster, P.A., et al., A murine monoclonal anti-factor VIII inhibitory antibody and two human factor VIII inhibitors bind to different areas within a twenty amino acid segment of the acidic region of factor VIII heavy chain. Blood Coagulation & Fibrinolysis, 1990. **1**(1): p. 9-16.
173. Hay CRM, L.C., Calvin BT, et al. On behalf of of the UK Haemophilia Centre Directors Organisation and Berntrop E, and F.K. Mauser-Bunschoten EP, Kasper CK, White G, Santagostino E., Factor VIII inhibitors in mild and moderate-severity haemophilia A. . Thromb Haemost, 1998. **79**: p. 762-6.
174. Pauling, L., Nature of forces between large molecules of biological interest. Nature, 1948. **161**(4097): p. 707-709.
175. Kohler G, M.C., Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specifity. . Nature 1975. **256**: p. 495-7.
176. Lacroix-Desmazes, S., et al., Catalytic activity of antibodies against factor VIII in patients with hemophilia A. Nature medicine, 1999. **5**(9): p. 1044-1047.
177. Lacroix-Desmazes, S., et al., Factor VIII inhibitor with catalytic activity towards factor VIII, in Catalytic Antibodies. 2000, Karger Publishers. p. 102-114.
178. Lacroix-Desmazes, S., et al., Catalytic IgG from patients with hemophilia A inactivate therapeutic factor VIII. The Journal of Immunology, 2006. **177**(2): p. 1355-1363.

179. Gilles JG, J.M., Saint-Remy JM. , Factor VIII inhibitors. Thromb Haemost ; 1997. **78**: p. 641-6.
180. Lavigne-Lissalde, G., et al., Molecular characterization of human B domain-specific anti-factor VIII monoclonal antibodies generated in transgenic mice. Thrombosis and haemostasis, 2007. **98**(1): p. 138-147.
181. Kazatchkine, M., et al., Circulating immune complexes containing anti-VIII antibodies in multi-transfused patients with haemophilia A. Clinical and experimental immunology, 1980. **39**(2): p. 315.
182. Gilles, J.G. and J.-M. Saint-Remy, Healthy subjects produce both anti-factor VIII and specific anti-idiotypic antibodies. Journal of Clinical Investigation, 1994. **94**(4): p. 1496.
183. Gilles, J.G., et al., Neutralizing antiidiotypic antibodies to factor VIII inhibitors after desensitization in patients with hemophilia A. Journal of Clinical Investigation, 1996. **97**(6): p. 1382.
184. Sakurai, Y., et al., Association of anti-idiotypic antibodies with immune tolerance induction for the treatment of hemophilia A with inhibitors. haematologica, 2004. **89**(6): p. 696-703.
185. Gilles, J.G.G., et al., In vivo neutralization of a C2 domain–specific human anti–Factor VIII inhibitor by an anti-idiotypic antibody. Blood, 2004. **103**(7): p. 2617-2623.
186. Yada, K., K. Nogami, and M. Shima, Different factor VIII neutralizing effects on anti-factor VIII inhibitor antibodies associated with epitope specificity and von Willebrand factor. British journal of haematology, 2013. **163**(1): p. 104-111.

187. Giles, A.R., et al., A detailed comparison of the performance of the standard versus the Nijmegen modification of the Bethesda assay in detecting factor VIII: C inhibitors in the haemophilia A population of Canada. Thrombosis and haemostasis, 1998. **79**(4): p. 872-875.
188. Pengo, V., et al., Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2009. **7**(10): p. 1737-1740.
189. Blanco, A.N., et al., A chromogenic substrate method for detecting and titrating anti-factor VIII antibodies in the presence of lupus anticoagulant. haematologica, 2002. **87**(3): p. 271-278.
190. 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.
191. Fulcher, C.A., et al., Localization of human factor FVIII inhibitor epitopes to two polypeptide fragments. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1985. **82**(22): p. 7728-7732.
192. Scandella, D., et al., Epitope mapping of human factor VIII inhibitor antibodies by deletion analysis of factor VIII fragments expressed in Escherichia coli. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1988. **85**(16): p. 6152-6156.
193. Lollar, P., E.T. Parker, and P. Fay, Coagulant properties of hybrid human/porcine factor VIII molecules. Journal of Biological Chemistry, 1992. **267**(33): p. 23652-23657.
194. Kopecky, E.-M., et al., Mapping of FVIII inhibitor epitopes using cellulose-bound synthetic peptide arrays. Journal of immunological methods, 2006. **308**(1): p. 90-100.

