



HAL
open science

Historique et évolution des thérapeutiques substitutives de l'hémophilie A : du plasma frais à l'arrivée du “ long-acting factor VIII ”

Laura Picard

► **To cite this version:**

Laura Picard. Historique et évolution des thérapeutiques substitutives de l'hémophilie A : du plasma frais à l'arrivée du “ long-acting factor VIII ”. Sciences pharmaceutiques. 2017. hal-01947153

HAL Id: hal-01947153

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01947153v1>

Submitted on 11 Oct 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE LORRAINE
2017

FACULTE DE PHARMACIE

THESE

Présentée et soutenue publiquement

le 10 mai 2017, sur un sujet dédié à :

**Historique et évolution des thérapeutiques
substitutives de l'hémophilie A :
du plasma frais à l'arrivée du
« *long-acting factor VIII* »**

pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par Laura PICARD

née le 24 juillet 1990 à Sarreguemines (57)

Membres du Jury

Président :	Mme Béatrice FAIVRE,	Professeur des Universités, Biologie cellulaire, Hématologie
Juges :	Mr Julien PERRIN,	Maître de Conférences, Praticien Hospitalier, Hématologie biologique
	Mr Claude VIGNERON, Mme Michèle MARTIN,	Professeur émérite à l'Université de Lorraine Praticien Hospitalier, Hématologie biologique

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2016-2017

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Béatrice FAIVRE

Directeur des Etudes

Virginie PICHON

Conseil de la Pédagogie

Président, Brigitte LEININGER-MULLER

Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier

Président, Béatrice DEMORE

Commission Prospective Facultaire

Président, Christophe GANTZER

Vice-Président, Jean-Louis MERLIN

Commission de la Recherche

Président, Raphaël DUVAL

Responsable de la filière Officine

Béatrice FAIVRE

Responsables de la filière Industrie

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable de la filière Hôpital

Béatrice DEMORE

Responsable Pharma Plus ENSIC

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable Pharma Plus ENSAIA

Raphaël DUVAL

Responsable Pharma Plus ENSGSI

Igor CLAROT

Responsable de la Communication

Marie-Paule SAUDER

**Responsable de la Cellule de Formation Continue
et individuelle**

Béatrice FAIVRE

**Responsable de la Commission d'agrément
des maîtres de stage**

Béatrice FAIVRE

Responsable ERASMUS

Mihayl VARBANOV

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Jean-Claude BLOCK

Max HENRY

Alain MARSURA ✕

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Roger BONALY

Pierre DIXNEUF

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Michel JACQUE

Pierre LABRUDE

Vincent LOPPINET

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT

Mariette BEAUD

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Janine SCHWARTZBROD
Louis SCHWARTZBROD

ASSISTANTS HONORAIRES

Marie-Catherine BERTHE
Annie PAVIS

Françoise HINZELIN
Francine KEDZIEREWICZ
Marie-Hélène LIVERTOUX
Bernard MIGNOT
Jean-Louis MONAL
Blandine MOREAU
Dominique NOTTER
Christine PERDICAKIS
Marie-France POCHON
Anne ROVEL
Gabriel TROCKLE
Maria WELLMAN-ROUSSEAU
Colette ZINUTTI

ENSEIGNANTS

Section
CNU*

Discipline d'enseignement

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	Thérapie cellulaire
Jean-Louis MERLIN	82	Biologie cellulaire
Alain NICOLAS	80	Chimie analytique et Bromatologie
Jean-Michel SIMON	81	Economie de la santé, Législation pharmaceutique
Nathalie THILLY	81	Santé publique et Epidémiologie

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	Pharmacologie
Igor CLAROT ☞	85	Chimie analytique
Joël DUCOURNEAU	85	Biophysique, Acoustique, Audioprothèse
Raphaël DUVAL	87	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE	87	Biologie cellulaire, Hématologie
Luc FERRARI	86	Toxicologie
Pascale FRIANT-MICHEL	85	Mathématiques, Physique
Christophe GANTZER	87	Microbiologie
Frédéric JORAND	87	Eau, Santé, Environnement
Isabelle LARTAUD	86	Pharmacologie
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	87	Biochimie
Pierre LEROY	85	Chimie physique
Philippe MAINCENT	85	Pharmacie galénique
Patrick MENU	86	Physiologie
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	87	Biochimie, Biologie moléculaire

MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

Béatrice DEMORE	81	Pharmacie clinique
Alexandre HARLE ☞	82	Biologie cellulaire oncologique
Julien PERRIN	82	Hématologie biologique
Marie SOCHA	81	Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS	87	Parasitologie
Xavier BELLANGER	87	Parasitologie, Mycologie médicale
Emmanuelle BENOIT	86	Communication et Santé
Isabelle BERTRAND	87	Microbiologie

Michel BOISBRUN	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François BONNEAUX	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Ariane BOUDIER	85	<i>Chimie Physique</i>
Cédric BOURA	86	<i>Physiologie</i>
Joël COULON	87	<i>Biochimie</i>
Sébastien DADE	85	<i>Bio-informatique</i>
Dominique DECOLIN	85	<i>Chimie analytique</i>
Roudayna DIAB	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Natacha DREUMONT	87	<i>Biochimie générale, Biochimie clinique</i>
Florence DUMARCAZ	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François DUPUIS	86	<i>Pharmacologie</i>
Adil FAIZ	85	<i>Biophysique, Acoustique</i>
Anthony GANDIN	87	<i>Mycologie, Botanique</i>
Caroline GAUCHER	86	<i>Chimie physique, Pharmacologie</i>
Stéphane GIBAUD	86	<i>Pharmacie clinique</i>
Thierry HUMBERT	86	<i>Chimie organique</i>
Olivier JOUBERT	86	<i>Toxicologie, Sécurité sanitaire</i>
Alexandrine LAMBERT	85	<i>Informatique, Biostatistiques</i>
Julie LEONHARD	86/01	<i>Droit en Santé</i>
Christophe MERLIN	87	<i>Microbiologie environnementale</i>
Maxime MOURER	86	<i>Chimie organique</i>
Coumba NDIAYE	86	<i>Epidémiologie et Santé publique</i>
Marianne PARENT ☒	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Francine PAULUS	85	<i>Informatique</i>
Caroline PERRIN-SARRADO	86	<i>Pharmacologie</i>
Virginie PICHON	85	<i>Biophysique</i>
Sophie PINEL	85	<i>Informatique en Santé (e-santé)</i>
Anne SAPIN-MINET	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Marie-Paule SAUDER	87	<i>Mycologie, Botanique</i>
Guillaume SAUTREY	85	<i>Chimie analytique</i>
Rosella SPINA	86	<i>Pharmacognosie</i>
Sabrina TOUCHET ☒	86	<i>Pharmacochimie</i>
Mihayl VARBANOV	87	<i>Immuno-Virologie</i>
Marie-Noëlle VAULTIER	87	<i>Mycologie, Botanique</i>
Emilie VELOT	86	<i>Physiologie-Physiopathologie humaines</i>
Mohamed ZAIYOU	87	<i>Biochimie et Biologie moléculaire</i>

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER	86	<i>Sémiologie</i>
--------------------	----	-------------------

PROFESSEUR AGREGÉ

Christophe COCHAUD	11	<i>Anglais</i>
--------------------	----	----------------

☒ *En attente de nomination*

***Disciplines du Conseil National des Universités :**

80 : *Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé*

81 : *Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé*

82 : *Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques*

85 : *Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé*

86 : *Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé*

87 : *Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques*

11 : *Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes*

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D' honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

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

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

Remerciements

A Madame Béatrice Faivre,

Professeur des Universités en hématologie et biologie cellulaire à la Faculté de Pharmacie de Nancy.

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider cette thèse,
Pour les connaissances que vous m'avez permis d'acquérir lors de vos enseignements,
Recevez ici, l'expression de ma profonde gratitude.

A Monsieur Julien Perrin,

Maître de Conférences à la Faculté de Pharmacie de Nancy – Praticien Hospitalier en hématologie biologique au CHRU de Nancy.

Pour avoir accepté de diriger ce travail,
Pour votre disponibilité et votre aide,
Pour vos conseils avisés et votre confiance quant à ce travail,
Pour vos enseignements,
Permettez-moi de vous exprimer mon plus profond respect et ma sincère gratitude.

A Monsieur Claude Vigneron,

Professeur émérite à la Faculté de Pharmacie de Nancy.

Pour m'avoir aidé à définir un sujet puis accordé votre temps et votre attention à chaque étape de ce travail,
Pour votre disponibilité malgré votre emploi du temps chargé,
Pour vos précieux conseils.
Veuillez trouver ici, le témoignage de ma plus grande reconnaissance.

A Madame Michèle Martin

Praticien Hospitalier en hématologie biologique au CHRU de Nancy.

Pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse,
Pour votre disponibilité,
Pour votre aide et vos indications qui m'ont permis d'apporter des éléments essentiels à l'élaboration de ce travail.
Soyez assurée de ma plus profonde gratitude.

A mes parents,

Je tiens bien évidemment à vous remercier.

Merci pour votre soutien sans faille.

Si je suis là aujourd'hui c'est grâce à vous. Merci de m'avoir donné les moyens nécessaires pour réussir mes études.

À mon frère David,

Pour ta discrétion durant mes innombrables heures de travail,

Pour ton soutien moral pendant ces années d'étude,

(Ironie quand tu nous tiens).

Pour tous les fous rires dont tu es à l'origine,

Parce que la vie à la maison aurait été tellement plus monotone sans toi.

A l'ensemble de ma famille,

Pour l'intérêt que vous avez toujours porté à mes études,

Pour votre soutien et vos encouragements,

Je vous remercie sincèrement.

À mes amis,

A Anne, Mathieu, Mélanie D. et F., Amandine, Guillaume, Jordane, Hasret, Camille, Adeline, Mathilde, Anaïs, Muriel, Flavie, Sophie, Clotilde, Florine, Frèd, ...

Pour tous les merveilleux moments passés ensemble,

Merci à tous de faire partie de ma vie.

A Anne, Marie-Laure et Gervais,

Pour le temps que vous avez accordé à la lecture et à la correction de ce travail.

Un immense merci.

À mes collègues actuels et passés,

Pour les connaissances que vous m'avez transmises et la confiance que vous m'avez accordée,

Pour votre gentillesse et votre bonne humeur,

Je vous remercie.

Merci à la Pharmacie des Arcades et à toute son équipe de m'avoir permis de pleinement évoluer lors de mon stage de 6^{ème} année.

A tous ceux que je n'ai pas cités et qui ont compté pour moi, je vous remercie.

Table des matières

TABLE DES FIGURES.....	7
TABLE DES TABLEAUX.....	9
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES.....	11
INTRODUCTION.....	15
PARTIE 1 : UN POINT SUR L'HÉMOPHILIE A.....	17
I. Définition et épidémiologie de la pathologie.....	18
II. La clinique.....	20
1. Les hémarthroses.....	20
2. Les hématomes musculaires.....	21
3. Les hémorragies extériorisées.....	22
4. Les hémorragies du système nerveux central (SNC).....	22
III. Le diagnostic.....	23
1. Diagnostic clinique.....	23
2. Diagnostic biologique.....	24
3. Diagnostic génétique.....	25
4. Diagnostic différentiel.....	25
IV. La génétique.....	27
1. Origine et transmission de l'hémophilie.....	27
2. Le gène du facteur VIII.....	28
3. Les anomalies génétiques responsables de la pathologie.....	29
V. Le facteur VIII.....	32
1. Synthèse et structure protéique.....	32
2. Un bref rappel sur l'hémostase.....	33
3. Le rôle du FVIII dans l'hémostase.....	35
4. Son interaction avec le facteur Willebrand (vWF).....	36
PARTIE 2 : LE TRAITEMENT SUBSTITUTIF DE L'HÉMOPHILIE A.....	37
I. Son évolution d'hier à aujourd'hui.....	38

1. La transfusion de sang total et de plasma	39
2. Les cryoprécipités	40
3. Les premiers concentrés lyophilisés de FVIII	41
4. Les concentrés de haute à très haute pureté ayant subi des étapes d'inactivation virale	42
A. Le contexte historique à l'origine de la mise en place de ces concentrés.....	42
B. La sécurisation du don du sang	43
a. La qualification du donneur	44
b. La qualification biologique du don	45
C. Les méthodes de fractionnement et de purification	47
a. Les contrôles virologiques antérieurs au fractionnement	47
b. Les étapes de fractionnement du plasma	47
c. Les procédés de purification.....	48
i. La chromatographie par échange d'ions	49
ii. La chromatographie d'immuno-affinité	49
iii. La chromatographie d'exclusion ou de filtration sur gel.....	49
D. Les méthodes d'élimination et d'inactivation virales des concentrés plasmatiques de FVIII.....	50
a. Les méthodes d'inactivation par la chaleur (traitements thermiques).....	51
i. Le traitement par chauffage à sec.....	51
ii. La pasteurisation (chauffage en milieu liquide)	51
iii. Chauffage sous tension de vapeur	52
b. L'inactivation par solvant-détergent (SD).....	52
c. La nanofiltration (filtration à 15 ou 35 nm)	53
d. Avantages et limites des techniques d'inactivation et d'élimination virales	53
E. La pharmacovigilance	55
F. Les concentrés plasmatiques de FVIII disponibles sur le marché français actuel pour le traitement de l'hémophilie A	55
5. Les facteurs recombinants	57

