

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE



MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAÏD DE TLEMCEM
FACULTE DE MEDECINE
DEPARTEMENT DE PHARMACIE

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES POUR L'OBTENTION DU
DIPLOME DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Thème :

**Etude des facteurs de risque d'apparition des Allo-Anticorps
Anti Facteur VIII au cours de l'hémophilie A : à propos
d'une série de cas suivis au CHU Tlemcen**

Présenté par :

Meryem BENDI-HADJI & Ahlem BELLAHCENE

Soutenu le 14/05/2017

Le jury

Président :

Professeur MESLI Naima

Membres :

Professeur BENABADJI Souad

Docteur GUENDOZ Souhila

Encadreur :

Professeur ALLAL TAOULI Katia

Co-encadreur:

Docteur AID Nawel

Année Universitaire : 2016/2017

° ° ° **REMERCIEMENTS** ° ° °

Nous tenons à exprimer toute notre reconnaissance au Pr. Katia Allal Taouli de nous avoir encadré.

Nous adressons nos sincères remerciements à Dr.Nawel Aid de nous avoir guidé durant notre travail avec une disponibilité permanente.

Nous remercions vivement les membres du jury d'avoir accepté de siéger à cette soutenance en leur exprimant notre grand respect et considération.

Nous voudrions présenter nos sincères remerciements à toutes les personnes qui nous ont aidés de près ou de loin durant ce travail de fin de cycle, nous citons particulièrement :

*Nos chers parents, qui ont toujours été là pour nous <<Vous avez tout sacrifié pour vos enfants n'épargnant ni santé ni efforts **nous vous dédions ce mémoire**>>.*

-Dr.Imad charif pour toute son aide.

-Nos frères qui ont été toujours là pour nous.

-Tous nos Ami(e)s pour leur sincère amitié et confiance.

-Nos maris pour leurs encouragements.

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

I. INTRODUCTION.....	6
I.1. Définition.....	6
I.2. Historique.....	7
I.3. Epidémiologie.....	8
II. PROBLEMATIQUE.....	9
III. OBJECTIFS.....	10
IV. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	11
IV.1. L'hémophilie A.....	11
IV.1.1. Gène du FVIII et la protéine correspondante.....	11
IV.1.2. Rôle du facteur dans la coagulation.....	20
IV.1.3. Bases moléculaires du déficit.....	21
IV.1.4. Mode de transmission.....	26
IV.1.5. Formes cliniques.....	27
IV.1.6 Diagnostic biologique.....	29
IV.1.7. Traitement de l'hémophilie.....	34
IV.1.8. Complications du traitement substitutif.....	43
IV.2. Développement d'inhibiteurs.....	44
IV.2.1. Prévalence et facteurs de risque d'apparition des inhibiteurs.....	44
IV.2.2. Mécanisme d'action.....	55
IV.2.3. Méthodes d'étude des inhibiteurs.....	58

IV.2.4. Traitement des inhibiteurs.....	65
IV.2.5. Conduite thérapeutique actuelle.....	66
IV.2.6. Les nouvelles perspectives thérapeutiques.....	69
V. PATIENTS ET METHODES	72
V.1. Patients.....	72
V.2. Matériel.....	73
V.3. Méthodes.....	75
V.3.1. Recueil et traitement des échantillons.....	75
V.3.2. Les tests d'hémostase.....	76
V.3.3. Dosage spécifique du facteur anti-hémophiliques A.....	78
V.3.4. Recherche et titrage d'inhibiteurs anti-facteurs VIII c chez les hémophiles.....	81
V.3.5. Introduction de l'étude génétique de la mutation en cause réalisée en 2013...	85
VI. RESULTATS.....	91
VI.1 Résultats de la recherche des ACC	91
VI.2. Résultats de l'étude moléculaire	95
VII. LES LIMITES DE L'ETUDE.....	95
VIII. DISCUSSION.....	96
IX. CONCLUSION.....	98
X. ANNEXE.....	99
XI. BIBLIOGRAPHIE-SITOGRAFIE.....	101

Liste des abréviations

Ac : Anticorps

ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

FVIII : Facteur VIII

FVIII c: FVIII coagulant

FIX : Facteur IX

FXa : Facteur X activé

fR/FR : faible/fort répondeur

HLA : Human Leukocyte Antigen (Complexe Majeur d'Histocompatibilité)

IC : Intervalle de Confiance

Ig : Immunoglobuline

IITR : International Immune Tolerance Registry

ISTH: International Society on Thrombosis and Haemostasis

ITI : Induction de la Tolérance Immune

IV : Intraveineuse

JCPA (ou CED) : Journées Cumulées en Présence de l'Antigène

Ly : Lymphocytes

MDS : Médicaments Dérivés du Sang

pFVIII : Facteur VIII d'origine plasmatique

PSL: Produits Sanguins Labiles

PTPs : Previously Treated Patients (patients déjà traités)

PUPs : Previously Untreated Patients (patients non préalablement traités)

rFVIIa : Facteur VII activé recombinant

rFVIII : Facteur VIII recombinant

RR : Risque Relatif

SNH : Suivi National des Hémophiles

TCA: Temps de Céphaline Activé

UB: Unité Bethesda

UI: Unités Internationales

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VHC : Virus de l'Hépatite C

vWF : von Willebrand factor (facteur Willebrand)

Liste des tableaux

Tableau 1: Structure/fonction du FVIII.....	15
Tableau 2: Facteurs influençant le risur de développer un inhibiteur.....	53
Tableau 3: Les amorces utilisées pour l'amplification de l'intron 22.....	87
Tableau 4 : Programme d'amplification de la PCR Long Range.....	89
Tableau 5: Résultats de la recherche d'inhibiteurs.....	92
Tableau 6: Résultats de l'étude moléculaire.....	95

Liste des figures

Figure 1: Localisation chromosomique et structure du gène du Facteur VIII.....	12
Figure 2 : Synthèse et sécrétion du FVIII.....	14
Figure 3 : Sites de modifications post-traductionnelles du facteur VIII.....	15
Figure 4 : Structure du FVIIIc.....	16
Figure 5 : Modèle de l'activation ou de l'inactivation du FVIIIc par la thrombine.....	19
Figure 6 : Anomalies moléculaires du gène du FVIIIc, délétions et mutations ponctuelles.....	23
Figure 7: Distribution des mutations ponctuelles sur les différents domaines du FVIII, d'après (Payne et al, 2013).....	24
Figure 8 : Stratégie de l'étude moléculaire de l'hémophilie A.....	33
Figure 9 : Principe de l'analyse du marqueur RFLP Bcl I de l'intron 18 du gène FVIII par la méthode d'amplification enzymatique PCR.....	33
Figure 10 : Mécanismes d'action des inhibiteurs.....	56
Figure 11 : Principe de recherche d'un inhibiteur.....	83
Figure 12 : Courbe semi-logarithmique pour le titrage des inhibiteurs anti FVIIIc.....	84
Figure 13 : Principe de la PCR.....	86
Figure 14 : Profil électrophorétique représentant les résultats attendus.....	90
Figure 15 : Répartition des hémophiles A selon la sévérité.....	91
Figure 16 : Répartition des hémophiles A sévères en fonction de l'âge.....	92
Figure 17 : Répartition des hémophiles A sévères en fonction du développement d'inhibiteurs.....	93
Figure 18 : Expression des résultats et calcul du titre d'inhibiteur.....	94
Figure 19 : Répartition des hémophiles A avec inhibiteurs en fonction du type de répondeur.....	94

I. INTRODUCTION

I.1. Définition

L'hémophilie A est une maladie hémorragique constitutionnelle à transmission récessive liée au sexe, due à une anomalie de la coagulation sanguine en rapport avec un déficit en facteur VIII (F VIII) responsable d'un défaut qualitatif et/ou quantitatif en F VIII(HA) circulants[2]. Cette pathologie touche principalement les garçons à une fréquence de 1/ 5 000 naissances masculines [3]. Les femmes conductrices de la maladie sont en général asymptomatiques.

Les cas de filles atteintes d'hémophilie A sont exceptionnels.

Dans environ 25 % des cas, l'hémophilie apparaît de façon sporadique (antécédents familiaux méconnus, mutation de novo).

Le diagnostic repose sur la mesure de l'activité coagulante (méthode chromo génique Et chromométriques) et de l'activité antigénique. Le diagnostic génotypique est réservé aux formes sévères. Seule la suspicion de formes sévères d'hémophilie peut justifier un diagnostic anténatal.

Les manifestations cliniques au cours de l'hémophilie (hémarthroses, hématomes, hémorragies) sont fonction de l'intensité du déficit en facteur (sévère, modéré ou mineur).

La classification de la sévérité clinique de l'hémophilie A ou B repose sur la mesure du taux plasmatique du facteur de coagulation déficitaire selon la classification redéfinie par le sous-comité du FVIII et FIX de l'International Society of Thromboses and Haemostasis (ISTH) 2001 :

- * Hémophilie sévère A ou B: Taux de FVIII ou FIX respectivement <01%
- * Hémophilie modérée A ou B: Taux de FVIII ou FIX respectivement compris entre 01% - 05%
- * Hémophilie mineure A ou B: Taux de FVIII ou FIX respectivement compris entre > 5% - <40%

Le traitement substitutif actuel de l'hémophilie A fait appel aux concentrés de FVIII.

Actuellement, la complication iatrogène majeure de l'hémophilie est le développement d'allo anticorps inhibiteurs dirigés contre le facteur perfusé, compromettant ainsi l'efficacité du traitement. Cette complication touche principalement l'hémophile A, avec le développement d'inhibiteurs anti-FVIII. Les anticorps inhibiteurs anti-FIX développés chez l'hémophile B sont plus rares et beaucoup moins étudiés.

La prévalence des inhibiteurs chez l'hémophile A est variable selon les études. Cette prévalence est de l'ordre de 15 à 30 %. Les hémophiles sévères ont un risque quatre fois plus

important de développer un inhibiteur que les hémophiles modérés-mineurs. Leur apparition est en général précoce dans la vie d'un hémophile, dès les premières injections de FVIII thérapeutique. Ils apparaissent souvent dans les 50 premiers jours cumulés en présence de l'antigène (JCPA).

L'apparition d'un anticorps inhibiteur marque un tournant dans la vie d'un hémophile. En effet, l'impact est à la fois médical, psychologique, social et économique.

La détection de ces anticorps inhibiteurs fait partie du suivi biologique classique d'un hémophile.

Les méthodes de détection de ces anticorps au laboratoire de biologie médicale sont basées sur des tests allant des plus simples, disponibles dans tous les laboratoires de biologie médicale, aux tests beaucoup plus spécifiques et réservés à certains laboratoires spécialisés.

I.2.Historique :

Le mot « Hémophilie », qui vient du grec haemo-philia, c'est-à-dire :« Attirance pour le sang», est en fait un raccourci du mot haemorrhaphilia qui veut dire « attirance pour les saignements».

La première trace écrite de conditions hémorragiques sévères évoquant probablement une hémophilie se trouve dans le Talmud babylonien du IIe siècle avant J.-C. Il y est indiqué que le troisième enfant d'une fratrie où déjà deux garçons sont décédés de complications hémorragiques après circoncision doit être lui-même exempté de circoncision. [4]

Le terme même d'hémophilie est habituellement attribué à Schonlein, d'après les écrits de l'un de ses étudiants, Friedrich Hoffmann, qui en fit son sujet de thèse en 1828 [5], alors que la première description précise de la maladie est due à Otto (Otto 1803) en 1803 [6] et à Nasse qui, en 1820, postula le mode de transmission de l'hémophilie (Nasse 1820).

Sous l'angle physiopathologique, la responsabilité du système de coagulation a été établie par Georges Hayem dès la fin du XIX siècle [7]. L'existence de différents types d'hémophilies fut suggérée en 1944 [8] et confirmée quelques années plus tard par Biggs [9] qui décrivit l'hémophilie B, due à un défaut du facteur IX, alors que l'hémophilie classique est due à un défaut du facteur VIII. Les facteurs VIII (ou anti hémophilique A) et IX (ou anti hémophilique B) ont ainsi, jusqu'aux années 80, été définis seulement par leur fonction, et par l'effet de leur présence ou absence sur le système de coagulation. Ce n'est que récemment que

des progrès décisifs concernant leur synthèse et leur structure moléculaire ont été accomplis grâce à la génétique moléculaire.

I.3.Epidémiologie

L'hémophilie est une maladie ubiquitaire et génétique qui concerne un garçon sur 5000 à 10000, avec une fréquence prédominante pour l'hémophilie A (pourcentage de 80 à 85%) contre (15 à 20%) seulement pour l'hémophilie B.

En Europe il existe environ 60000 hémophiles, dont :

- 5000 personnes en France,
- Plus de 700 en suisse,
- Presque 20000 en Angleterre.

En Belgique on dénombre 1000 [10].

En Algérie le registre national du ministère de la santé a recensé 1435 hémophiles en l'année 2012 [11] et 2300 cas en 2016 [92]

II. PROBLEMATIQUE

La survenue d'un inhibiteur dirigé contre le facteur VIII est considérée actuellement comme l'une des plus sérieuses complications du traitement substitutif de l'hémophilie A.

En compromettant à des degrés divers l'efficacité des fractions anti-hémophiliques, ces inhibiteurs empêchent en effet considérablement la prise en charge thérapeutique de ces malades. Le pronostic fonctionnel est ainsi particulièrement compromis sans parler du pronostic vital puisque l'on considérerait il y a une dizaine d'années que la présence d'un inhibiteur multipliait par cinq le risque de décès.

Les traitements visant à établir un état de tolérance immune parfois institués lors de la détection d'un inhibiteur sont contraignants et pas toujours efficaces. Leurs modalités mêmes (fortes doses, faibles doses) n'en sont toujours pas clairement établies. L'utilisation des fractions dites « activées » même dans leur forme la plus élaborée pose un certain nombre de problèmes et n'offre pas la même garantie d'efficacité et de sécurité que les concentrés de facteur VIII. Les hémophiles porteurs d'un anticorps puissant peuvent ainsi se trouver écartés des progrès thérapeutiques auxquels ont accès les hémophiles sans inhibiteur, tel par exemple le recours à la chirurgie orthopédique ou les traitements prophylactiques. C'est pourquoi la question des inhibiteurs mobilise toujours particulièrement l'attention des cliniciens et biologistes dont la recherche et le titrage permettent d'instaurer une attitude thérapeutique adaptée et une prise en charge rigoureuse afin d'éviter des complications dramatiques mettant en jeu le pronostic vital.

L'apparition des inhibiteurs est due à l'interaction, voire la synergie, de nombreux facteurs de risque qui peuvent être d'une part intrinsèques et donc propres au patient lui-même, et d'autre part extrinsèques dépendants des modalités thérapeutiques (type de F VIII administré, dosage ou mode d'administration, l'âge à la première exposition), ou même à l'environnement.

III. OBJECTIFS

- Déterminer la prévalence des inhibiteurs anti-FVIII chez les hémophiles sévères suivis aux Services d'Hématologie clinique et de pédiatrie du Centre Hospitalo-universitaire de Tlemcen.
- Mise au point des techniques de détection des inhibiteurs anti-FVIII.
- Etude de l'influence de certains facteurs de risques sur le développement d'inhibiteurs : - sévérité de la pathologie - modalités des traitements substitutifs
 - facteurs individuels (introduction de l'étude génétique réalisée en 2013 sur quelques hémophiles suivis au CHU Tlemcen)

IV. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

IV.1. L'HÉMOPHILIE A

IV.1.1. Gène du FVIII et la protéine correspondante

IV.1.1.1. Gène

Le gène du facteur VIII (FVIII), est situé sur l'extrémité distale du bras long du chromosome X en position Xq28. Le gène F8 a été cloné en 1984 [87]. Il s'étend sur 186kb et comprends 26 exons de taille allant de 69 à 3106 paires de bases (Pb) séparés par 25 introns allant de 207 à 32400 Pb. L'intron 22, de très grande taille, contient deux gènes indépendants, F8A et F8B (Figure 1)[88].

Régions régulatrices :

-1,2 kb en 5' du gène permet l'expression du gène in vitro et contient différents sites de liaison de facteurs agissant en cis et spécifiques du foie (HNF-1, C/EBPa et b et DBP).

- Transcription débute -170 bp en 5' du codon ATG (Met -19).

- Séquence GATAAA typique de «TATA box!» à 200 bp en 5' du codon ATG.

- 1,8 kb en 3' du gène non transcrit avant un signal de polyadénylation (AATAAA).

Introns :

- Séquences de 0,2 à 32 kb (intron 22).

- Intron 22 contient 2 éléments génétiques distincts de F8C, F8A (int22h-1) et F8B.

F8A est un gène transcrit en sens opposé à F8C, F8B est transcrit dans le même sens que F8C. Le rôle des polypeptides codés par F8A et F8B non déterminé, leur délétion n'affecte pas le développement ou la croissance chez la souris.

- Intron 1 contient 1 élément génétique distinct de F8 d'environ 1kb, int1h-1

Exons : Séquences de 69 à 262 bp sauf exons 26 et 14 respectivement de 2 et 3,1 kb. [12]

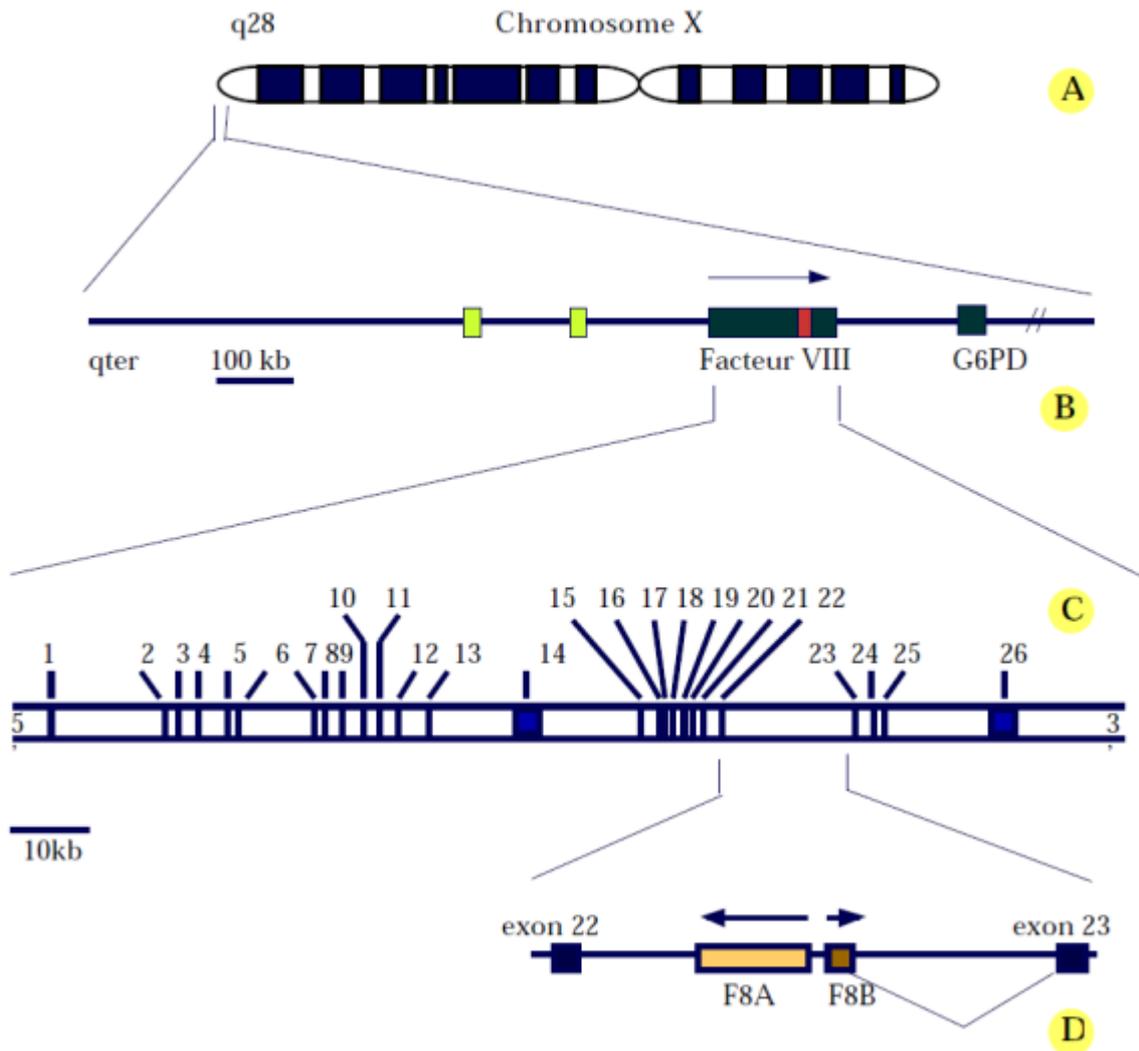


Figure 1: Localisation chromosomique et structure du gène du Facteur VIII.

Le gène du FVIII est localisé sur le chromosome X (A), approximativement à 100 kb du qter (B). Le gène contient 186 kb et contient 26 exons (C). Deux gènes sont localisés dans l'intron 22: F8A et F8B. F8B utilise l'exon 23 comme second exon (D).

IV.1.1.2. Biosynthèse du facteur VIII

Le facteur VIII c ou facteur anti-hémophilique A est une glycoprotéine contenue dans le plasma à l'état de traces, jouant un rôle de cofacteur dans la coagulation

Le facteur VIII c est synthétisé sous forme d'un précurseur protéique de 330 ka.

La source principale du facteur VIII semble être le foie (Win, Kelly et al. 1985; Levinson, Kennewick et al 1992; Figueiredo and Brown Lee 1995). L'utilisation des anticorps monoclonaux a prouvé le rôle essentiel de l'hépatocyte dans cette synthèse. Par contre, l'augmentation du taux de facteur VIII dans les insuffisances hépatocellulaires, suppose d'autres sources. En effet, ceci a pu être confirmé par la mise en évidence de l'ARNm de ce facteur au niveau d'autres organes, en particulier, le rein, la rate et au niveau des lymphocytes (Goth, Hathaway et al. 1974). Les cellules endothéliales pulmonaires de la microcirculation produisent du FVIII (Jacquemin et al, Blood, 2006).

L'ADN code pour un polypeptide de 2351 acides aminés qui perd son peptide signal de 19 acides aminés au cours du passage dans le réticulum endoplasmique où s'effectue sa glycosylation (Figure 2). Une fraction du FVIII fixée à des protéines du réticulum endoplasmique (Dorner, Bole et al. 1987) est dégradée ; l'autre partie transite vers l'appareil de Golgi où s'effectuent les modifications post-traductionnelles : O-glycosylations, N-glycosylations, sulfatations et le clivage de la protéine de 330 ka en une chaîne légère de 80 ka et une chaîne lourde de 210 ka (Dorner, Bole et al. 1987). La formation de complexes circulants actifs dépend alors de la présence du facteur Von Willebrand (vWF) qui associe les deux chaînes libres.

Le FVIII est une protéine de l'inflammation et sa synthèse est amplifiée lors de syndromes inflammatoires.

Dans le plasma, il circule sous forme d'un dimère stabilisé par le facteur de Von WILLEBRAND. [13]

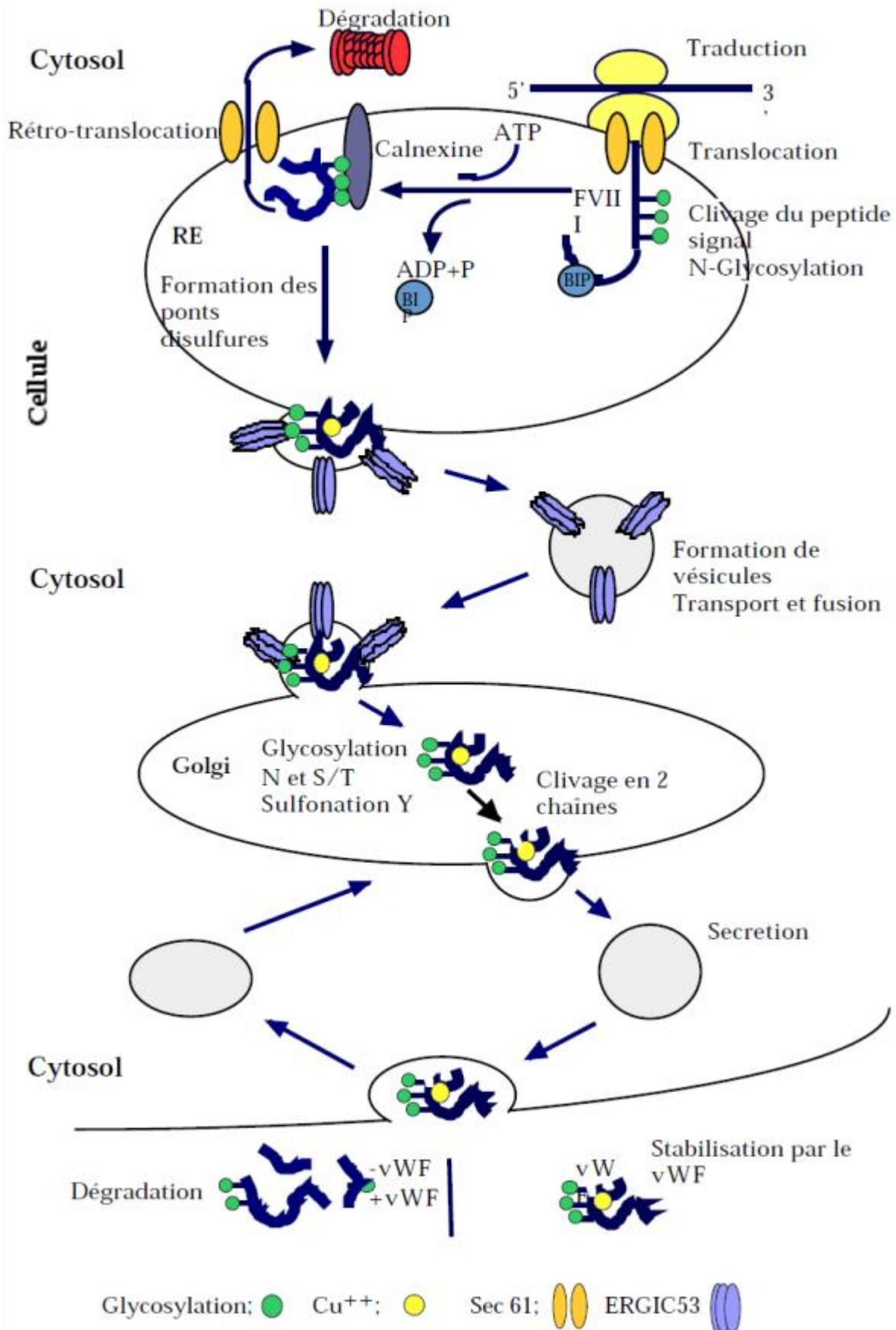


Figure 2: Synthèse et sécrétion du FVIII

SITES DE MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DU FACTEUR VIII

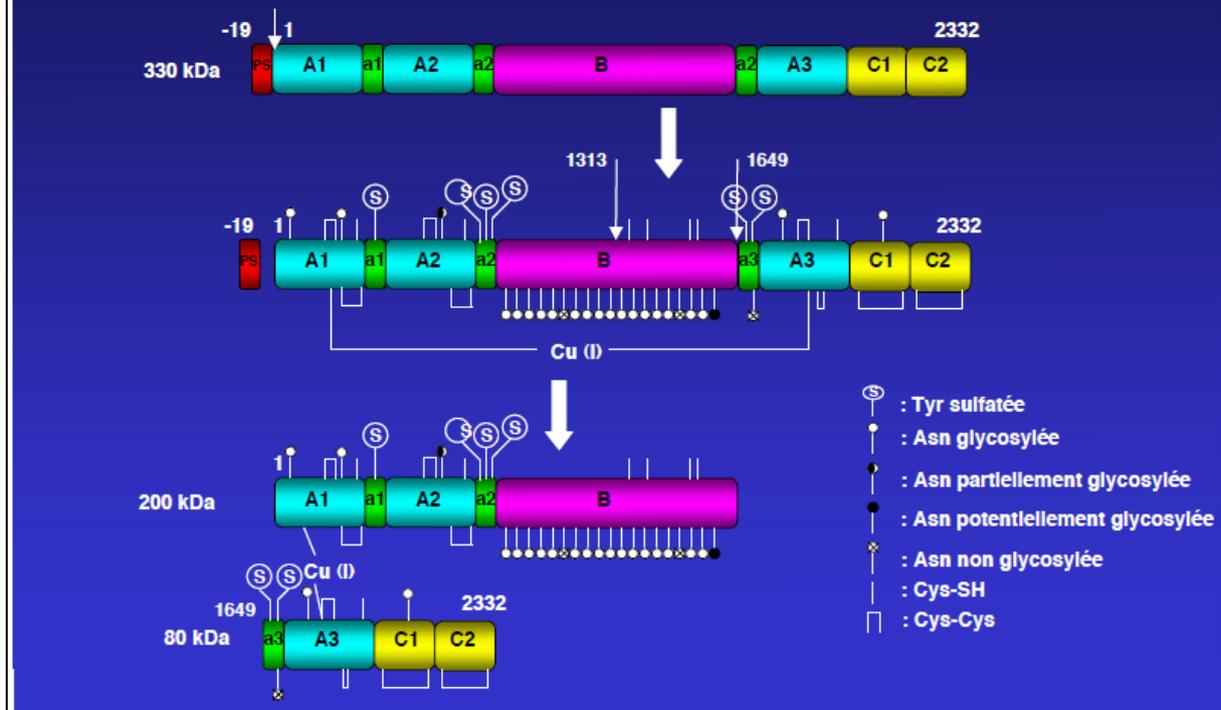


Figure 3: Sites de modifications post-traductionnelles du facteur FVIII

IV.1.1.3. Structure du facteur FVIII

L'ARNm code pour un polypeptide de 2351 acides aminés (AA) ; ce polypeptide est constitué d'un peptide signal de 19 AA, qui sera clivé lors de la sécrétion, et d'une protéine mature de 2332 AA. Le poids moléculaire du FVIII mature est d'environ 285 kDa. La protéine de FVIII est organisée en domaines (Figure 4) suivant le motif : A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2 [88]. Les 3 domaines A contiennent environ 330 AA chacun, ont une homologie de séquence entre eux d'approximativement 30-40%, et présentent 35% d'homologie de structure avec le Facteur V (FV) et la céruloplasmine (protéine de transport du cuivre). Les domaines A sont interconnectés par des peptides linker courts (*a1*, *a2*, *a3*) [89], appelés régions acides du fait de leur richesse en résidus acide. Les domaines C sont plus petits, avec environ 150 AA ; ils sont structurellement homologues au domaine C du FV et à la lectine discoïdine de type I.E. Le domaine B central est extrêmement glycosylé, sensible à la protéolyse, non indispensable à la fonction coagulante, mais possède un rôle dans la sécrétion de la protéine. Il contrôlerait l'action d'effecteurs dans les phases de la coagulation sanguine

(Fijnvandraat, Berntop et al. 1997). Dès que le FVIII est synthétisé, il est clivé en une série d'hétéro dimères possédant une chaîne légère (80 kDa) faite des domaines A3, C1, C2, et une chaîne lourde (92 kDa et plus) correspondant aux domaines A1, A2 et d'une portion variable du domaine B. Ces deux chaînes sont réunies par des ponts calcium. Le FVIII est lié au vWF par l'extrémité N-terminale de la chaîne légère et aux phospholipides par l'extrémité C-terminale de cette même chaîne. Sous l'action de la thrombine et plus accessoirement du facteur Xa, le FVIII est activé en FVIIIa, qui se présente comme un hétéro trimère composé d'un fragment de 54 kDa (globalement A1), 44 kDa (A2) et 72 kDa (A3, C1, C2). Cette molécule est très instable et se dégrade rapidement sous l'action de la protéine C activée et de la dissociation des sous unités. Elle perd ainsi son activité pro coagulante.