195. Smith, G.P. and V.A. Petrenko, Phage display. Chemical reviews, 1997. **97**(2): p. 391-410.
196. Lavigne-Lissalde, G., et al., Simultaneous detection and epitope mapping of anti-factor VIII antibodies. Thrombosis and haemostasis, 2008. **99**(6): p. 1090-1096.
197. Lebreton, A., et al., Discontinuous epitopes on the C2 domain of coagulation Factor VIII mapped by computer-designed synthetic peptides. British journal of haematology, 2011. **155**(4): p. 487-497.
198. El Khorassani, M. and N. Benkirane, Anticoagulant circulant antifacteur viii chez l'hemophile A. Médecine du Maghreb, 1999(73).
199. Negrier, C., Y. Dargaud, and J. Bordet, Basic aspects of bypassing agents. Haemophilia, 2006. **12**(s6): p. 48-53.
200. Turecek P, V.K., Gritsch H, Schwarz H. , FEIBA®: mode of action. Haemophilia, 2004. **10**: p. 3-9.
201. Monroe, D.M., et al., Platelet activity of high-dose factor VIIa is independent of tissue factor. British journal of haematology, 1997. **99**(3): p. 542-547.
202. Gabriel, D., et al., Recombinant human factor VIIa (rFVIIa) can activate factor FIX on activated platelets. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2004. **2**(10): p. 1816-1822.
203. Dargaud, Y., et al., Evaluation of the overall haemostatic effect of recombinant factor VIIa by measuring thrombin generation and stability of fibrin clots. Haemophilia, 2011. **17**(6): p. 957-961.
204. Lisman, T., et al., Inhibition of fibrinolysis by recombinant factor VIIa in plasma from patients with severe hemophilia A. Blood, 2002. **99**(1): p. 175-179.

205. santé, A.f.d.s.s.d.p.d., Développement des inhibiteurs et prise en charge chez les patients hémophiles traités par facteur VIII ou IX d'origine plasmatique ou recombinante. Saint Denis: AFSSAPS; . 2006.
206. J., G., Urgences hémorragiques chez l'hémophile. Chap 26. Urgence. 2009.
207. Blatny, J., et al., Traitement de l'hémophilie-Défis actuels et futurs: Rapport basé sur les présentations faites durant le symposium satellite sponsorisé par Bayer Schering Pharma dans le cadre du Consortium Européen sur l'Hémophilie, Septembre 2008–Dublin. La Presse Médicale, 2009. **38**(9): p. H1-H9.
208. G., L.J.P.G.S.M.G.M.C.T., Hémostase et thrombose La Simarre Ed. JOUE LES TOURS.- 4e Ed. ed. 1994.
209. (GREHCO)., G.d.R.e.d.E.d.H.d.C.e.d.l.O., Le traitement de l'hémophilie. 2éme édition. Médecine et Sciences ed. Paris 2002.
210. C, R., Risque hémorragique. Analyses De Laboratoire en Odontostomatologie, 2012,: p. Pages 209-222
211. Brackmann, H., J. Oldenburg, and R. Schwaab, Immune Tolerance for the Treatment of Factor VIII Inhibitors-Twenty Years'‘Bonn Protocol’. Vox sanguinis, 1996. **70**(s1): p. 30-35.
212. Mauser-Bunschoten, E.P., et al., Low-dose immune tolerance induction in hemophilia A patients with inhibitors. Blood, 1995. **86**(3): p. 983-988.
213. Dimichele, D., Inhibitors: resolving diagnostic and therapeutic dilemmas. Haemophilia, 2002. **8**(3): p. 280-287.