A.	Le contexte d'apparition et l'évolution de ces facteurs	57
B.	Le procédé général de fabrication.....	57
C.	Le processus de purification.....	59
D.	Le contrôle de la qualité	60
E.	Les différentes générations de facteurs recombinants	61
a.	Les facteurs recombinants de « première génération »	61
b.	Les facteurs recombinants de « deuxième génération ».....	62
c.	Les facteurs recombinants de « troisième génération ».....	63
d.	Le facteur recombinant de « quatrième génération » : Nuwiq®	64
i.	La sécurité virale du produit.....	65
ii.	Les modifications post-traductionnelles	65
1)	Glycosylations	65
2)	Sulfatations	66
iii.	La demi-vie du produit	67
F.	Les modifications apportées à certains facteurs recombinants	68
a.	La délétion partielle ou totale du domaine B.....	68
i.	Un facteur recombinant à domaine B délété : ReFacto® et ReFacto® AF (<i>moroctocog alfa</i>).....	68
ii.	Les facteurs recombinants à domaine B tronqué	69
1)	NovoEight® (<i>turoctocog alfa</i>)	69
2)	Nuwiq® (<i>simoctocog alfa</i>)	69
iii.	L'implication potentielle de la délétion du domaine B dans l'immunogénicité du FVIII.....	70
b.	L'introduction du gène de la protéine humaine HSP70 (<i>human heat shock protein 70</i>) : Kovaltry®	71
G.	Les FVIII recombinants actuellement disponibles en France.....	73
6.	Les facteurs VIII recombinants à demi-vie prolongée	76
A.	Le contexte d'apparition de ces facteurs.....	76

a.	Un point sur la prise en charge actuelle de l'hémophilie A : traitement prophylactique <i>versus</i> traitement « à la demande ».....	76
b.	Les inconvénients majeurs du traitement prophylactique actuel	77
B.	Les transformations apportées aux FVIII recombinants pour prolonger leur demi-vie	77
a.	Fusion avec le fragment Fc des immunoglobulines G	78
i.	Elocta® (<i>efmoroctocog alfa</i>)	79
ii.	FVIII-Fc-vWF-XTEN.....	80
b.	Fusion à l'albumine	81
c.	FVIII recombinant à chaîne unique.....	82
d.	PEGylation	83
i.	BAX 855 (<i>rurioctocog alfa pegol</i>)	85
ii.	BAY 94-9027 (<i>damoctocog alfa pegol</i>)	86
iii.	N8-GP (<i>turoctocog alfa pegol</i>)	86
e.	Polysialylation	87
C.	Etat des lieux des études cliniques réalisées sur les FVIII à demi-vie prolongée	88
a.	Les résultats obtenus dans la population adulte (≥12 ans)	88
i.	Données pharmacocinétiques	88
ii.	Efficacité et données concernant le traitement prophylactique.....	89
iii.	Sécurité : formation d'inhibiteurs et d'anticorps non neutralisants (ANN)	92
b.	Les résultats obtenus dans la population pédiatrique (<12 ans)	94
i.	Données pharmacocinétiques	94
ii.	Efficacité et données concernant le traitement prophylactique.....	94
iii.	Sécurité : formation d'inhibiteurs et d'anticorps non neutralisants (ANN)	96
c.	Conclusion	97
D.	L'implication clinique des FVIII « <i>long-acting</i> » : les différentes stratégies thérapeutiques possibles	98
a.	La première stratégie thérapeutique : minimiser le nombre d'injections.....	98

b.	La seconde stratégie thérapeutique : atteindre une concentration plasmatique minimale de FVIII plus élevée	99
E.	Les limites des FVIII à longue durée d'action.....	99
a.	Un allongement de la demi-vie limité.....	99
b.	La sécurité des facteurs à demi-vie prolongée	100
i.	Les propriétés immunogènes et toxiques potentielles des facteurs PEGylés	100
ii.	L'immunogénicité potentielle du FVIII fusionné au fragment Fc d'immunoglobuline.....	101
c.	L'aspect économique	101
d.	Les méthodes de mesure.....	102
F.	Le statut des FVIII à demi-vie prolongée à l'heure actuelle	103
II.	La problématique majeure du traitement substitutif actuel : la survenue d'inhibiteurs	104
1.	Contexte et épidémiologie.....	104
2.	Les différents types d'anticorps anti-FVIII et leur impact clinique.....	104
A.	Les anticorps anti-FVIII neutralisants ou inhibiteurs	104
B.	Les anticorps non neutralisants (ANN).....	104
3.	Les facteurs de risque	105
A.	Les facteurs de risque génétiques	105
B.	Les facteurs de risque liés au traitement.....	106
a.	Les facteurs de risque liés aux modalités du traitement substitutif	106
i.	Un traitement intensif précoce	106
ii.	L'administration de FVIII dans un contexte inflammatoire (« Signal de danger »).....	108
iii.	Le traitement prophylactique.....	108
b.	Les facteurs de risque liés au facteur VIII utilisé.....	109
i.	L'origine du facteur VIII : plasmatique <i>versus</i> recombinant	109
1)	Un point sur les données actuelles : état des lieux des études.....	109

2) L'origine potentielle de cette différence d'immunogénicité	111
3) L'impact sur la stratégie thérapeutique	111
ii. Le type de facteur recombinant utilisé : « deuxième génération » <i>versus</i> « troisième génération »	111
4. Les stratégies thérapeutiques actuellement utilisées lors d'une allo-immunisation	113
PARTIE 3 : L'AVENIR THÉRAPEUTIQUE DE L'HÉMOPHILIE A.....	115
I. La thérapie génique	116
1. La modification des cellules <i>in vivo</i> à travers un vecteur viral : le virus associé à l'adénovirus (AAV).....	117
2. La modification des cellules <i>ex vivo</i>	119
3. L'ingénierie ciblée des génomes	119
II. Les stratégies thérapeutiques alternatives	122
1. Les molécules actuellement à l'étude	122
A. Anticorps bispécifique : ACE 910 (<i>emicizumab</i>).....	122
B. Anticorps anti-TFPI	123
C. ARN interférant : ALN-AT3 (<i>fitusiran</i>)	123
2. Etat des lieux des principales données cliniques actuelles	125
3. Les avantages de ces stratégies et leur implication clinique potentielle	126
CONCLUSION	128
BIBLIOGRAPHIE.....	130

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Hématomes de localisation dangereuse (7).....	21
Figure 2 : Schéma de transmission de l'hémophilie dans le cas d'un père hémophile (17) ...	27
Figure 3 : Schéma de transmission de l'hémophilie dans le cas d'une mère conductrice (17)	28
Figure 4 : Représentation du gène du FVIII (« <i>F8 gene</i> ») corrélée aux domaines codés au niveau du FVIII (15).....	29
Figure 5 : Représentation schématique de l'inversion de l'intron 22 (27)	30
Figure 6 : Les étapes de transformation du FVIII de sa structure primaire à sa forme activée (35).....	33
Figure 7 : Schéma simplifié de l'hémostase (36)	34
Figure 8 : Historique et évolution du traitement de l'hémophilie A (41)	39
Figure 9 : Les différentes étapes du fractionnement des protéines plasmatiques (88).....	48
Figure 10 : Les différentes étapes de la fabrication des FVIII recombinants (14).....	59
Figure 11 : Les épitopes antigéniques présents au niveau des FVIII recombinants selon le type de cellules productrices (153). Références : 15(157), 19(163), 21(164).....	66
Figure 12 : Les structures moléculaires du FVIII de pleine longueur et du <i>turoctocog alfa</i> (145).....	69
Figure 13 : Le <i>simoctocog alfa</i> de la structure primaire à la structure dimérique (147)	70
Figure 14 : Représentation schématique d'une protéine de fusion au fragment Fc des immunoglobulines (233)	78
Figure 15 : La voie de recyclage physiologique des immunoglobulines via le récepteur FcRn (42).....	79
Figure 16 : Représentation schématique de l' <i>efmoroctocog alfa</i> (42)	80
Figure 17 : Représentation schématique d'une protéine de fusion à l'albumine (233).....	82
Figure 18 : Représentation schématique d'une protéine PEGylée (233).....	83
Figure 19 : Mécanisme d'action responsable de l'allongement de la durée de vie du FVIII par PEGylation (258).....	84
Figure 20 : Représentation schématique d'un liposome PEGylé sur lequel sont attachées les protéines d'intérêt (233).....	85

Figure 21 : Représentation schématique d'une protéine polysialylée (233)	87
Figure 22 : La théorie de la discontinuité (329).....	107
Figure 23 : Les deux principales stratégies de thérapie génique : la modification des cellules <i>in vivo</i> ou <i>ex vivo</i> (349).....	116
Figure 24 : L'ingénierie ciblée des génomes (358)	120

TABLE DES TABLEAUX

Tableau I : Corrélation entre le pourcentage d'activité du FVIII et la gravité des manifestations hémorragiques possibles (6).....	19
Tableau II : Corrélation entre le type de mutation et la sévérité de l'hémophilie A	31
Tableau III : Avantages et limites des méthodes d'inactivation et d'élimination virales (82) ..	53
Tableau IV : Les concentrés plasmatiques de FVIII disponibles sur le marché français actuel pour le traitement de l'hémophilie A (14)	55
Tableau V : Les lignées cellulaires utilisées pour la production des FVIII recombinants	58
Tableau VI : Les fonctions spécifiques des sites de sulfatation du FVIII au niveau physiologique (144,158,169,170)	67
Tableau VII : Les FVIII recombinants qui ont été et qui sont actuellement commercialisés en France (144).....	74
Tableau VIII : Schéma thérapeutique de la prophylaxie de mise en place précoce et d'intensification progressive (222)	77
Tableau IX : Données pharmacocinétiques des études cliniques sur les FVIII à demi-vie prolongée - Population adulte.....	88
Tableau X : Schémas thérapeutiques des études cliniques sur les FVIII à demi-vie prolongée - Population adulte	90
Tableau XI : Données relatives à l'efficacité des FVIII à demi-vie prolongée lors des études cliniques - Population adulte.....	91
Tableau XII : Données relatives à la prophylaxie provenant des études cliniques réalisées sur les FVIII à demi-vie prolongée - Population adulte.....	92
Tableau XIII : Données relatives à la sécurité des FVIII à demi-vie prolongée lors des études cliniques - Population adulte.....	93
Tableau XIV : Données pharmacocinétiques des études cliniques sur les FVIII à demi-vie prolongée - Population pédiatrique.....	94
Tableau XV : Schémas thérapeutiques des études cliniques sur les FVIII à demi-vie prolongée - Population pédiatrique.....	95
Tableau XVI : Données relatives à l'efficacité des FVIII à demi-vie prolongée lors des études cliniques - Population pédiatrique.....	96

Tableau XVII : Données relatives à la prophylaxie provenant des études cliniques faites sur les FVIII à demi-vie prolongée - Population pédiatrique.....	96
Tableau XVIII : Données relatives à la sécurité des FVIII recombinants lors des études cliniques - Population pédiatrique.....	97
Tableau XIX : Tableau récapitulatif de l'ensemble des FVIII recombinants à demi-vie prolongée actuellement à l'étude ou ayant obtenu une AMM (306,307)	103
Tableau XX : Tableau récapitulatif des résultats des études observationnelles CANAL, RODIN et EUHASS ainsi que de l'étude randomisée SIPPET par rapport au développement d'inhibiteurs selon l'origine du FVIII utilisé.	110
Tableau XXI : Tableau récapitulatif des résultats des études RODIN, FranceCoag, UKHCDO et EUHASS par rapport au développement d'inhibiteurs selon le type de FVIII utilisé.	113
Tableau XXII : Les thérapies géniques par modification des cellules <i>in vivo</i> actuellement à l'étude (354)	118
Tableau XXIII : Etat des lieux des principales données cliniques actuelles concernant les stratégies thérapeutiques alternatives	125

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES

AAV	Virus Associé à l'Adénovirus
Ac	Anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AINS	Anti-inflammatoire non stéroïdien
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ANN	Anticorps Non Neutralisant
ANSM	Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé
APCC	<i>Activated Prothrombin Complex Concentrate</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	Acide ribonucléique interférant
AS	Activité Spécifique
Ag	Antigène
AT	Antithrombine
ATU	Autorisation Temporaire d'Utilisation
BC	Butyl Sepharose Chromatographie
BHK	<i>Baby Hamster Kidney Cell</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CA	Chromatographie d'Affinité
CANAL	<i>Concerted Action on Neutralizing Antibodies in severe hemophiLia A</i>
CE	Chromatographie d'Exclusion
CEI	Chromatographie par Echange d'Ions
CGR	Concentré de Globules Rouges
CHMP	<i>Committee for Medicinal Products for Human Use</i>
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary cell</i>
CIA	Chromatographie d'Immuno-Affinité
CoMETH	Coordination Médicale pour l'Étude et le Traitement des maladies Hémorragiques constitutionnelles
CP	Concentré Plaquettaire
CPA	Cellule Présentatrice de l'Antigène

CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Associated protein-4</i>
Da	Dalton
DGV	Dépistage Génomique Viral
DHFR	Dihydrofolate réductase
DHPC	Déficits Héritaires en Protéines Coagulantes
EFS	Etablissement Français du Sang
EI	Événement Indésirable
EUHASS	<i>European Haemophilia Safety Surveillance System</i>
FII	Facteur II
FV	Facteur V
FVII	Facteur VII
FVIII	Facteur VIII
FVIIIa	Facteur VIII activé
FIX	Facteur IX
FIXa	Facteur IX activé
FX	Facteur X
FXa	Facteur X activé
FcRn	<i>Neonatal Fc Receptor</i>
FMH	Fédération Mondiale de l'Hémophilie
FT	Facteur Tissulaire
G	Génération
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HPPS	<i>Human Plasma Protein Solution</i>
HSA	<i>Human Serum Albumin</i>
HSH	Hommes qui ont eu des relations Sexuelles avec des Hommes
HSP	<i>Heat Shock Protein</i>
HTLV	<i>Human T-cell lymphotropic virus</i>
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
Ig	Immunoglobuline

IL	Interleukine
int22h-1	<i>intron 22 homology – 1</i>
InVS	Institut de Veille Sanitaire
ITI	Induction de Tolérance Immune
IV	Intraveineuse
kb	Kilobase
kg	Kilogramme
LFB	Laboratoire français du Fractionnement et des Biotechnologies
LRP	<i>Low density lipoprotein Receptor–related Proteins</i>
MAT	Microangiopathie Thrombotique
MDS	Médicament Dérivé du Sang
Neu5Gc	<i>N-glycolylneuraminic acid</i>
NeuNAc	Acide N-acétylneuraminique
NF	Nanofiltration
pb	Paire de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEG	Polyéthylène glycol
PFA	<i>Platelet Function Analyzer</i>
PLs	Phospholipides
PSA	<i>Polysialic acid</i>
PSL	Produit sanguin labile
PTM	<i>Post-Translational Modification</i>
PUP	<i>Previously Untreated Patient</i>
RCo	Ristocétine
rFVIII	Facteur VIII recombinant
RFC	Réseau FranceCoag
RODIN	<i>Research Of Determinants of INhibitor Development among PUPs with haemophilia</i>
Rq	Remarque
Sacch.	Saccharose
SD	Solvant-Détergent

SIDA	Syndrome d'Immunodéficience Acquise
SIPPET	<i>Survey of Inhibitors in Plasma-Products Exposed Toddlers</i>
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
SNC	Système Nerveux Central
SOBI	<i>Swedish Orphan Biovitrum</i>
T_{1/2}	Temps de demi-vie
TALEN	<i>Transcription Activator-Like Effector Nucleases</i>
TCA	Temps de Céphaline Activée
TFPI	<i>Tissue Factor Pathway Inhibitor</i>
TGS	<i>Transcriptionnal Gene Silencing</i>
TMA	<i>Transcription Mediated Amplification</i>
TNBP	Tri-N-Butyl Phosphate
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TP	Taux de Prothrombine
TQ	Temps de Quick
Tregs	<i>Regulatory T cells</i>
UB	Unité Bethesda
UF	Ultrafiltration
UKHCDO	<i>United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation</i>
vg	<i>vector genomes</i>
VHA	Virus de l'Hépatite A
VHB	Virus de l'Hépatite B
VHC	Virus de l'Hépatite C
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
vWF	<i>von Willebrand Factor</i>
WFH	<i>World Federation of Hemophilia</i>
ZFN	<i>Zinc Finger Nucleases</i>

INTRODUCTION

L'hémophilie A est une maladie hémorragique héréditaire rare qui se caractérise par un déficit en un facteur de la coagulation : le facteur VIII (FVIII). Les conséquences cliniques liées au caractère hémorragique de la pathologie sont majeures et peuvent aboutir à des dommages musculo-articulaires importants. La sévérité clinique est directement corrélée à l'importance du déficit en FVIII. Sa prise en charge repose actuellement sur le traitement substitutif par des concentrés de FVIII d'origine plasmatique ou recombinante.