Le FVIII possède 23 résidus cystéine dont 19 sont répartis dans les domaines A et C à des positions identiques d'un domaine homologue à l'autre, suggérant la formation de ponts disulfures équivalents dans chacun de ces domaines.

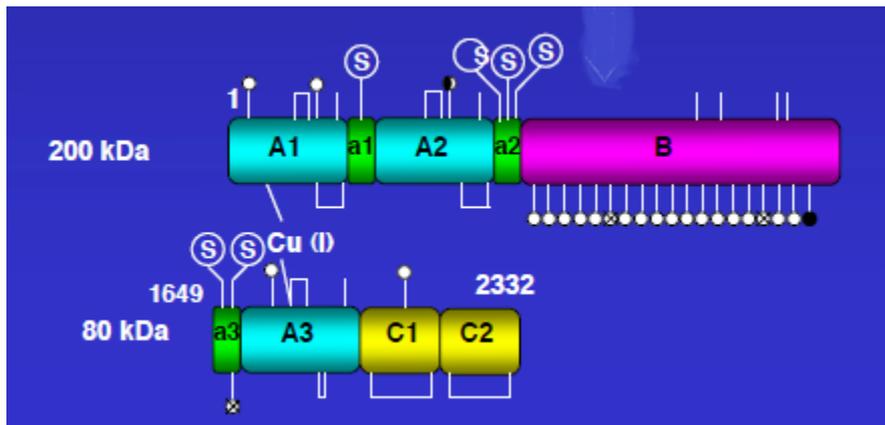


Figure 4 : Structure du FVIII

Domaine	Acide Aminé	Site de liaison pour	Référence
A1	Cys 310	Cu ⁺⁺	Tagliavacca 1997
A1	337-372	FX	Lapan 1997
A1	337-372	A2	Fay 1993
A2		FIXa	Lollar 1994
A2	558-565	FIXa	Fay 1994
A3	1675-1684	Vwf	Foster 1990
A3	1811-1818	FIX	Lenting 1996

C2	2009-2018	Protéine C	Walker 1990
C2	2303-2324	Phospholipides	Gilbert 1995
C2	2308-2312	Vwf	Shima 1995
C2	372, 740, 1689	Clivage par thrombine	Esmon 1996

Tableau 1: Structure/fonction du FVIII

IV.1.1.4. Activation et inactivation du facteur VIII

L'activité du FVIII plasmatique est régulée par de nombreuses protéines. Le FVIII peut être activé par la thrombine (Figure 5), le Facteur X activé (FXa) et le Facteur IX activé (FIXa), et inactivé par la protéine C activée (APC) (

figure 5). L'augmentation brutale de l'activité procoagulante observée après action de la thrombine est liée à la protéolyse de la chaîne lourde du FVIII pour former un complexe actif composé de fragments de 70, 50 et 45 kDa (figure 5). Des études ont été réalisées pour déterminer les sites de clivage du FVIII par la thrombine. Ainsi, la mutation des arginines en position 740 et 1648 empêche la libération du domaine B par protéolyse (O'Brien, Johnson et al. 1992), rendant impossible la formation des polypeptides caractéristiques de 90 et 80 kDa. Cette dernière mutation n'altère pas l'activation du FVIII in vivo. Ainsi, la scission du domaine B n'est-elle pas une étape préalable et indispensable à l'activation du FVIII.

Cependant, lorsque les sites 372 (domaine A2) et 1689 (domaine A3) sont mutés, la thrombine est incapable de protéolyser la protéine et le FVIII n'est pas activable par cet effecteur (Shima, Ware et al. 1989). De plus, si un seul de ces deux sites est modifié, l'activation est impossible. Enfin, l'hémophilie sévère observée chez certains patients dont la structure du FVIII diffère par une substitution de l'arginine 1689 en cystéine ou de l'arginine 372 en histidine confirme l'importance de ces sites de clivage.

La thrombine et le FXa coupent les chaînes lourdes du FVIII après l'arginine 740 pour engendrer un polypeptide de 90 kDa. Ce polypeptide est ensuite protéolysé après le résidu 372 en deux fragments de 50 (domaine A1) et 45 kDa (domaine A2). La chaîne légère du FVIII est ensuite clivée en position 1689 par la thrombine et le facteur Xa pour engendrer une protéine de 70 kDa. Après la formation du complexe activé de 70-50-45 kDa, une phase d'inactivation est observée in vitro. Elle est indépendante de l'action de la thrombine et résulte d'une dissociation du complexe en un dimère de 70-50 kDa et un fragment de 45 kDa. Le FXa modifie également les formes activées du FVIII en protéolysant les polypeptides de 70 et 50

kDa en deux fragments de 67 et 45 kDa. Ces clivages entraînent une diminution brutale de l'activité procoagulante du FVIII (van't Veer, Hackeng et al. 1994). Enfin, la protéine C activée (figures 5 et 6) se lie à la chaîne légère du FVIII pour couper uniquement la chaîne lourde au niveau des résidus 740 et 336. La mutation ponctuelle de l'arginine 336 en lysine ou isoleucine provoque une inhibition de l'activation par la protéine C activée, favorisant ainsi les risques thrombotiques chez les sujets atteints (Amano, Michnick et al. 1998; Dahlback 1999)

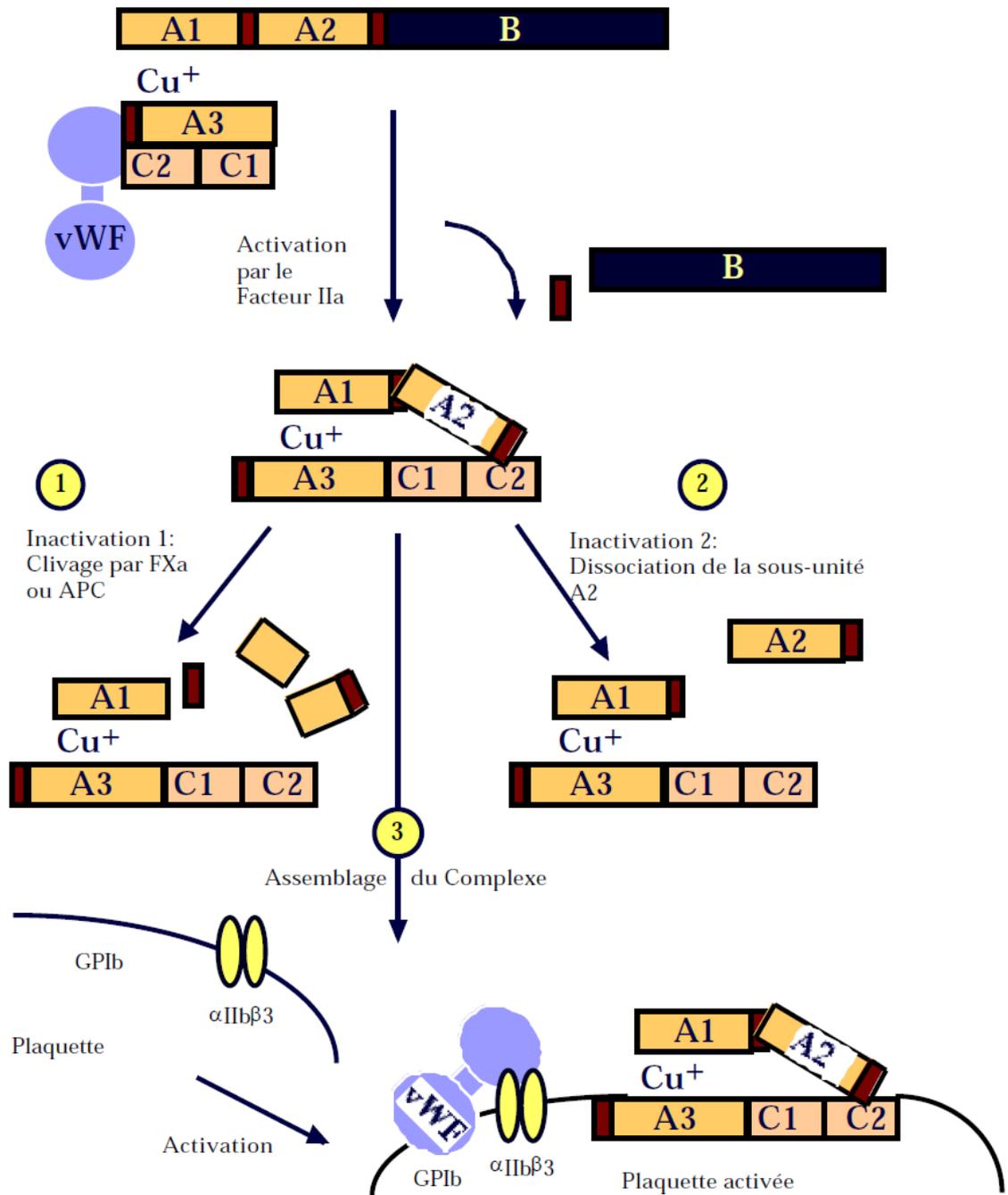


Figure 5 : Modèle de l'activation ou de l'inactivation du FVIIIc par la thrombine

Le FVIII est représenté par 2 chaînes liées par un ion cuivre. Le vWF est relié à la chaîne légère du FVIII. Les sites de clivage par la thrombine (résidus 372 et 1689) permettent l'activation du FVIII. L'inactivation du FVIII peut être réalisée par (i) clivage par le FXa ou la protéine C activée (APC) ou (ii) par dissociation de la sous-unité A2. [13]

IV.1.2. Rôle du facteur dans la coagulation

La coagulation se déroule en 3 étapes :

Phase d'initiation : conduit à la génération de faibles traces de thrombine à la surface plaquettaire. Le complexe [FT-FVIIa] est l'initiateur de cette étape → activation directe du FX en FXa et du FIX en FIXa mais reste en quantité faible car elle est limitée par le TFPI (inhibiteur du FT).

Phase d'amplification :

Nécessite la présence de cofacteur : Le FVIII. Ce dernier est activé par les faibles traces de thrombines et de FX générés lors de l'initiation. Le FIXa se lie au FVIIIa en présence de Ca^{2+} au sein d'un complexe appelé ténase intrinsèque → le FVIIIa augmente la catalyse de la R° de transformation du FX → FXa par le FIXa d'un facteur $>10^5$ → génération de quantité importante de Xa, qui va générer à son tour la IIa → fibrine.

* La thrombine active le FV → FVa qui se fixe sur les PL et forme avec le Xa la prothrombinase → de la prothrombine en thrombine → active de nouveau du FVIII en FVIIIa → boucle d'amplification au sein de laquelle les facteurs anti hémophiliques A et B en sont les acteurs principaux.

➤ La phase de propagation : génération de manière explosive de IIa qui entraîne :

- Activation en boucle du FXI en XIa → activation du FIX
- Protéolyse du fibrinogène en fibrine.
- Activation du FXIII en XIIIa → stabilisation du réseau de fibrine.
- Activation plaquettes.

Dans la coagulation, le FVIIIc joue un rôle central. Il s'agit du cofacteur du facteur IX. Le facteur VIII, activé par la thrombine, devient le catalyseur de la réaction d'activation du facteur X par le facteur IX activé, en présence d'ion calcium et de phospholipides. La réaction d'activation du facteur X est accélérée environ 200 000 fois en présence du facteur VIII. Le facteur X activé acquiert une activité catalytique qui lui permet de transformer la prothrombine en thrombine. Celle-ci dégrade le fibrinogène en fibrine. Le caillot ainsi formé sera stabilisé par le facteur XIII, ce qui permet l'arrêt du saignement. [14]

IV.1.3. Bases moléculaires du déficit

Les anomalies génétiques responsables d'une hémophilie A sont de quatre types :

- Inversion :

La majorité des mutations responsables de l' HA sont rares ou spécifiques à une famille à l'exception des micro-inversions du gène F8 qui sont relativement communes et courantes (Bagnall et al, 2002; Lakich et al, 1993). Deux types de micro-inversions intra-chromosomiques du gène F8 ont été décrits. Il s'agit de la micro-inversion de l'intron 22 et de l'intron 1 dont le mécanisme pathogène est une recombinaison entre les séquences intra-géniques Int22h-1 et Int1h-1 avec leurs séquences homologues extra-géniques télomériques respectivement Int22h-2 et Int22h-3, et Int1h-2. Ces deux micro-inversions sont responsables d'un phénotype sévère de la maladie. Elles surviennent principalement lors de la méiose masculine où la partie intermédiaire du chromosome X se trouve libre (Rossiter et al, 1994)

- ✓ La micro inversion de l'intron 22 :

La micro-inversion de l'intron 22 constitue l'anomalie la plus fréquente (50%) chez les patients HA sévères (Lakich et al, 1993). Cette micro-inversion est le résultat d'une recombinaison intra-chromosomique homologue qui a lieu au cours de la méiose entre la région intra-génique Int22h-1 (contenue dans l'intron 22 du gène F8) et l'une des deux copies extra-géniques homologues: int22h-2 (proximale) ou int22h-3 (distale) (Lakich et al, 1993; Naylor et al, 1995).

Après alignement homologue, la recombinaison a pour effet de déplacer et inverser les exons 1 à 22 de leur contexte normal (Oldenburg, 2001). Le résultat de cet événement est l'inversion d'un fragment de 500 kb ou 600 kb ayant pour limite centromérique : Int22h-1 suivi des exons 22 à 1 du gène F8, et pour limite télomérique : Int22h-2 ou Int22h-3. L'Int22h-1 et les 22 premiers exons du F8 forment ainsi la limite télomérique du fragment et présentent une orientation inversée par rapport à celle normale de leur localisation intra-génique. Le gène F8 est ainsi divisé en deux parties avec sa partie 5' éloignée à plus de 400 kb vers le télomère et ayant changé d'orientation avec sens de lecture 5'-3' inversé du centromère vers télomère, bloquant toute possibilité de transcription complète du gène.

✓ La micro-inversion de l'intron 1 :

La première description faisant évoquer la micro-inversion de l'intron 1 a été rapportée en 1996 par Brinke et al. Qui décrivait une inversion altérant le F8 au niveau de son premier intron (Brinke et al, 1996). Cette micro-inversion est le résultat d'un crossing-over intra-chromosomique homologue entre une séquence de 1 kb au niveau de l'intron 1 du gène F8 (Int1h-1) et sa séquence homologue (Int1h-2) répétée dans une orientation opposée à approximativement 140 Kb de la région télomérique, aboutissant à la rupture de la séquence du gène F8 (Bagnall et al, 2002) [90].

Le gène F8 se trouve divisé en deux parties dans des orientations opposées. En effet, l'exon 1 est déplacé dans la direction opposée à celle des exons 2 à 26. Cette micro-inversion crée deux transcrits hybrides : l'un sous le contrôle du promoteur du F8 et ne comprend que l'exon 1 du F8; l'autre sous le contrôle du promoteur du gène BRCC3 et comprend tous les exons sauf le dernier de BRCC3 et les exons de 2 à 26 du gène F8 (Brinke et al, 1996).

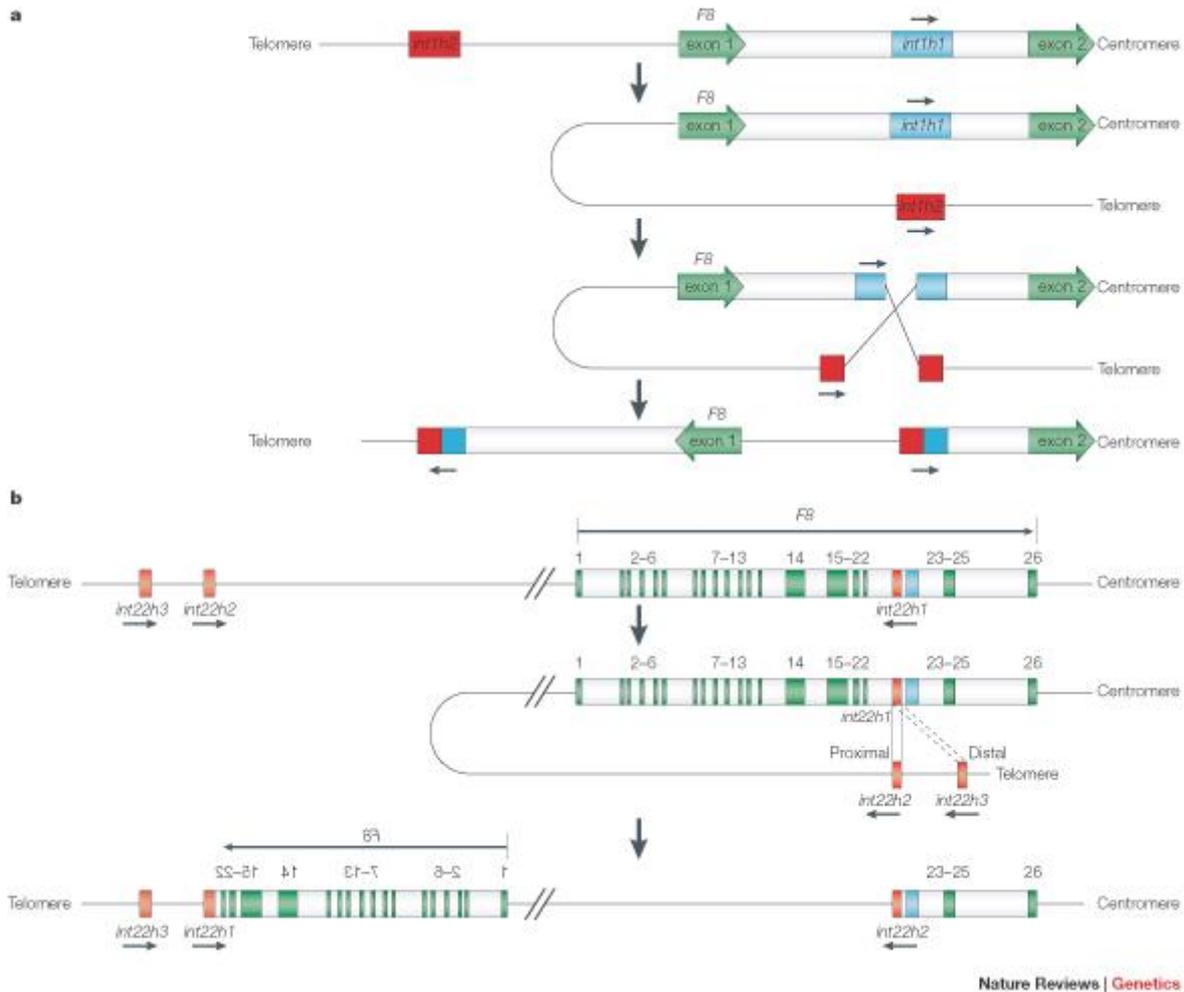


Figure 6 : Anomalies moléculaires du gène du FVIIIc, inversion de l'intron 22

L'existence de séquences homologues entre l'intron 22 du gène FVIII et une région télomérique (rectangles grisés) favorise un appariement intra chromosomique au cours de la méiose entre ces zones. La recombinaison entre la copie de l'intron 22 et l'une des séquences télomériques aboutit à une inversion d'une partie du chromosome X interrompant le gène FVIII. b) Les rectangles rouges indiquent la position d'un duplicon présent dans l'intron 22 du gène (int22h1 ou F8A1), dont 2 autres copies « orientées tête bêche » existent, respectivement à 360 Kb et 435 Kb en amont du premier exon, dénommées F8A2 (ou int22h2) et F8A3 (ou int22h3). La flèche indique l'orientation des fragments. Durant la méiose masculine, cette région n'a pas de partenaire avec lequel s'apparier. L'ADN qui la constitue peut former une boucle permettant l'appariement entre le duplicon intronique et l'une des 2 séquences extérieures. Le résultat est une inversion para centrique d'environ 500 kb qui coupe le gène. [27]

- Mutations ponctuelles :

Elles regroupent les mutations non-sens générant habituellement des formes sévères, les mutations faux-sens, générant des formes modérées ou mineures et des anomalies d'épissage de l'acide ribonucléique (ARN) dont les conséquences sont variables sur le taux de FVIII selon leur localisation par rapport à la jonction exon-intron.

La distribution de ces mutations tout au long des exons du gène F8 codant les différents domaines de la protéine est représentée dans la figure 34. Les mutations non-sens et au niveau des sites d'épissage sont réparties sur l'ensemble des domaines FVIII. Cependant, les mutations faux-sens sont dispersées tout au long des domaines à l'exception du domaine B où elles sont relativement rares (Payne et al, 2013)[91]

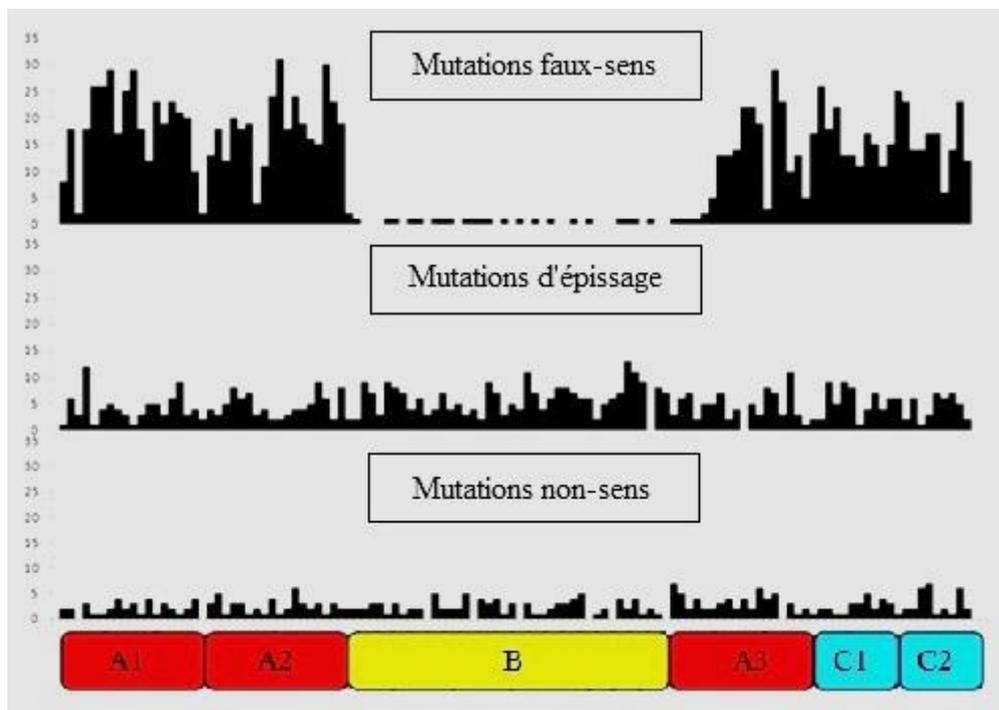


Figure 7: Distribution des mutations ponctuelles sur les différents domaines du FVIII, d'après (Payne et al, 2013).

Environ le tiers des cas de mutations ponctuelles sont récurrentes, survenant dans des zones spécialement exposées (hot spot) correspondant à des di nucléotides CpG avec mutation CG TG ou CG CA susceptibles de faire apparaître un codon stop. Ces zones sont facilement criblées par l'enzyme de restriction Taq 1, qui reconnaît la séquence normale TCGA mais non la séquence mutée TTGA ou TCAA.

L'apparition d'inhibiteurs survient le plus souvent au cours des formes sévères (mutations non-sens) mais est décrite dans quelques formes modérées avec taux résiduel de FVIII entre 3

et 7 % (mutations faux-sens). En réalité, plusieurs phénomènes peuvent rendre complexes les relations génotype-phénotype.

En effet, des mutations non-sens ou faux-sens peuvent quelquefois être associées à des anomalies d'épissage, soit en altérant celui-ci si elles sont situées au niveau des séquences consensus, soit en induisant un épissage aberrant. Par ailleurs, certaines mutations non-sens des exons 19 et 22, sans introduire de site aberrant, sont décrites associées à un phénomène d'« exon skipping » ou court-circuitage de l'exon correspondant [19]. Ce phénomène, observé pour d'autres gènes [20], n'est pas encore élucidé : modification de la structure secondaire de l'ARN messenger, diminution de la stabilité de celui-ci impliquant une reconnaissance des codons de terminaison de la traduction avant que l'épissage ne soit effectué, ne sont que des hypothèses. Ainsi, la synthèse de FVIII amputés seulement des acides aminés correspondant aux exons « court-circuités » pourrait expliquer l'absence d'inhibiteurs du FVIII chez les patients porteurs de telles mutations [19].

L'effet des mutations faux-sens est quelquefois difficile à établir. Lorsqu'elles affectent des sites clés dans la protéine et que les propriétés du ou des résidus en question sont drastiquement modifiées, il est licite d'impliquer la mutation à l'origine de la maladie. À l'inverse, la découverte d'un nouveau mutant situé dans une zone dont l'importance est mal définie doit faire émettre des réserves quant à son rôle pathogène et doit être confrontée au taux de FVIIIc et aux résultats de l'étude moléculaire dans la famille.