214. Damiano, M. and J. Hutter Jr, Immune tolerance for haemophilia patients with inhibitors: analysis of the western United States experience. The Tri-Regional Nursing Group. Haemophilia: the official journal of the World Federation of Hemophilia, 2000. **6**(5): p. 526-532.
215. Lusher, J.M., Inhibitors in young boys with haemophilia. Best Practice & Research Clinical Haematology, 2000. **13**(3): p. 457-468.
216. Calvez, T., et al., Recombinant factor VIII products and inhibitor development in previously untreated boys with severe hemophilia A. Blood, 2014. **124**(23): p. 3398-3408.
217. Collins, P.W., et al., Factor VIII brand and the incidence of factor VIII inhibitors in previously untreated UK children with severe haemophilia A, 2000-2011. Blood, 2014: p. blood-2014-07-580498.
218. Fischer, K., et al., Inhibitor development in haemophilia according to concentrate Four-year results from the European HAemophilia Safety Surveillance (EUHASS) project. Thrombosis and haemostasis, 2015. **113**(5): p. 968-975.
219. Darby, S.C., et al., The incidence of factor VIII and factor IX inhibitors in the hemophilia population of the UK and their effect on subsequent mortality, 1977–99.Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2004. **2**(7): p. 1047-1054.
220. Goudemand, J., Evaluation de l'incidence de survenue des inhibiteurs anti-facteur VIII dans l'hémophilie. Sang Thrombose Vaisseaux, 2001. **13**(3): p. 31-7.
221. Pahl, S., et al., In vitro characterization of recombinant factor VIII concentrates reveals significant differences in protein content, activity and thrombin activation profile.Haemophilia, 2013. **19**(3): p. 392-398.

222. Hay, C.R., et al., The diagnosis and management of factor VIII and IX inhibitors: a guideline from the United Kingdom Haemophilia Centre Doctors Organisation. British journal of haematology, 2006. **133**(6): p. 591-605.
223. Kreuz, W., et al., Full-length sucrose-formulated recombinant factor VIII for treatment of previously untreated or minimally treated young children with severe haemophilia A. Thrombosis and haemostasis, 2005. **93**(03): p. 457-467.

Serment de Galien

Je jure en présence des maîtres de cette faculté :

- *D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaisse en restant fidèle à leur renseignement.*
- *D'exercer ma profession avec conscience, dans l'intérêt de la santé public, sans jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humain.*
- *D'être fidèle dans l'exercice de la pharmacie à la législation en vigueur, aux règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- *De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession, de ne jamais consentir à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.*
- *Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses, que je sois méprisé de mes confrères si je manquais à mes engagements.*

جامعة محمد الخامس
كلية الطب والصيدلة
— الرباط —
قسم الصيدلي

بسم الله الرحمان الرحيم

أقسم بالله العظيم

- أن أراقب الله في مهنتي
- أن أبجل أساتذتي الذين تعلمت على أيديهم مبادئ مهنتي وأعترف لهم بالجميل وأبقى دوما وفيا لتعاليمهم.
- أن أزاول مهنتي بوازع من ضميري لما فيه صالح الصحة العمومية، وأن لا أقصر أبدا في مسؤوليتي وواجباتي تجاه المريض وكرامته الإنسانية.
- أن ألتزم أثناء ممارستي للصيدلة بالقوانين المعمول بها وبأدب السلوك والشرف، وكذا بالاستقامة والترفع.
- أن لا أفشي الأسرار التي قد تعهد إلى أو التي قد أطلع عليها أثناء القيام بمهامي، وأن لا أوافق على استعمال معلوماتي لإفساد الأخلاق أو تشجيع الأعمال الإجرامية.
- لأحظى بتقدير الناس إن أنا تقيدت بعهودي، أو أحتقر من طرف زملائي إن أنا لم أف بالتزاماتي.

والله على ما أقول شهيد

جامعة محمد الخامس -الرباط
كلية الطب والصيدلة بالرباط

سنـة: 2018 **أطروحة رقم: 85**

معايرة مثبطات العامل VIII في الناعور أ، دراسة 28 حالة.

أطروحة:

قدمت ونوقشت علانية يوم.....

من طرف

الآنسة: العيساوي يسرا

المزدادة في 28 يناير 1991 آسفي

داخلية سابقة و صيدلانية مقيمة بالمركز الإستشفائي إبن سينا بالرباط

لنيل شهادة الدكتوراه في الصيدلة

الكلمات الأساسية: **الناعور أ، مثبطات عامل الثختر VIII ، طريقة Nijmegen .**

تحت إشراف اللجنة المكونة من الأساتذة:

السيدة: سعاد بنكيران أستاذة في علم الأحياء الدقيقة	**رئيسة**
السيد: عز العرب مسرار أستاذ في علم الدم البيولوجي	**مشرف**
السيدة: منى نزيه أستاذة في علم الدم البيولوجي	**أعضاء**
السيد: عبد الله دامي أستاذ في علم الكيمياء الإحيائي	