L'histoire de l'hémophilie est jalonnée de progrès thérapeutiques majeurs et d'évènements tragiques. Jusqu'au milieu du XX^{ème} siècle, les patients atteints d'une hémophilie sévère avaient une espérance de vie bien plus faible que la moyenne, du fait de l'absence d'une thérapie réellement efficace. L'apparition des concentrés de FVIII d'origine plasmatique représente une véritable révolution thérapeutique. Leur utilisation est associée à la prise en charge rapide et efficace des hémorragies ainsi qu'à la possibilité de mise en place d'un traitement prophylactique à domicile. Malheureusement, la contamination d'un grand nombre de patients par le VIH et les virus des hépatites B et C marquent la fin de l'euphorie liée à ces concentrés. Les traitements anti-hémophiliques actuels sont à la fois efficaces et très sécurisés dans les pays développés. Des voies d'amélioration sont cependant encore possibles.

Dans une première partie, nous ferons un point sur l'hémophilie A. Nous débiterons par une brève définition, en insistant sur les données épidémiologiques actuelles, suivie de la description clinique de la pathologie. Nous verrons ensuite les étapes du diagnostic avant de développer l'aspect génétique de l'hémophilie A. Pour finir, nous nous intéresserons au FVIII et à son implication dans l'hémostase afin de mieux comprendre la pathologie.

Une seconde partie portera sur le traitement substitutif de l'hémophilie A. Nous décrirons l'évolution de ce traitement de la transfusion de sang complet à l'arrivée des FVIII recombinants à demi-vie prolongée. Nous parlerons également de la problématique majeure du traitement substitutif actuel, à savoir la survenue d'anticorps anti-FVIII neutralisants ou inhibiteurs.

Pour finir, la troisième partie de ce travail portera sur les thérapies d'avenir. Nous ferons un point sur les données actuelles concernant la thérapie génique ainsi que les nouvelles stratégies thérapeutiques à l'étude.

PARTIE 1 : UN POINT SUR L'HÉMOPHILIE A

I. Définition et épidémiologie de la pathologie

L'hémophilie est une pathologie hémorragique héréditaire liée au chromosome X. Son expression clinique concerne donc principalement le sexe masculin mais, exceptionnellement, le sexe féminin peut aussi présenter des symptômes. On parle de « forme symptomatique d'hémophilie A de la femme porteuse » (1). L'hémophilie peut aussi être acquise, du fait du développement d'auto-anticorps, chez des personnes ne souffrant pas d'une forme congénitale. C'est un cas qui est cependant très rare et que nous ne développerons pas dans ce travail.

Cette pathologie est due à un déficit en une protéine de la coagulation. On distingue deux types d'hémophilie, selon la protéine qui est déficiente : l'hémophilie A si le déficit est lié au facteur VIII et l'hémophilie B si c'est le facteur IX. D'après les données démographiques du Réseau FranceCoag¹ datant de février 2017, 5762 patients atteints d'hémophilie A sont actuellement suivis sur le territoire français, contre 1303 patients atteints d'hémophilie B (3).

L'hémophilie A est une maladie chronique rare, affectant les populations du monde entier, dont l'incidence annuelle mondiale est voisine de 1 sur 6000 individus de sexe masculin (4). D'après les données de prévalence des maladies rares publiées en novembre 2016 dans les cahiers d'Orphanet² (5), sa prévalence dans la population mondiale est estimée à 4,85/100 000 et sa prévalence à la naissance à 11,25/100 000.

L'hémophilie A, au même titre que l'hémophilie B, la maladie de Willebrand et les autres déficits hémorragiques en protéine de la coagulation dans leurs formes sévères, fait partie des Déficiences Héritaires en Protéines Coagulantes (DHPC).

On distingue trois degrés de sévérité clinique selon l'importance du déficit en facteur VIII (FVIII) : l'hémophilie sévère lorsque l'activité biologique du FVIII est inférieure à 1 %, modérée quand elle est comprise entre 1 et 5% et légère lorsque celle-ci est comprise entre 5 et 40%. Le but de cette classification est d'évaluer le risque hémorragique (**Tableau I**) afin de guider la prise en charge. D'après les données du Réseau FranceCoag de février 2017, sur les 5762 patients suivis, 32% sont atteints d'une hémophilie sévère, 14% d'une hémophilie modérée et 54% d'une hémophilie mineure (3).

¹ « Le Réseau FranceCoag (RFC) est un dispositif national reposant sur un suivi de cohorte de patients porteurs d'un déficit héréditaire en protéines coagulantes (DHPC), mis en place par les pouvoirs publics et coordonné par l'Institut de veille sanitaire (InVS) depuis janvier 2004.» (2)

² Le portail des maladies rares et des médicaments orphelins.

TABLEAU I : CORRÉLATION ENTRE LE POURCENTAGE D'ACTIVITÉ DU FVIII ET LA GRAVITÉ DES MANIFESTATIONS HÉMORRAGIQUES POSSIBLES (6)

Niveau de sévérité de l'hémophilie	Pourcentage d'activité du facteur VIII	Manifestations hémorragiques possibles
Sévère	Inférieur à 1%	<ul style="list-style-type: none"> - Hémorragies spontanées fréquentes, surtout articulaires ou musculaires. - Saignements anormaux à la suite d'une chirurgie, d'une extraction dentaire ou de blessures mineures.
Modérée	1-5%	<ul style="list-style-type: none"> - Hémorragies spontanées rares. - Saignements anormaux à la suite d'une chirurgie, d'une extraction dentaire ou de blessures mineures.
Légère	5-40%	<ul style="list-style-type: none"> - Pas d'hémorragies spontanées. - Saignements anormaux à la suite d'une chirurgie, d'une extraction dentaire ou de blessures mineures.

II. La clinique

(7–10)

Les signes cliniques de l'hémophilie se matérialisent par des manifestations hémorragiques dont la gravité est généralement corrélée au taux sanguin en facteur anti-hémophilique, comme nous l'avons vu précédemment (**Tableau I**). Il est important de noter que la sévérité clinique est la même chez tous les membres d'une même famille. De plus, cette sévérité reste stable au cours du temps. On distingue plusieurs types d'hémorragies selon leur localisation.

1. Les hémarthroses

L'hémarthrose correspond à un épanchement de sang à l'intérieur d'une articulation. Elle se manifeste chez l'enfant en bas âge, avec l'apprentissage de la marche, et représente la majorité des accidents hémorragiques du patient hémophile. Les articulations les plus touchées par ordre de fréquence croissante sont : les chevilles, les genoux, les coudes, moins souvent les hanches et les épaules. Les autres articulations peuvent également être touchées, mais de manière beaucoup plus rare.

L'hémarthrose débute généralement par une sensation de gêne au mouvement et se poursuit, en l'absence de traitement, par une douleur très vive du fait de l'inflammation importante de l'articulation qui est gonflée, rouge et chaude. Elle aboutit à une impotence fonctionnelle totale de l'articulation touchée, qui peut persister quelques jours voire même plusieurs semaines en l'absence de traitement substitutif. Son apparition peut se faire de manière spontanée chez le patient hémophile sévère, ou après un traumatisme, même minime, qui peut passer inaperçu. Il faut également noter que l'atteinte hémorragique d'une articulation la prédispose à la survenue d'hémarthroses ultérieures, dont la répétition entraîne des lésions cartilagineuses puis osseuses et musculaires aboutissant à une arthropathie chronique. On parle alors d'« arthropathie hémophilique ». Sa manifestation est la source d'handicap majeur de l'hémophilie puisque la possibilité de mouvement des articulations touchées est relativement limitée. Elle peut entraîner une gêne considérable à la marche lorsque les articulations des membres inférieurs sont atteintes, mais aussi une gêne à l'utilisation du membre supérieur lorsque le coude est touché par exemple. Ainsi, l'un des objectifs principal du traitement substitutif est la prévention ou le ralentissement de l'apparition de cette arthropathie.

2. Les hématomes musculaires

Les hématomes musculaires peuvent toucher n'importe quel muscle. Ils sont moins fréquents que les hémarthroses mais plus souvent post-traumatiques. Ils peuvent mettre en jeu le pronostic fonctionnel voire même le pronostic vital (asphyxie, collapsus hémorragique) en fonction de leur volume et de leur localisation, notamment à proximité d'un nerf ou d'un organe vital (**Figure 1**). Les hématomes les plus redoutables sont l'hématome du psoas, pouvant se manifester par une paralysie crurale et des séquelles fonctionnelles, les hématomes rétro-péritonéaux, qui peuvent entraîner une déperdition importante de sang, les hématomes cervicaux par le risque de compression voire d'obstruction des axes vasculaires à destination du cerveau, et enfin les hématomes sublinguaux qui peuvent entraîner une compression voire une obstruction des voies respiratoires. Un hématome mal résorbé ou insuffisamment traité peut s'enkyster et évoluer vers la formation d'une pseudotumeur hémophilique. Son caractère invasif est à l'origine de destructions osseuses importantes mettant en jeu le pronostic fonctionnel et parfois même vital.

On différencie les hématomes superficiels (muscles des membres ou de la paroi abdominale) des hématomes profonds (psoas iliaque). Les localisations les plus fréquentes sont le psoas iliaque, les muscles des bras et de l'avant-bras, la jambe et la cuisse, et plus rarement le deltoïde, la fesse et la paroi abdominale.

En ce qui concerne les symptômes, on observe de manière successive : une sensation d'inconfort, une douleur devenant de plus en plus présente, une tuméfaction localisée, une attitude vicieuse du membre qui va se matérialiser notamment par un flexum ou un trouble de la marche, des ecchymoses. On retrouve également des signes cliniques qui sont spécifiques aux muscles touchés.

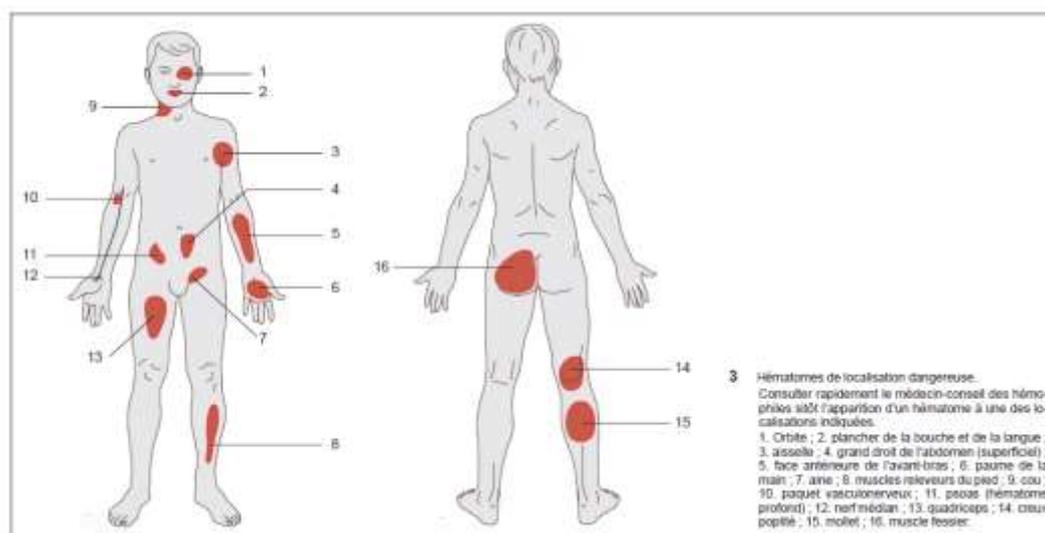


FIGURE 1 : HÉMATOMES DE LOCALISATION DANGEREUSE (7)

3. Les hémorragies extériorisées

Les hémorragies extériorisées sont rares et touchent des sites variés.

- Les hémorragies intrabuccales : elles sont le plus souvent post-traumatiques (extraction dentaire, morsure de la langue ...) et fréquentes, en particulier chez le jeune enfant.
- Les épistaxis : les épistaxis, ou saignements de nez, sont fréquentes aussi bien chez l'enfant que chez l'adulte.
- Les hémorragies digestives : elles sont rares et se traduisent généralement par une émission de sang par la bouche ou les selles. Ces hémorragies sont révélatrices de lésions sous-jacentes du tube digestif.
- Les hématuries : elles peuvent être fréquentes, généralement spontanées, mais peuvent aussi faire suite à un traumatisme lombaire. Leur caractère récidivant doit faire l'objet de la recherche d'une lésion de l'appareil urinaire, notamment la présence d'un hématome intra-rénal.