Il existe également une variabilité phénotypique associée à une même mutation : ceci peut être expliqué, au-delà des différences de critères d'observation liées aux laboratoires, par l'influence de mutations additionnelles du gène FVIII ou par la présence d'autres anomalies de la coagulation (déficit combiné en facteurs VIII et XI).

- Délétions et insertions :

3 à 5 % des hémophilies A sont liés à de grandes délétions (de 2 à 210 kb) dont près de 80 variétés ont été décrites et qui, à trois exceptions près, déterminent une hémophilie A sévère (associée au développement d'un inhibiteur dans un tiers des cas).

Une quarantaine de petites délétions, de 1 à 23 Pb, et une dizaine de micro-insertions (1 à 10 pb) dont la moitié sont localisées dans l'exon 14, ont été publiées. Ces petites délétions ou insertions situées dans des régions codantes sont responsables, lorsque le nombre de

nucléotides délétés est différent d'un multiple de 3, d'un décalage du cadre de lecture lors de la traduction de l'ARN messager en protéine, ce qui aboutit le plus souvent à l'apparition d'un codon de terminaison de la traduction (ou codon stop). Ces anomalies sont appelées mutations « frame shift » ou décalantes. [15-16]

Deux insertions d'une séquence L1 ou LINE (3,8 et 2,1 kb) ont été rapportées chez deux hémophiles au niveau de l'exon 14 [17]. Une de ces séquences proviendrait de la rétro transposition d'un élément L1 du bras long du chromosome 22 [18].

- Les duplications

Un autre type de mutation responsable de l'HA est les duplications du gène F8. Ces mutations sont responsables d'environ 0,1% des cas d'HA. Elles peuvent avoir comme effet soit un décalage du cadre de lecture ou de gros réarrangements de gène de type duplication d'un exon individuel comme cela a été rapporté pour l'exon 24 (Rafai et al, 2011) ou bien d'une région contenant plusieurs exons tels que les duplications des exons 1 à 5 et des exons 7 à 22 (Rost et al, 2008; Zimmermann et al, 2010).

IV.1.4. Mode de transmission

Trois situations peuvent se présenter [10] :

Si on désigne par **X** le gène porteur de l'anomalie, et par **x** le gène sain, on aura :

a- Une femme porteuse de l'anomalie (Xx) mariée à un homme sans anomalie (XY) :

- Leurs filles peuvent être : Sans aucune anomalie (xx) Ou porteuses de la maladie (Xx)
- Les garçons peuvent également être: Sains (XY) Ou hémophiles (xY)

b- Une femme non porteuse (xx) mariée à un homme hémophile (xY) :

- Leurs filles seront toutes porteuses de la maladie (Xx)
- Leurs fils seront tous sains (XY)

c- Une femme porteuse de l'anomalie (Xx) mariée à un homme hémophile (xY) :

- Le cas est extrêmement rare (deux cas recensés en Algérie)

50 % de leurs filles seront hémophiles (**XX**)

50 % seront porteuses de la maladie (**XX**)

50 % des garçons seront hémophiles (**XY**)

50 % des garçons seront sains (**XY**)

d. Hémophilie féminine :

L'hémophilie féminine a été décrite dans quelques rares cas à travers le monde. Il s'agit de cas exceptionnels de filles "double hétérozygotes" pour l'hémophilie ou bien de cas d'expression du gène muté chez une fille. Les causes pouvant en être:

- une lyonisation extrême inactivant la majorité des chromosomes porteurs du gène ;
- un syndrome de Turner (X0) ;
- une translocation X-autosome ;
- un couple parental constitué par un homme hémophile et une femme conductrice (du même type d'hémophilie) ;
- une disomie X maternelle : anomalie de disjonction du chromosome X au cours de la méiose aboutissant à la présence chez le zygote de deux chromosomes X maternels.

e. L'hémophilie apparaît de façon sporadique dans environ 25 % des cas (antécédents familiaux méconnus, mutation de novo).

IV.1.5. Formes cliniques

Les manifestations cliniques de l'HA sont essentiellement d'ordre hémorragique et peuvent avoir différentes conséquences en raison de leurs répétitions ou localisations.

- Les sites hémorragiques sont habituellement fermés.
- Les hémorragies ne sont pas spontanées, mais diathèse hémorragique de la première enfance secondaires à un traumatisme même minime.
- Le caractère pathologique de l'hémorragie n'est pas lié à son intensité mais à sa durée.
- Il n'y a pas de troubles de l'hémostase primaire, donc pas de pétéchies, pas ou peu d'écchymoses et d'hémorragie des muqueuses. [28]

Le tableau clinique est fait :

- En période néonatale :

- Hémorragie cérébo-méningée (accouchement par forceps) ;
 - Hémorragie à la chute du cordon ombilical.
- Chez un enfant de moins de 1 an (à 6 mois généralement) :
- Les ecchymoses multiples lors de mouvements dans le berceau ;
 - Un hématome ou hémarthrose vers l'âge de un an à l'apprentissage de la marche (un gros hématome du front ou de la fesse) ;
-
- Des hématomes au niveau d'un prélèvement sanguin, d'une injection intra musculaire ou d'une vaccination
 - Hémorragies prolongées suite à une plaie de section. [28]

Les caractéristiques des saignements sont typiques d'une coagulopathie. La tendance hémorragique se révèle très rarement à la naissance même si certaines hémorragies intracrâniennes néonatales peuvent apparaître dans environ 1 % des cas sévères. Jusqu'à l'âge de 6 à 12 mois, l'hémophile A est généralement exempt d'hémorragies importantes le nourrisson étant relativement protégé des traumatismes. [13]

L'hémarthrose représente l'hémorragie interne la plus caractéristique de l'hémophilie A sévère, la plus fréquente (70 à 90% des cas d'hémophilie sévère), la plus douloureuse et la plus invalidante, physiquement, psychologiquement et économiquement, des manifestations des maladies héréditaires de la coagulation. [13].

Les hématomes représentent, après les hémarthroses, la deuxième hémorragie la plus caractéristique de l'hémophilie A. Les hématomes musculaires sont environ cinq fois moins fréquents que les hémarthroses, mais ils peuvent se révéler très dangereux lorsqu'ils produisent un syndrome d'hypertension d'un compartiment musculaire.

Tous les muscles peuvent être atteints. On distingue les hématomes superficiels et profonds. Hémorragies intracrâniennes, Même avec un traitement substitutif administré à des doses suffisantes, l'hémorragie intracrânienne se révèle être la cause de mortalité dans près d'un tiers des cas. Les hémorragies peuvent être sous-durales, épidurales ou intracérébrales. Les hémorragies sous arachnoïdiennes, qui sont les moins fréquentes, ont le meilleur pronostic. Les hémorragies peuvent également se produire au niveau de la moelle épinière ou de ses méninges. [13]

Hématuries :

Elles sont très caractéristiques de l'hémophilie. Elles sont spontanées, récidivantes, parfois accompagnées de coliques néphrétiques.

Les formes modérées et mineures d'HA sont principalement dues aux accidents hémorragiques provoqués à l'occasion d'une intervention chirurgicale ou avulsion dentaire. De ce fait le diagnostic de la maladie peut donc être fait à l'âge adulte, voire dans le cadre d'un bilan systématique préopératoire.

IV.1.6. Diagnostic biologique

IV .1.6.1.Diagnostic positif

Le bilan de coagulation standard est caractérisé par un allongement isolé du temps de céphaline activée (TCA ou TCK), sans allongement du temps de Quick, du temps de thrombine, du temps de saignement (TS). Le diagnostic de l'hémophilie A et du degré de sévérité ne peut être apporté que par le dosage spécifique du FVIIIc.

Dosage de l'activité coagulante du FVIII : Deux techniques sont employées pour déterminer la concentration plasmatique en FVIII. Ce sont des techniques basées sur la mesure de l'activité pro-coagulante du FVIII (FVIII:C) c'est-à-dire sa fonctionnalité. Ces deux techniques sont :

-Une méthode coagulométrique (la plus utilisée) Le FVIII coagulant (FVIII : C) est dosé habituellement en un temps, sur le principe de la correction du temps de coagulation d'un plasma dépourvu de FVIII sous l'effet de l'apport de FVIII par le plasma du patient.

-méthode chromo génique :peut également être utilisée.

Enfin l'antigène FVIII (FVIII : Ag) peut être dosé en radio-immunologie ou en Elisa avec des taux habituellement proches des taux de FVIII : C. Les patients chez lesquels le dosage antigénique retrouve, même à l'état de traces, la présence du facteur anti hémophiliques sont dits aussi « CRM+ » (CRM : cross reacting material). Le risque de développer un inhibiteur est probablement plus faible chez ces patients que chez les sujets CRM-.

IV. 1.6.2. Diagnostic phénotypique

Le taux de FVIII, qui varie chez les sujets normaux de 50 à 200 %, est en théorie, de 50 % chez les conductrices d'hémophilie A. En réalité de grandes variations sont observées selon le degré de lyonisation c'est-à-dire d'inactivation au hasard de l'un des deux chromosomes X dans les cellules somatiques synthétisant le FVIIIc. La synthèse du vWF étant normale chez l'hémophile, c'est en fait le rapport FVIII/vWF qui est pris en compte. Le dosage du FVIII : Ag apparaît même plus discriminant que celui du FVIII : C. L'interprétation de ce rapport doit tenir compte de l'âge (le FVIII et le vWF sont plus élevés aux âges extrêmes de la vie), du groupe sanguin ABO (les sujets O ont des taux de FVIII et de vWF plus faibles que les sujets des autres groupes) et de la reproductibilité de la méthode.

Chaque laboratoire doit ainsi établir ses propres normes. Un rapport FVIII : C/vWF : Ag inférieur à 0,7 retrouvé à plusieurs reprises, en dehors de toute grossesse, est cependant assez évocateur du statut de conductrice. Néanmoins une petite proportion de conductrices (15 à 20 %) reste dans les strictes limites de la normale. Il est donc impossible d'éliminer le statut de conductrice au vu de l'analyse phénotypique. [13]

IV .1.6.3. Diagnostic génotypique

Le diagnostic génotypique utilise deux approches :

- une approche directe, par mise en évidence directe du défaut génétique responsable de l'anomalie.

- une approche indirecte par étude de l'association entre le défaut causal et des marqueurs polymorphes situés à proximité ou au sein du gène ; cette approche est plus lourde car elle impose l'étude de plusieurs membres de la famille.

IV.1.6.3.1.Approche directe [3, 13]

L'approche directe est plus largement proposée dans les formes sévères :

- La Recherche systématique en priorité de l'inversion de l'intron 22 du gène du facteur VIII retrouvée dans 50 % des cas d'hémophilie A sévère, par technique de Southern blot et par PCR longs fragments. Environ 85 % résultent d'une recombinaison entre l'intron 22 du gène FVIII et la copie extra génique distale de la région, 12 % d'une recombinaison

avec la copie proximale, les 3 % de profils différents pouvant s'expliquer par une recombinaison avec une copie supplémentaire.

✓ Recherche du phénomène d'inversion dans l'intron 1 du gène du facteur VIII en deuxième intention selon la technique décrite.

✓ En l'absence de ces phénomènes d'inversion et conformément aux recommandations de l'International Society of Thombosis and Haemostasis (ISTH), l'analyse directe des délétions et des mutations responsables de l'hémophilie A (expliquant moins de 50 % des formes sévères) est réalisée par séquençage systématique et automatique des régions codantes du gène du facteur VIII. La recherche de mutations peut être ciblée sur les points chauds que constituent les di nucléotides CpG (mutation CG * TG ou CG * CA susceptible de faire apparaître un codon stop), par l'utilisation de l'enzyme de restriction Taq I qui reconnaît la séquence normale TCGA mais ne reconnaît plus une séquence mutée TTGA ou TCAA

✓ les hémophilies A modérées ou mineures étant dues à des mutations faux-sens, l'approche directe repose uniquement sur la recherche de mutations ponctuelles dans l'ensemble des parties codantes du gène.

IV .1.6.3.2.Approche indirecte [3]

Jusqu'à la découverte de l'inversion, la plupart des laboratoires de génétique moléculaire ne proposaient qu'un diagnostic indirect par l'étude de marqueurs polymorphes du gène qui permettent de suivre la ségrégation de l'allèle morbide dans une famille. Elle est mise en œuvre lorsque l'anomalie causale responsable de l'hémophilie n'est pas identifiée. Elle recherche la liaison entre l'allèle morbide et des marqueurs polymorphes situés à l'intérieur ou à proximité du gène du FVIII. Plusieurs types de marqueurs sont utilisés, que l'on distingue par leur position par rapport au gène (intra- ou extra géniques) et par leur informativité (bi alléliques ou multi alléliques). Sont évidemment à étudier en priorité les marqueurs intra géniques multi alléliques les plus informatifs (figure 8). Dans le cas de l'hémophilie A, on étudie ainsi par ordre de priorité décroissante :

1. Les deux systèmes multi alléliques VNDR (répétition en nombre variable d'un di nucléotide ou microsatellite), au niveau des introns 13 et 22 (répétition du di nucléotide CA). Ils sont à étudier en première intention, conjointement à la recherche d'une inversion lorsqu'il s'agit d'une hémophilie A sévère. Les différents allèles, amplifiés par PCR, sont distingués selon leur taille après migration électro phorétique dans un gel très résolutif.

2. Plusieurs RFLPs (polymorphismes de longueur des fragments de restriction) ont été décrits dans le gène FVIII ; ils correspondent à des variations ponctuelles et neutres de séquences qui constituent des sites de reconnaissance d'enzymes de restriction : l'enzyme coupe ou ne coupe pas selon la séquence. Le polymorphisme est donc bi allélique et peut être rapidement analysé par action de l'enzyme sur un court fragment génique amplifié par PCR. Le site Bcl I de l'intron 18 est le plus fréquemment étudié (figure 9). Un site polymorphe de l'intron 7 est analysé de la même façon par PCR à l'aide d'amorces introduisant un site artificiel Alw NI. Trois RFLPs Xba I, l'un situé dans l'intron 22, les deux autres au niveau des régions homologues juxta géniques, sont simultanément étudiés par Southern blot .

3. Lorsque la recherche d'une inversion est négative et qu'aucun des marqueurs intra géniques n'est informatif, ce qui constitue une minorité de cas, on peut étudier le marqueur extra génique multi allélique « St14 », de type VNTR (nombre variable de séquences répétées en tandem ou mini satellite), situé au locus DXS52, à 5 centiMorgans du gène FVIII. C'est-à-dire que son utilisation dans le diagnostic comporte un risque d'erreur de 5 % équivalent au taux de recombinaison entre ce marqueur et le gène. Ce polymorphisme est exploré par simple analyse de la taille des fragments amplifiés par PCR.

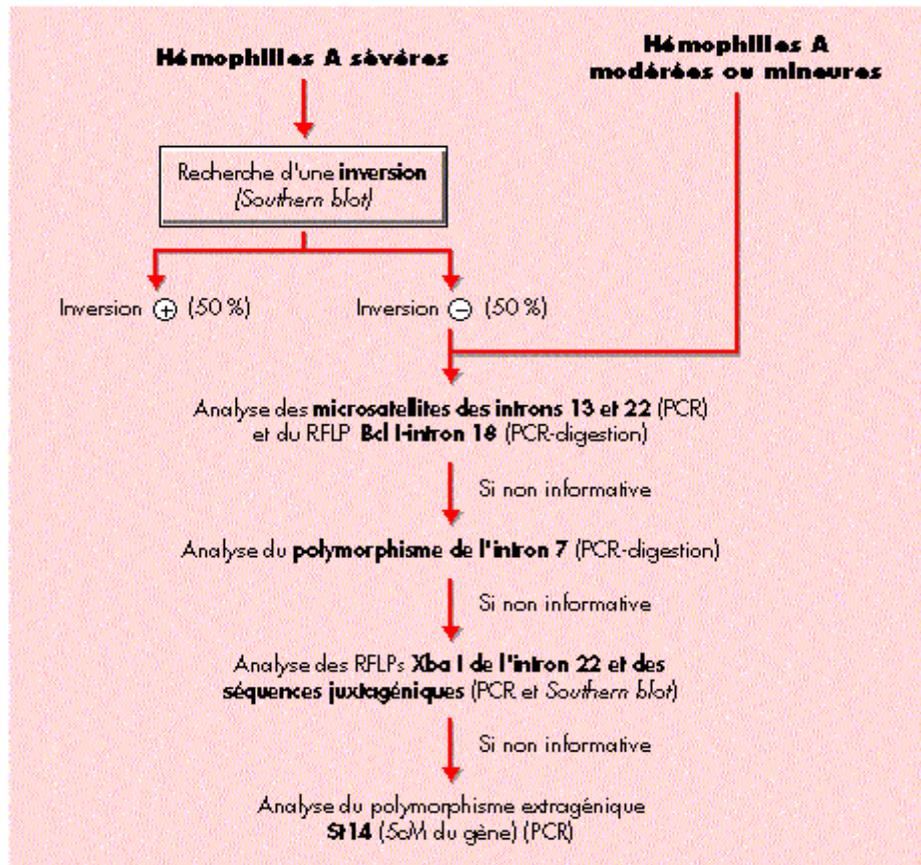


Figure 8 : Stratégie de l'étude moléculaire de l'hémophilie A

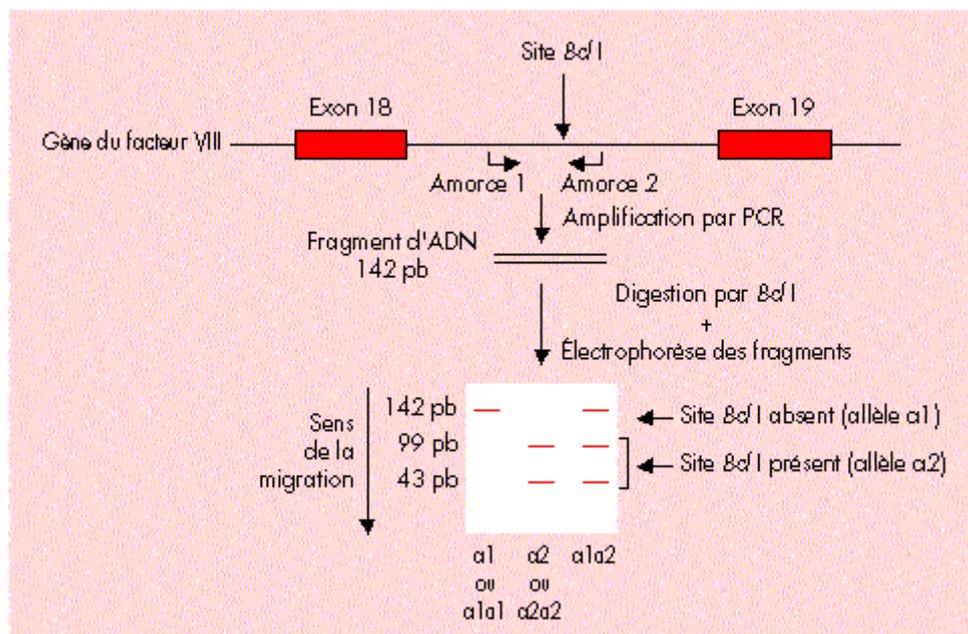


Figure 9 : Principe de l'analyse du marqueur RFLP *Bcl* I de l'intron 18 du gène FVIII par la méthode d'amplification enzymatique PCR

IV 1.6.4.Diagnostic prénatal

Le diagnostic prénatal s'inscrit dans le cadre d'un conseil génétique et concerne les couples dont la femme est possiblement conductrice d'une forme sévère d'hémophilie. La pratique du diagnostic prénatal d'hémophilie par ponction de sang fœtal au deuxième trimestre de la grossesse a été introduite en Angleterre en 1978. Il faut veiller à la non-contamination de l'échantillon sanguin par le liquide amniotique, qui peut activer le FVIII : C. Il est d'ailleurs préférable de doser aussi le FVIII : Ag.

Lorsque la mutation causale (de type inversion de l'intron 22 du gène du FVIII) a été identifiée dans la famille, il est possible de proposer aux couples un diagnostic prénatal précoce par étude de l'ADN recueilli par ponction des villosités trophoblastiques dès la dixième semaine d'aménorrhée.

Lorsque la mutation causale n'a pas été identifiée, la stratégie diffère selon qu'il s'agit d'une hémophilie avec antécédents familiaux ou d'une hémophilie sporadique. Dans le premier cas, si la femme conductrice est informative pour au moins un des marqueurs polymorphiques, un diagnostic prénatal par ADN trophoblastique peut être proposé. Si la femme n'est informative pour aucun des polymorphismes testés et si le fœtus est de sexe masculin, la seule solution consiste à effectuer un prélèvement de sang fœtal à la 18e semaine. Dans le deuxième cas, si la femme est informative pour au moins un marqueur, un diagnostic sur ADN trophoblastique peut être tenté à la 11e semaine. Si le fœtus masculin a hérité du même allèle que l'hémophile, il faudra recourir à un prélèvement de sang fœtal pour éviter toute erreur liée au fait que la mère ne soit en fait pas conductrice. [13]

IV.1.7.Traitement de l'hémophilie

Le traitement vise, soit à arrêter le saignement lors d'une complication hémorragique, soit à le prévenir, en particulier le saignement intra-articulaire.

Le traitement des complications infectieuses (hépatites virales, infection par le VIH) ne sera pas abordé ici.

IV.1.7.1.Produits disponibles

On dispose de trois types de produit dans le traitement de l'hémophilie : les traitements substitutifs – facteurs anti hémophiliques A –, les traitements non substitutifs et les facteurs activés, utilisés chez l'hémophile avec inhibiteur. [29]

IV.1.7.1.1.Correction du déficit en facteur VIII : facteurs anti hémophiliques A

➤ Produits plasmatiques

Ce sont les plus anciens. Ils sont préparés à partir de donneurs volontaires, le prélèvement pouvant être fait sous deux formes : soit par dons de sang, puis centrifugation rapide et congélation du plasma ; soit par dons de plasma par plasmaphérèse.

Cette dernière technique permet d'obtenir des quantités beaucoup plus importantes. Les produits préparés en France sont tous issus de donneurs bénévoles. Les produits importés sont le plus souvent issus de donneurs rémunérés.

Factane® :

Ce produit a remplacé le Facteur VIII-LFB®, dont il diffère par une double nano filtration à 35 nm et 15 nm. Il est préparé par chromatographie sur résine échangeuse d'ions et absorption. Les mesures de sécurisation virale comportent plusieurs étapes :

- les sérologies et le dépistage génomique viral, effectués individuellement sur les donneurs, puis sur les pools par le laboratoire.
- les procédés d'inactivation ou d'élimination physique des virus : traitement par solvant-détergent, qui élimine les virus encapsulés, et nano filtration à 35 nm puis 15 nm, permettant de retenir les particules virales non encapsulées, insensibles au traitement solvant-détergent, tel le parvovirus.

Octanate® :

Son activité spécifique est de 50 UI/ml. Son procédé de fabrication comprend une double inactivation virale : solvant-détergent et chauffage à sec court (100°C, 30 min). [29]

➤ Produits recombinants

Deux lignées cellulaires, principalement, sont utilisées pour préparer les produits recombinants : les cellules CHO (*chinese hamster ovary*) et les cellules BHK (*baby hamster kidney*). Ces lignées cellulaires issues de mammifères ont été choisies pour leur capacité à effectuer les modifications post-traductionnelles (repliement et surtout glycosylation), leur stabilité, la bonne connaissance obtenue grâce à leur utilisation pour la préparation de produits recombinants dans d'autres domaines thérapeutiques [31]. On dispose de trois produits et de quatre spécialités, l'un des produits étant distribué par deux laboratoires différents.

Advate® :

Il s'agit de facteur VIII recombinant (octocog alpha), préparé à partir de cellules CHO. Dans un but de sécurité, le processus de fabrication n'utilise aucune protéine animale ou humaine. La cellule est transfectée avec le gène du facteur VIII et celui du facteur de von Willebrand. L'intérêt du facteur de von Willebrand est de stabiliser le facteur VIII dans le milieu de culture. Le facteur VIII est ensuite purifié par chromatographie échangeuse d'ions et chromatographie d'immun affinité. Le produit ne contient plus que des traces de facteur de von Willebrand (< 2 ng/UI de facteur VIII) et ne contient pas d'albumine. Il a remplacé Recombinate®, produit par le même laboratoire, qui contenait de l'albumine. L'activité spécifique du produit est de 4 000 UI/mg de protéine à 10 000 UI/mg de protéine.

Helixate Nexgen® et Kogenate Bayer

Ces deux produits sont aussi de l'octocog alpha. Ils proviennent des mêmes chaînes de fabrication, utilisant des cellules BHK cultivées en présence d'un milieu dépourvu de protéines animales. Le facteur VIII est purifié à partir du milieu de culture par chromatographie échangeuse d'ions et chromatographie d'immun affinité. Il subit un traitement solvant-détergent. Ce produit ne contient pas d'albumine.

Refacto®(Le moroctocog alpha ou Refacto®)

Est également préparé à partir de cellules CHO. Le gène transfecté a pour particularité d'avoir été délété de la partie codante correspondant au domaine B de la molécule. Là encore, les cellules sont cultivées sur des milieux exempts de protéines animales et le produit ne contient pas d'albumine. [29]

IV.1.7.1.2.Traitements non substitutifs

Deux traitements antihémorragiques non substitutifs sont utilisés dans l'hémophilie.

➤ **Desmopressine ou DDAVP**

Il s'agit d'un composé synthétique dérivé de l'adrénaline et proche de la vasopressine. Utilisé sous une autre présentation dans le diabète insipide, il est présenté sous deux formes :

- une forme intraveineuse, Minirin®, utilisée à la dose de 0,3 µg/kg en perfusion de 20 à 30 minutes dans du sérum salé ;
- une forme nasale, Octim®, dont une pulvérisation équivaut à l'injection de 0,2 µg/kg de Minirin®.

La desmopressine a pour effet d'augmenter les concentrations plasmatiques de facteur de von Willebrand et de facteur VIII, mais aussi de l'activateur tissulaire du plasminogène. L'effet est dû à une libération de ces facteurs par l'endothélium où ils sont stockés. La desmopressine est surtout utilisée dans l'hémophilie modérée et dans la maladie de Von Willebrand. En raison de son activité antidiurétique, elle peut induire une hyponatrémie, c'est la raison pour laquelle on impose habituellement une restriction hydrique lors des périodes de traitement. En outre, l'utilisation répétée expose à un risque de tachyphylaxie, par épuisement des stocks avec réduction d'activité biologique. La desmopressine ne doit pas de ce fait être utilisée plus de trois jours de suite.

La réponse à la desmopressine est variable d'un individu à l'autre. Elle doit être testée avant que la desmopressine puisse être proposée pour éviter les traitements de substitution. [29]

➤ **Acide tranexamique**

Commercialisé sous le nom d'Exacyl®, il est doté d'une activité anti fibrinolytique et d'un effet antihémorragique non spécifique indiscutable. Il représente un traitement d'appoint utile pour les petits gestes chirurgicaux ou pour réduire la fréquence des saignements. [29]

IV .1.7.2.Modalités d'utilisation de ces produits : traitement et prévention des hémorragies

Schématiquement, les facteurs antihémophiliques peuvent être utilisés dans trois types de situation : traitement d'un accident hémorragique, prévention des accidents hémorragiques et couverture d'un geste chirurgical ou invasif [32-33].

- **Principes du traitement des accidents hémorragiques**

Il est habituel de considérer que le taux de facteur VIII à atteindre pour arrêter un saignement chez un hémophile est d'environ 30 %. On dispose de deux méthodes pour apprécier les quantités injectées :

- Méthode empirique globale :

La dose à injecter se calcule par la formule :

$$\text{Dose} = [\text{poids en kg} \times \text{augmentation attendue (\%)}] / 2$$

Ainsi, pour un hémophile sévère (< 1 %) pesant 60 kg, un taux de 30 % est atteint théoriquement par 900 U de facteur VIII ;

- Calcul de la dose à partir des données pharmacocinétiques chez l'individu :

Pour obtenir une plus grande précision, compte tenu des variabilités interindividuelles de cinétique médicamenteuse, il est important d'effectuer une étude pharmacocinétique chez l'hémophile avec le produit qu'il utilise. Elle consiste à injecter en général 25 UI/kg, à distance de tout épisode hémorragique et de toute injection récente, puis à mesurer les taux de facteur VIII à 30 min, 1 heure, 4 heures, 8 heures, voire 24 heures.