4. Les hémorragies du système nerveux central (SNC)

Elles sont rares et se traduisent par des hémorragies intracrâniennes ou exceptionnellement intrarachidiennes.

- Les hémorragies intracrâniennes
Elles peuvent être à l'origine de séquelles neurologiques graves voire même fatales. En effet, ces hémorragies sont encore l'une des principales causes de décès du jeune hémophile. Elles peuvent survenir suite à un traumatisme, même banal, et se traduire entre autres par un traumatisme crânien ou des céphalées violentes d'apparition brutale. L'apparition de ces symptômes entraîne systématiquement le recours à un traitement substitutif. Il faut également savoir que certains facteurs favorisent l'apparition d'une hémorragie intracrânienne lors de la période néo-natale : la prématurité, la souffrance fœtale aiguë, l'accouchement par forceps ou ventouse. Dans les autres cas, le risque hémorragique lors de l'accouchement est similaire à celui d'un enfant non atteint.
- Les hémorragies intrarachidiennes
Elles sont le plus souvent causées par un traumatisme et peuvent engendrer des troubles moteurs ou des sensations anormales (fourmillements, sensations désagréables au toucher voire douleur).

III. Le diagnostic

Un diagnostic d'hémophilie peut être effectué dans différentes circonstances :

- Lorsque des ecchymoses apparaissent fréquemment dans la petite enfance.
- Lors de saignements « spontanés », c'est-à-dire sans raison apparente connue, en particulier dans les articulations, les muscles et les tissus mous.
- Lors d'un bilan d'hémostase demandé en raison d'antécédents familiaux d'hémophilie.
- Lors d'un bilan d'hémostase fortuit, notamment préopératoire (7).

Dès que le diagnostic de la pathologie est suspecté, le guide de l'HAS (2007) préconise de réaliser un « bilan adapté à l'âge, à la nature du déficit, aux circonstances diagnostiques et aux signes cliniques » (6), qui comprend :

- Un bilan de l'hémostase (Partie 1, III, 2).
- Un bilan sanguin : hémogramme, groupe sanguin ABO.
- La recherche d'anticoagulants circulants non spécifiques d'un facteur (antiphospholipides).
- Des tests spécifiques : dosages des facteurs de la coagulation, recherche d'inhibiteurs spécifiques d'un facteur, dosages immunologique et fonctionnel du facteur Willebrand (vWF) : antigène du facteur Willebrand (vWF:Ag), activité cofacteur de la ristocétine (vWF:RCo), liaison au facteur VIII (vWF:FVIIIb), dosage de l'activité de liaison au collagène (vWF:CB), étude des multimères du facteur Willebrand, étude des fonctions plaquettaires.
- Un génotypage.
- Une enquête génétique avec proposition de dépistage des sujets porteurs.
- Un test thérapeutique à la desmopressine pour apprécier la qualité de répondeur, dans le cas de la prise en charge thérapeutique d'une hémophilie mineure ou modérée.
- Les sérologies virales (VIH, VHC, VHB, VHA).

1. Diagnostic clinique

L'interrogatoire du patient ou de la famille, si c'est un enfant, est une étape essentielle du diagnostic clinique, il permet (11,12) :

- De rechercher des antécédents hémorragiques personnels et d'en préciser la période de survenue (naissance, apprentissage de la marche, adulte), la localisation, la fréquence et la gravité.
- D'enquêter sur les circonstances de survenue des hémorragies, spontanées ou provoquées par un traumatisme mineur, un accouchement, une intervention chirurgicale ou une extraction dentaire.
- De rechercher l'existence d'antécédents hémorragiques familiaux et d'établir un arbre généalogique.
- D'évaluer la présence de facteurs favorisants ou déclenchants : prise récente de médicaments à risque (anticoagulants, AINS, aspirine ...), affection aiguë (syndrome infectieux) ou chronique (insuffisance hépatique ou rénale...) pouvant être à l'origine d'un syndrome hémorragique.
- De préciser s'il y a des antécédents d'anémie et/ou de traitement par du fer.

L'interrogatoire s'accompagne d'un examen clinique. Il va permettre d'évaluer le retentissement de l'hémorragie par la recherche d'une anémie (pâleur, fatigue, tachycardie, essoufflement) et/ou d'une hypovolémie (hypotension, choc). Il va également permettre de définir le contexte (hémorragie isolée ou associée à une maladie hépatique, rénale, infectieuse) et la nature de l'hémorragie (hématome, hémarthrose, ecchymose, épistaxis, gingivorragie, hématurie, hémorragie intracrânienne...).

2. Diagnostic biologique

Il repose sur la réalisation du bilan de l'hémostase qui se traduit par (11–14) :

- Un bilan d'hémostase primaire normal par mesure du temps d'occlusion plaquettaire (PFA-100), de la numération plaquettaire, du taux de facteur Willebrand (vWF).
- Un temps de Quick (TQ), de prothrombine (TP) et un taux de fibrinogène normaux.
- Un allongement isolé du temps de céphaline avec activateur (TCA).
- Toute augmentation du TCA doit amener à quantifier le FVIII par la mesure de son activité coagulante (FVIII:C) et/ou par mesure de son activité antigénique (FVIII:Ag).

Un TCA dans les limites de la normale ne permet pas d'exclure une hémophilie A mineure. Chez les conductrices d'hémophilie ou en cas d'antécédents familiaux, il est conseillé de pratiquer un dosage de FVIII même si le TCA est normal. De même, pour toute sœur d'un garçon hémophile, potentielle conductrice d'une forme d'hémophilie identique à celle de son frère, on peut doser le taux de FVIII de manière précoce. Le dosage est réalisé dans le but

de vérifier qu'elle ne se trouve pas dans une situation de conductrice à taux bas qui comporterait un risque hémorragique.

3. Diagnostic génétique

Les techniques de diagnostic génétique actuelles permettent d'identifier la mutation responsable d'hémophilie sévère au sein d'une famille. La réalisation du génotypage, après diagnostic d'un nouveau cas d'hémophilie sévère, est essentielle pour le conseil génétique et le diagnostic prénatal (recherche de l'anomalie génétique chez le fœtus afin de pouvoir éventuellement faire le choix d'interrompre médicalement la grossesse), mais aussi pour le patient lui-même. En effet, la connaissance de la mutation contribue à l'évaluation du risque de développer un inhibiteur du FVIII (15).

Une enquête génétique peut également être proposée afin de déterminer le statut des membres d'une même famille (par exemple la sœur d'un garçon hémophile) et d'apporter un diagnostic et un conseil génétique de certitude (16).

4. Diagnostic différentiel

Devant tout syndrome hémorragique avec un allongement isolé du TCA et la présence d'un déficit en FVIII, un diagnostic différentiel doit être réalisé afin d'écarter (15) :

- Une hémophilie A acquise par développement d'auto-anticorps anti-FVIII. Un contexte caractéristique est généralement rencontré : grossesse, personne âgée, en cas d'antibiothérapie récente, de maladie auto-immune associée ou de cancer. La correction du TCA, après incubation avec un plasma témoin, permet d'écarter la présence d'un anticorps circulant.
- Une maladie de Willebrand : de type 1 sévère, 2N (variant Normandie) qui correspond à un défaut qualitatif de liaison du vWF au FVIII, ou de type 3 se caractérisant par un défaut quantitatif complet en vWF.

En ce qui concerne la maladie de Willebrand de type 2N, la seule manière de faire la distinction avec l'hémophilie A mineure est de mettre en évidence une anomalie de la liaison du FVIII au vWF. La mesure de la liaison vWF-FVIII est diminuée en cas de maladie de Willebrand de type 2N et normale en cas d'hémophilie.

Dans le cas de la maladie de Willebrand de type 3, le diagnostic différentiel est confirmé par le dosage du vWF:Ag. Le taux mesuré est inférieur à la valeur seuil de détection des techniques de dosage du vWF:Ag (5-6%).

L'hémophilie B a été écartée par le dosage en FIX, dont le taux est déficitaire, et un taux en FVIII normal.

IV. La génétique

1. Origine et transmission de l'hémophilie

L'hémophilie est une maladie récessive liée au chromosome sexuel X. Il s'agit d'une maladie héréditaire causée par une anomalie génétique. Elle ne se révèle généralement que chez l'homme, celui-ci ne possédant qu'un seul chromosome X. En effet, lorsque cette anomalie est présente chez une femme, du fait de la présence de deux chromosomes X et du caractère récessif de la pathologie, l'activité normale de l'un masquera l'anomalie de l'autre. Cette femme est conductrice, c'est-à-dire qu'elle peut transmettre la pathologie, mais non hémophile. L'hémophilie féminine existe tout de même mais elle reste exceptionnelle.

En ce qui concerne la transmission de la pathologie (**Figures 2 et 3**) :

- Un homme hémophile est porteur du gène déficient de l'hémophilie sur son unique chromosome X. Ses fils ne sont donc pas concernés par la transmission de la pathologie puisqu'ils n'héritent que du chromosome Y. Par contre, il transmet obligatoirement son chromosome X, porteur du gène déficient, à toutes ses filles qui sont donc conductrices (**Figure 2**).

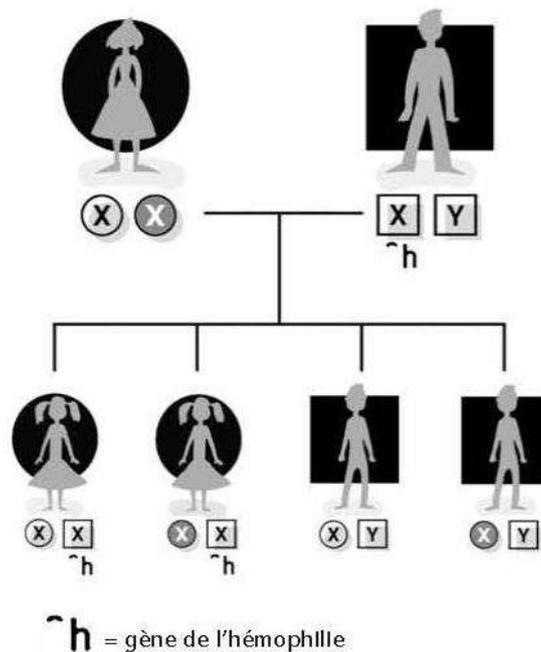


FIGURE 2 : SCHÉMA DE TRANSMISSION DE L'HÉMOPLHIE DANS LE CAS D'UN PÈRE HÉMOPLHIE (17)

- Dans le cas d'une femme conductrice, un des chromosomes X est normal alors que l'autre est porteur de la mutation. Ses filles ont donc 50% de risque d'hériter du chromosome X présentant la mutation et d'être conductrices. De la même manière, les fils ont 50% de risque d'hériter du chromosome X avec la mutation et de présenter les symptômes de l'hémophilie (**Figure 3**).

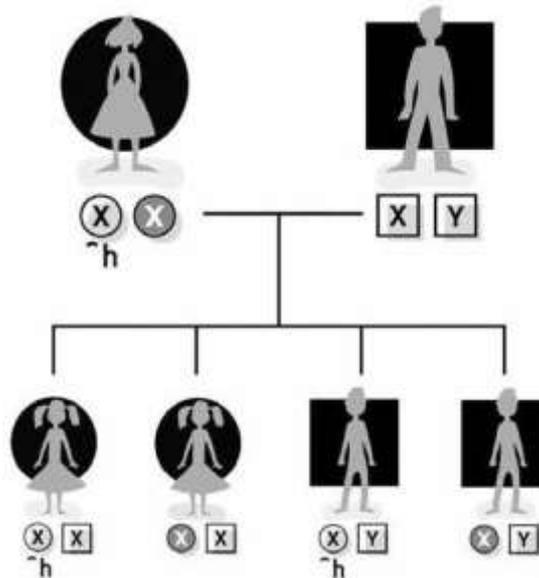


FIGURE 3 : SCHÉMA DE TRANSMISSION DE L'HÉMOFILIE DANS LE CAS D'UNE MÈRE CONDUCTRICE (17)

On retrouve également, dans environ 40% des cas (18), des hémophilies A dites sporadiques dans des familles où il n'y a pas d'antécédents. Elles sont causées par des mutations *de novo*.

2. Le gène du facteur VIII

Le gène du FVIII se situe sur le bras long du chromosome X (Xq28). Il s'agit d'un gène de grande taille comportant 186 936 paires de bases (pb), dont 26 exons et 25 introns (19). Parmi ces 26 exons, 24 ont une longueur comprise entre 69 et 262 pb et deux, à savoir les exons 14 et 26, se différencient par leur caractère très étendu (19). Ils comprennent respectivement 3106 et 1958 pb (19).

La **figure 4** permet d'apprécier le positionnement des 26 exons du gène et les domaines correspondants du FVIII. La connaissance des équivalences entre les exons et le domaine qu'ils codent est essentielle pour la thérapeutique. En effet, cela permet d'évaluer la sévérité de la pathologie ainsi que le risque de survenue d'inhibiteurs.

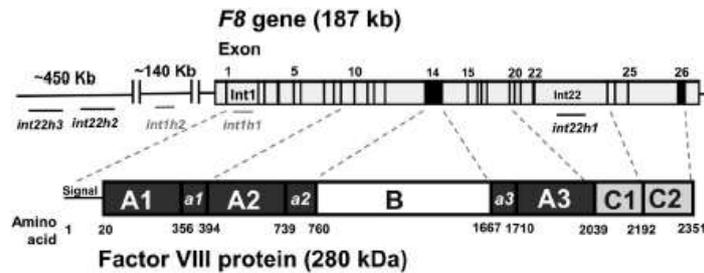


FIGURE 4 : REPRÉSENTATION DU GÈNE DU FVIII (« F8 GENE ») CORRÉLÉE AUX DOMAINES CODÉS AU NIVEAU DU FVIII (15)

3. Les anomalies génétiques responsables de la pathologie

(18,20–22)

La connaissance du type d'anomalie qui affecte le gène du FVIII et cause l'hémophilie est indispensable au dépistage et à l'évaluation du risque de survenue d'inhibiteurs du FVIII en réponse au traitement substitutif. D'après la base de données mondiale des anomalies génétiques du FVIII (23), sur les 5480 individus étudiés, on retrouve actuellement plus de 2000 mutations uniques du gène.

Les anomalies génétiques responsables de l'hémophilie A peuvent être divisées, de manière globale, en deux catégories (24) :

- Les anomalies qui empêchent toute synthèse du FVIII.
Elles résultent de phénomènes de délétions étendues, d'inversions, de mutations non-sens et de certaines anomalies d'épissage. Ces anomalies sont fortement délétères et sont à l'origine d'hémophilies sévères. Elles sont associées à un risque élevé d'apparition d'inhibiteurs.
- Les anomalies qui préservent la synthèse de FVIII, de manière anormale mais significative.
Elles proviennent de mutations faux-sens ou d'anomalies d'épissage. Elles sont associées à un risque de survenue d'inhibiteurs plus faible.

Les **inversions** sont des mutations de type grand réarrangement, présentes dans 23% des cas d'hémophilie A (15). Elles comprennent l'inversion de l'intron 22 ou de l'intron 1. L'inversion de l'intron 22 (**Figure 5**) est la plus fréquente des anomalies génétiques associées à l'hémophilie A sévère, elle en serait responsable dans environ 45 % des cas (15). Elle est issue d'une recombinaison homologue intra-chromosomique de séquences nucléotidiques introniques répétées : int22h-1 (« intron 22 homology - 1 ») et une des deux copies int22h-2 et int22h-3, situées en position plus télomérique et orientées en sens inverse

de int22h-1. Cette recombinaison d'une portion du gène du FVIII sépare les exons 1 à 22 des exons 23 à 26, empêchant la production d'un facteur VIII intact. Elle a été décrite en 1993 par Lakich (25) et en 1995 par Naylor (26). L'inversion de l'intron 1 touche 2 à 5% des patients présentant une hémophilie A sévère, soit environ 10 fois moins que l'inversion de l'intron 22 (15). Elle est la conséquence de la recombinaison homologe intrachromosomique entre deux séquences répétées : int1h-1 et int1h-2. L'inversion de l'intron 1 entraîne la séparation du FVIII en deux cadres de lecture de directions opposées, aboutissant à la production d'un segment court d'ARNm du FVIII composé uniquement de l'exon 1 du FVIII.

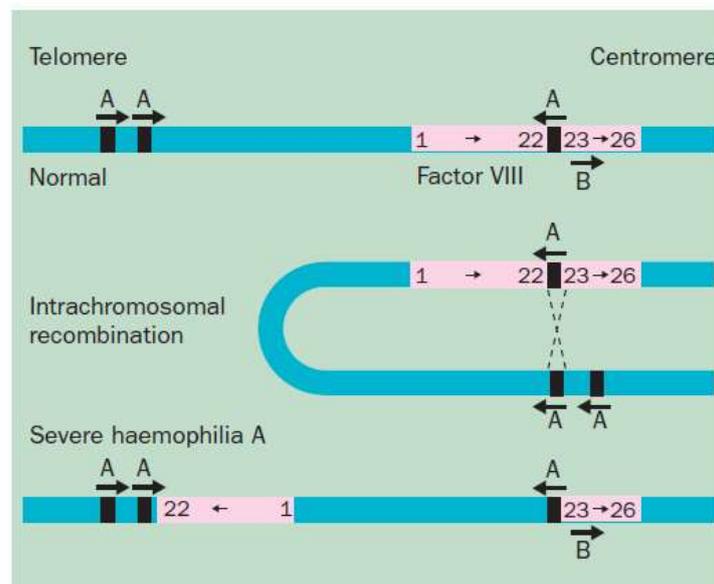


FIGURE 5 : REPRÉSENTATION SCHEMATIQUE DE L'INVERSION DE L'INTRON 22 (27)

Les **mutations ponctuelles** (66,5% des mutations enregistrées dans la base de données mondiale des anomalies génétiques du FVIII (23)) se matérialisent par la substitution d'un seul nucléotide. Elles aboutissent soit au remplacement d'un acide aminé (mutation faux-sens ou *missense* en anglais), générant des formes mineures ou modérées de la pathologie, soit à la création d'un codon stop amenant à la synthèse d'une protéine tronquée (mutations non-sens) générant des formes sévères de la maladie.

Les **insertions** (1,6% des mutations enregistrées dans la base de données mondiale des anomalies génétiques du FVIII (23)) ou **délétions** (23,2% des mutations enregistrées dans la base de données mondiale des anomalies génétiques du FVIII (23)) d'une séquence nucléotidique plus ou moins étendue aboutissent généralement à un décalage du cadre de lecture et/ou à un codon stop et donc à la formation d'une protéine tronquée. On retrouve également des **indel mutations** (1,3% des mutations enregistrées dans la base de données

mondiale des anomalies génétiques du FVIII (23)) ; il s'agit du terme anglais correspondant à une mutation qui allie simultanément une insertion et une délétion.

Les **anomalies d'épissage** de l'ARNm (*splice site* en anglais) et les **duplications** (4,8% des mutations enregistrées dans la base de données mondiale des anomalies génétiques du FVIII (23)) sont également rencontrées. Elles peuvent être responsables d'hémophilie sévère, modérée ou mineure.

L'ensemble de ces mutations vont avoir des conséquences variées et déterminer le niveau de sévérité de la pathologie (**Tableau II**).

TABLEAU II : CORRÉLATION ENTRE LE TYPE DE MUTATION ET LA SÉVÉRITÉ DE L'HÉMOFILIE A

Types de mutation	Prévalence (23)	Conséquence(s) de la mutation	Sévérité de l'hémophilie A associée
Inversion de l'intron 22	23%	Transcription incomplète	Sévère
Inversion de l'intron 1			Sévère
Délétion ou insertion étendue	23,2% dans le cas des délétions 1,6% pour les insertions	Désorganisation du gène	Sévère
Délétion ou insertion de petite taille		Décalage du cadre de lecture et/ou apparition d'un codon stop et donc formation d'une protéine tronquée	Sévère ou modérée
Mutations ponctuelles :			
Faux-sens	66,5%	Remplacement d'un acide aminé	Modérée ou mineure
Non-sens		Création d'un codon stop aboutissant à la formation d'une protéine tronquée	Sévère

V. Le facteur VIII

1. Synthèse et structure protéique

Le facteur VIII, également appelé « facteur anti-hémophilique A », est une protéine plasmatique complexe de 2332 acides aminés qui se divise en différents domaines (19,28) :

- Trois domaines « A » (A1, A2 et A3) comportant environ 330 acides aminés chacun. Ces domaines présentent une homologie de séquence entre eux et une homologie de structure avec le FV et la céruloplasmine, une protéine plasmatique de transport du cuivre (29).
- Un domaine « B » central d'environ 980 acides aminés. Ce domaine n'est pas connu pour avoir des homologues de structure et n'intervient pas dans les fonctions procoagulantes du facteur VIII (30). Il comporte en revanche la majorité des sites de glycosylation, qui ont notamment un rôle dans la conformation intracellulaire de la protéine et dans son cheminement dans la voie de sécrétion (31).
- Deux domaines « C » (C1 et C2) qui sont plus petits, comprenant environ 150 acides aminés chacun. Ces domaines présentent une homologie entre eux, avec le FV ainsi qu'avec des protéines liant les phospholipides (PLs) (28). Les domaines C ont donc potentiellement un rôle dans les interactions FVIII/PLs. Ils seraient également nécessaires à la liaison au vWF (32).

La séquence primaire de ces domaines peut être schématisée de la manière suivante : A1-A2-B-A3-C1-C2. On retrouve également de petites régions peptidiques acides (a1, a2 et a3) qui réunissent les domaines les uns avec les autres (**Figure 6**). Ces régions acides joueraient un rôle important dans l'interaction du FVIII avec certaines protéines plasmatiques, en particulier la thrombine et le FXa, qui sont essentiels à son activation.

La synthèse du FVIII se fait principalement dans le foie mais d'autres sites de synthèse, notamment le rein ou la rate, sont également possibles (33). Celui-ci est synthétisé sous la forme d'un précurseur polypeptidique de 2351 acides aminés, comprenant un peptide signal de 19 acides aminés qui sera clivé par des protéases plasmatiques lors de la sécrétion. La protéine mature est composée de 2332 acides aminés et son poids moléculaire est d'environ 285 kDa.

Le FVIII est sécrété dans le plasma sous la forme d'un hétérodimère (**Figure 6**) par clivage au sein du domaine B. Cet hétérodimère est composé d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère, reliées entre elles par des liaisons ioniques divalentes (cuivre, calcium ou manganèse) entre les domaines A1 et A3. La chaîne lourde comporte les domaines A1-A2-B

de taille moléculaire variable, comprise entre 90 et 210 kDa, selon la taille du fragment de domaine B clivé par les protéases, tandis que la chaîne légère comporte les domaines A3-C1-C2 pour une taille moléculaire constante d'environ 80 kDa. Le FVIII n'est que très peu sécrété dans le plasma humain, sa concentration plasmatique est comprise entre 0,1 et 0,2 µg/mL (34).

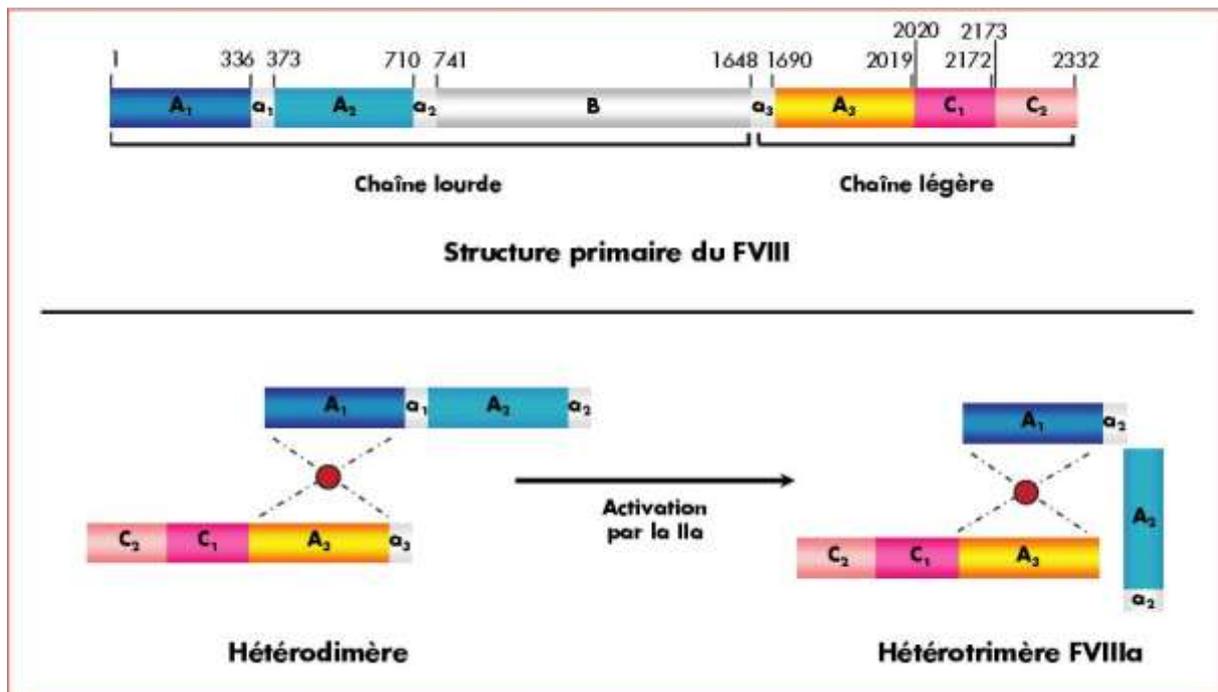


FIGURE 6 : LES ÉTAPES DE TRANSFORMATION DU FVIII DE SA STRUCTURE PRIMAIRE À SA FORME ACTIVÉE (35)

2. Un bref rappel sur l'hémostase

Un bref rappel sur l'hémostase (**Figure 7**) est nécessaire, puisqu'il va nous permettre de mieux comprendre le rôle du FVIII et la problématique de la pathologie.

La formation d'un caillot au niveau d'une brèche vasculaire résulte du fonctionnement harmonieux d'un ensemble de phénomènes physiologiques : l'hémostase. Le processus de l'hémostase se divise en trois étapes initiées simultanément (36) :

- L'hémostase primaire qui correspond aux interactions entre la paroi vasculaire, les plaquettes et des protéines plasmatiques, principalement le vWF. Elle aboutit à l'obturation de la brèche vasculaire par un agrégat plaquettaire. Les principales étapes sont la vasoconstriction, l'adhésion et l'agrégation plaquettaires.
- La coagulation ou hémostase secondaire qui aboutit à la formation du réseau de fibrine insoluble. C'est cette étape que nous allons développer ici.

- La fibrinolyse qui est un processus enzymatique permettant de résorber le caillot de fibrine formé.