Ceci permet de disposer de deux paramètres cinétiques importants, le taux de récupération et la demi-vie.

Le taux de récupération est le taux mesuré immédiatement après injection. On constate habituellement qu'une injection de 1 U/kg de facteur VIII augmente le taux de facteur VIII de 2 U/ dl.

C'est à partir de ces données qu'ont été établies les formules empiriques précédentes. Parfois, la récupération est plus faible et nécessite des doses plus importantes.

La demi-vie de la molécule est le temps au bout duquel 50 % du produit circulant est éliminé. La demi-vie du facteur VIII est habituellement de 10 à 12 heures. C'est la raison pour laquelle, en cas d'hémorragie importante ou de chirurgie, il faut répéter les injections de facteur VIII toutes les huit heures. [29]

- **Mesures spécifiques liées au type d'accident hémorragique** [29]

Les modalités thérapeutiques précises (doses injectées, rythme d'injection et mesures d'accompagnement) diffèrent selon le site de l'hémorragie :

➤ **Hémarthroses**

Les doses sont habituellement de 20 UI/kg à 30 UI/kg une ou deux fois par jour pour le facteur VIII. Il est rare d'avoir à dépasser des durées de traitement de deux jours. L'articulation doit être mise au repos jusqu'à disparition des symptômes. L'application d'une vessie de glace permet de réduire la douleur et de limiter l'épanchement. En cas d'épanchement abondant et douloureux, il peut être proposé une ponction articulaire sous asepsie stricte.

➤ **Hématomes**

Les plus fréquents sont les hématomes musculaires, en général post-traumatiques. Les doses sont habituellement les mêmes que dans l'hémarthrose, mais la durée de traitement est parfois plus prolongée car les hématomes sont souvent traités avec retard, lorsque le mollet, la cuisse ou la fesse contiennent déjà des quantités de sang importantes. Les hématomes très importants ou à risque compressif peuvent imposer, en plus des gestes spécifiques, le recours à des posologies plus élevées : 40 UI/kg à 50 UI/kg pour le facteur VIII. Le massage des hématomes est formellement déconseillé.

Des mesures spécifiques doivent être mises en œuvre pour les hématomes de localisation dangereuse. La substitution doit se faire à un niveau élevé : 50 UI/kg à 60 UI/kg trois fois par jour pour le facteur VIII.

Dans tous les cas, il est important d'associer au traitement de l'hématome, lorsque cela est possible, l'application de froid et la compression.

➤ **Hématuries**

Il est préférable de ne pas injecter de facteur antihémophilique, car ceci peut déclencher une crise de colique néphrétique en favorisant la création d'un caillot. Les hématuries de l'hémophile ne sont jamais graves par elles-mêmes. En cas de récurrence fréquente, il peut être nécessaire de recourir à un avis spécialisé afin de ne pas laisser évoluer une lésion de l'appareil urinaire.

➤ **Hémorragies digestives**

Elles relèvent des mêmes mécanismes que les hémorragies digestives chez le non-hémophile. Elles nécessitent une substitution importante, telle qu'elle est appliquée en contexte chirurgical : 50 UI/kg à 60 UI/kg de facteur VIII trois fois par jour.

Ceci permet de mener les investigations nécessaires à ce type de situation, qui sera ensuite gérée comme le sont les hémorragies digestives chez le non-hémophile.

➤ **Situations particulières**

En cas de traumatisme crânien ou de polytraumatisme, de suspicion de pathologie abdominale relevant d'une thérapeutique chirurgicale, il est préférable, même en l'absence d'hémorragie documentée, d'appliquer un traitement systématique : 40 UI/kg à 50 UI/kg pour le facteur VIII, de façon à obtenir une hémostase normale.

• **Prévention des hémorragies en dehors de la chirurgie : la prophylaxie**

➤ **À qui s'adresse la prophylaxie ?**

La prophylaxie primaire est recommandée au cours de l'hémophilie sévère et de certaines hémophilies modérées à phénotype clinique hémorragique. Pour l'hémophilie modérée ou fruste, le traitement à la demande, appliqué uniquement en cas d'accident hémorragique, est en général proposé. Une prophylaxie secondaire plus ou moins prolongée peut en revanche être indiquée en cas d'accidents hémorragiques récurrents, articulaires en particulier, ou après un accident hémorragique grave.

➤ **Quand la mettre en place ?**

La prophylaxie peut être instituée dès le diagnostic d'hémophilie, du moins dans la première année de vie [34, 35]. Il s'agit de prophylaxie primaire vraie, sans attendre le premier accident hémorragique. En fonction du contexte ou des pratiques propres à chaque centre ou pays, elle est parfois mise en œuvre après un, deux, voire trois accidents hémorragiques, ou bien dès la première hémarthrose, ou bien lors de la récurrence d'une hémarthrose sur une même articulation. Il est en tout cas bien démontré que l'efficacité de la prophylaxie pour prévenir l'arthropathie hémophilique dépend surtout de la précocité de la mise en place [34].

Dans certains cas, la prophylaxie est instaurée de façon provisoire ou définitive pour empêcher l'aggravation d'une atteinte articulaire. On parle alors de prophylaxie secondaire [36].

Un bénéfice supplémentaire de la prophylaxie est de faciliter l'acceptation des injections par les enfants, car les circonstances sont plus favorables : injection à froid, sans urgence, sans pression excessive de la part de l'entourage.

➤ **Conduite du traitement prophylactique**

L'objectif est de maintenir constamment un taux circulant de facteur antihémophilique suffisant pour éviter les accidents hémorragiques. Les doses utilisées dans la prophylaxie classique sont de 25 UI/kg de facteur VIII toutes les 48 heures, avec des variations possibles de 30 UI/kg à 40 UI/kg toutes les 48 heures ou trois fois par semaine.

En pratique, ce traitement peut être modulé. Les recommandations françaises [37] de la Coordination médicale pour l'étude et le traitement de l'hémophilie (COMETH) proposent une escalade de doses par paliers : la posologie au premier palier pour le facteur VIII est de 50 UI/kg une fois par semaine, au deuxième de 30 UI/kg deux fois par semaine, au troisième de 25 UI/kg à j1 et j3 et 30 UI/kg à j5, ou de 30 UI/kg toutes les 72 heures. Le quatrième palier est le traitement classique à la posologie de 25 UI/kg toutes les 48 heures.

L'objectif est de prévenir complètement les hémarthroses spontanées et de réduire à moins de deux l'incidence annuelle des hémarthroses traumatiques. En cas de survenue de deux hémarthroses en moins de six mois, il est proposé de passer au palier supérieur. D'autres protocoles sur mesure sont utilisés dans différents pays, avec des principes assez similaires.

- **Prévention des hémorragies per- et postopératoires**

En cas d'intervention lourde, l'objectif de la prévention est d'obtenir un taux de facteur VIII proche de la normale et en tout cas supérieur à 60 %. Le traitement doit être poursuivi à raison de trois injections par jour pour le facteur VIII pendant toute la période postopératoire immédiate, et tant que les redans montrent la persistance d'un saignement interne. Après cette période, le traitement dépend du type de chirurgie. En chirurgie viscérale, la durée de traitement est en général d'une dizaine de jours, avec une réduction des doses au-delà de trois jours après l'intervention. En chirurgie orthopédique, il est nécessaire de maintenir une couverture antihémophilique pendant la période de rééducation, le plus souvent, avec un schéma de type prophylactique.

Des recommandations précises existent concernant la possibilité d'appliquer des traitements par perfusions continues en fonction du type de produit. Il est habituel de ne pas prescrire de prévention antithrombotique lors des interventions chirurgicales chez l'hémophile.

IV.1.8.Complications du traitement substitutif

IV.1.8.1.Complications infectieuses

Complication du traitement par des concentrés d'origine plasmatique :

- Infection à VIH.
- Hépatite B, C et virus GB.
- Infection par le parvovirus.
- Infection par des agents transmissibles non conventionnels. [38]

IV.1.8.2.Développement d'anticorps non neutralisants (ANN)

Ces ANN sont détectées à l'aide de tests immunologiques (ELISA, Luminex entre autres) pratiqués sur des plasmas d'hémophiles sans inhibiteurs détectés par la méthode Bethesda. Ces Anticorps n'interagissent donc pas avec les fonctions procoagulantes du FVIIIc : ils sont non-inhibiteurs. Une large étude multicentrique de 210 patients a pu montrer une prévalence de l'ordre de 18 % de ces ANN à l'aide de la technologie Luminex . Leur principale cible semble être la chaîne lourde du FVIIIc. 18% de ces ANN étaient dirigés contre le domaine B du FVIII. L'impact clinique de ces ANN n'a pas encore été démontré. Certains auteurs ont émis l'hypothèse que ces anticorps pourraient être responsables d'une augmentation de l'élimination du FVIIIc et donc être impliqués dans les mauvaises récupérations biologiques du FVIII parfois observées chez certains patients. Actuellement, la détection de ce type d'anticorps ne fait pas partie du suivi classique d'un hémophile. Leur détection n'influe pas sur la prise en charge du patient hémophile. Des études sont en cours dans le but de mieux connaître la physiopathologie de ces ANN. [38]

IV.1.8.3.Développement d'inhibiteurs dirigés contre le FVIIIc.

Environ 30 % des hémophiles A sévères développent des anticorps dirigés contre le FVIIIc. L'apparition de tels inhibiteurs constitue une importante complication mettant en échec les traitements habituellement utilisés. La gravité de cette complication est fonction du titre de l'inhibiteur. [38].

Selon la réponse à l'injection de concentrés de facteur VIII les hémophiles avec inhibiteurs sont classés en patients « fort répondeurs » ou « faibles répondeurs ». Schématiquement :

- les patients « forts répondeurs » sont des hémophiles dont le titre de l'inhibiteur 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) ces anticorps n'ont pratiquement aucune chance de disparaître spontanément et sont ceux qui induisent les plus grandes difficultés thérapeutiques.

- les patients « faibles répondeurs » gardent des titres bas (inférieurs à 5 UB) faiblement influencés par l'exposition au facteur VIII (pas ou peu de réponse anamnestic) ces anticorps 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 ;

- certains inhibiteurs sont également dits « transitoires » : il s'agit d'inhibiteurs qui disparaissent 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) mais ils peuvent se réapparaître ultérieurement dans certaines circonstances [93]

IV.2.Développement d'inhibiteurs

IV.2.1.Prévalence et facteurs de risque d'apparition des inhibiteurs

La survenue d'un inhibiteur est aujourd'hui la complication la plus fréquente du traitement. L'apparition des inhibiteurs est due à l'interaction, voire la synergie, de nombreux facteurs de risque qui peuvent être d'une part intrinsèques et donc propres au patient lui-même, et d'autre part extrinsèques et donc dépendants des modalités thérapeutiques (type de F VIII administré, dosage ou mode d'administration), ou même à l'environnement.

IV.2.1.1.Facteurs liés au patient :

- Type d'hémophilie :

L'apparition d'inhibiteurs est beaucoup plus fréquente dans l'hémophilie A que dans l'hémophilie B. Il faut aussi tenir compte du degré de sévérité de l'hémophilie. Le risque d'inhibiteur est environ quatre fois plus élevé en cas d'hémophilie A sévère qu'en cas d'hémophilie modérée ou mineure. [39]. Ainsi, la prévalence des inhibiteurs dans l'hémophilie A sévère varie de 15 à 33 % en fonction des études [38]. Dans l'hémophilie B sévère, elle ne représenterait que 1 à 5 % des cas.

- Âge du patient et date du traitement :

Les inhibiteurs apparaissent plus fréquemment dans la petite enfance (dans les six premiers mois de la vie). Les études montrent que l'incidence cumulée d'inhibiteur est de 41% chez ceux traités pour la première fois avant l'âge de 6 mois. Cette incidence est plus faible, 29%, si le premier traitement a été administré entre 6 et 12 mois de vie et diminue à 12% si la 1ère injection de FVIII a été effectuée après l'âge de 12 mois.

Le jeune âge au premier traitement semble constituer un facteur de risque d'inhibiteur, mais les réserves suivantes doivent être émises : - Les enfants traités le plus précocement sont peut-être ceux qui sont atteints le plus sévèrement et porteurs des mutations les plus délétères (absence complète de FVIII), et donc avec un risque plus élevé d'inhibiteur.

En général les inhibiteurs apparaissent tôt, dans les 10 à 50 (au maximum 100) premiers jours d'exposition au produit (JCPA : journées cumulées en présence de l'antigène) [40]. Le risque devient faible (mais non nul) au-delà du 100^{ème} jour de traitement.

- Origine ethnique

L'origine ethnique influence clairement le développement d'inhibiteurs chez l'hémophile. La fréquence d'inhibiteur est plus grande chez les patients noirs d'origine africaine par rapport à une population caucasienne (20.9% versus 13.9%).

Certaines variations génétiques concernant le FVIII, et récemment rapportées [13], pourraient contribuer à cette prédisposition. Des différences significatives ont été identifiées dans la séquence d'acides aminés, et ce y compris dans les régions du FVIII souvent reconnues par

des anticorps inhibiteurs, les domaines A2 et C2 [41]. Ce polymorphisme, partiellement en relation avec l'origine ethnique, pourrait jouer un rôle dans l'induction d'anticorps inhibiteurs et pourrait rendre compte d'une observation clinique.

Le FVIII était jusqu'il y a peu considéré comme faiblement polymorphique, c'est-à-dire que la séquence d'acides aminés constituant la molécule était considérée comme ne variant pas d'un individu à l'autre. Mais très récemment, des différences significatives ont été identifiées dans la séquence d'acides aminés, et ce y compris dans les régions du FVIII souvent reconnues par des anticorps inhibiteurs, les domaines A2 et C2 [41]. Ce polymorphisme, partiellement en relation avec l'origine ethnique, pourrait jouer un rôle dans l'induction d'anticorps inhibiteurs et pourrait rendre compte d'une observation clinique, à savoir que la fréquence d'induction d'inhibiteurs est plus forte dans certains groupes ethniques et notamment chez les noirs. [42]

○ Facteurs génétiques et familiaux :

Parmi les facteurs de risque génétique :

✓ **Le type de mutation touchant le gène du F VIII**

Les anomalies affectant le gène du FVIII et entraînant l'hémophilie modifie considérablement le risque d'apparition d'inhibiteur. Ils se répartissent en deux groupes :

- Celles qui se révèlent fortement délétères et empêchent toute synthèse de la molécule (inversions, délétions étendues, mutations non-sens) sont associées à un risque d'inhibiteur élevé, variant entre 20 et 90% des patients traités, ces derniers pouvant être considérés comme « naïfs » vis-à-vis du FVIII.
- Celles qui résultent en une synthèse de FVIII, certes anormale mais significative (mutations faux sens ou anomalie d'épissage), pour lesquelles le risque d'inhibiteur est plus faible et estimé à 10% environ des patients traités.

Ces données sont issues d'une synthèse récente d'Oldenburg *et al*[43], et de données obtenues avec des cohortes homogènes de PUPs traités par FVIII recombinant [44] et de la base de données internationales HAMSTeRS (haemophilia A mutation, structure, test and resource site) (<http://europium.csc.mrc.ac.uk>) qui collige toutes les anomalies génétiques répertoriées, à l'exception des inversions de l'intron 22 et de l'intron 1.

- Le risque de développer un inhibiteur diffère selon l'anomalie génétique causale et décroît comme suit :

- Délétions étendues touchant plusieurs exons : 68%
- Mutations non-sens touchant la chaîne légère : 50%
- Inversion de l'intron 22 : 35%
- Petites insertions ou délétions de type non A run : 20%
- Mutations non-sens touchant la chaîne lourde : 14%
- Délétions étendues ne touchant qu'un seul exon: 12%
- Mutations faux-sens touchant la chaîne légère : 12%
- Petites insertions ou délétions de type A run : 6%
- Mutations faux-sens touchant la chaîne lourde : 4%
- Anomalies d'épissage : 2%

Parmi celles-ci trois sont associés à un risque accru d'inhibiteur : la mutation à codon stop, la délétion étendue et l'inversion de l'intron 22. Il n'y a pas de synthèse de FVIII (pas de F VIII : Ag).

Dans le cas des autres mutations il y a synthèse d'une molécule de F VIII, non fonctionnelle mais néanmoins présente, d'où un type de réponse immune probablement différent. On peut aussi remarquer que la présence de F VIII: Ag est retrouvée dans 30 % environ des cas d'hémophilie A sévère en l'absence d'inhibiteur et que ce chiffre correspond à peu près à la fréquence des mutations faux sens ou micro délétions observée dans l'étude de Schwaab *et al.*

- Chez les hémophiles modérés ou mineurs, ce sont essentiellement des mutations ponctuelles qui sont impliquées résultant en une modification d'acides aminés portant surtout sur les domaines A2, C1, C2 et plus rarement A1 et A3. L'implication de ces mutations dans le développement des inhibiteurs est évoquée par la proportion élevée d'antécédents familiaux (41 %) parmi les malades testés. Les mutations ponctuelles suivantes sont à considérer comme à risque plus élevé d'inhibiteur : Arg593His ; Try2105Cys ; Arg2150His ; Trp2229Cys (liste non exhaustive).

- Arg593-Cys cette mutation qui résulte en une hémophilie mineure affecte très probablement la structure du domaine A2 et induit des anticorps de spécificité variable reconnaissant ou non le propre F VIII (muté) du patient ; dans les cas rapportés par Van den Brink [52] et Thompson [51], l'anticorps reconnaît à la fois le F VIII sauvage et le F VIII muté d'où la diminution très significative de la concentration de F VIII des patients ; dans l'observation rapportée par

Fijnvandraat [53], l'inhibiteur ne reconnaît que le F VIII sauvage et non le propre F VIII du patient d'où la persistance chez ce dernier d'un taux de F VIII de l'ordre de 14 % .

- Arg 2150-His retrouvée également en cas d'hémophilie mineure ; dans les observations rapportées par Santagostino [55] et Hay [35], la présence de l'inhibiteur est associée à un taux de F VIII très abaissé ; dans l'un des deux cas rapportés par Peerlinck [56] il coexiste à la fois un inhibiteur de titre élevé (300 UB) et un taux de F VIII circulant peu abaissé (23 %), l'anticorps ne reconnaissant alors que le F VIII sauvage et non le F VIII muté ; l'influence exercée par le facteur Willebrand dans le mécanisme de neutralisation du F VIII évoque d'ailleurs le rôle du résidu d'Arg2150 dans la liaison du F VIII au vWF [57] ; de façon générale la zone de jonction domaines C1 et C2 pourrait des constituer une zone à haut risque pour le développement des inhibiteurs dans le cas des hémophilies modérées et mineures [35, 57].

○ **Le système majeur d'histocompatibilité** [42]

Les différences rapportées entre hémophiles avec ou sans inhibiteur ne portent que sur les antigènes de classe II. Dans un groupe homogène de 71 patients atteints d'hémophilie A sévère liée exclusivement à une inversion de l'intron 22 ayant tous dépassé 100 jours d'exposition aux concentrés de F VIII, une augmentation de fréquence de l'haplotype HLA-A13, B7, C7, DQA*0102, DQB*062, DR15 (fréquent en Europe du Nord) est mis en évidence chez les patients avec un inhibiteur comparés à ceux sans inhibiteur' toutefois cette différence n'apparaît pas significative [47]. Une autre étude a été réalisée au Royaume-Uni chez 176 hémophiles sévères dont 44 % porteurs de l'inversion de l'intron 22 et 30 % d'un inhibiteur de titre élevé [46]. Une augmentation de fréquence de l'haplotype HLA-DRB1*1501, DQA1*0102, DQB1*0602 est retrouvée chez les malades avec inhibiteur par rapport à la population témoin. Seule l'élévation de fréquence de l'allèle DQA1*0102 est significative essentiellement chez les patients porteurs de la mutation intron 22. Ces études sont rendues particulièrement difficiles par la variabilité des fréquences alléliques dans les différentes populations (ce qui limite forcément les effectifs), le risque de méconnaître des antécédents d'inhibiteur chez les patients considérés comme dépourvus d'anticorps, la variété des mutations impliquées dans l'hémophilie et la variété des spécificités des anticorps anti-F VIII. Néanmoins, l'élution d'un petit peptide de 16 aa de la chaîne légère du F VIII (aa 1 706-1 721) à partir d'une lignée cellulaire HLA-DR2 renforce l'hypothèse d'une relation possible entre les antigènes de classe II et le type de réponse immune chez l'hémophile [61].

Cependant, a facteur génétique égal, tous les sujets ne développent pas forcément d'inhibiteurs y compris au sein des mêmes familles et y compris d'ailleurs chez des jumeaux monozygotes. Dans une série portant sur 48 paires de frères hémophiles dont l'un au moins avec un inhibiteur on observe ainsi que dans 25 paires (52 %) seul un des frères est porteur d'un inhibiteur et pas l'autre ; enfin sur quatre paires de jumeaux, l'une d'elle est totalement discordante (présence d'un inhibiteur élevé chez l'un des frères, absent chez l'autre). Ces observations suggèrent donc qu'en dehors des facteurs génétiques (type de la mutation, caractéristiques ethniques, système majeur d'histocompatibilité), d'autres facteurs sont probablement aussi à prendre en compte

IV .2.1.2.Facteurs de risque liés au traitement substitutif

➤ Les modalités thérapeutiques

Certaines situations peuvent comporter un risque accru de voir apparaître un inhibiteur. L'incidence des inhibiteurs serait plus élevée en cas de première administration précoce de FVIII. L'âge à la première exposition serait donc crucial mais cette donnée est à nuancer car elle n'a pas été confirmée lors de plusieurs études. Les modalités d'injections ont également été incriminées : en effet, la prophylaxie serait associée à un risque plus faible que l'administration des traitements à la demande. Le passage de l'utilisation d'un produit de pureté intermédiaire vers un produit de haute pureté [46] ; l'exposition à une multiplicité de produits [47] ; la combinaison d'un changement de produit, d'un traitement intensif administré en particulier lors d'une intervention chirurgicale, d'une administration en perfusion continue pourraient revêtir un risque particulier [48-49].

➤ La nature des concentrés de facteur VIII :

L'influence exercée par le type de concentré de F VIII reste un sujet largement discuté. Le type de traitement substitutif utilisé, recombinant ou plasmatique, est sujet à de nombreux débats. Actuellement, les données de la littérature ne permettent pas de statuer de manière définitive sur le risque en fonction du type de produit. [38]

Le rôle exercé par les concentrés a été clairement établi dans au moins deux circonstances liées à l'introduction de concentrés plasmatiques dont le mode d'inactivation virale avait été modifié qui ont déclenché rapidement une forte augmentation de l'incidence des inhibiteurs anti-F VIII chez des malades déjà largement traités (en anglais : PTPs pour previously treated

patients) et qui n'avaient jusque-là pas développé d'inhibiteur. Ce phénomène a été observé aux Pays-Bas et en Belgique en 1990 après introduction d'un concentré de F VIII plasmatique de pureté intermédiaire dont le mode d'inactivation virale de chauffage à sec (72 h à 68 °C) avait été remplacé par une pasteurisation (chauffage 10 h à 60 °C en milieu liquide) [50, 51] puis plus tard en 1995 en Belgique et en Allemagne après l'introduction d'un concentré de F VIII plasmatique à double inactivation virale comportant un traitement par solvant détergent et une pasteurisation [52, 53]. Ces nouveaux anticorps avaient des caractéristiques communes : apparition chez des malades préalablement traités (plus de 200 JCPA) jusque-là sans inhibiteur, délai d'apparition tardif (après 100 à 150 jours d'exposition), titre en général élevé avec de fortes répercussions sur la réponse thérapeutique, disparition rapide de l'inhibiteur après remplacement du F VIII incriminé par une autre variété de F VIII [54]. Dans ces circonstances la responsabilité du type de concentré est clairement engagée. [40]

En revanche, l'apparition d'un inhibiteur chez un malade qui n'a jamais été traité jusqu'alors par F VIII (PUPs : *previously untreated patients*) est un phénomène plus complexe qui doit dans son interprétation tenir compte non seulement du type de produit reçu mais aussi des autres facteurs de risque précédemment évoqués dont génétiques.

❖ **Les différences entre produits recombinants et produits plasmatiques [42]**

On peut certainement s'interroger sur les raisons qui pourraient expliquer une différence entre produits plasmatiques et recombinants au regard du risque d'inhibiteur. Tous les concentrés plasmatiques ne sont certainement pas équivalents. La concentration en vWF est ainsi plus importante dans les concentrés de F VIII de pureté intermédiaire et les concentrés préparés par chromatographie conventionnelle que dans les concentrés préparés par chromatographie d'immuno-affinité (alors qu'elle est nulle dans les concentrés de F VIII recombinants).

▪ **FVIII recombinants**

Certaines préparations de FVIII recombinant sont purifiées par affinité, avec utilisation d'une colonne sur laquelle un anticorps murin est fixé, mais cette procédure est appliquée aussi à certains FVIII plasmatiques. La quantité d'anticorps d'origine murine retrouvée dans le produit final est suffisamment significative pour induire une réponse immunitaire spécifique chez certains patients. Il n'existe actuellement aucune preuve que cette réponse anti-anticorps murins joue un rôle quelconque dans l'immunogénicité du FVIII. D'autres protéines, issues de la lignée cellulaire productrice de FVIII, sont potentiellement présentes, mais aucune

investigation n'a été réalisée jusqu'ici, afin d'évaluer leur rôle éventuel dans l'immunogénicité du FVIII.

Enfin, une proportion non négligeable de molécules de FVIII (jusqu'à 20%) présentes dans les préparations de FVIII recombinant n'est pas capable de se fixer au facteur Willebrand, étant ainsi plus sensibles à la protéolyse [55], mais les conséquences en termes d'inhibiteurs ne sont pas connues.

- **FVIII dérivés du plasma**

Les préparations de FVIII dérivées de plasma contiennent, à des taux variables, deux types de contaminants : des protéines co-purifiées avec le FVIII, qui sont essentiellement le fibrinogène, la fibronectine et des proportions variables d'immunoglobulines (dont une fraction est d'origine murine pour les FVIII immunopurifiés), des molécules ayant une action sur l'immunité, comme le TGF-beta et du facteur Willebrand (vWF). Toutes les préparations de FVIII dérivées du plasma ne contiennent pas de vWF.

De nombreuses publications soutiennent un rôle possible du TGF-beta, voire du fibrinogène et de la fibronectine, en tant que modulateurs de l'immunogénicité du FVIII. Ces études font usage de méthodes analytiques, évaluant notamment des marqueurs cellulaires de surface. Ainsi, une réduction de la proportion de lymphocytes T CD4+, ou de la production de certaines cytokines *in vitro* après stimulation de lymphocytes T a été observée après exposition à du FVIII plasmatique [56, 57]. Il n'est cependant pas démontré que ces effets immunomodulateurs, observés *in vitro*, jouent un rôle *in vivo* dans le contrôle de l'induction d'inhibiteurs.

Le rôle du vWF semble plus complexe. Il est clairement démontré que la liaison du FVIII au Vwf masque certains épitopes B (réduisant donc la fixation de certains anticorps) exprimés en particulier par le domaine C2 [58]. Cette liaison modifie aussi la conformation du FVIII de telle façon que des épitopes plus ou moins accessibles le deviennent [59]. Ceci implique une modification de l'antigénicité (reconnaissance par des anticorps) et non nécessairement de l'immunogénicité (capacité d'induire une réponse immunitaire) du FVIII.

Les F VIII d'origine plasmatique pourraient aussi moduler la réponse immunitaire et en particulier les interactions entre cellules B et cellules T par l'axe CD40/CD40L [60]. La modulation de la réponse immunitaire pourrait dans ce système être expliquée par la présence de certains composants type TGF-beta dans les produits d'origine plasmatique, totalement absents des recombinants [61, 62].

Les concentrés plasmatiques pourraient ainsi différer entre eux par de nombreuses caractéristiques incluant la concentration en vWF, la composition en PL, le mode d'inactivation virale, la plus ou moins grande concentration en protéines contribuant à moduler l'expression de la réponse immunitaire.