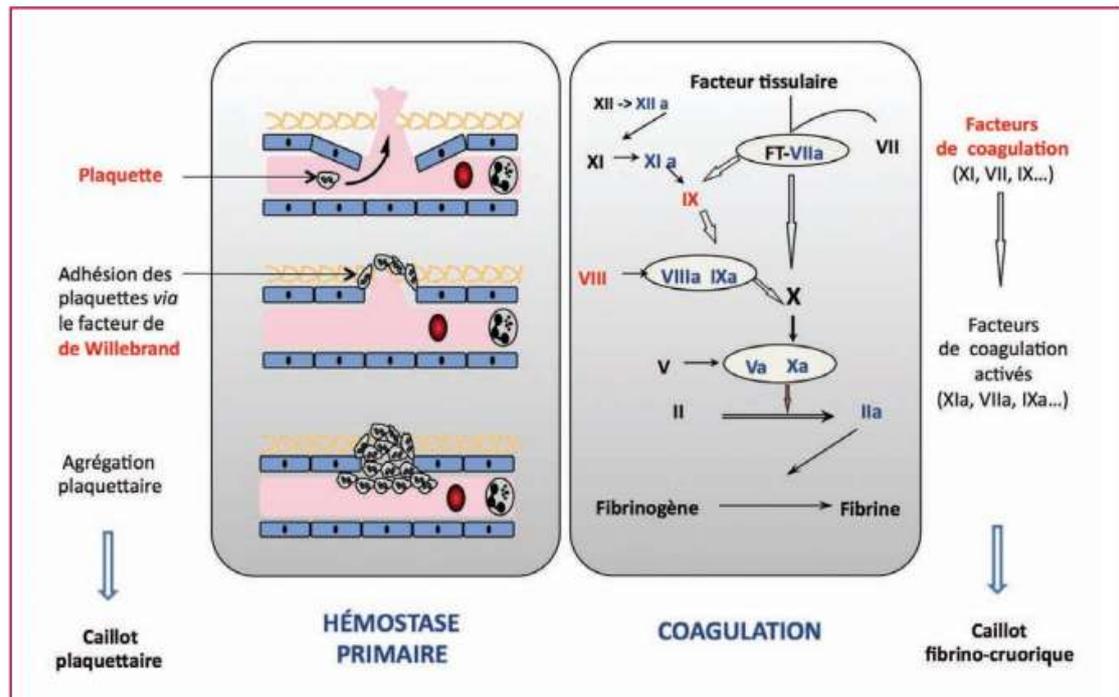


FIGURE 7 : SCHÉMA SIMPLIFIÉ DE L'HÉMOSTASE (36)

La coagulation permet la consolidation du thrombus plaquettaire formé lors de l'hémostase primaire, grâce à une « cascade » de réactions enzymatiques réalisées par des facteurs de la coagulation. Elle aboutit à la formation de thrombine correspondant à l'enzyme clé de la production de fibrine. Le processus de coagulation est représenté dans le schéma ci-dessus (Figure 7).

Il se décompose en trois phases (37) :

- Une phase d'initiation qui va conduire à la formation de faibles quantités de thrombine.

Cette phase est dépendante du facteur tissulaire (FT), dont l'exposition à la surface des cellules du sous-endothélium (fibroblastes, cellules musculaires lisses) est le point de départ de la coagulation. Celui-ci se lie au FVII circulant formant le « complexe ténase extrinsèque », qui active à son tour le FX et le FIX. Le FXa active la prothrombine (FII) permettant la génération d'une faible quantité de thrombine à la surface des cellules exprimant le FT.

- Une phase d'amplification qui aboutit à l'accumulation de facteurs de coagulation activés à la surface des plaquettes et à l'accélération du processus de la coagulation. La thrombine générée en faible quantité lors de l'étape précédente va amplifier sa propre production en activant les cofacteurs VIII et V, le FXI et les plaquettes. Elle va également permettre la dissociation du complexe FVIII – vWF.
- Une phase de propagation qui aboutit à la formation d'une grande quantité de thrombine induisant la formation d'un caillot stable.

La formation du « complexe ténase intrinsèque », par liaison du cofacteur VIIIa au FIXa, entraîne l'activation du FX. Ce qui permet l'assemblage du « complexe prothrombinase », formé du cofacteur Va et du FXa. Ce complexe va activer la prothrombine en thrombine en quantité très importante. C'est ce pic de thrombine qui permet une transformation massive du fibrinogène, son principal substrat, en monomères de fibrine. La polymérisation et la stabilisation de ces monomères de fibrine seront ensuite effectuées par le facteur XIII activé (FXIIIa).

Il est important de rappeler que le processus de coagulation est régulé par un système anticoagulant, qui comporte principalement trois systèmes inhibiteurs : l'antithrombine (AT), l'inhibiteur de la voie du FT (TFPI pour « *tissue factor pathway inhibitor* ») et la voie de la protéine C - protéine S.

3. Le rôle du FVIII dans l'hémostase

(34)

Le mécanisme de l'hémostase énoncé précédemment permet d'identifier le rôle du FVIII dans la coagulation. Celui-ci intervient en tant que cofacteur du FIXa dans le « complexe ténase intrinsèque » permettant l'activation du FX. Il permet d'accélérer 10⁵ à 10⁶ fois le pouvoir catalytique du FIXa. En l'absence de FVIII, la formation de FXa est insuffisante, d'où une génération de thrombine moindre retardant la formation du caillot. Le saignement est donc dû à un défaut d'amplification de la génération de thrombine, notamment dans les tissus où le facteur tissulaire est peu abondant comme les articulations, et où l'amplification par la ténase intrinsèque est primordiale. On comprend à présent pourquoi la coagulation est considérablement ralentie chez le patient hémophile.

4. Son interaction avec le facteur Willebrand (vWF)

(34,38)

Le facteur Willebrand a deux fonctions principales, essentielles au bon déroulement de l'hémostase : il favorise l'adhésion et l'agrégation plaquettaires lors d'une lésion vasculaire et assure le transport du FVIII dans la circulation sanguine. C'est cette dernière fonction qui nous intéresse ici. Plus de 90% des FVIII sécrétés se lient de façon non covalente au vWF (28). Les régions impliquées dans cette liaison se trouvent au niveau de la chaîne légère du FVIII : la région a3 et une ou plusieurs régions des domaines C1 et C2. La formation du complexe vWF-FVIII est cruciale pour maintenir un taux plasmatique en FVIII stable. En effet, cette complexation le protège non seulement de l'effet inactivateur de la protéine C activée mais aussi de l'effet activateur du FXa (39,40) et limite sa clairance en empêchant sa capture par les cellules. De plus, la liaison au vWF prévient l'intégration prématurée du FVIII dans le « complexe ténase intrinsèque ». C'est donc grâce à sa liaison avec le vWF que le FVIII peut atteindre une demi-vie comprise entre 10 et 16 heures (14). Le vWF ne protège cependant pas le FVIII de l'effet protéolytique de la thrombine, qui va entraîner une rupture de la liaison entre le FVIII et le vWF et aboutir à une activation du FVIII. Le FVIII activé se présente sous la forme d'un hétérotrimère de séquence A1/A2/A3-C1-C2, après suppression du domaine B et clivage entre les domaines A1 et A2 (**Figure 6**). Il peut être activé soit par la thrombine, soit par le FXa. La compréhension de la relation entre le FVIII et le vWF *in vivo* est importante puisque, comme nous le verrons par la suite, certains concentrés utilisés dans le traitement substitutif de l'hémophilie A ont la particularité d'être enrichis à la fois en FVIII et en vWF (FVIII/vWF) (Partie 2, I, 4, F).

PARTIE 2 : LE TRAITEMENT SUBSTITUTIF DE L'HÉMOPHILIE A

I. Son évolution d'hier à aujourd'hui

Jusqu'au milieu du XX^{ème} siècle, les patients atteints d'une hémophilie sévère étaient voués à une qualité de vie médiocre et à une espérance de vie bien plus faible que la moyenne, du fait de l'absence d'un traitement réellement efficace. En effet, leur espérance de vie était estimée à 11 ans en 1840 (41). Elle est passée à 25 ans dans les années 60 (14) avec l'arrivée des cryoprécipités puis à 60 ans dans les années 80 (42) jusqu'à devenir quasiment comparable à l'espérance de vie de la population générale, grâce aux traitements substitutifs actuels.

Etant donné le caractère hémorragique de la pathologie, ce n'est pas surprenant que la transfusion de sang total puis de plasma a été la première piste de traitement de l'hémophilie. Les traitements substitutifs à proprement parler ont été mis en place avec les méthodes de fractionnement du plasma et se caractérisent aujourd'hui par l'utilisation de concentrés de FVIII de très haute pureté. Les concentrés issus de techniques de génie génétique ont ensuite été développés, on parle de facteurs recombinants. Par ailleurs, les FVIII à demi-vie prolongée ont récemment fait leur apparition sur le marché des facteurs recombinants, Elocta[®] (*efmoroctocog alfa*) étant le premier à avoir obtenu une autorisation de mise sur le marché en Europe en novembre 2015 (43). Actuellement, les facteurs anti-hémophiliques plasmatiques et recombinants ont tous deux leur place dans la stratégie thérapeutique.

Il est important de souligner que la desmopressine, découverte en 1977, constitue le traitement de choix des patients atteints d'une hémophilie A modérée. Il s'agit d'une molécule d'origine synthétique qui permet d'augmenter la concentration plasmatique du FVIII et du vWF. Son utilisation permet d'éviter, ou au moins de réduire, le recours aux concentrés de FVIII à risque infectieux et immunogène (44).

La prise en charge thérapeutique actuelle de l'hémophilie A sévère est essentiellement basée sur le traitement substitutif, à savoir l'administration par voie intraveineuse du facteur de la coagulation déficitaire : le FVIII. L'objectif est de continuer à améliorer la qualité de vie des patients, tout en gardant un coût acceptable quant à la prise en charge de la pathologie.

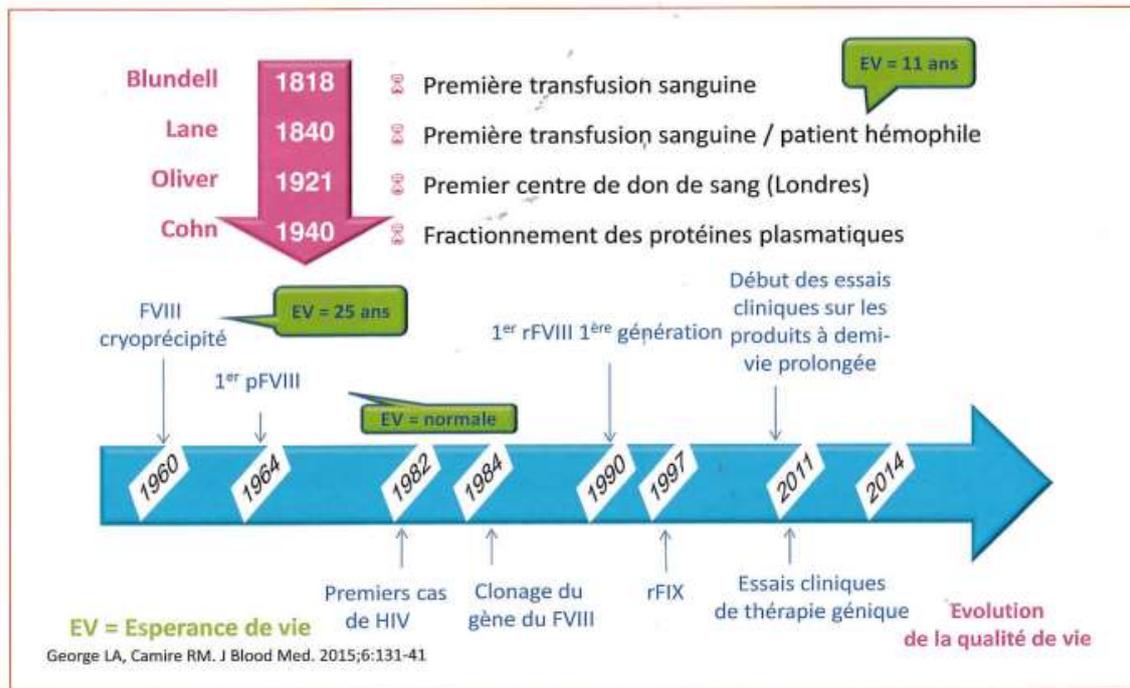


FIGURE 8 : HISTORIQUE ET ÉVOLUTION DU TRAITEMENT DE L'HÉMOPHILIE A (41)

1. La transfusion de sang total et de plasma

(44–47)

En 1840, Samuel Armstrong Lane a réalisé avec succès la première transfusion de sang total chez un garçon de 11 ans dont les antécédents hémorragiques laissent à penser qu'il était atteint d'hémophilie (48). Cependant, cette technique est à l'origine de nombreux échecs et n'apparaît donc pas comme un traitement de choix de l'hémophilie. C'est grâce aux travaux de Karl Landsteiner ayant permis la mise en évidence des groupes sanguins en 1900-1901 (49) et la réalisation des tests de compatibilité par Ottenberg et Kaliski en 1913 (50) que d'énormes progrès ont été possibles dans ce domaine.

Quelques années plus tard, en 1925, une publication du journal *The Wiener klinische Wochenschrift* décrit un raccourcissement du temps de coagulation de patients atteints d'hémophilie par la transfusion de plasma (51). Puis, en 1936, les chercheurs Patek et Taylor de l'université d'Harvard prouvent qu'ils peuvent corriger l'anomalie de coagulation de l'hémophilie en ajoutant une substance extraite du plasma, qui fut nommée « globuline anti-hémophilique » (52,53). La fraction plasmatique riche en facteurs anti-hémophiliques a pu être isolée par le biochimiste Edwin Joseph Cohn et son équipe grâce à la mise en place de la première méthode de fractionnement du plasma sanguin par l'éthanol en 1946 (54). Suivant les travaux du groupe de Cohn, différentes techniques de fractionnement ont été

développées en Angleterre par les chercheurs Kekwick et Wolf (55), en France par Jean-Pierre Soulier et son équipe (56) et en Suède par Margareta Blombäck *et al.* (57), amenant en 1958 au développement du premier modèle de traitement prophylactique de l'hémophilie en Suède (58) (Partie 2, I, 6, A, a). Il est important de souligner que les premières fractions anti-hémophiliques ne sont pas produites dans des quantités suffisantes pour pouvoir en faire un traitement de choix de la pathologie. Parallèlement, dans les années 50, des « globulines anti-hémophiliques » sont produites à partir de plasma d'origine animale, notamment bovine (59), mais leur utilisation n'est pas généralisée du fait de l'immunogénicité de ces produits.

Le traitement de l'hémophilie se réduit à la transfusion de sang total jusqu'au développement des méthodes transfusionnelles, durant la Seconde Guerre mondiale, qui vont amener à une évolution des techniques de fractionnement du sang total et à la production de plasma à usage thérapeutique. Le plasma, soit frais, soit frais congelé, va donc être préférentiellement utilisé jusqu'au début des années 60. On retrouve une contrainte majeure à ce traitement : la faible concentration en FVIII nécessitant l'administration d'un volume important de plasma ou de sang, avec un risque d'hypervolémie. L'appareil circulatoire des patients victimes d'une hémorragie sévère devenait surchargé avant même qu'une quantité suffisante de FVIII ne puisse être administrée. De plus, le traitement de l'hémophilie se limitait uniquement aux épisodes hémorragiques. Du fait de la pauvreté des solutions thérapeutiques disponibles, la majorité des hémophiles sévères mouraient très jeunes des suites d'un traumatisme ou d'une opération.