Facteurs augmentant le risque de développer un inhibiteur		
Facteurs génétiques	Génotype F	Mutations non sens Inversion de l'intron 22 Large délétions
	Antécédents familiaux d'inhibiteurs	1 ^{er} degrés surtout
	Ethnie	Non Caucasien
	Génotype de certains gènes	TNF Alpha IL 10
Facteurs non génétiques	Modalités thérapeutiques	Traitement à la demande Diffusion/injection sous cutanée du Chirurgie Age à la première injection Traitement intensif pour hémorragie majeur
Facteurs diminuant le risque de développer un inhibiteur		
Facteurs génétiques	Génotype de certains gènes	CTLA-4
Facteurs non génétiques	Modalités thérapeutiques	Prophylaxie régulière

Tableau 2: Facteurs influençant le risque de développer un inhibiteur

IV .2.1.3. Autres facteurs : [42]

*La transfusion de produits sanguins labiles (PSL) : peut constituer une première exposition au FVIII plasmatique. En cas d'apparition ultérieure d'un inhibiteur anti-FVIII, on

peut donc émettre l'hypothèse qu'il s'agit d'une relance d'un inhibiteur, dont l'apparition a été provoquée par la transfusion antérieure de PSL. Ceci explique la position prise dans les études françaises d'exclure de l'analyse de suivi des enfants traités par FVIII, ceux ayant des antécédents transfusionnels avant la première injection de FVIII. Si la transfusion de PSL est effectuée simultanément au premier traitement par FVIII, le phénomène de relance d'inhibiteur n'intervient pas. La cohorte historique évaluée avec le FVIII LFB n'écarte pas les enfants transfusés moins de 24 heures avant la première injection de FVIII (données non publiées). Par ailleurs, la nécessité de transfuser des PSL est un signe indirect de gravité de l'épisode traité. Selon l'analyse comparative des deux cohortes historiques françaises traitées par FVIII recombinant et plasmatisque, la transfusion de PSL augmente le risque de développer un inhibiteur mais la différence n'est pas significative en analyse multivariée (données non publiées). Dans cette situation, il faut aussi tenir compte des effets de l'intensité du traitement, comme discuté précédemment.

Chez les patients pour lesquels on cherche à ne pas induire une relance de l'inhibiteur, la transfusion de concentrés érythrocytaires lavés est toutefois préconisée.

*Chez les malades infectés par le VIH, les antirétroviraux peuvent restaurer les fonctions immunitaires, évolution qui, associée à un syndrome inflammatoire, peut favoriser l'apparition d'un inhibiteur. Néanmoins, un tel événement peut aussi être contemporain de modifications du traitement Substitutif.

*Chez les malades infectés par le VHC, le traitement par interféron peut aussi être associé à l'apparition de nouveaux inhibiteurs.

*Les vaccinations : induisent par définition une stimulation du système immunitaire. On peut donc émettre l'hypothèse que si une injection de FVIII est effectuée à proximité d'une vaccination, le risque d'apparition d'un inhibiteur est augmenté, surtout s'il y a extravasation du FVIII. Ce risque n'est jusqu'à présent que théorique. En France, cette information est recueillie dans le protocole PUPs mené par le Réseau FranceCoag, ce qui permettra une analyse ultérieure de cette question.

*Allaitement maternel : il a été suggéré par certains auteurs que l'allaitement maternel exerçait un effet protecteur vis-à-vis de l'apparition d'inhibiteurs. Le lait maternel participe en effet au développement du système immunitaire digestif et à la mise en place d'une tolérance immune par voie orale. En outre, le lait maternel contient une protéine (human milk fat globulin) homologue au FVIII et au FV. Ceci a conduit une équipe suédoise (le taux d'allaitement maternel en Suède étant particulièrement élevé) à tester cette hypothèse dans un

groupe de 116 enfants hémophiles sévères (100 hémophiles A et 16 hémophiles B), dont 25 avaient développé un inhibiteur (19 hémophiles A et 6 hémophiles B). Les auteurs ne rapportent cependant aucune différence significative d'incidence d'inhibiteurs selon le recours ou non à l'allaitement maternel et sa durée [94].

Enfin, certains polymorphismes du TNF alpha et de l'IL 10 ont également été associés à un risque plus élevé.

À l'inverse, certains facteurs diminueraient le risque de développer un inhibiteur comme la prophylaxie régulière ou certains polymorphismes de la CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte associated protein-4).

IV.2.2.Mécanisme d'action

Les inhibiteurs anti-FVIII vont principalement compromettre l'interaction du FVIIIc avec ses différents partenaires (facteur von Willebrand, FIX, phospholipides ou FX) selon différents mécanismes. D'une manière générale, les Allo-anticorps ont une cinétique de type I c'est-à-dire qu'ils inhibent complètement, de manière dose-dépendante, l'activité pro coagulante du FVIII. L'épitope reconnu par l'anticorps et sa localisation interviennent de manière importante dans le mécanisme d'inhibition. Les principaux épitopes reconnus par les inhibiteurs précisément identifiés sont situés au niveau des domaines C2, A2 et/ou a3A3 du FVIII. [13].

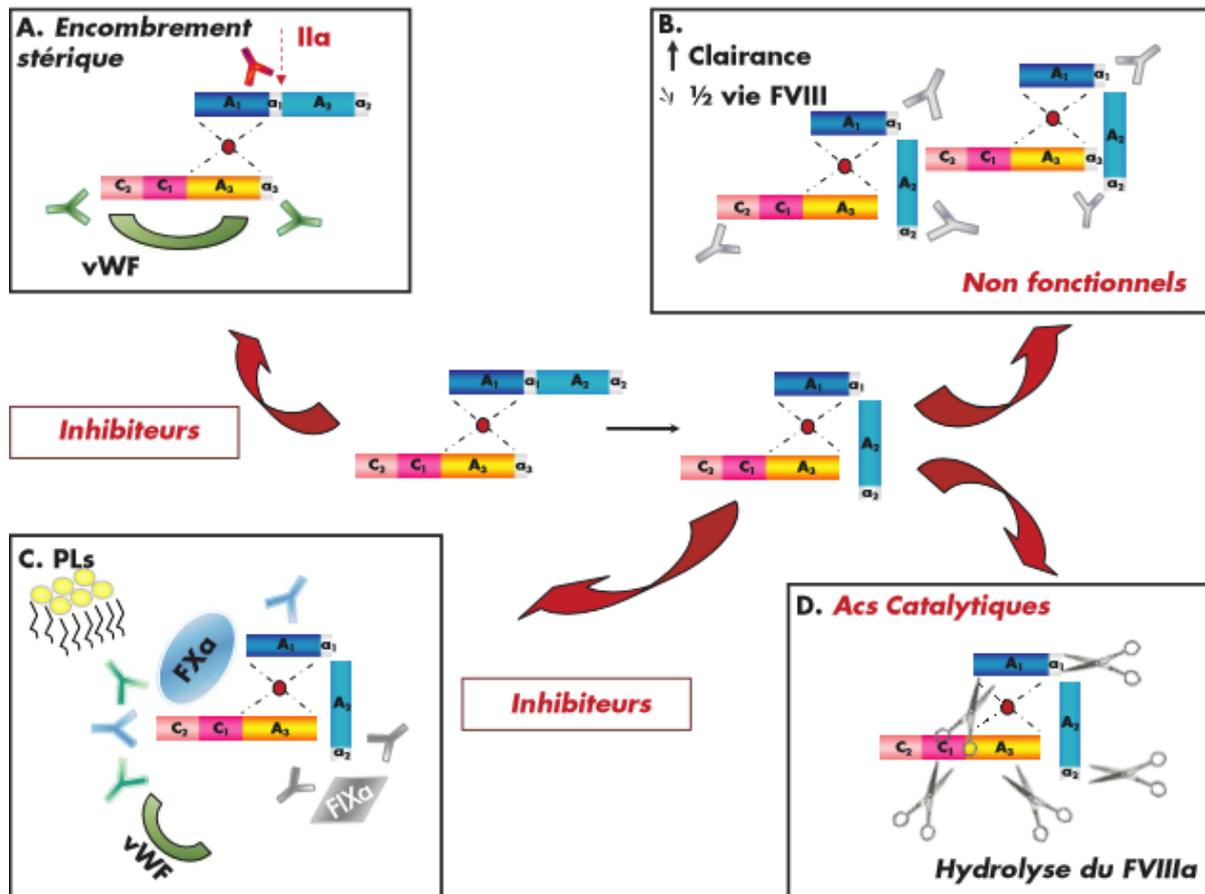


Figure 10 : Mécanismes d'action des inhibiteurs.

Un des mécanismes est fondé sur l'inhibition de la liaison du FVIII avec l'un de ces partenaires (A) ; les Acs anti-domaine C2 (en vert) empêchent l'interaction avec le vWF soit avec les PLs. Certains Acs anti-domaines C2, de la même manière que les Acs anti-domaines α1 (bleu) inhibent l'interaction du FVIII avec le FXa, et les Acs anti-domaines A2 et anti-domaines A3 (gris) perturbent l'interaction du FVIII avec le FIXa. Un deuxième mécanisme est fondé sur l'encombrement stérique (B) masquant les épitopes fonctionnels du FVIII. Certains inhibiteurs dirigés contre la région acide α1 (rouge) interfèrent avec l'activation du FVIII par la thrombine. D'autres Acs, spécifiques du domaine C2 ou de la région acide α3 (vert), empêchent la protection par le vWF, rendant le FVIII plus sensible à la protéolyse. Un autre mécanisme est lié à l'augmentation de la clairance du FVIII car certains inhibiteurs (gris) génèrent des complexes immuns avec le FVIII l'éliminant de la circulation (C). Le dernier mécanisme fait intervenir les anticorps catalytiques : certains inhibiteurs présentent une activité protéolytique et dégradent le FVIII (D).

Les Acs anti-domaine C2 vont essentiellement compromettre la liaison du FVIII au facteur von Willebrand ainsi qu'aux phospholipides électro-négatifs. Les Acs anti-A2 vont compromettre l'interaction avec le FIXa. Certains Acs dirigés contre le domaine A2 vont empêcher l'activation du FVIII par la thrombine. Enfin, les Acs dirigés contre le domaine A3 vont essentiellement compromettre l'interaction avec le FIXa [4]. Les Acs anti-C2 semblent être les plus fréquemment identifiés parmi les inhibiteurs développés chez l'hémophile A. Une autre catégorie d'Acs anti-FVIII est représentée par les Acs catalytiques. Ces Acs possèdent une activité enzymatique et catalytique directe sur le FVIII [5]. Cette catégorie particulière d'Acs serait présente chez plus de 50 % des hémophiles A avec inhibiteurs. Ces

anticorps catalytiques sont aussi décrits dans l'hémophilie acquise et sont capables de catalyser le FVIII mais aussi le FIX [6].

Les sites reconnus par les inhibiteurs anti-VIII ont d'abord été étudiés par les techniques d'immunoblotting utilisant des fragments de FVIII protéolysé par la thrombine ou des fragments recombinants. La majorité des épitopes reconnus par les anticorps anti-FVIII ont ainsi pu être localisés sur un fragment de 18,3 kDa en position N terminal du domaine A2 et/ou un fragment de 17,3 kDa en position C terminale du domaine C2, quelques-uns d'entre eux reconnaissant en plus le domaine A3. Certains anticorps dirigés contre la zone acide AR1 ont parfois aussi été décrits. Ultérieurement les méthodes de neutralisation ont montré que certains sites antigéniques pouvaient être détruits par les techniques de dénaturation SDS utilisées au cours de l'immunoblotting. La distinction entre anticorps neutralisants et non neutralisants était par ailleurs établie par d'autres équipes soulignant l'intérêt de privilégier les méthodes mesurant une activité inhibitrice plutôt que celles évaluant uniquement la liaison de l'anticorps à la protéine.

Grâce à l'utilisation des hybrides FVIII porcine/FVIII humain et aux travaux du groupe de Lollar [13], il a été possible de localiser plus précisément les épitopes reconnus par les inhibiteurs anti-F VIII :

- anti-A2 : la composante anti-A2 est associée au fragment 484-508 ; la façon dont cet anticorps neutralise l'activité coagulante du F VIII reste encore obscure puisque cette variété d'anticorps ne bloque pas la liaison du F VIII au facteur IX ou aux PL ; ces anticorps se comportent néanmoins comme des inhibiteurs non compétitifs du complexe F VIIIa/IXa/PL ;

- anti-C2 : la plupart des anti-C2 empêchent la liaison du F VIII au vWF et aux PL d'où probablement une instabilité du F VIII ; par ailleurs le F VIIIa ne se lie que de façon incomplète aux PL d'où une insuffisance de l'activation du facteur X ; l'épitope reconnu par ces anticorps a été localisé dans la portion C terminale du fragment C2 en position 2315-2330 avec un rôle important joué par les résidus Cys2326 et Glu2327 probablement dans le maintien de la conformation du site ; l'importance de sites davantage situés du côté N terminal du domaine C2 (2 181-2 243) a aussi été montrée , confirmé par Barrow et al. pour les sites 2181-2 321 ; le rapprochement des extrémités N et C terminales du domaine C2 assuré par des ponts di-sulfures est probablement une composante importante de l'antigénicité du

domaine C2 ; plus rarement les anticorps anti-C2 ne bloquent que la liaison aux PL sans empêcher la liaison du vWF; dans ce cas la dissociation du F VIII et du vWF est ralentie ; comme les sites de liaison du vWF et des PL se chevauchent ceci entraîne probablement une interférence dans la liaison aux PL ; la liaison du F VIII aux PL protège le F VIII de l'activité inhibitrice des anti-C2 ;

Les anticorps anti-C2 semblent être les plus fréquemment identifiés parmi les inhibiteurs développés chez l'hémophile A.

- anti-A3 : dans le cas de la composante anti-A3 le site semble être localisé en position 1 694-2 017, peut-être plus en position 1 811-1 818 ou 1 778-1 823 bloquant la liaison du F VIIIa au F IXa ;

- anti-AR3 : enfin une composante dirigé contre le peptide d'activation 1 649-1 689 a été clairement identifiée dans plusieurs plasmas contenant une activité anti-A3 ; ces anticorps agissent très probablement en bloquant l'activation du F VIII.

-Une autre catégorie d'anticorps anti-FVIII est représentée par les anticorps catalytiques. Ces anticorps possèdent une activité enzymatique et catalytique directe sur le FVIII. Cette catégorie particulière serait présente chez plus de 50 % des hémophiles A avec inhibiteurs. Ces anticorps catalytiques sont aussi décrits dans l'hémophilie acquise et sont capables de catalyser le FVIII mais aussi le FIX. [38].

IV.2.3.Méthodes d'étude des inhibiteurs

IV.2.3.1. Méthode Oxford [63]

Principe : On fait incuber des dilutions du plasma à tester avec une quantité connue de facteur VIIIc ; puis on dose le FVIIIc résiduel.

Cette méthode utilise comme source de F VIIIc un concentré de F VIII dont la concentration est exprimée en U/ml.

Le taux d'anticoagulants est égal à l'inverse de la dilution du plasma à tester qui neutralise 0.5 UI de F VIII du mélange.

IV.2.3.2.Méthode de Kasper ou Bêthesda [13]

L'activité neutralisante des anticorps anti-FVIII du plasma est mesurée par la méthode de Kasper (Kasper, Aledort *et al.* 1975). Afin de neutraliser l'activité anti-FVIII présente dans le

plasma des sujets ayant développé des anticorps anti-FVIII, le FVIII exogène est détruit par chauffage 1 h à 56°C, avant de déterminer l'activité anti-FVIII. Le plasma ou les anticorps anti-FVIII immunopurifiés sont incubés avec un volume égal de pool de plasma citraté humain. Un contrôle est réalisé en incubant à parts égales un volume de pool de plasma citraté humain et un volume de tampon Owren koller 0,05 M pH 7,3. Les mélanges ont été incubés 2 h à 37°C. L'activité du FVIII est déterminée par méthode chromométrique en incubant à parts égales un volume de céphaline et de Kaolin (5 mg/ml), un volume de plasma exempt de FVIII et différentes dilutions de la solution à doser. Le temps de formation du caillot de 4 dilutions en série (1/20 ème à 1/160 ème) du pool de plasmas de référence a été comparé à celui des différentes dilutions des échantillons à tester. Le titre en unités Béthesda (UB) est défini comme l'inverse de la dilution donnant 50 % de FVIII résiduel [6].

IV.2.3.3. Méthode de Nijmegen [64]

Pour pallier le manque de sensibilité et de spécificité de la méthode pour les anticorps faibles la méthode de Nijmegen dérivée de la méthode Bethesda a été introduite en 1995. Cette méthode comporte deux différences par rapport à la méthode Béthesda : le maintien à pH 7,4 du mélange et du contrôle (pour éviter la diminution du F VIII : C liée à la baisse de pH au cours de l'incubation), l'utilisation d'un plasma déficient en F VIII comme contrôle au lieu de tampon pour égaliser les concentrations protéiques. L'utilisation de la variante dite Nijmegen semble ainsi réduire la fréquence des anticorps de faible titre, probablement non spécifiques.

IV.2.3.4. ELISA [65]

L'antigène (anticorps monoclonal murin anti-IgG humaine, FVIII immunopurifié, fragments F (ab')₂ d'IVIg ou d'IgG anti-FVIII immunopurifiés, ou fragments Fc d'IgG [Pasteur Mérieux]) à une concentration de 2 µg/ml (ou 10 UI/ml dans le cas du FVIII) dans 50 µl de PBS est adsorbé au fond de puits de plaques ELISA la nuit à 4°C. Les sites libres seront saturés par addition de 100 µl d'une solution de PBS-gélatine 1 % pendant 1 h à 37°C. Après lavage à l'aide de PBS, la solution à tester, diluée dans le tampon de PBS-gélatine, est incubée au contact de l'antigène pendant 1 h à 37°C. Les plaques sont ensuite lavées et incubées avec des anticorps secondaires adéquats (anticorps murin anti-IgG humaine ou anticorps de chèvre anti-IgG murine) couplés à la phosphatase alcaline. Après lavage, les anticorps secondaires fixés sont révélés avec le substrat de la phosphatase alcaline et la densité optique de chaque puits est mesurée au spectrophotomètre à 405 nm. Les résultats des tests démontrent des valeurs de densité optique égales ou plus grandes que 2 fois la valeur obtenue pour la moyenne des contrôles négatifs est considérée comme résultats positifs.

IV.2.3.5. Immunoblot [13]

Le FVIII (95 µl de FVIII à 0,76 mg/ml) est digéré par 5 µl de thrombine à 20 U/ml et dialysé contre un tampon tris 50 mM, Na Cl 150 mM et CaCl₂ 2 mM à pH 7,2. Après 1 h d'incubation à 37°C, 1 µl de PPACK (phenyl alanine proline arginine chloromethyl ketone) et 8,5 µl de tampon d'échantillon 4X (Glycérol, SDS, Tris, β-mercaptoéthanol, bleu de bromophénol, pH 6,8) sont ajoutés. Le FVIII digéré est soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS. Composition du gel de séparation (0,75 mm d'épaisseur): 10% d'acrylamide, 0,27% de bis-acrylamide, tris 0,375 M à pH 8,8, SDS 0,1%, TEMED 0,1%, 0,25% d'ammonium-persulfate. Composition du gel de dépôt : 4 % d'acrylamide, 0,1 % de bis-acrylamide, tris 0,125 M à pH 6,8, SDS 0,1 %, TEMED 0,8 %, 0,05 % d'ammonium persulfate. La migration des protéines est effectuée à température ambiante à l'aide d'un système mini-PROTEAN II (Bio-Rad) à une intensité de 25 mA/gel jusqu'à ce que le front de migration atteigne l'extrémité inférieure du gel. Après l'électrophorèse, les protéines seront transférées du gel sur une membrane de nitrocellulose (Schleicher et Schüll, Dassel, Allemagne) par transfert électrique semi-sec pendant 60 mn à 0,8 mA/cm² à l'aide d'un Semy Dry Electrobloetter B (Ancos, Danemark). La membrane de nitrocellulose est ensuite "bloquée" en présence de PBS/Tween 20 (Sigma) 0,2 % pendant 90 mn. Les IgG anti-FVIII immunopurifiés seront incubés avec la membrane dans un dispositif de type "Cassette

Miniblot System" (Immunetics Inc., Cambridge, MA) pendant 4 h à température ambiante avec agitation lente. Après incubation, la membrane est lavée avec du PBS/Tween 20 0,2 %, puis incubée en présence d'un anticorps secondaire anti-IgG humain couplé à la phosphatase alcaline (Sigma) pendant 90 mn à température ambiante. La membrane est ensuite lavée. Les anticorps fixés seront révélés avec du nitrobleu tetrazolium (NBT)/bromo-chloro-indolyl phosphate (BCIP) dans le tampon de substrat de la phosphatase alcaline (100 mM Tris pH 9,5, 100 mM Na Cl, 5 mM MgCl₂). La réaction est arrêtée après 3-5 mn en immergeant la membrane dans l'eau distillée. La quantification des IgG fixées et du profil des protéines est effectuée par densitométrie, en mode réflectif, à l'aide d'une caméra haute résolution CCD (Masterscan, Scanalytics, Billerica, MA).

IV.2.3.6. Tests radio immunologiques d'inhibition de liaison d'anticorps anti-FVIII [13]

Pour le marquage des anticorps, 100 µl de iodogène dilué dans du chloroforme à la concentration de 0,5 mg/ml sont déposés dans des tubes en verre à hémolyse de 5 ml. Les tubes sont laissés à température ambiante jusqu'à évaporation du chloroforme et conservés à 4°C jusqu'à utilisation. Quatre-vingts µg d'anticorps anti-FVIII immunopurifiés à partir des plasmas des patients Bor et Wal ainsi que 80 µg de F(ab')₂ d'IVIg anti-FVIII sont mélangés à de l'¹²⁵I à raison de 20 µCi/µg d'anticorps. Après 6 mn à température ambiante, le mélange est déposé sur une colonne PD-10 (Pharmacia Biotech) préalablement équilibrée par du PBS. La colonne est éluée par fractions de 500 µl. On mesure les cpm présents dans 2 µl de chaque fraction à l'aide d'un compteur g. Les fractions contenant plus de 105 cpm sont rassemblées et conservées à 4°C jusqu'à utilisation. Un volume de 50 µl de FVIII immunopurifié (Hemophil M, Travenol Lab., USA) à une concentration de 10 U/ml est déposé au fond de puits de plaques Falcon 3912 (Becton-Dickinson). Les plaques sont incubées la nuit à 4°C. Les sites libres seront saturés par l'addition de 100 µl d'une solution de PBS-gélatine 1 % pendant 1 h à 37°C. Dans le cas d'expériences d'inhibition compétitive, l'inhibiteur dilué en série au 1/3 dans 50 µl de PBS-gélatine est incubé au contact du FVIII pendant 3 h à 37°C. Cinquante µl d'anticorps anti-FVIII radiomarqués sont ensuite ajoutés à la concentration de 3 µg/ml et incubés une h à 37°C. Dans le cas d'expériences de compétition idiotypique, les anticorps radiomarqués à une concentration de 3 µg/ml sont préincubés dans un volume total de 50 µl en présence de dilutions en série au 1/3 d'inhibiteurs, pendant 4 h à 37°C. La solution préincubée a ensuite été incubée au contact de l'antigène pendant 1 h à 37°C. Les plaques ont été lavées à l'eau et les cpm comptés au compteur gamma [13].

IV.2.3.7. Mesure des constantes d'affinité des anticorps anti-FVIII immunopurifiés [13]

L'analyse en temps réel de la formation de complexes entre les anticorps IgG anti-FVIII et les domaines C2 et A2, la chaîne légère du FVIII, et le FVIII immunopurifié a été réalisée à l'aide du système BIAcore® (Biacore, Uppsala, Suède). Les anticorps IgG anti-FVIII immunopurifiés ont été dialysés contre un tampon NaHCO₃ 0,1 mol/l, pH 8,3 et incubés avec de la biotine 3 h à 4°C. Les IgG biotinylées ont ensuite été immobilisées sur une "sensorchip" SA comportant de la streptavidine dans un tampon HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,005%, CaCl₂ 5 mM, pH 7,4 (HBS-CaCl₂), selon la méthode recommandée par le fabricant. Toutes les expériences ont été réalisées à 25°C. Trente microlitres de tampon HBS-CaCl₂

contenant une concentration de 6,25, 12,5, 25, 50 ou 100 nM de FVIII immunopurifié ou de fragments de FVIII, a été injecté sous un flux continu de 5µl/mn permettant d'obtenir un temps de contact avec les anticorps fixés sur la sensorchip de 7 min. La dissociation a été enregistrée sur une période de 4 min suivant l'injection du tampon HBS-CaCl₂ seul. La régénération de la "sensorchip" a été effectuée après chaque analyse par deux injections successives de 10 µl d'une solution de HCl 100 mM. Un témoin négatif a été réalisé en injectant le FVIII immunopurifié ou les fragments de FVIII sur une "sensorchip" SA non activée. Les courbes d'association et de dissociation du témoin négatif ont été soustraites des courbes obtenues par l'injection du FVIII immunopurifié ou des fragments de FVIII sur les sensorchips activées par les anticorps anti FVIII. Le calcul des constantes d'association et de dissociation a été réalisé à l'aide du logiciel BIAevaluation 3.0 (Pharmacia).

Autres méthodes :

- Les techniques d'immuno-empreinte ou d'immuno- précipitation ont permis les premières études sur la spécificité épitopique des Acs anti-FVIII [20]. L'utilisation de fragments du FVIII générés 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 [21]. 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 à la résolution de l'analyse épitopique en raison de l'absence de dissociation de la chaîne 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 [22]. 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 homologues 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 technique Spot a été développée 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 [23]. Ces peptides sont ensuite immergés par une solution contenant les anticorps anti-FVIII et la liaison des Acs est révélée par un Acs marqué. 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 [24]. 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 rendant, en pratique, peu accessible en routine.

• La technique Luminex est également utilisée afin de rechercher et de caractériser les Acs anti-FVIII [25]. Cette technique est basée sur l'utilisation de microbilles magnétiques possédant chacune une combinaison spécifique de marqueurs fluorescents. À 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 reconnaît le codage fluorescent de la bille et un second laser reconnaît l'anticorps secondaire marqué à la phycoérythrine. Cette technique autorise également un multiplexage permettant théoriquement l'analyse d'environ 100 analytes différents.

IV.2.4. Traitements des hémophiles avec inhibiteurs : les facteurs activés

➤ Feiba®

Le terme Feiba est un acronyme (*factor eight inhibitor bypassing activity*). Ce dérivé, appelé aussi complexe prothrombique activé, est une fraction PPSB contenant des formes activées des facteurs de coagulation : FIIa, FVIIa, FIXa et des phospholipides. Il est d'origine plasmatique et subit une inactivation par chauffage à la vapeur. Il y a un risque connu de thrombose en cas de surdosage. [29]

➤ Novoseven®

Il s'agit de facteur VII recombinant activé (eptacog alfa activé) produit par génie génétique à partir de cellules BHK. Le facteur VII purifié passe par plusieurs étapes de chromatographie au cours desquelles la molécule s'active spontanément. Le facteur VII activé est stabilisé par du chlorure de calcium sans ajout de protéines humaines. Utilisé à forte dose, il s'avère d'une très bonne efficacité chez les hémophiles avec inhibiteur. Après injection, il se fixe de façon non spécifique à la surface des plaquettes, où il participe avec les autres facteurs activés de coagulation au phénomène d'explosion de thrombine thrombin burst.[29]

IV.2.5. Conduite thérapeutique actuelle

Le traitement de l'hémophilie avec inhibiteurs constitue un vrai défi. Les différentes stratégies actuelles reposent sur trois solutions : restaurer le processus de coagulation autrement que par l'administration du facteur VIII, leurrer le système immunitaire ou, solution plus radicale, tenter d'éliminer les inhibiteurs. [66]

IV.2.5.1. Contourner le besoin en facteur VIII

Si les patients avec un titre faible d'inhibiteurs peuvent parfois être traités avec de fortes doses de FVIII, ceux qui ont un titre élevé nécessitent des stratégies alternatives, sans facteur VIII humain. En effet, l'utilisation de facteur VIII humain serait susceptible de « relancer » leur production. [66]

✓ Les concentrés de complexe prothrombique (Feyzin®, Autoplex®)

Contiennent les facteurs de coagulation II, VII, IX et X sous forme partiellement activée. Ils permettent de « court-circuiter » le besoin en facteur VIII dans la cascade de coagulation. Leur efficacité clinique est démontrée depuis plus de vingt-cinq ans. Cependant, ils présentent plusieurs inconvénients. D'abord, leur action est très limitée dans le temps, ce qui peut rendre nécessaires jusqu'à trois injections par jour. De plus, un risque de coagulation trop importante existe (thrombose). Enfin, la présence de traces de FVIII dans ces complexes est susceptible de relancer la production d'inhibiteurs. [66]

✓ Le facteur VII activé recombinant (NovoSeven®) :

Amplifie la coagulation au niveau du site hémorragique. Autorisé en France depuis 1996, ce produit a fait ses preuves dans le traitement des accidents hémorragiques modérés et sévères et dans la prévention des saignements en cas de chirurgie. Bien toléré cliniquement et biologiquement, ce produit présente l'avantage de ne contenir ni facteur VIII ni facteur IX (pas de relance des inhibiteurs). De plus, les problèmes éventuels de coagulation excessive sont très rares. Enfin, sa nature recombinante garantit une sécurité virale maximale. Sa courte demi-vie est son principal inconvénient, rendant le traitement contraignant. [66]

IV.2.5.2.Mystifier le système immunitaire

✓ Le facteur VIII porcin (Hyate C®) :

Présente une forte homologie avec le facteur VIII humain et peut ainsi être efficace pour restaurer le processus de coagulation tout en trompant le système immunitaire, c'est-à-dire en passant inaperçu des inhibiteurs anti-FVIII humain.

Malgré quelques effets secondaires, ce facteur VIII porcin est particulièrement utile pour arrêter les saignements importants chez des patients ayant un fort titre d'inhibiteurs (de l'ordre de 50 UB). Toutefois, chez 25 à 35 % des patients, son utilisation conduit à une réponse immunitaire contre le facteur VIII porcin (développement d'inhibiteurs anti-FVIII porcin) lors de la seconde injection. [66]

IV.2.5.3.Eliminer les inhibiteurs

Certaines méthodes, toutefois assez lourdes à mettre en œuvre, permettent d'éliminer transitoirement les inhibiteurs. Souvent, elles doivent être associées à un traitement immunosuppresseur (par exemple cortisone) afin de bloquer la synthèse d'anticorps en amont.

✓ La plasmaphérèse :

Consiste à prélever le sang total, à « épurer » le plasma des inhibiteurs et à ré-administrer le sang sans inhibiteur au donneur.

Cette méthode diminue significativement le titre d'inhibiteurs et restaure ainsi temporairement l'efficacité des concentrés de FVIII. Elle peut par exemple être pratiquée efficacement avant une chirurgie non urgente. [66]

✓ L'immunoabsorption

Est une méthode d'épuration plasmatique qui fait intervenir la protéine A pour éliminer les anticorps anti-FVIII. Plus courante chez les malades atteints d'hémophilie acquise, cette méthode est parfois utilisée en association avec du rFVIIa (facteur VII activé recombinant) dans des cas compliqués d'échec thérapeutique. [66]

✓ **Le Rituximab®.**

Des études préliminaires indiquent que le Rituximab®, anticorps initialement destiné au traitement des lymphomes, pourrait être efficace pour éliminer les anticorps anti-FVIII, essentiellement dans le cas des auto-anticorps anti-FVIII retrouvés lors de maladies auto-immunes. [66]

✓ **L'induction de tolérance immune (ITI)**

L'élimination des inhibiteurs par tolérance immune reste le meilleur choix pour le long terme et surtout pour les titres élevés d'inhibiteurs. Cette approche consiste à administrer de fortes doses de facteur VIII. Les doses massives de facteur antihémophilique induisent une tolérance immune par excès d'antigène [67, 68].

Plusieurs éléments ont une valeur pronostique pour la réussite de l'ITI [9] :

***Titre de l'inhibiteur au moment de l'induction.** C'est le facteur prédictif le plus important : si le titre est inférieur à 10 UB, la probabilité de faire disparaître l'inhibiteur après ITI atteint 85 %, contre 43 % au-dessus de ce taux.

***Pic de l'inhibiteur avant l'ITI et pic après instauration de l'ITI.** Un taux d'inhibiteur dépassant 500 UB, surtout s'il est atteint en cours de traitement, laisse mal augurer d'une efficacité possible.

***Délai entre la détection de l'inhibiteur et l'instauration de l'ITI.** Il est souhaitable que l'ITI commence le plus tôt possible, mais il serait abusif de traiter par ITI un inhibiteur transitoire, tel qu'il se rencontre lors de l'initiation d'un traitement.

***Âge à l'instauration de l'ITI.** L'ITI a plus de chances de succès chez un enfant en bas âge.

Protocoles

Il est de règle d'utiliser le produit qui a entraîné l'apparition de l'inhibiteur. Cette recommandation consensuelle ne repose toutefois sur aucune base scientifique, comme d'autres recommandations en matière de tolérance immune [69].

Le schéma thérapeutique classique utilise des doses de 100 UI/kg/j à 300 UI/kg/j [70]. D'autres schémas sont possibles : 50 UI/kg trois fois par semaine ou des posologies intermédiaires entre ces deux propositions. L'absence de consensus sur les doses a conduit à proposer la mise en place d'un essai randomisé international.

Le titre de l'inhibiteur doit être évalué tous les mois. Le critère minimum de réussite est la disparition apparente de l'inhibiteur, c'est-à-dire la diminution du taux en dessous du seuil de détection de 0,5 UB

Il est habituel de faire suivre l'ITI d'une prophylaxie, à raison de deux ou trois injections par semaine.

Compte tenu des doses injectées, ce traitement est coûteux et contraignant. L'indication relève de centres spécialisés et ne doit être mise en place qu'après étude des caractéristiques de l'inhibiteur et de son évolution chez le patient. Une approche alternative, le protocole de Malmö, repose sur une étape d'immuno-adsorption combinée à l'administration d'immunosuppresseurs. Malgré un succès certain (élimination des inhibiteurs dans 63 à 100 % des cas), le moment d'induction d'une tolérance immune varie significativement d'un protocole à l'autre.

IV.2.6. Les nouvelles perspectives thérapeutiques

Les bases moléculaires de la réponse immunitaire contre le FVIII sont de mieux en mieux comprises. Cela permet d'envisager de nouvelles approches thérapeutiques. Ces nouvelles perspectives se fondent sur la modification de l'immunogénicité de la molécule du FVIII, sur la neutralisation des inhibiteurs ou sur une intervention au niveau des lymphocytes T « helper » CD4+.

IV.2.6.1. Réduire l'immunogénicité du FVIII

Deux approches, en cours d'évaluation, consistent à tenter de rendre le FVIII moins immunogène. Ces stratégies, très intéressantes, doivent cependant encore être testées chez l'homme :

– La première repose sur une modification chimique de la molécule de FVIII pour minimiser l'exposition des épitopes (zones du FVIII reconnues par les inhibiteurs). Cette

approche permettrait non seulement de réduire l'immunogénicité du FVIII, mais aussi d'augmenter sa demi-vie dans l'organisme.

– Un second espoir réside dans la nouvelle génération de molécules recombinantes hybrides FVIII humain - FVIII porcin. En effet, le FVIII porcin, moins antigénique que le FVIII humain, remplacerait alors le FVIII humain dans ses régions fortement immunogènes. Moins antigénique que le FVIII humain, ce produit hybride, réalisé par génie génétique, bénéficierait aussi de très grandes garanties contre d'éventuels risques de transmissions virales.

IV.2.6.2. Neutraliser les inhibiteurs :

Plusieurs méthodes, étudiées actuellement, consistent à bloquer l'action des inhibiteurs.

• Les leurres peptidiques

Certains peptides miment les épitopes reconnues par les inhibiteurs. Ils leurrent ainsi les inhibiteurs qui se fixent à eux au lieu de se fixer au FVIII. Le FVIII, libre, conserve alors son activité coagulante. L'utilisation de ces peptides serait une nouvelle voie prometteuse de traitement des inhibiteurs. Cependant, les travaux de recherche n'ont jusqu'à présents été effectués que chez la souris.

• Anticorps anti-idiotypiques :

Certains anticorps anti-idiotypiques neutralisent efficacement les inhibiteurs. Ces anticorps protecteurs sont présents dans le plasma des sujets sains. On a également décrit leur apparition chez de rares patients hémophiles avec inhibiteurs rendus tolérants au FVIII et chez certains patients en rémission d'une hémophilie acquise. L'effet neutralisant de ces anticorps anti-idiotypiques a été validé *in vivo* dans un modèle de souris rendues artificiellement hémophiles (invalidation du gène codant le FVIII).

• Neutralisation de l'activité protéolytique des inhibiteurs :

L'équipe de Srinivasan a démontré récemment une activité hydrolytique significative des inhibiteurs de 13 patients hémophiles sur 24. De nouvelles approches thérapeutiques importantes pourraient découler de ces travaux. Elles consisteraient à

concevoir des molécules synthétiques qui neutraliseraient cette activité hydrolytique des inhibiteurs, notamment grâce à l'identification des sites du FVIII qui sont la cible de ces inhibiteurs protéolytiques.

IV.2.6.3. Intervenir au niveau des lymphocytes T « helper »

• Molécules de costimulation :

Pour que les lymphocytes B produisent des anticorps (inhibiteurs), il est nécessaire que les lymphocytes T s'activent grâce à des signaux de costimulation. Certaines études ont montré qu'en agissant sur la signalisation de la costimulation, on agissait sur la réponse des lymphocytes T et, en conséquence, sur la synthèse des inhibiteurs.

• Lymphocytes T spécifiques du FVIII

Les lymphocytes T spécifiques du FVIII sont actuellement caractérisés. En théorie, il serait possible d'utiliser des anticorps spécifiques pour neutraliser directement ces lymphocytes et bloquer la fabrication d'inhibiteurs.

IV.2.6.4. Thérapie génique

La thérapie génique a suscité un grand espoir dans l'hémophilie après les premiers essais menés en 1995. La quasi-totalité des essais ont été suspendus. Théoriquement, l'hémophilie constitue un candidat de choix pour la thérapie génique [71, 72]. C'est une maladie monogénique et il suffirait, pour mettre les patients à l'abri des complications, d'obtenir des taux circulants constants de facteur VIII correspondant à une situation d'hémophilie modérée, voire fruste. Un autre avantage possible du concept de thérapie génique chez l'hémophile est qu'un excès de facteur VIII ou IX induit par thérapie génique a peu de conséquences délétères à court terme.

Néanmoins, les espoirs soulevés par la thérapie génique ont été déçus, même si quelques équipes continuent à travailler sur ce modèle. La thérapie génique chez l'hémophile pose non seulement des problèmes médicaux et techniques, mais aussi des problèmes éthiques : l'hémophilie n'est plus une maladie mortelle, la prophylaxie permet aux hémophiles de mener une existence presque normale et les met à l'abri des complications ostéoarticulaires.

Dans ces conditions, le risque potentiel, pour une grande part inconnu, de la thérapie génique doit être mis en parallèle avec la possibilité pour un hémophile de mener une vie normale grâce aux médicaments actuels ou à venir.

V. PATIENTS ET METHODES

V.1. Patients

Il s'agit d'une étude descriptive rétrospective de 41 patients hémophiles A suivis au CHU Tlemcen de la période allant de janvier 2011 à décembre 2016, dont l'âge varie de 2ans et 55 ans.

Recueil des données

La collecte des données s'est faite d'une manière passive à partir des dossiers des malades et d'une manière active avec les malades eux même ou leurs médecins.

Pour cela, un questionnaire a été établi pour chaque patient, il contient :

-Nom et prénom

-Age

-Type d'hémophilie

-Sévérité de la maladie

-Enquête familiale (frères oncles, cousins maternel : malades ;nom de la maman)

-Type de traitement reçu.

-Prophylaxie poursuivie ?

-Type de prophylaxie (primaire ou secondaire)

-Date des derniers Acc(positif ou négatif)

-Titre des Acc

-Transfusé ou jamais ?

-Type de PSL reçu.

V .2.Matériel

La recherche et le titrage des anticoagulants circulants anti-facteurs VIII se sont effectués au niveau de l'unité d'hémostase du service d' Hémobiologie du CHU Tlemcen, le matériel utilisé (commun pour les autres tests d'hémostase) est le suivant :

* Une centrifugeuse.

* Des tubes secs pour la congélation.

* Des tubes à hémolyse.

* Des portoirs.

* Un bain marie (37°,56°).

* Des pipettes de 50 µL, 100µL, 200µL, 1000 µL.

* Billes magnétiques

* Barrettes

* Micropipette

* Coagulomètre semi automatique (type SStart)

* Coagulomètre automatique (type STA Compact)

* Embouts

Réactifs :

- Thromboplastine calcique (réactif déclenchant)
- CK Prest Céphaline+ Kaolin,
- CaCl₂ 0,025M,
- Réactif substrat déficient en facteur VIII,
- Unical
- Tampon Owren Koller.
- L'eau distillée pour la reconstitution des réactifs.

V .3.Méthodes

V .3.1.Recueil et traitement des échantillons

Selon les recommandations du GEHT :

✓ Le prélèvement

- Le prélèvement est effectué par ponction veineuse franche, garrot peu serré, il est préférable d'être à jeun lors du prélèvement.
- Le tube doit être rempli correctement, il faut respecter le rapport anti-coagulant/sang qui est de 1/9 ; l'anti-coagulant utilisé est le citrate trisodique 0,109M.
- Le tube doit être agité par retournement immédiat pour éviter la formation de micro-caillots.
- Le délai entre le prélèvement et le traitement des échantillons au laboratoire doit être le plus court possible de 2à3 heure maximum.
- La recherche des ACC anti-facteurs VIII peut se faire sur du sang frais ou après décongélation d'un plasma pauvre en plaquettes conservé à -80°C.

✓ Centrifugation :

- Cette étape est cruciale, plus le plasma sera pauvre en plaquette meilleure sera la sensibilité des tests de dépistage des ACC.
- Pour préparer un plasma pauvre en plaquettes on soumet les échantillons à un double centrifugation, la première de 10 mn à 3000g suivie d'une deuxième de 10 mn à 3000 g également.

✓ Conservation des échantillons :

- La conservation des échantillons repose sur la congélation de leur plasma pauvre en plaquettes.
- Les échantillons sont conservés dans des tubes secs étiquetés à -80°C.

- L'échantillon doit être maintenu congelé jusqu'au moment de l'essai puis rapidement décongeler et utilisé pour les tests de coagulation.

- Décongélation rapide au bain-marie à 37°C, puis homogénéisation et test immédiat. Si tests différés : conservation à + 4°C < 2 heures. Recongélation : à proscrire pour tous les tests fonctionnels. [73]

➤ Pour l'étude génétique, 5 ml de sang périphérique ont été récoltés dans des tubes avec EDTA (Ethylène Diamine Tetracétique Acide) comme anticoagulant.

- Les prélèvements sont par la suite congelés à -20°C, pour une extraction ultérieure de l'ADN.

V.3.2.Les tests d'hémostase

V.3.2.1.Détermination du temps de Quick (TO):

✓ Principe du test :

C'est le temps de coagulation à 37°C d'un plasma citraté pauvre en plaquettes, recalcifié en présence d'un excès de facteur tissulaire et de phospholipides.

Le temps de Quick consiste à comparer en présence de thromboplastine calcique, les temps de coagulation d'un plasma pauvre en plaquettes par rapport à un plasma témoin normal traité dans les mêmes conditions.

✓ Mode opératoire :

- Déposer les barrettes dans la zone d'incubation

- Distribuer une bille dans chaque cupule

- Mettre 50µL de plasma citraté dans chaque cupule

- Incuber pendant 1mn

- Transférer dans la zone de lecture

- Déclencher la coagulation en distribuant 100µL de thromboplastine calcique (préincubée à 37°C) dans chaque cupule

- Le temps de coagulation se mesure par l'arrêt du mouvement de billes.

✓ **Résultats :**

Les résultats sont exprimés en seconde. Le TQ est voisin de 12 sec, il est allongé s'il dépasse le témoin de 2 sec.

En pratique courante, le temps de Quick (TQ) est converti en taux de prothrombine (TP) exprimé en pourcentage. La conversion du TQ en TP se fait à l'aide d'une droite d'étalonnage ou droite de «Thivolle », établie à partir de plasma témoin pur et dilué au $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{3}$, $\frac{1}{4}$ en tampon Owren Koller.

Les valeurs moyennes normales sont comprises entre 70 et 100%

V.3.2.2.Détermination du temps de Céphaline Activée (C.K.PREST) TCA :

✓ Principe du test :

C'est le temps de coagulation à 37°C d'un plasma citraté pauvre en plaquettes en présence de céphaline et d'un activateur de la phase contact=Kaolin et de calcium.

✓ Mode opératoire :

- Placer les barrettes dans la zone d'incubation
- Mettre une bille dans chaque cupule
- Ajouter 50µL de plasma citraté et 50µL de céphaline activateur
- Incuber pendant 3mn
- Transférer la barrette en zone de lecture
- Déclencher la coagulation en ajoutant 50µL de solution de CaCl₂

Le temps de coagulation se mesure par l'arrêt du mouvement de billes

✓ Résultat:

Le temps de coagulation est exprimé par rapport au temps d'un plasma témoin dont la valeur moyenne varie entre 20 et 40 sec. Le TCA est allongé lorsqu'il dépasse de 10 sec le temps du témoin ou lorsque le rapport tps du malade/tps du témoin est supérieur à 1,2.

V.3.3.Dosage spécifique du facteur anti-hémophiliques A

✓ principe :

Il consiste à mesurer un temps de céphaline activée sur un mélange du plasma à tester et d'un plasma artificiellement déplété en FVIIIc, qui apporte l'ensemble des autres facteurs en excès. Dans ces conditions, le temps de coagulation est directement fonction de l'activité du facteur VIII que l'on veut doser. L'activité est mesurée par comparaison au temps de coagulation d'un plasma commercial de référence dont l'activité est de 100%.

✓ **Mode opératoire :**

Le plasma témoin dilué par du tampon d'Owren koller au 1/10, 1/20, 1/40, 1/80. La dilution 1/10 est considérée arbitrairement comme correspondant à une activité de 100%.

Ces dilutions serviront à établir la droite d'étalonnage.

Le plasma à tester est dilué au 1/10 .

Les réactifs sont placés dans la zone d'incubation à 37°C.

- Placer les barrettes dans la zone d'incubation
- Mettre une bille dans chaque cupule
- Ajouter 50µL de plasma dilué, 50µL de déficient en FVIII et 50µL de céphaline-kaolin
- Incuber pendant 3mn
- Transférer la barrette en zone de lecture
- Déclencher la coagulation en ajoutant 50µL de solution de CaCl₂

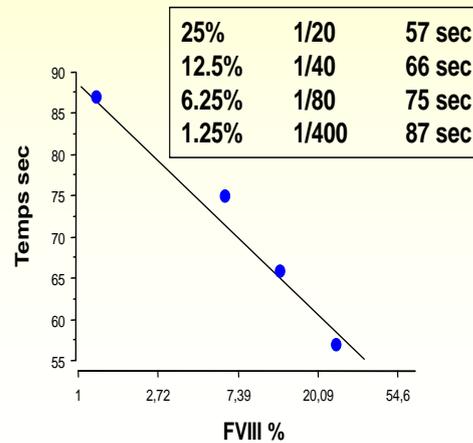
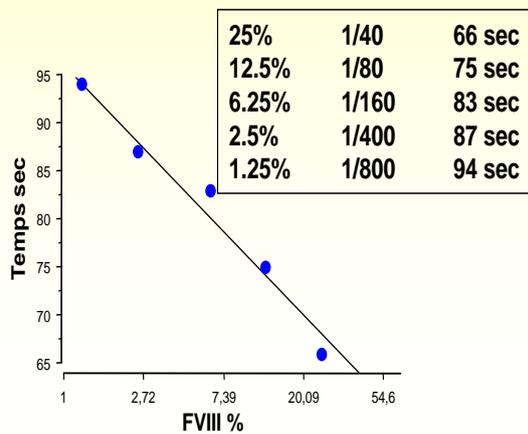
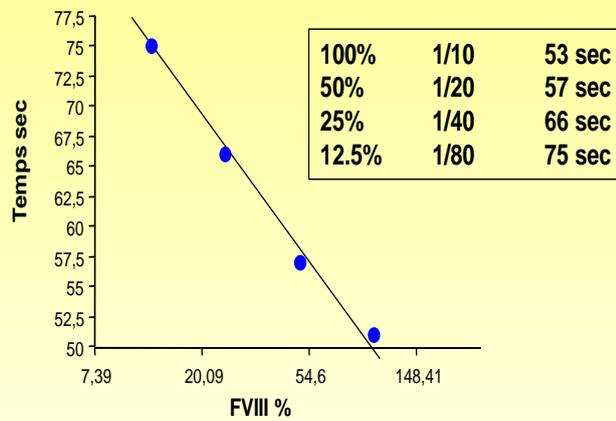
✓ **Expression des résultats :**

On porte les temps en ordonnées d'un papier bi logarithmique et les concentrations ou dilutions du plasma témoin en abscisse. Le taux de facteur VIIIc du plasma à tester est obtenu par intrapolation, après avoir joint tous les points pour obtenir la droite d'étalonnage.

Les valeurs normales : 55-110% d'activité.

Le taux hémostatique est à 40 %.

Droite d'étalonnage Gammes Fine/Large



V.3.4. Recherche et titrage d'inhibiteurs anti-facteurs VIIIc chez les hémophiles par la méthode Bethesda

V.3.4.1. Test de dépistage [42]

✓ **Principe :**

On incube le plasma à tester avec le plasma témoin, puis on dose le facteur anti-hémophilique VIIIc résiduel dans la mixture.

✓ **Mode opératoire :**

- Préparation des mélanges :

Mélange 1

Un volume du plasma référence à 100% de facteur

Un volume du Tampon Owren Koller

Mélange 2

Un volume du plasma référence à 100% de facteur

Un volume du plasma malade

- Incuber les deux mélanges 2heures à 37°C.

- Tracer la courbe d'étalonnage à partir du mélange 1 : 1(PT+Tampon OK), en faisant des dilutions au 1/10, 1/20, 1/40, 1/80.

- Doser le F VIIIc dans le mélange 2 dilué au 1/10.

* Si le taux= 50% : Absence d'inhibiteur.

* Si le taux est inférieur à 50% : Titrer l'inhibiteur.

V.3.4.2. Titrage de l'inhibiteur anti-facteur VIIIc : Méthode Béthesda

✓ Principe :

Mesure du taux résiduel de FVIII après incubation 2 heures à 37°C d'un mélange vol/vol constitué du plasma malade (ou des dilutions de ce plasma) et d'un plasma témoin titré à 100% de FVIIIc.

Le titre d'inhibiteur est exprimé en unité Béthesda.

On définit l'unité Béthesda comme étant la quantité d'anticorps qui neutralise 50% d'activité du F VIIIc.

✓ Mode opératoire :

- Préparation des mélanges pour le titrage de l'inhibiteur :

Mélange 1

Un volume du plasma référence à 100% de facteur

Un volume du Tampon Owren Koller

Mélanges 2, 3, 4, 5, 6

Un volume du plasma référence à 100% de facteur

Un volume de plasma à tester Dilué en tampon Owren Koller

1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160....

-Incuber 2heures à 37°C au bain marie en tubes bouchés.

-Dosage du F VIIIc sur les différents mélanges dilués au 1/10.

✓ **Mode d'expression des résultats** : L'inverse de la dilution du plasma malade qui donne 50% d'activité de F VIIIc résiduel représente le titre de l'inhibiteur.

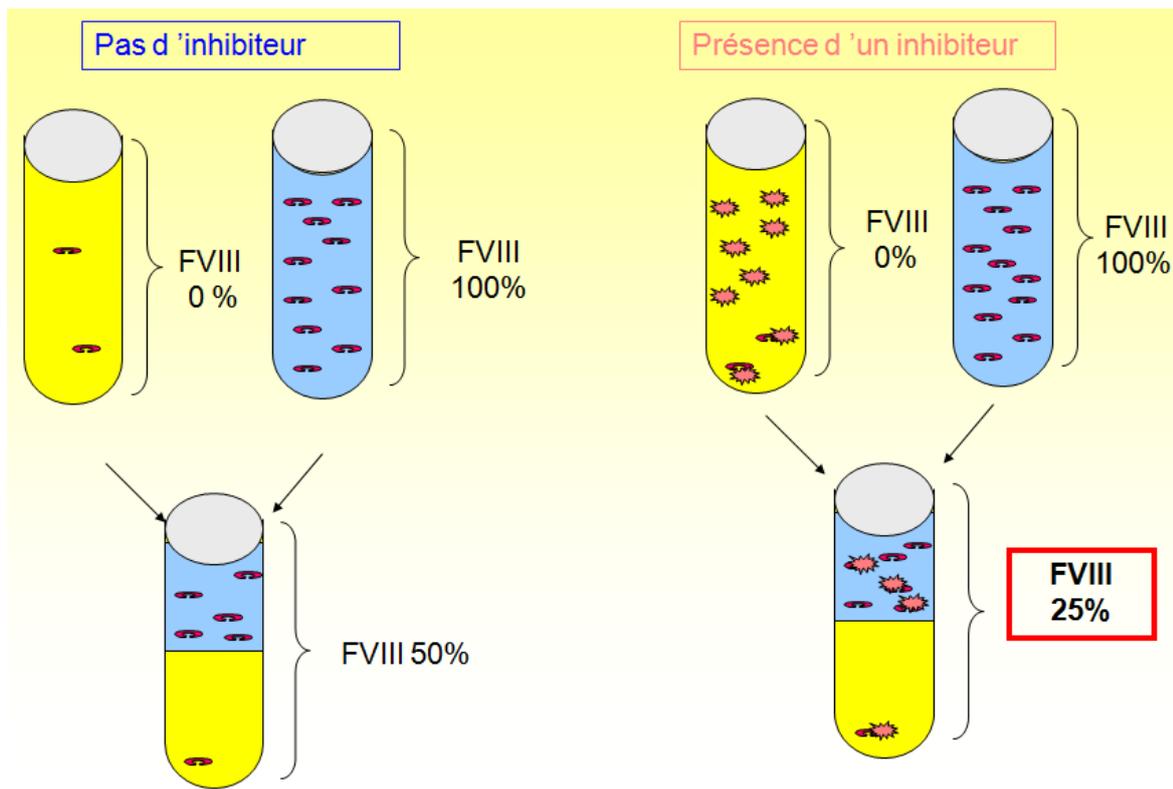


Figure 11 : Principe de recherche d'un inhibiteur

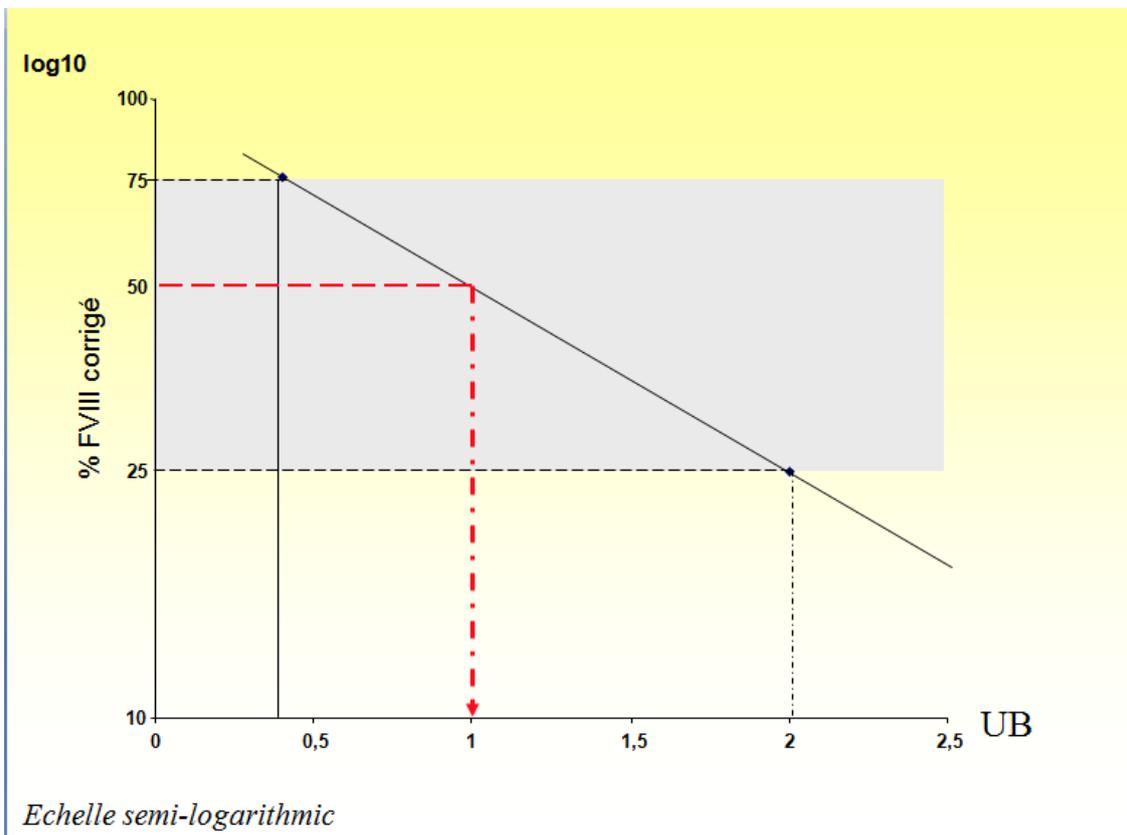


Figure 12 : Courbe semi-logarithmique pour le titrage des inhibiteurs anti FVIIIc