2. Les cryoprécipités

(44,57,59)

C'est en 1964 que le docteur Judith Graham Pool fait une découverte qui va révolutionner le traitement de l'hémophilie. Elle montre que le « cryoprécipité », à savoir la fraction restant insoluble après que le plasma fraîchement congelé soit remis à 4°C, contient une grande quantité de FVIII (60). Il s'agit de l'une des plus grandes avancées thérapeutiques de l'hémophilie, puisque son utilisation va permettre de traiter les hémorragies sévères par l'injection de volumes relativement faibles de produit. Le cryoprécipité est en effet beaucoup plus riche en FVIII que le sang frais ou le plasma et donc beaucoup plus efficace. Son utilisation va être largement généralisée jusque dans les années 70.

Les cryoprécipités présentent cependant des inconvénients majeurs tels que le faible degré de pureté et le manque de spécificité. En effet, ils contiennent également d'autres protéines

plasmatiques, notamment du fibrinogène et de la fibronectine. Leur tolérance est souvent mauvaise, d'où la survenue fréquente de réactions allergiques (prurit, fièvre, urticaire...) pouvant avoir des conséquences graves. Ces réactions justifient que l'administration de cryoprécipités soit réservée au milieu hospitalier. Un autre inconvénient majeur de cette méthode provient de l'absence d'inactivation virale.

Il faut savoir que les cryoprécipités sont encore utilisés de nos jours dans certains pays en développement qui, par manque de moyens financiers, n'ont pas d'autre option possible. Leur utilisation n'est cependant pas recommandée dans le traitement de l'hémophilie et se justifie uniquement lorsque les concentrés de facteurs de coagulation ne sont pas disponibles.

3. Les premiers concentrés lyophilisés de FVIII

(44,59,61–64)

Les concentrés de FVIII se sont développés à la fin des années 60 (65,66). Ils sont issus de la purification de cryoprécipités par le biais de méthodes chromatographiques. Des concentrés lyophilisés de pureté dite « intermédiaire » vont être produits et seront amplement utilisés sur le territoire français jusqu'au milieu des années 80 (47). Ils traduisent une avancée considérable par rapport aux cryoprécipités, du fait de leur teneur supérieure en facteurs de la coagulation dans un volume de liquide moindre. La forte activité de ces concentrés liée à un faible volume d'administration a entraîné une amélioration importante de l'efficacité du traitement, permettant la prise en charge rapide des hémorragies et donc la réduction des dommages articulaires et musculaires sous-jacents. De plus, les opérations chirurgicales deviennent possibles afin de corriger ou de minimiser les séquelles articulaires et/ou musculaires. Celles-ci étaient fréquemment rencontrées chez les patients non ou insuffisamment traités, suite aux épisodes hémorragiques n'ayant pas pu être correctement pris en charge (63, 64).

L'utilisation des concentrés lyophilisés de FVIII représente le progrès majeur du traitement moderne de l'hémophilie par la possibilité de mise en place du traitement à domicile, par les patients eux-mêmes ou par le personnel soignant. Sa présentation sous la forme de poudre lyophilisée, pouvant être réfrigérée puis reconstituée dans un solvant et injectée au besoin, a permis une amélioration considérable de la qualité de vie des patients hémophiles (46).

La mise en place des concentrés de FVIII est également à l'origine du développement de la pratique prophylactique (Partie 2, I, 6, A, a) chez les patients atteints d'hémophilie A sévère, dans certains pays. Elle se traduit par l'administration régulière de FVIII dans le but de

prévenir plutôt que de traiter les événements hémorragiques, afin notamment de limiter la survenue d'une arthropathie (46).

L'inconvénient majeur de ces concentrés concerne l'absence d'inactivation virale lors de leur fabrication. Cela va avoir des conséquences tragiques au sein de la « communauté hémophile ».

4. Les concentrés de haute à très haute pureté ayant subi des étapes d'inactivation virale

A. Le contexte historique à l'origine de la mise en place de ces concentrés

(57,58,61,63,67,68)

Le début des années 80 est marqué par un événement tragique mettant fin à l'optimisme lié à l'utilisation des concentrés de FVIII d'origine plasmatique. Les pools de plasma à l'origine de ces concentrés, provenant du mélange de plusieurs milliers de dons de sang, a rendu possible la diffusion massive d'agents infectieux jusque-là non détectés chez les donneurs. Trois virus transmis par ces produits ont eu des conséquences majeures chez les hémophiles : le virus de l'hépatite B (VHB), le virus de l'hépatite C (VHC) et le virus de l'immunodéficience humaine (VIH).

Ainsi, avant l'apparition des premiers produits chauffés en France en 1985, plus d'un tiers des patients hémophiles ont été contaminés sur le territoire français. 60 à 80% des patients atteints d'une hémophilie sévère ont été touchés en Europe et aux Etats-Unis (67). La première description d'infections caractéristiques d'une immunodéficience a été faite aux Etats-Unis en 1982, chez trois patients atteints d'une hémophilie A (69). Ce n'est qu'à la fin de 1983 (70) et au début de 1984 (71) que des virus ont été isolés chez des patients atteints du SIDA (Syndrome d'Immunodéficience Acquise), mais l'évidence absolue qu'ils étaient la cause de la pathologie n'a pas été définie avant la fin de l'année 1984 (46). Le SIDA est responsable du décès de milliers de patients hémophiles dans les années 80 et 90 (63), du fait de l'absence de traitements réellement efficaces. Ce n'est qu'au milieu des années 90 (46) que la thérapie antirétrovirale a permis de contrôler l'évolution de la pathologie, permettant d'apporter une qualité de vie acceptable et d'augmenter l'espérance de vie des malades.

Le virus de l'hépatite C, identifié en 1989 (72), se retrouve également chez la quasi-totalité des patients traités par ces concentrés. Près de la moitié d'entre eux ont développé une hépatite C chronique, caractérisée par l'élévation plus ou moins persistante des

transaminases et la présence du virus dans le sang. Cependant, du fait de l'évolutivité lente, les conséquences à long-terme de l'infection par le VHC (cirrhose, carcinome hépatocellulaire) n'étaient pas connues à l'époque. La grande majorité des patients étaient asymptomatiques (46).

En ce qui concerne le virus de l'hépatite B, la plupart des hémophiles qui ont eu recours de manière régulière aux concentrés plasmatiques non soumis aux méthodes d'inactivation virale ont été infectés, avant que soit mise en place la stratégie de vaccination systématique au début des années 90 (47).

Suite à ce drame du sang contaminé, la sécurité des produits dérivés du sang devient une priorité absolue pour le présent et l'avenir, menant au développement de différentes techniques de sécurisation virale. Dans le cas des concentrés de FVIII, la réduction du risque viral débute par la sécurisation du don du sang pour assurer la sécurité de la matière première et se poursuit par la mise en place d'une succession d'étapes de purification, d'inactivation et d'élimination virales au cours du procédé de fabrication.

B. La sécurisation du don du sang

La matière première des concentrés plasmatiques étant le plasma issu du don du sang, la nécessité de sécuriser cet acte s'avère indispensable. La sécurisation du don du sang s'impose au cours de l'année 1983, marquée par l'accumulation de preuves d'une transmission du VIH par le sang, avant même qu'il ne soit identifié (73). Celle-ci passe par la qualification du don comprenant la sélection médicale des donneurs, les analyses biologiques et la réalisation de nombreux tests de dépistage de maladies transmissibles effectués sur le don. Seuls les dons de plasma répondant à l'ensemble des critères de sécurité sont utilisés pour la fabrication des concentrés plasmatiques. Une directive européenne, parue en 2003, établit les « normes de qualité et de sécurité pour la collecte, le contrôle, la transformation, la conservation et la distribution du sang humain, et des composants sanguins » (74). En fonction du pays d'origine, le don peut être rémunéré ou bénévole. Sur le territoire français, il s'agit obligatoirement d'un acte bénévole.

En France, l'EFS (Etablissement Français du Sang) est l'unique acteur national chargé de la collecte, de la qualification et de la distribution des produits sanguins labiles (PSL) issus des dons. Ces PSL correspondent notamment au sang total, au plasma et aux cellules sanguines d'origine humaine, à savoir les concentrés plaquettaires (CP) et les concentrés de globules rouges (CGR). 90 % du plasma prélevé est utilisé pour la production de médicaments dérivés du sang (MDS) ou produits sanguins stables, et seulement 10 % sont

utilisés pour les transfusions dites « thérapeutiques » impliquées dans la prise en charge des hémorragies (accident, accouchement, opération chirurgicale) et de certaines maladies du sang telles que les leucémies (75). Les concentrés plasmatiques de FVIII, assimilés aux MDS depuis 1989 (76), nécessitent l'obtention d'une autorisation de mise sur le marché pour être commercialisés. Le Laboratoire français du Fractionnement et des Biotechnologies (LFB), créé en 1993 (77), est le seul autorisé à fabriquer des MDS à partir du « plasma pour fractionnement » en France.

a. **La qualification du donneur**

(78)

En France, la qualification du donneur doit répondre à des critères de qualité et de sécurité. En application de la loi du 4 janvier 1993 (79), les normes publiées par l'arrêté du 22 septembre 1993, relatif aux bonnes pratiques de prélèvement, permettent notamment de définir les conditions de sélection des donneurs par rapport à différents critères :

- L'âge : 18 à 70 ans pour le don de sang.
- Le volume de prélèvement : 420 à 480mL de sang.
- La fréquence des dons : une femme peut donner son sang au maximum 4 fois par an et un homme 6 fois, en respectant un délai d'au moins 8 semaines entre deux dons du sang.
- Les contre-indications permanentes ou temporaires : elles relèvent du principe de précaution, basé sur la compréhension des mécanismes de transmission des agents pathogènes, et sont réactualisées en fonction de l'évolution des connaissances.

Les contre-indications permanentes regroupent les infections transmissibles par le sang (hépatites virales, syphilis, infection par le VIH, paludisme...), les situations d'exposition à des agents transmissibles non détectables comme le prion (séjours de plus d'une année cumulée au Royaume-Uni entre 1980 et 1996, traitement par hormone de croissance avant 1989, antécédent familial de maladie à prion, antécédent de greffe de cornée ou de dure-mère, antécédent de chirurgie de l'encéphale ou de l'œil avant avril 2001). Celui-ci est responsable d'une maladie dégénérative du SNC d'évolution fatale : la maladie de Creutzfeldt-Jakob. Un antécédent de transfusion ou de greffe, d'usage de drogues par voie intraveineuse ou intramusculaire, du fait d'un risque potentiel d'exposition à un agent infectieux, constituent également des contre-indications permanentes.

Les contre-indications temporaires, se justifiant par un risque d'exposition récent à un agent infectieux, sont rencontrées dans les situations suivantes : un séjour dans un pays en

situation épidémique par rapport à des agents transmissibles par le sang (Chikungunya, Zika, ...), une relation sexuelle avec un nouveau ou plusieurs partenaires différents au cours des 4 derniers mois, un rapport sexuel avec un autre homme au cours des 12 derniers mois dans le cas des HSH (Hommes qui ont eu des relations Sexuelles avec des Hommes) selon l'arrêté du 5 avril 2016 (80), ...

Un examen médical du donneur, comprenant un entretien et un examen clinique, précède le don. L'entretien permet d'évaluer la présence de facteurs de risque potentiels par la connaissance du mode de vie, des éventuels voyages ou encore de l'histoire médicale du donneur, à la recherche d'éventuelles contre-indications au don. L'examen clinique va permettre d'évaluer l'état de santé général de la personne, notamment par rapport à la présence de signes évocateurs d'une infection justifiant une contre-indication temporaire au don. L'entretien et l'examen médical constituent un premier « verrou de sécurité » (81) dans le processus de sécurisation du don. Ils conduisent à la sélection de donneurs apportant le maximum de garanties vis-à-vis de la non-exposition à un risque de contamination virale.

b. La qualification biologique du don

(14,68,74,83)

La qualification biologique s'applique à chaque don, qu'il soit issu d'un nouveau donneur ou d'un donneur plus régulier. Elle consiste à effectuer une série de tests sérologiques permettant le dépistage d'une infection présente ou passée.

Les marqueurs viraux systématiquement recherchés en France sont :

- L'antigène HBs, marquant la présence du virus de l'hépatite B, ainsi que les anticorps anti-HBc, dirigés contre l'antigène de core de l'hépatite B, qui sont des marqueurs indirects du virus.
- Les anticorps anti-VIH-1 depuis 1985 et anti-VIH-2 depuis 1989.
- Les anticorps anti-VHC dont la présence témoigne d'une contamination par le virus de l'hépatite C.
- Les anticorps anti-HTLV I et II qui traduisent la présence du virus HTLV (*Human T-cell lymphotropic virus*).
- La sérologie de la syphilis.
- Le dosage des transaminases dont l'augmentation peut révéler un dysfonctionnement hépatique d'origine virale.

Depuis 2002, le dépistage de l'ARN du VIH-1 et du VHC, par des techniques d'amplification génique (PCR pour *Polymerase Chain Reaction* ou TMA pour *Transcription Mediated Amplification*) sur des mini-pools (8 à 24 dons), est devenu obligatoire en France et dans la plupart des pays industrialisés. L'intérêt de cette recherche directe du génome viral est d'augmenter les performances de détection et de dépister précocement les sujets récemment infectés, avant l'apparition des premiers anticorps (fenêtre sérologique). On parle de « dépistage génomique viral » (DGV) (68).

La présence de l'un des marqueurs précédemment cités entraîne la disqualification immédiate du don. La qualification biologique du don concerne la recherche de pathogènes majeurs pouvant être détectés par les tests biologiques disponibles. Elle vise à limiter le risque résiduel qui doit être réduit ultérieurement par d'autres mesures de sécurisation que l'on va développer dans la suite du travail.

Il est également important de souligner que le plasma issu des dons doit obligatoirement subir une leucoréduction depuis avril 1998 (83). Celle-ci consiste à éliminer par filtration la majeure partie des leucocytes présents dans un produit sanguin, permettant de réduire le risque infectieux et de contribuer à la sécurité immunitaire. En France, une leucoréduction spécifique du plasma est réalisée lors de la préparation du plasma pour fractionnement avant sa congélation (84).