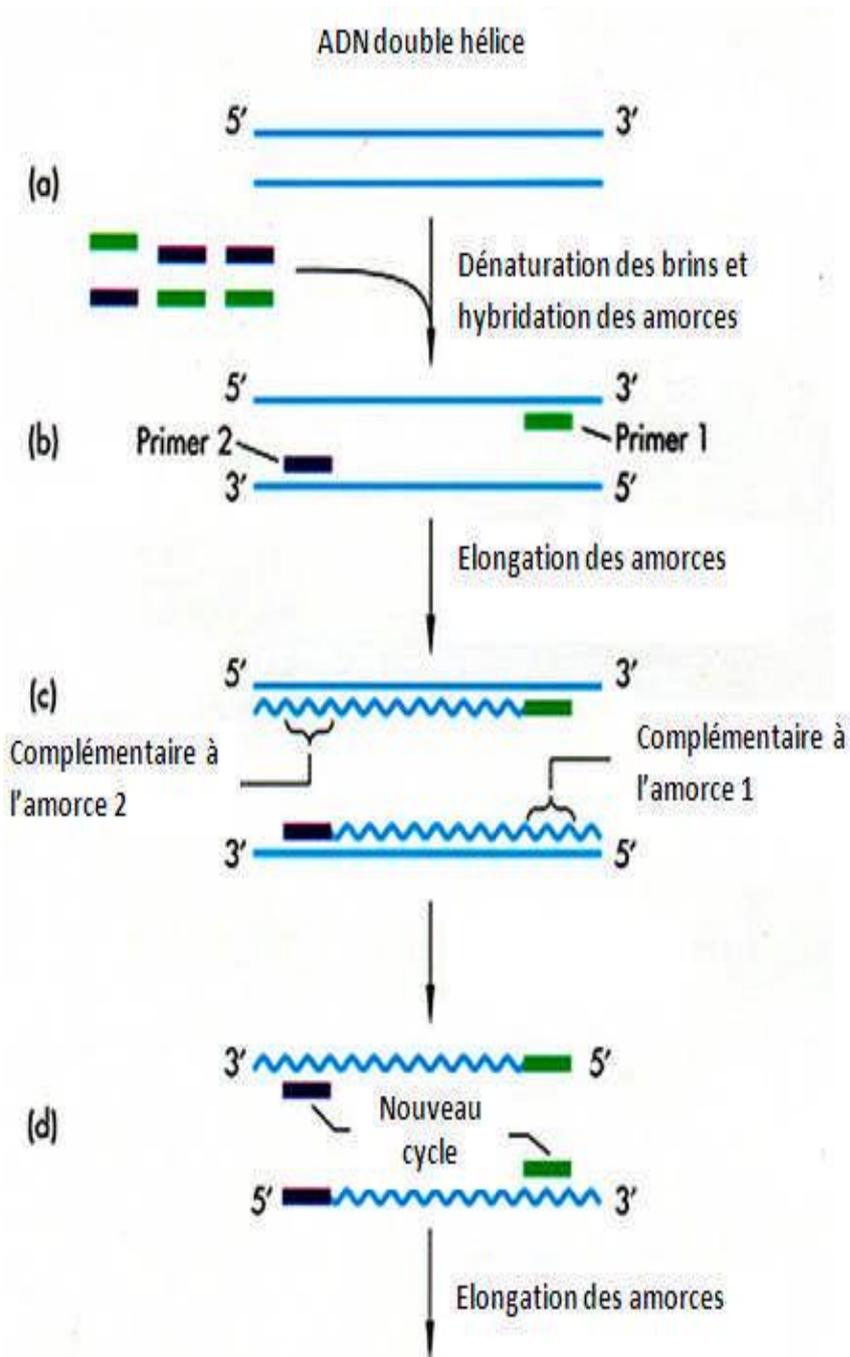
V.3.5.Introduction de l'étude génétique de la mutation en cause réalisée en 2013: amplification de l'intron 22 par PCR long Range :

✓ Principe de la PCR standard [74]

L'amplification d'ADN in vitro appelée aussi Polymerase Chain Reaction ou PCR est une technique de biologie moléculaire mise au point en 1985 par Kary Mullis (Mullis K. et al 1986). Cette technique permet de produire un grand nombre de copies d'ADN de longueur et de séquences bien déterminées à partir d'un brin d'ADN matrice.

L'amplification est assurée par une enzyme thermorésistante « Taq polymérase » extraite d'une bactérie thermophile « *Thermus aquaticus* ». D'une certaine façon, la PCR imite la réplication naturelle de l'ADN, puisque le nombre de molécules d'ADN générées est doublé après chaque cycle. Après « n » cycle, nous pouvons reproduire environ 2^n copies d'ADN.

La réaction PCR est assurée automatiquement par un automate « thermocycleur », elle comporte des cycles successifs comprenant chacun trois phases : dénaturation d'ADN, hybridation des amorces et élongation des brins à partir des amorces (Figure.13).



13 : Figure Principe de la PCR

✓ **Principe de la PCR Long Range (PCR Long Distance ou PCR longue) : [75]**

La PCR est une méthode habituellement utilisée pour amplifier les fragments dont la séquence varie entre 0,5 à 1,5 Kb. En apportant certaines modifications à la PCR

standard, il est désormais possible d'amplifier des fragments de grandes tailles pouvant atteindre 50Kb. La réaction d'amplification permettant de réaliser de tels fragments est appelée la PCR Long Range ou une PCR long distance.

Pour réaliser ces amplifications, quatre amorces correspondant aux séquences d'intérêt (int22h-1, int22h-2 et int22h-3) ont été utilisées. Ces amorces sont représentées dans le tableau qui suit :

<u>5'int22h1 P</u>	gCC CTg CCT gTC CAT TAC ACT gAT gAC ATT ATg CTg AC
<u>3'int22h1 Q</u>	ggC CCT ACA ACC ATT CTg CCT TTC ACT TTC AgT gCA ATA
<u>5'int22h2/3 A</u>	CAC AAg ggg gAA gAg TgT gAg ggT gTg ggA TAA gAA
<u>3'int22h2/3 B</u>	CCC CAA ACT ATA ACC AgC ACC TTg AAC TTC CCC TCT CAT A

Tableau 3: Les amorces utilisées pour l'amplification de l'intron 22

L'étude de l'inversion de l'intron 22 avec les amorces ABQ et PBQ permet l'obtention de deux profils électrophorétique distincts. A partir de ce profil le génotypage des individus peut être réalisé. La concordance entre les deux profils (ABQ/PBQ) permet la confirmation des résultats.

La migration sur gel d'agarose des produits d'amplification nous permettra de mettre en évidence les éventuelles inversions au niveau de l'intron amplifié et qui se révèlent par la présence d'une bande supplémentaire.

✓ **Mise au point de la PCR Long Range :**

- Pensez à préchauffer l'amplificateur 9700 à 94°C (20mn) avant de distribuer les ADN.
- -Dilution des ADN à 100 ng / µl (Suivant la qualité des mix on peut être amené à travailler à 50ng/µl).
- -Décongeler et garder dans la glace les aliquots PQB et ABQ
- Amplification de l'intron 22 avec les 3 amorces PBQ :

L'ADN génomique (concentré à 50ng/μl) est amplifié dans un mélange réactionnel de 25μl composés de 23 μl de Mix PBQ et de 2 μl d'ADN du patient atteint.

Le Mix PBQ contient 18,6 μl de prémix PBQ, 1,9 μl de DMSO, 0,5 μl de 7déaza dGTP à (10mM), 1,5 μl d'H₂O distillée stérile, et 0,5 μl de Taq long rang 5U/μl.

Les amorces PBQ nous permettent de détecter l'inversion de l'intron 22.

- Amplification de l'intron 22 avec les 3 amorces ABQ :

L'ADN génomique (concentré à 50ng/ μl) est amplifié dans un mélange réactionnel de 25μl composés de 22 μl de Mix ABQ et de 3 μl d'ADN du patient atteint.

Ce Mix contient 18,6 μl de prémix ABQ, 1,9 μl de DMSO, 0,5 μl de 7déaza dGTP à (10mM), et 0,5 μl de Taq long range 5U/μl.

- **Préparation du Mix PCR**

	1 tube	n tubes		1 tube	n tubes
<u>Mix PQB</u>	18,6μl		<u>Mix ABQ</u>	18,6 μl	
D .M.S.O.	1,9 μl		D .M.S.O.	1,9 μl	
7déaza dGTP à 10mM	0,5 μL		7déaza dGTP à 10mM	0,5 μL	
Taq expand	0,5 μL		Taq expand	0,5 μL	
H ₂ O	1,5 μl		H ₂ O	0 μl	
Agiter les Mix et répartir dans les tubes PCR :(toujours dans la glace)					
<u>Volume de Mix</u>	23 μl			21.5 μl	
ADN à 100 ng / μl	2 μl			3.5 μl	

Remarque : Lorsque le mix a été fraîchement préparé 50ng d'ADN suffisent.

L'amplification a été réalisée dans un thermocycleur (Biometra T Gradient) utilisé dans le laboratoire du département de Génétique Moléculaire Appliquée (USTO). Le programme d'amplification comporte une première étape de dénaturation initiale à 94° pendant 3 minutes, suivi de deux étapes d'hybridation de 10 et 29 cycles respectivement. La première étape d'hybridation de 10 cycles dure un peu plus de 13mn dont, 12sec à 94°, 2mn à 60°, 3mn à 65°, 3mn à 6°, et 5mn à 65°.

La deuxième étape est similaire à la première à la différence qu'elle comporte 20 cycles, et qu'un incrément de 10sec/cycle pour les 5 dernières minutes y est inséré.

La dernière étape est un cycle d'élongation à 72° pendant 7 minutes. La réaction d'amplification dure environ 8heures (Tableau 4).

94°	94°	60°	65°	60°	65°	94°	60°	65°	60°	65°	72°	4°
3'	12s	2'	3'	3'	5'	12s	2'	3'	3'	5'*	7'	∞
1c	10 cycles					20 cycles					1	

* = incrément de 10 secondes par cycle - Durée du programme (environ 8h)

Tableau 4 : Programme d'amplification de la PCR Long Range

✓ Electrophorèse sur gel d'agarose pour le test d'amplification

Le contrôle d'amplification s'effectue par électrophorèse sur gel d'agarose. Après plusieurs essais le choix s'est finalement porté sur un gel d'agarose à 1%, préparé dans du TAE 1X. Le mélange agarose-TAE 1X est chauffé jusqu'à l'obtention d'une solution transparente, où est ajouté 10µl de BET (bromure d'éthidium 100 ng/µl) avant polymérisation.

Les échantillons déposés sur le gel sont un mélange de 5 µl du produit d'amplification et 5 µl de tampon de charge (bleu de bromophénol 6X ; le sucrose 40%) Ce tampon est utilisé pour marquer le front de migration et pour alourdir l'ADN, dans chaque puits.

La migration se fait dans du tampon TAE 1X à 90 Volts pendant 45mn et la visualisation des produits amplifiés se fait sous UV. Une amplification positive se traduit par l'observation de plusieurs bandes sur le gel, et dont la taille varie entre 10 et 12kb.

✓ **Résultats attendus**

L'inversion de l'intron 22 est le résultat d'un crossing-over intra-chromosomique entre les régions AB, et PQ qui font 10Kb et 12Kb respectivement. Le résultat de ce réarrangement est la génération de deux régions QA et PB de 11KB chacune.

Les amorces ABQ s'hybrideront avec la région BA dans le cas normal, et avec les régions BA et QA en cas d'inversion, les résultats attendus sur le gel seront donc les bandes de 10Kb et 11Kb correspondant à ces deux régions respectivement.

Les amorces PBQ s'hybrideront avec PQ dans le cas normal et avec PB en cas d'inversion, les résultats de l'électrophorèse révéleront à une bande de 12Kb correspondant à la région normale et une bande de 11Kb correspondant à la région réarrangée.

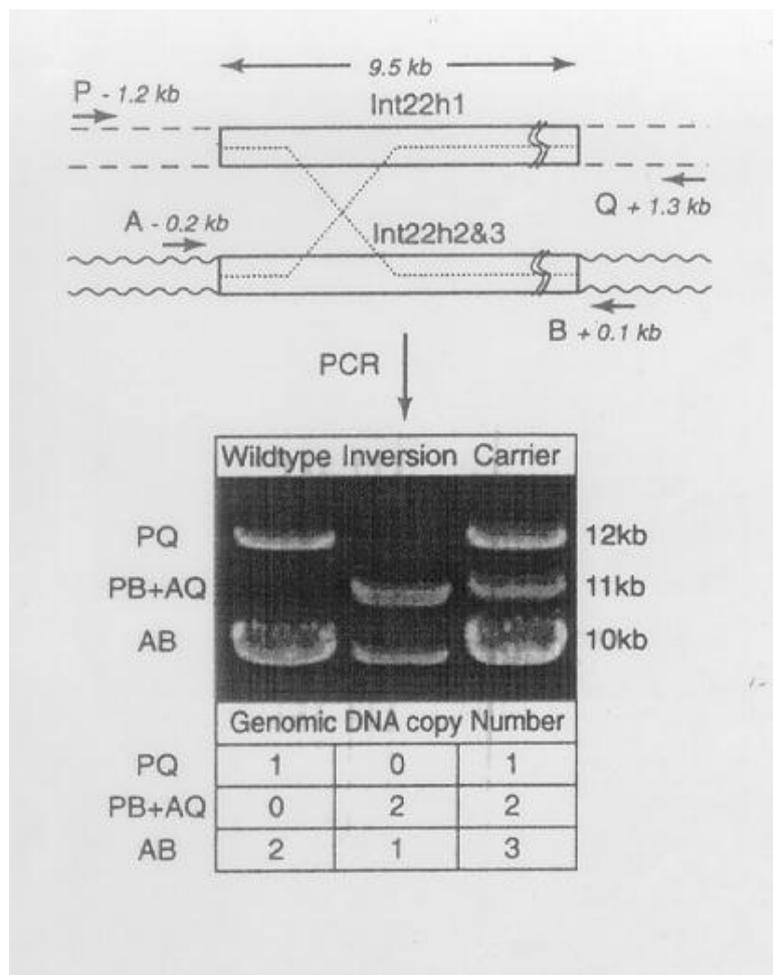


Figure 14 : Profil électrophorétique représentant les résultats attendus

VI. RESULTATS

VI.1. Résultats de la recherche des ACC :

➤ 62 hémophiles A recensés, dont :

- 45 hémophiles A sévères (73%)
- 14 hémophiles A modérés (22%)
- 3 hémophiles A mineurs (5%)

L'âge de ces patients varie de 2ans et 55 ans avec une médiane de 28 ans.

Figure 15 : Répartition des hémophiles A selon la sévérité

➤ Parmi les 45 hémophiles A sévères :

- 17 enfants (38%)
- 28 adultes (62%)

Figure 16 : Répartition des hémophiles A sévères en fonction de l'âge

➤ 41 hémophiles ont bénéficiés de la recherche des inhibiteurs dont :

- 36 HA sévères,
- 5 HA modérés.

Les 5 HA modérés n'ont pas développés des Acc, parmi les 36 HA sévères y en a 11 hémophiles ont développés des inhibiteurs et 25 qui n'en ont pas.

Les résultats sont exprimés dans le tableau et la figure qui suivent :

Hémophile A	Nombre	Fréquence
Sans inhibiteurs	25	69%
Avec inhibiteurs	11	31%

Tableau 5: Résultats de la recherche d'inhibiteurs

Figure 17 : Répartition des hémophiles A sévères en fonction du développement d'inhibiteurs

Les 11 qui ont développés des inhibiteurs étaient tous des HA sévères :

- 2 patients ont présentés un fort titre d'inhibiteurs > 5UB

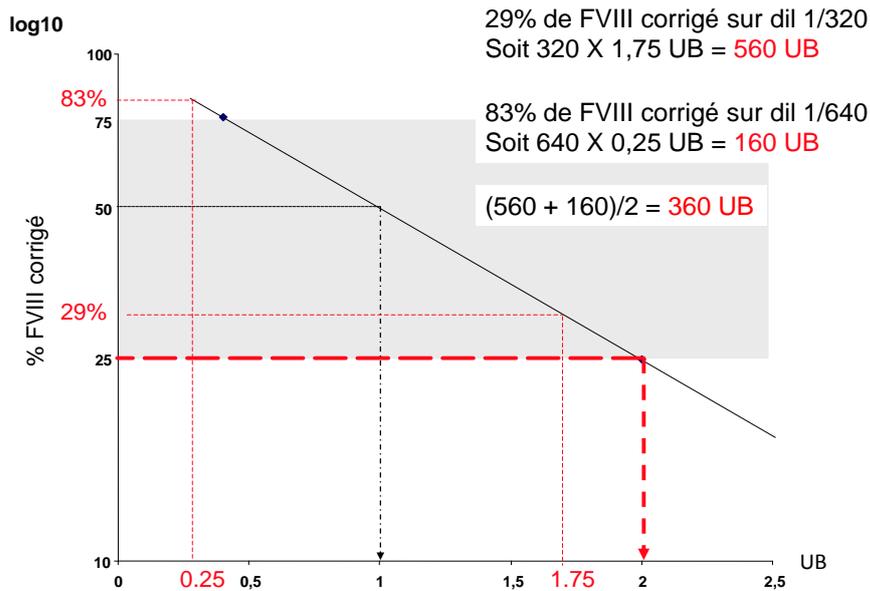
Expression de l'inhibiteur : Recherche positive Cas

N°1 KRIM

Mélange	FVIII	FVIII cor
Mélange 1 (Ref + tampon)	FVIII = 53%	
Mélange 2 (Ref + plasma pur)	FVIII = 1,6%	2%
Mélange 3 (Ref + dil 1/2)	FVIII = 1,7%	3%
Mélange 4 (Ref + dil 1/5)	FVIII = 2%	3,9%
Mélange 5 (Ref + dil 1/10)	FVIII = 2%	3,9%
Mélange 6 (Ref + dil 1/20)	FVIII = 2,1%	3,9%
Mélange 7 (Ref + dil 1/40)	FVIII = 2,1%	3,9%
Mélange 8 (Ref + dil 1/80)	FVIII = 2,8%	5,2%
Mélange 9 (Ref + dil 1/160)	FVIII = 4,5%	8,3%
Mélange 10 (Ref + dil 1/320)	FVIII = 15,8%	29,4%
Mélange 11 (Ref + dil 1/640)	FVIII = 45%	83%
Mélange 12 (Ref + dil 1/1280)	FVIII = 88%	165%



Cinétique simple



Echelle semi-logarithmic

Figure 18 : Expression des résultats et calcul du titre d'inhibiteur

- les 9 autres patients étaient des faibles répondeurs (titre d'inhibiteur <5UB)

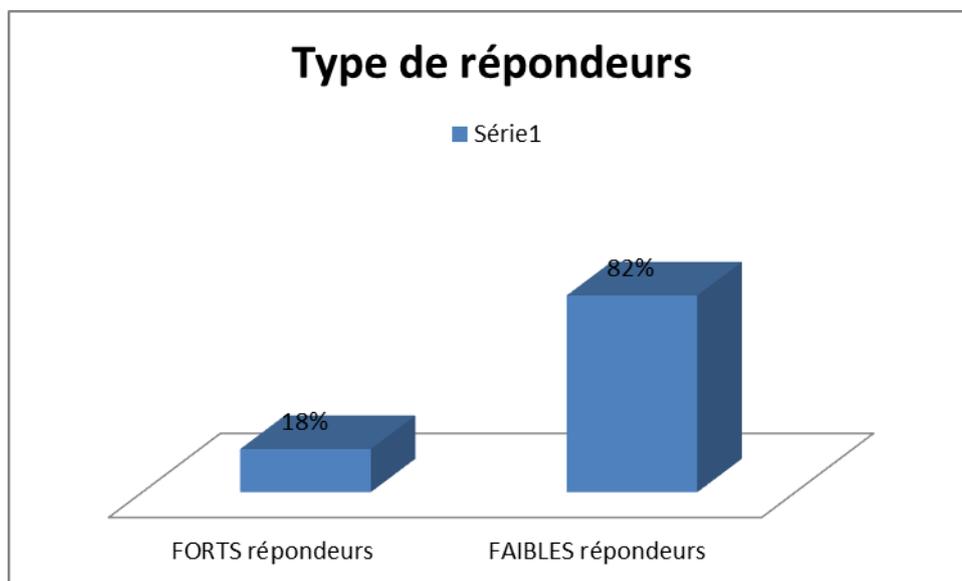


Figure 19 : Répartition des hémophiles A avec inhibiteurs en fonction du type de répondeur

VI.2.Résultats de l'étude moléculaire

L'étude a été réalisée chez 6 hémophiles A sévère. Les résultats sont exprimés sur le tableau ci-dessous :

Code	Nom et prénom	sévérité	FVIII/C	inhibiteur	Intron22	Intron1
Tlemcen 1	S.H	sévère	<1%	négatif	négatif	Négatif
Tlemcen 2	B.M	sévère	<1%	indéterminé	négatif	Négatif
Tlemcen 3	G.S	sévère	<1%	positif	négatif	Négatif
Tlemcen 4	R. N	sévère	<1%	négatif	positif	
Tlemcen 5	T. S	sévère	<1%	positif	positif	
Tlemcen 6	F. S	sévère	<1%	négatif	positif	

Tableau 6: Résultats de l'étude moléculaire

Parmi les 6 qui ont bénéficiés de l'étude moléculaire, 3 présentaient une inversion de l'intron22.

2 des 6 patients étaient de faibles répondeurs :

- L'un d'eux possédait l'inversion de l'intron 22
- L'autre ne la présentait pas

VII. Les limites de l'étude

- Absence du réactif substrat déficient en facteur VIII durant notre période de stage pour le dosage des ACC ce qui nous a obligé de passer à une étude rétrospective.
- Difficultés d'avoir des réponses sincères dans les questionnaires proposés aux patients en raison de certains tabous qui caractérisent notre société.
- Taille réduite de la population étudiée.
- La durée courte de l'étude.

VIII. DISCUSSION

- L'hémophilie A sévère est plus fréquente que les formes modérée et mineure (73% versus 22% et 5% respectivement).

Dans notre étude, la prévalence des inhibiteurs au cours de l'hémophilie A sévère était de 27% (11 cas sur 41) :

- 2 patients ont présentés un fort titre d'inhibiteurs > 5UB
 - Les 9 autres patients étaient des faibles répondeurs (titre d'inhibiteur <5UB)
- Parmi les 6 qui ont bénéficié de l'étude moléculaire, 3 présentaient une inversion de l'intron22 (50%). Parmi ces 3, un seul a développé des inhibiteurs,

Les résultats sont exprimés sur le tableau ci-dessous :

Code	Nom et prénom	sévérité	FVIII/C	inhibiteur	Intron22	Intron1
Tlemcen 1	S.Hichem	sévère	<1%	négatif	négatif	Négatif
Tlemcen 2	B. Medjdoub	sévère	<1%	indéterminé	négatif	Négatif
Tlemcen 3	G.Sidahmed	sévère	<1%	positif	négatif	Négatif
Tlemcen 4	R.Nazim	sévère	<1%	négatif	positif	
Tlemcen 5	T.Slimane	sévère	<1%	positif	positif	
Tlemcen 6	F .Salah	sévère	<1%	négatif	positif	

- 2 des 6 patients étaient de faibles répondeurs :

- L'un d'eux ne possédait pas l'inversion de l'intron 22 (Ghomari)
- L'autre la présentait (Tadjine)

- Chez ce dernier le traitement prophylactique n'a pas été suivi, en plus il a été transfusé plusieurs fois par du sang total, par contre ses frères et certains de ses cousins et oncles n'ont pas développé d'ACC (ils n'ont pas reçus de transfusions), mais un de ses cousins était aussi un faible répondeur, ce dernier comme le propositus, il a reçu un traitement transfusionnelle.

A facteur de risque égal, la transfusion était la seule variable entre le groupe qui a développé les inhibiteurs et celui qui n'en a pas.

- A facteur de risque génétique égal (Ghomari) et en absence de l'inversion de l'intron22, le frère ayant bénéficié d'une prophylaxie primaire n'a pas développé d'ACC par rapport à celui qui a reçu une prophylaxie secondaire.
- Le patient présentant un fort titre d'inhibiteurs (fort répondeur) a été transfusé plusieurs fois, en plus il est HCV positif, cependant la mutation en cause n'a pas pu être déterminée.
- Fakir, présentait l'inversion de l'intron 22 mais pas d'inhibiteurs. Ce patient n'a reçu aucune thérapeutique avant l'analyse génétique.

Selon la littérature, l'inversion de l'intron 22 est décrite dans 50% des familles ayant une hémophilie A sévère [76, 77,78]. Nos résultats concordent avec ces données.

Évidemment, la mutation qui sous-tend l'hémophilie est importante. Cependant, en réalité, la situation n'est pas aussi tranchée. Chez les patients présentant des mutations identiques, certains peuvent produire des inhibiteurs et d'autres non. De toute évidence d'autres facteurs sont impliqués [79, 80, 81] :

- Le risque cumulé de développer des inhibiteurs chez les patients préalablement non traités (PUPs) a été évalué selon la littérature de 0% à 38,7% [80,81].
- Théoriquement, la sollicitation du système immunitaire provoquée par des infections, la vaccination, et des lésions tissulaires en association avec l'exposition FVIII, génèrent des signaux qui activent les cellules présentatrices d'antigène [83,84], et induisent une réponse immunitaire contre le FVIII. L'influence des autres facteurs : tels que l'âge à la première exposition, le type de produit utilisé, et les modalités de traitement, ont été rapportés dans les études cliniques [84, 85, 86].
- D'autres circonstances d'immunisation ont été rapportées par certaines études [95] [96] telles : l'apport massif de facteurs antihémophiliques réalisé lors des interventions chirurgicales ou en cas d'hémorragie grave, l'âge à la première exposition, changement du produit, cependant on n'a pas pu les déterminer dans notre étude.

IX. CONCLUSION

Dans cette étude, outre la mutation en cause, d'autres facteurs de risque contrôlables ont été évoqués tels : les modalités thérapeutiques (notamment prophylaxie versus traitement à la demande, prophylaxie primaire versus prophylaxie secondaire, traitement transfusionnel, l'existence d'infections récentes). Ces facteurs, en particulier les facteurs environnementaux restent encore à élucider.

A ce jour, peu de données sont disponibles sur la relation qui pourrait exister entre les modalités d'administration des facteurs anti-hémophiliques et l'apparition d'inhibiteurs. En effet il est souhaitable de faire un recueil à long terme d'informations sur le traitement en prophylaxie

Chez la plupart des hémophiles immunisés, il est nécessaire de limiter les indications du traitement transfusionnel afin de permettre à l'activité de l'inhibiteur de décroître jusqu'au titre le plus bas possible. Chez ces malades, si le traitement transfusionnel d'une anémie intense paraît inévitable, il est logique d'utiliser des suspensions d'hématies lavées.

Malheureusement, faute d'un nombre suffisant de patients inclus, aucune conclusion formelle ne peut être apportée sur cette question.

Nous espérons par ce modeste travail avoir attiré l'attention du personnel médical et paramédical sur la nécessité d'un suivi biologique régulier dans le but d'améliorer la qualité de vie de ces patients et de leur prise en charge.

En définitive l'objectif essentiel serait théoriquement la prévention de la sensibilisation elle-même. Le préalable indispensable d'une telle entreprise est de savoir reconnaître, parmi les hémophiles, ceux qui sont plus que d'autres exposés aux risques d'une immunisation éventuelle. Il s'agit là d'une question à laquelle nul ne peut encore donner de réponse. Celle-ci devrait logiquement venir de l'immunogénétique.

X. ANNEXES

noms	Prénom	Type d'hémo	Sévérité	Age	Enquête familiale	Prophylaxie ???	Traitement reçu	type de prophylaxie	schéma de prophylaxie	Prophylaxie poursuivie ???	Date des derniers ACC	ACC	titre ACC	Transfusé e?	Type de PSL reçus
A	M	A	Sévère	31	fils unique 5 sœurs		Fact VIII				oct-11	N			
B	T	A	Sévère	3	frère hémophile							N			
B	A	A	Sévère	9	frère hémophile		fact VIII		2 X / S		oct-11	N			
B	B	A	Sévère	12	2 oncles hémop	Oui	FVIII recombinant/ FVIII plasmatique	llaire	1 X / S	Oui		P	0,6	Jamais	
M	M	A	Sévère	33	frère hémophile, neveux belhadou ibrahim	Non	FVIII plasmatique/ recombinant			Non	oct-11	P	0,75	Plusieurs fois	sang total
M	A	A	Sévère	46	frère hémophile, neveux belhadou ibrahim	Non	FVIII plasmatique/ recombinant			Non	oct-11	N		Plusieurs fois	sang total
G	R	A	Sévère	4	3 neveux hémophiles							P			
G	B	A	Sévère	18	2 frères hémop sid ahmed+1 DCD, 1 oncle DCD	Oui	FVIII recombinant	laire		Oui	May 2012	N		Une fois	sang total
G	S	A	Sévère	23	2 frères hémop Ibrahim+1 DCD, 1 oncle DCD	Oui	FVIII recombinant	llaire		Oui	May 2012	P	3	Une fois	sang total/ PFC
R	D	A	Sévère	2	cousin hémop les 2 naceri		Fact VIII					P	0,6		
R	M	A	Sévère	26	frère et neveux 2 naceri		Fact VIII					N			
T	A	A	Sévère	9	famille d'hémophiles	Oui	FVIII recombinant			Non	May 2012 Nov-16	N P			
T	B	A	Sévère	12	famille d'hémophiles	Oui	FVIII recombinant			Non	May 2012	N			
N	M	A	Sévère	23	frère hémop +2 oncle hémophile Regasse med,ramdane	Oui	FVIII recombinant	llaire		Non	oct-11	N		Oui	sang total
B	M	A	Sévère	20	oncle zerkaoui, cousin tadjine	Oui	FVIII recombinant	laire	2 X / S	Oui		N		Une fois	sang total
N	O	A	Sévère	25	1 frère et 2 oncles hémophiles	Oui	FVIII recombinant	llaire		Non	May 2012	P	2,75	Oui	sang total
R	R	A	Sévère	25	frère et neveux 2 naceri	Oui	FVIII recombinant	llaire		Non	May 2012	P	0,6	Oui	sang total
T	S	A	Sévère	16	famille d'hémophiles	Oui	FVIII recombinant			Non	May 2012 Nov-16	P	4,4	Oui	sang total
B	A	A	severe	4ans	Oncle ragas Hemoph	oui	FVIII recombinant	primaire	Une fois/se	oui	2014/1 UB	N			

					Couz maternel naceri hemoph Frere malades				m		2015/1 UB 2016/ne ngatif				
F	S	A	Sévère	4	Familiale			llaire			May 2012	N			
K	A	A	Sévère	43	cas unique	Non	Novoseven			Oui	May 2012	P	360	Plusieurs fois	sang total
K	S	A	sévère	4ans	Unik	non	F VIII	secondair e		non	Nov- 2016	P	7.7	oui	
M	I	A	Sévère	5ans	Unik	oui	F VIII	primaire		oui	Nov- 2016	N			
R	M	A	Sévère	12	cas unique		Fact VIII	llaire	2 X / S		May 2012	N			
S	H	A	Sévère	11	cas unique	Oui	FVIII recombinant	laire	1 X / S	Oui	May 2012	N		Oui	sang total
B	S	A	Sévère	11	frère hémophile		Fact VIII		1 X / S			N			
B	B	A	Sévère	12	cas unique		Fact VIII		2 X / S		May 2012	N			
D	M	A	Sévère	5			fact VIII					N			
M	A	A	Sévère	10	cas unique	Oui	FVIII recombinant	llaire	2 X / S	Oui	May 2012	N		Jamais	
M	M	A	Sévère	31	2 neveux (kerboua,most efaoui		Fact VIII					N			
M	M	A	Sévère	23	1 frère+ 1oncleDCD hém		Novo seven				oct-11	N			
M	A	A	Sévère	16	oncle hémophile		Fact VIII					N			
M	M	A	Sévère	36	frère hémophileDCD	Oui	FVIII plasmatique	llaire			oct-11	N		Plusieurs fois	sang total
M	M	A	Sévère	23	cas unique	Oui	FVIII recombinant	llaire	1 X / S		oct-11	N			
Z	A	A	Sévère	38	famille d'hémophiles	Non	FVIII plasmatique					N		Plusieurs fois	sang total
Z	S	A	Sévère	41	famille d'hémophiles		Fact VIII					N			
H	C	A	Modéré e	35	Frere hémoph		Fact VIII					N			
H	I	A	Modéré e	20	Frere hémoph		Fact VIII					N			
S	M	A	Modéré e	35	frère hémophile							N			
S	M	A	Modéré e	45	frère hémophile		Fact VIII					N			
Z	Y	A	Modéré e	31	cas unique		Fact VIII					N			

XI. BIBLIOGRAPHIE-SITOGRAPHIE

- [1] V.Chamouard, I. Lopez, N. Stieltjes. Facteurs antihémophiliques : traitement substitutif de l'hémophilie A et B. Revue d'évaluation sur le médicament, Dossier du CNHIM 2003, XXIV, 3-4.
- [2] O. Christophe. Interaction facteur VIII/ facteur Willebrand : applications à l'hémophilie. INSERM U.770, 20 Novembre 2009.
- [3] Emmanuelle Girodon, Nada Ghanem, Michel Goossens. Les bases moléculaires de l'hémophilie A : possibilités actuelles du diagnostic et du conseil génétique. Hématologie. Volume 2, Numéro 1, 7-15, Janvier - Février 1996, REVUES ET MINI-REVUES
- [4] Claude Négrier. Le traitement de l'hémophilie : des dérivés du plasma à la thérapie génique. Hématologie. Volume 2, Numéro 1, 17-27, Janvier - Février 1996, REVUES ET MINI-REVUES.
- [5] Hopff F. Ueber die Haemophilie oder die erbliche Anlage zu tödtlichen Blutungen. Inaugural-Abhandlung. Würzburg : CW Becker, 1828.
- [6] Otto JC. An account of an haemorrhagic disposition existing in certain families. Med Reposit 1803 ; 6 : 1-4.
- [7] Hayem G. Du sang et de ses altérations anatomiques. Paris, 1889.
- [8] Pavlovsky A. A contribution to the pathogenesis of hemophilia. Blood 1947 ; 2 : 185-8.
- [9] Biggs R, Douglas AS, Macfarlane RG, Dacie JV, Pitney WR, Merskey C, O'Brien JR. Christmas disease. A condition previously mistaken for haemophilia. Brit Med J 1952 ; 2 : 1378-82.
- [10] <http://hemophilieab.blogspot.com/>
- [11] <http://slideplayer.fr/slide/472659/>
- [12] http://www.adrhec-diuhemostaseclinique-lyon.com/DIU_BIOLOGIE/Cours_session_1/
- [13] Alexandre Moreau. Thèse : Anti-corps anti-F VIII chez l'homme sain et en pathologie Juin 2003
- [14] El khorassani M, Benkirane Agoumi N, Le facteur coagulant médecine du Maghreb, 1966 M.
- [15] Tuddenham EGD and al. Hæmophilia A : database of nucleotide substitutions, deletions, insertions and rearrangements of the factor VIII gene, second edition. Nucleic Acids Res 1994 ; 22 : 3511-33.
- [16] Gitschier J and al. Characterization of the human factor VIII gene. Nature 1984 ; 312 : 326-30.
- [17] Kazazian HHJ and al. Hæmophilia A resulting from de novo insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man. Nature 1988 ; 332 : 164-6.
- [18] Dombroski BA, Mathias SL, Nanthakumar E, Scott AF, Kazazian HH. Isolation of an active human transposable element. Science 1991 ; 254 : 1805-8.

- [19] Naylor JA and al. Analysis of factor VIII mRNA reveals defects in everyone of 28 haemophilia A patients. Hum Mol Genet 1993 ; 2 : 11-7.
- [20] Dietz HC and al. The skipping of constitutive exons in vivo induced by nonsense mutations. Science 1993 ; 259 : 680-3.
- [21] Lakich D and al. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. Nature Genet 1993 ; 5 : 236-41.
- [22] Naylor JA and al. Characteristic mRNA abnormality found in half the patients with severe haemophilia A is due to large DNA inversions. Hum Mol Genet 1993 ; 2 : 1773-8.
- [23] Naylor JA and al. Investigation of the factor VIII intron 22 repeated region (int22h) and the associated inversion junctions. Hum Mol Genet 1995 ; 4 : 1217-24.
- [24] Levinson B and al. A transcribed gene in an intron of the human factor VIII gene. Genomics 1990; 7 : 1-11.
- [25] Pratt-Rossiter J, Young M, and al. Factor VIII gene inversions causing severe hemophilia A originate almost exclusively in male germ cells. Hum Mol Genet 1994 ; 3 : 1035-9.
- [26] Les bases moléculaires de l'hémophilie A : possibilités actuelles du diagnostic et du conseil génétique. Hématologie. Volume 2, Numéro 1, 7-15, Janvier - Février 1996, REVUES ET MINI-REVUES
- [27] Andrew Read, Dian Donnai. Génétique médicale: De la biologie à la pratique clinique.
- [28] <http://hemophilieab.blogspot.com/2012/08/expression-clinique-de-lhemophilie.html>
- [29] J.-F. Schved. Traitements de l'hémophilie. Elsevier Masson 2009 ; 13-021-B-20.
- [30] Farrugia A. Safety and supply of haemophilia products: worldwide perspectives. Haemophilia 2004;10:327-33.
- [31] Bhattacharyya MS, and al. Recombinant factor VIII for haemophilia. An overview of production technologies. Crips 2003;4:2-8.
- [32] Lee CL, Berntorp EE, Hoots WK. Textbook of hemophilia. Malden: Blackwell Publishing; 2005.
- [33] United Kingdom Haemophilia Centre Doctor's Organisation (UKHCDO). Guidelines on the selection and use of therapeutic products to treat haemophilia and other hereditary bleeding disorders. Haemophilia 2003;9:1-23.
- [34] Astermark J, and al. Primary prophylaxis in severe haemophilia should be started at an early age but can be individualized. Blood 1999;105:1109-13.
- [35] Berntorp E, et al. Consensus perspectives on prophylactic therapy for haemophilia: summary statement. Haemophilia 2003;9 (suppl1): 1-4.. Proc Soc Exp Biol Med 1947 ; 66 : 117-20.

- [36] Manco-Johnson MJ, Nuss R, Geraghty S, Funk S, Kilcoyne R. Results of a secondary prophylaxis in children with severe hemophilia. *Am J Hematol* 1994;47:113-7.
- [37] Prophylaxie de longue durée chez les enfants hémophiles A et B sévères en prévention de l'arthropathie hémophilique. *Recommandations Cometh*. 2006.
- [38] Aurélien Lebretona, Géraldine Lavigne. Les anticorps anti-FVIII et anti-FIX. *REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES - JUIN 2012 - N° 443*.
- [39] Hay CRM, Ludlam CA, Colvin BT, Hill FGH, et al. Factor VIII inhibitors in mild and moderate-severity haemophilia A. *Thromb Haemost* 1998 ; 79 : 762-6
- [40] Evaluation de l'incidence de survenue des inhibiteurs anti-facteur VIII dans l'hémophilie. *Sang Thrombose Vaisseaux*. Volume 13, 31-7, Supplément, Mars 2001, Session 2. Hémophilie et maladie de Willebrand
- [41] Howard T., Machiah D, et al. African-Americans express multiple haplotypic forms of the wildtype Factor VIII (FVIII) protein: a possible role for pharmacogenetics in FVIII inhibitor development?, *Blood*. 104 (2004), 113a.
- [42] AFSSAPS. Développement des inhibiteurs et prise en charge chez les patients hémophiles traités par facteur VIII ou IX d'origine plasmatique ou recombinante. Rapport du 15 mai 2006. www.afssaps.sante.fr
- [43] Oldenburg J., Schroder J., et al. Environmental and genetic factors influencing inhibitor development, *Semin Hematol*. 41 (2004), 82-88.
- [44] Goodeve AC., Williams I., Bray GL., Peake IR. Relationship between factor VIII mutation type and inhibitor development in a cohort of previously untreated patients treated with recombinant factor VIII (Recombinate). *Recombinate PUP Study Group, Thromb Haemost*. 83 (2000), 844-848.
- [45] Hay CR., Ollier W., et al. HLA class II profile: a weak determinant of factor VIII inhibitor development in severe haemophilia A. *UKHCDO Inhibitor Working Party, Thromb Haemost*. 77 (1997), 234-237.
- [46] Zanon E, Zerbinati P, Girolami B, Bertomoro A, Girolami A. Frequent but low titre factor VIII inhibitors in haemophilia A patients treated with high purity concentrates. *Blood Coag Fibrinol* 1999 ; 10 : 117-20.
- [47] Moreau A, Lacroix-Desmazes S, et al. Antibodies to the light chain that neutralize F VIII procoagulant activity are present in plasma of nonresponder patients with severe haemophilia A and in natural polyclonal human IgG. *Blood* 2000; 95 : 3435-1.
- [48] Van den Berg HM, Rosendaal G, Voorberg J, Mauser-Bunschoten EP. Inhibitor development in a multitransfused patient with severe haemophilia A. *Thromb Haemost* 1999 ; 82 : 151-2.
- [49] Koestenberger M, Raith W, Muntean W. High titre inhibitor after continuous factor VIII administration for surgery in young infant. *Haemophilia* 2000 ; 6 : 120.

- [50] Rosendaal FR, Nieuwenhuis HK, van den Berg HM, et al. A sudden increase in factor VIII inhibitor development in multitransfused haemophilia A patients in the Netherlands. *Blood* 1993 ; 81 : 2180-6.
- [51] Peerlinck K, Arnout J, Gilles JG, Saint-Remy JM, Vermynen J. A higher than expected incidence of factor VIII inhibitors in multitransfused haemophilia A patients treated with an intermediate purity pasteurized factor VIII concentrate. *Thromb Haemost* 1993 ; 69 : 115-8.
- [52] Peerlinck K, Arnout J, Di Giambattista M, Gilles JG, Laub R, Jacquemin M, Saint-Remy JMR, Vermynen J. Factor VIII inhibitor in previously treated haemophilia A patients with a double virus-inactivated plasma derived factor VIII concentrate. *Thromb Haemost* 1997 ; 77 : 80-6.
- [53] Laub R, Di Giambattista M, Fondu P, Brackmann HH, Lenk H, Saenko EL, Felch M, Scandella D. Inhibitors in German haemophilia A patients treated with a double virus inactivated factor VIII concentrate bind to the C2 domain of the F VIII light chain. *Thromb Haemost* 1999 ; 81 : 39-44.
- [54] Mauser-Bunschoten EP, Rosendaal FR, Nieuwenhuis HK, Rosendaal G, Briët E, van den Berg M. Clinical course of factor VIII inhibitors developed after exposure to a pasteurised Dutch concentrate compared to classic inhibitors in haemophilia A. *Thromb Haemost* 1994 ; 71 : 703-6.
- [55] Lin Y., Yang X., Chevrier MC., Craven S., Barrowcliffe TW., Lemieux R., Ofori FA. Relationships between factor VIII:Ag and factor VIII in recombinant and plasma-derived factor VIII 60 concentrates, *Haemophilia*. 10 (2004), 459-469.
- [56] Wadhwa M., Dilger P., Tubbs J., Mire-Sluis A., Barrowcliffe T., Thorpe R. Identification of transforming growth factor-beta as a contaminant in factor VIII concentrates: a possible link with immunosuppressive effects in hemophiliacs, *Blood*. 84 (1994), 2021-2030.
- [57] Hodge G., Flower R., Han P. Effect of factor VIII concentrate on leucocyte cytokine production: characterization of TGF-beta as an immunomodulatory component in plasma-derived factor VIII concentrate, *Br J Haematol*. 106 (1999), 784-791.
- [58] Suzuki T., Arai M., Amano K., Kagawa K., Fukutake K. Factor VIII inhibitor antibodies with C2 domain specificity are less inhibitory to factor VIII complexed with von Willebrand factor, *Thromb Haemost*. 76 (1996), 749-754.
- [59] Gilles JG., Lavend'homme R., Peerlinck K., et al. Some factor VIII (FVIII) inhibitors recognise a FVIII epitope(s) that is present only on FVIII-vWF complexes, *Thromb Haemost*. 82 (1999), 40-45.
- [60] Hodge G, Hann P. Effect of factor VIII concentrate on antigen presenting cell (APC)/T-cell interactions in vitro: relevance to inhibitor formation and tolerance induction. *Br J Haematol* 2000; 109: 195-200.
- [61] Wadhwa M, Dilger P, Tubbs P, Mire-Sluis A, Barrowcliffe T, Thorpe R. Identification of transforming growth factor beta as a contaminant in factor VIII concentrates. A possible link with immunosuppressive effects in haemophiliacs. *Blood* 1994 ; 84 : 2021-30.

- [62] Hodge G, Flower R, Hann P. Effect of factor VIII concentrate on leukocyte cytokine formation: characterization of TGF-beta as an immunomodulatory component in plasma-derived factor VIII concentrate. *Br J Haematol* 1999 ; 106 : 784-91.
- [63] MERIANE.F. Manuel d'hémostase.Edition OPU.
- [64] JENNY GOUDEMAND. Anti-corps anti-facteur F VIII chez les hémophiles.Edition John Libbey-euro-texte ; Hématologie Volume 7, N° 3 Mai-Juin 2001, p170 à 183.
- [65] F VIII inhibitory Assay: www.gtidiagnostics.com.
- [66] SRINI KAVERI-SEBASTIEN. Les inhibiteurs : Etat des lieux et perspectives thérapeutiques. *Hémophilie* Juin 2004,p17-20.
- [67] Hausl C,Ahmad RU, Sasgary M, Doering CB, Lollar P, Richter G, et al. High-dose factor VIII-specific memory B cells in hemophilia A with factor VIII inhibitors. *Blood* 2005;106:3415-22.
- [68] Reipert B, Van den Helden PM, Schwarz HP, Hausl C. Mechanisms of action of immune tolerance induction against factor VIII in patients with congenital haemophilia A and factor VIII inhibitors. *Br J Haematol* 2006;136:12-25.
- [69] Di Michele D. Immune tolerance therapy for factor VIII inhibitors: moving from empirism to an evidence-based approach. *J Thromb Haemost* 2007;5(suppl1):143-50.
- [70] Astermark J, Morado M, Rocino A, Van den Berg HM, von Depka M, Gringeri A, et al. Current European practice in immune tolerance induction therapy in patients with haemophilia and inhibitors. *Haemophilia* 2006;12:363-71.
- [71] Nathwani AC, Davidoff AM, Tuddenham EG. Prospects for gene therapy of haemophilia. *Haemophilia* 2004;10:309-18.
- [72] Lillicrap D,VandenDriesscheT, High K. Cellular and genetic therapies for haemophilia. *Haemophilia* 2006;12(suppl3):36-41.
- [73]http://site.geht.org/site/Pratiques-Professionnelles/Documents-GEHT/VariablesPreanalytiques/Recommandations-VARIABLES-preanalytiques_69_722.html
- [74] www.biology.kenyon.edu/.../Chap08/Chapter_08a.html
- [75] <http://hadb.org.uk/WebPages/Database/Methods/longpcr.htm>
- [76] Brower C, Thompson AR Hemophilia A. 2000 Sep 21 [updated 2008 Mar 25]. In: Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, editors. *GeneReviews* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=hemo-a>.

- [77] Margaglione M, Castaman G, Morfini M, Rocino A, Santagostino E, Tagariello G, et al. Mannucci PM; AICE-Genetics Study Group. The Italian AICE-Genetics hemophilia A database: results and correlation with clinical phenotype. *Haematologica* 2008; 93(5):722–8.
- [78] Reitter S, Sturm R, Horvath B, Freitag R, Male C, Muntean W, et al. Austrian Molecular Haemophilia Study Group. Spectrum of causative mutations in patients with haemophilia A in Austria. *Thromb Haemost* 2010;104(1):78–85.
- [79] Bowen DJ. Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. *Mol Pathol* 2002;55(2):127–44.
- [80] Astermark J. Inhibitor development: patient-determined risk factors. *Haemophilia* 2010;16(102):66–70.
- [81] Gouw SC, Van den Berg HM. The multifactorial etiology of inhibitor development in hemophilia: genetics and environment. *Semin Thromb Hemost* 2009;35(8):723–34.
- [82] Antagostino E. Can the genetic profile predict inhibitor development in hemophilia A? *J Thromb Haemost* 2007;5(2):261–2.
- [83] Ghosh K, Shetty S. Immune response to FVIII in hemophilia A: an overview of risk factors. *Clin Rev Allergy Immunol* 2009;37(2):58–66.
- [84] Kurnik K, Bidlingmaier C, Engl W, Chehadeh H, Reipert B, Auerswald G. New early prophylaxis regimen that avoids immunological danger signals can reduce FVIII inhibitor development. *Haemophilia* 2010;16(2):256–62.
- [85] Astermark J, Altisent C, Batorova A, Diniz MJ, Gringeri A, Holme PA, et al. On Behalf Of The European Haemophilia Therapy Standardisation Board (EHTSB). Non-genetic risk factors and the development of inhibitors in haemophilia: a comprehensive review and consensus report. *Haemophilia* 2010;16(5):747–66.
- [86] Eckhardt CL, Menke LA, van Ommen CH, van der Lee JH, Geskus RB, Kamphuisen PW, et al. Intensive peri-operative use of factor VIII and the Arg593 – Cys mutation are risk factors for inhibitor development in mild/moderate hemophilia A. *J Thromb Haemost* 2009;7(6):930–7.
- [87] Gitschier J, Wood W, Goralka T, Wion K, Chen E, Eaton D, et al. Characterization of the human factor VIII gene. 1984. *Biotechnol Read Mass*. 1992;24:288–92.
- [88] Hoyer L. The factor VIII complex: structure and function. *Blood*. 1981 Jul 1;58(1):1–13
- [89] Marc TROSSAËRT : Etude phénotypique et génotypique de patients hémophiles A modérés ou atténués avec anomalie qualitative : rapports structure / fonction du facteur VIII
- [90] Bagnall RD, Giannelli F, Green PM (2005) Polymorphism and hemophilia A causing inversions in distal Xq28: a complex picture. *J Thromb Haemost* 3: 2598-2599
- [91] Rosner F (1969) Hemophilia in the Talmud and rabbinic writings. *Ann Intern Med* 70: 833- 837
- [92] <http://sudhorizons.dz/fr/les-classiques/sante/15522-2362-hemophiles-recenses-en-2017-en-algerie>

[93] Jenny Goudemand;les anticorps anti-facteur VIII chez l'hémophile ;2001.

[94] Knobe KE., Tengborn LI., Petrini P., Ljung RC. Breastfeeding does not influence the development of inhibitors in haemophilia, Haemophilia. 8 (2002), 657-659 Lorenzo JL, Lopez A, Altisent C, Aznar JA.

[95] Incidence of factor VIII inhibitors in severe hemophilia : the importance of patient age. Br J Haematol 2001;113:600-3

[96] Hay CR, Ludlam CA, Colvin BT, Hill BG, Preston FE, Wasseem N, et al. Factor VIII inhibitors in mild and moderate-severity haemophilia UK Haemophilia Centre Directors Organisation. Thromb Haemost 1998;79:762-6.

Résumé :

Ce travail a pour objectif d'étudier certains facteurs de risque responsable d'apparition des inhibiteurs anti-facteur VIII dans l'hémophilie A. Leur dépistage a été réalisé par la méthode Bethesda sur 41 hémophiles dans l'âge varie de 2 à 55 ans, suivis au laboratoire d'hémodiagnostic du CHU Tlemcen.

L'hémophilie A sévère est plus fréquente que les formes modérée et mineure (66% versus 29% et 5% respectivement). 27% des hémophiles A sévères ont présenté des inhibiteurs dont 11% sont de forts répondeurs et 89% des faibles répondeurs.

Les résultats obtenus concordent avec ceux de la littérature :

- A facteur de risque génétique égal, une prophylaxie primaire protège contre le développement d'acc par rapport à une prophylaxie secondaire.
- Le patient fort répondeur est un polytransfusé, HCV positif. Cependant la mutation en cause n'a pas été déterminée.
- Le patient ayant l'inversion de l'intron 22 mais pas d'inhibiteurs n'a reçu aucune thérapeutique.

L'indispensable de cette étude est de savoir reconnaître, parmi les hémophiles, ceux qui sont exposés aux risques d'une immunisation. Nul ne peut encore donner de réponse. Celle-ci devrait logiquement venir de l'immunogénétique.

Mots-clés : Hémophilie A, diagnostic génotypique, facteur VIII, inhibiteur, traitement substitutif, facteurs génétiques.

Abstract :

The aim of this work is to study certain risk factors responsible for the appearance of anti-factor VIII inhibitors in hemophilia A. Their screening was carried out by the Bethesda method on 41 hemophiliacs in the age range from 2 to 55 years, followed at the hemobiology laboratory of the Tlemcen University Hospital.

Severe hemophilia A was more common than moderate and minor forms (66% versus 29% and 5%, respectively). 27% of severe hemophiliac A had inhibitors, 11% of which were strong responders and 89% of the weak responders.

The results obtained are in agreement with those of the literature:

- At the same genetic risk factor, primary prophylaxis protects against the development of acc compared with secondary prophylaxis.
- The strong responder is a polytransfused, HCV positive. However, the mutation in question has not been determined.
- The patient with inversion of intron 22 but no inhibitors received no therapy.

The essential feature of this study is to recognize, among the hemophiliacs, those who are exposed to the risks of immunization. No one can give any answer yet. This should logically come from immunogenetics.

Keywords: Hemophilia A, genotypic diagnosis, factor VIII, inhibitor, replacement therapy, genetic factors.

ملخص :

ويهدف هذا العمل إلى دراسة بعض عوامل الخطر المسؤولة عن تطوير الاجسام المضادة للعامل الثامن مثبطات في الهيموفيليا "أ". أجري الاختبار من خلال طريقة بيتسدا على 41 مرضى الهيموفيليا في سن 2-55 سنوات المتبعة في مختبر CHU تلمسان. شديد الهيموفيليا (أ) هو أكثر شيوعا من أشكال معتدلة والثانوية (66% مقابل 29% و 5% على التوالي). 27% من المرضى عرض مثبطات شديدة منها 11% من المستجيبين عالية و 89% من المستجيبين منخفضة. نتائج تتفق مع الأدب:

- وعلى قدم المساواة، الوقاية الأولية عوامل الخطر الجينية يحمي من تطور مثبطات فيما يتعلق الوقاية الثانوية.
- المستجيب عالية هو المريض HCV إيجابي. ومع ذلك، لم يتم تحديد الطفرة المعنية.
- المريض الذي يحمل قلب إنترن 22 لم يتلقى أي علاج.

ما هو جوهري من هذه الدراسة هو كيفية التعرف، بين مرضى الهيموفيليا، الذين يتعرضون لمخاطر التحسين. لا يمكن لأحد حتى الآن تعطي جوابا. هذا ينبغي أن يأتي منطقيا من المناعية. كلمات البحث: الهيموفيليا A، التشخيص الوراثي، وعامل الثامن العلاج ببدائل المانع، والعوامل الوراثية