La mise en place d'une phase de quarantaine est un moyen complémentaire pour limiter ce risque résiduel. Elle consiste à stocker les poches de plasma congelé durant une période donnée, afin de pouvoir les éliminer aisément suite à la réception d'informations post-don concernant le donneur. Ainsi, l'autorisation de libérer un plasma issu d'un individu donné est accordée dès lors qu'aucune séroconversion n'ait été observée chez le donneur durant un certain délai après sa collecte. Cette pratique a permis de couvrir la « fenêtre sérologique » avant que les tests de détection des génomes viraux ne soient mis en place. Cette phase d'observation est d'au moins 90 jours au sein du Laboratoire Français du fractionnement et des Biotechnologies (LFB), dans l'attente d'un second don confirmant la négativité des tests de dépistage. Ce n'est qu'après avoir contrôlé l'ensemble des critères de conformité que les unités de plasma congelé peuvent être fractionnées en différents dérivés (albumine, facteurs de coagulation, immunoglobulines).

C. Les méthodes de fractionnement et de purification

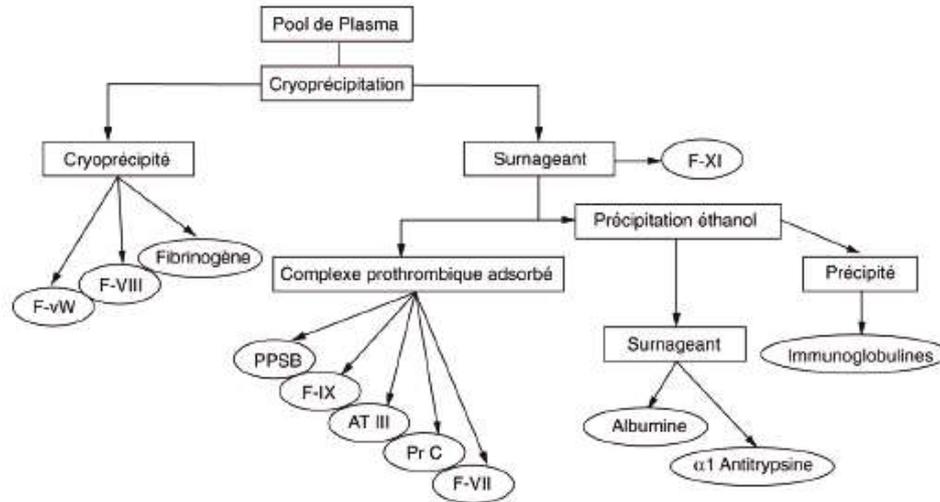
a. Les contrôles virologiques antérieurs au fractionnement

(14,64,68,83)

Une qualification de la matière première plasmatisque par dépistage des virus de l'hépatite A, B, C, du VIH et du parvovirus B19, grâce à des techniques d'amplification génique, est réalisée avant le fractionnement du plasma. Des contrôles virologiques sont réalisés dans un premier temps sur des mini-pools puis sur le pool, c'est-à-dire sur le lot de plasma issu du mélange d'un nombre important d'unités. Le contrôle virologique postérieur au poolage est essentiel puisque cette étape représente un risque important de contamination virale. En effet, la présence d'une unité infectée peut contaminer l'ensemble du lot. Cette étape de poolage justifie d'ailleurs la recherche de virus qui ne sont pas systématiquement dépistés lors des dons, du fait d'une faible fréquence chez les donneurs, mais qui peuvent se retrouver concentrés au niveau des pools. C'est le cas du parvovirus B19 et du virus de l'hépatite A, qui ont d'ailleurs été à l'origine de contaminations de patients hémophiles traités par des concentrés de FVIII au cours des années 1990 et 2000 (85–87). De plus, ces virus non enveloppés sont résistants à certains procédés d'inactivation virale. Il est donc important de les dépister dans les pools de plasma avant leur fractionnement afin de limiter au maximum leur quantité. Des contrôles virologiques sont également effectués en cours de procédé sur les produits intermédiaires et sur le produit fini.

b. Les étapes de fractionnement du plasma

Le fractionnement consiste à séparer les différentes protéines présentes dans le plasma (**Figure 9**). Celui-ci est constitué d'une centaine de protéines ayant chacune une fonction propre. De manière générale, le fractionnement débute par une phase de cryoprécipitation qui conduit à la formation d'un cryoprécipité (Partie 2, I, 2), contenant notamment le FVIII, le fibrinogène et le vWF, et d'un surnageant qui va permettre d'isoler l'albumine, les immunoglobulines ou encore le FIX. La cryoprécipitation étant une technique peu spécifique, elle est toujours suivie par des phases de purification.



1 Différentes étapes du fractionnement des protéines plasmatiques. VWF : facteur Willebrand ; AT III : antithrombine III ; Pr C : protéine C ; F VII : facteur VII ; F VIII : facteur VIII ; F IX : facteur IX ; F XI : facteur XI ; PPSB : prothrombine, proconver-tine, facteur Stuart, facteur antihémophilique B.

FIGURE 9 : LES DIFFÉRENTES ÉTAPES DU FRACTIONNEMENT DES PROTÉINES PLASMATIQUES (88)

c. Les procédés de purification

Le cryoprécipité va être soumis à différentes techniques de purification basées sur des méthodes chromatographiques. Celles-ci vont permettre de séparer sélectivement les protéines présentes et de pouvoir isoler au maximum le FVIII des autres protéines. Le vWF, de par son rôle de stabilisateur naturel du FVIII (Partie 1, V, 4), est le seul « contaminant » toléré. Les concentrés de FVIII ont des degrés de pureté variables, appréciés par leur « activité spécifique » (AS). L'AS représente le rapport entre l'activité du FVIII, exprimée en unités internationales (UI), et la quantité de protéines totales de la solution (mg). Jusqu'au milieu des années 80, les concentrés étaient de pureté dite « intermédiaire », leur activité spécifique variait entre 1 et 50 UI/mg, du fait de la présence d'autres protéines plasmatiques (vWF, fibrinogène, fibronectine, immunoglobulines...). La fin des années 80 est marquée par l'apparition de concentrés de FVIII humain de haute (AS comprise entre 50 et 100 UI/mg) à très haute pureté (AS supérieure ou égale à 100 UI/mg), produits à l'échelle industrielle. Ces concentrés de très haute pureté ne contiennent plus que des traces des autres protéines plasmatiques, le vWF étant le « contaminant » principal (47,89).

Les procédés de purification participent aussi à l'élimination virale. Ce degré d'élimination est cependant insuffisant, il est donc nécessaire de compléter ces procédés par des méthodes spécifiques d'inactivation et d'élimination virales.

On distingue différentes techniques chromatographiques selon le support et le tampon d'élution utilisés.

i. La chromatographie par échange d'ions

Dans cette technique, la séparation résulte de l'échange des protéines ionisées avec les ions de la solution tampon, qui vont neutraliser la charge des groupements échangeurs d'ions (anioniques ou cationiques) se trouvant sur la phase stationnaire. Les ions de la solution tampon remplacent ainsi les protéines qui sont alors éluées sélectivement. Cette technique permet la séparation du FVIII et du fibrinogène des immunoglobulines, aboutissant à un concentré de FVIII de très haute pureté (14).

ii. La chromatographie d'immuno-affinité

(14)

Cette technique se base sur l'interaction entre des molécules liées de façon covalente au support de chromatographie, à savoir des anticorps monoclonaux, et les protéines plasmatiques voulues. Le produit obtenu présente une activité spécifique initiale très élevée, de l'ordre de 2000 à 3000 UI/mg (47). Cependant, une adjonction ultérieure d'albumine humaine est généralement nécessaire, du fait de la faible stabilité des concentrés de FVIII, ce qui diminue considérablement l'AS du produit final. De plus, une petite quantité d'anticorps monoclonaux peut se retrouver dans le produit final. Ceux-ci peuvent potentiellement être responsables d'une immunisation du patient et d'un risque de réaction allergique lors d'injections répétées. L'ajout d'une deuxième étape de purification par chromatographie échangeuse d'ions favorise l'élimination de ces anticorps.

iii. La chromatographie d'exclusion ou de filtration sur gel

(14,47)

La chromatographie d'exclusion repose sur la différence de taille moléculaire entre les différents composés d'une solution. La séparation s'effectue selon le diamètre des pores de la phase stationnaire et la taille des composés. Cette technique ne s'utilise que lorsque la taille des protéines est très différente.

D. Les méthodes d'élimination et d'inactivation virales des concentrés plasmatiques de FVIII

(63,68,82)

Les techniques d'inactivation et d'élimination virales ont rapidement été développées par les industriels dès le milieu des années 80, en réaction à l'affaire du sang contaminé. On retrouve des méthodes physiques (traitements thermiques et nanofiltrations) et chimiques (traitements par solvant-détergent). Ces techniques sont intégrées dans les phases de fabrication des facteurs anti-hémophiliques, de préférence en fin de procédé de préparation. Elles peuvent aussi être appliquées sur le produit fini, dans le cas du chauffage à sec ou de la nanofiltration. Ces procédés doivent permettre d'obtenir une réduction et une inactivation virales convenables tout en préservant un niveau de rendement suffisant ainsi que l'intégrité du principe actif, par souci d'immunogénicité. En effet, la fragilité des produits biologiques s'oppose à la résistance extrême de certains des agents pathogènes aux différents traitements physico-chimiques. C'est notamment le cas du parvovirus B19 et du prion responsable de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (81).

Aucune des techniques actuelles n'est totalement efficace seule, c'est pourquoi plusieurs méthodes sont couplées au cours du processus de fabrication des concentrés de FVIII. La plupart des industriels procèdent à une double inactivation virale, associant un traitement par solvant-détergent (SD) à une méthode d'inactivation par la chaleur (47). Une étape supplémentaire de nanofiltration complète cette double inactivation virale afin de participer à l'exclusion des virus de petite taille tels que les virus non-enveloppés. Il s'agit d'une méthode d'élimination virale.

La mise en place progressive de l'ensemble de ces mesures d'inactivation et d'élimination virales, associées aux méthodes de purification et de sécurisation du don du sang, a permis aux concentrés plasmatiques de FVIII d'atteindre un haut niveau de sécurité virale. Cette sécurisation va concerner non seulement les agents pathogènes connus, mais parfois aussi, par anticipation, les agents émergents encore inconnus. Tel a, par exemple, été le cas du virus de la grippe aviaire ou du virus West-Nile (virus endémique dans le pourtour méditerranéen, en Europe Centrale et en Amérique du Nord, qui est à l'origine d'une fièvre brutale pouvant être associée à des complications neurologiques sévères) pour lesquels il a pu être démontré que les procédés de sécurité virale utilisés lors de la fabrication des MDS étaient efficaces (46).

Cependant, la survenue de quelques cas de transmission d'agents infectieux relatifs à l'utilisation de concentrés plasmatiques de facteurs anti-hémophiliques, tels que le parvovirus B19 (86,90) ou le prion responsable d'une variante de la maladie de Creutzfeldt-

Jacob (91), doit rappeler qu'il ne faut jamais baisser la garde et qu'il n'est pas possible d'atteindre une sécurité absolue. C'est dans cette optique que le programme européen nommé EUHASS (*European Haemophilia Safety Surveillance System*) a débuté à la fin de l'année 2008 (92). Il s'agit d'un registre de pharmacovigilance dont le but est de surveiller la tolérance et la sécurité des traitements utilisés chez les patients atteints d'un désordre hémorragique héréditaire en Europe.

a. Les méthodes d'inactivation par la chaleur (traitements thermiques)

(14,82,89)

i. Le traitement par chauffage à sec

Ce traitement est généralement réalisé sur le produit fini car il présente l'avantage de ne pas nécessiter de stabilisants particuliers tout en maintenant une activité biologique acceptable (85 à 90 %) (82). Ce procédé peut aussi avoir lieu sur une fraction lyophilisée au cours de la fabrication. C'est au milieu des années 80 que le traitement par chauffage à sec a été mis en place dans le but d'inactiver le VIH. On avait recours à des températures allant de 60 à 68°C pendant une durée de 4 jours maximum. Cependant, des cas de contamination par le VIH ont été rapportés pour les concentrés de FVIII ayant subi un chauffage à sec à 60°C pendant 30 heures ; ces conditions sont insuffisantes pour inactiver le virus (93–95). L'utilisation de ces concentrés a également été à l'origine de contaminations par les virus responsables d'hépatites (96–98), ceux-ci nécessitant d'être chauffés à des températures plus importantes et durant une période plus longue pour être inactivés. Certains concentrés sont chauffés à 80°C pendant 72 heures dans le but de limiter la transmission de ces virus. Actuellement, cette technique est surtout utilisée en tant que méthode d'inactivation complémentaire, notamment pour les produits préalablement traités par solvant-détergent (SD) (99). Ces produits vont être chauffés pendant 30 minutes, voire 2 heures, dans le but d'inactiver le VHA. Ces conditions ne sont néanmoins pas suffisantes pour inactiver le parvovirus B19.

ii. La pasteurisation (chauffage en milieu liquide)

La pasteurisation est une technique de chauffage en milieu liquide à 60°C durant 10 heures. Le complexe plasmatique FVIII/VWF de « pureté intermédiaire » Haemate[®] P (Humate-P[®] aux Etats-Unis) a été le premier concentré pasteurisé à apparaître sur le marché en 1981 en Allemagne (100), suivi du concentré de très haute pureté Beriate[®] P en 1990 (45). Cette technique présente une bonne efficacité par rapport à l'inactivation du VIH (101,102) et des

virus des hépatites (103–105). Des contaminations par le parvovirus B19 ont cependant été observées (90). Ce processus présente l'inconvénient de dénaturer les protéines. L'ajout de stabilisants, tels que des sucres ou des acides aminés, est donc nécessaire pour maintenir la fonction biologique du FVIII. La pasteurisation est généralement réalisée au cours du processus de purification, de manière à ce que les stabilisants puissent être éliminés par chromatographie ou ultrafiltration.

iii. **Chauffage sous tension de vapeur**

La méthode d'inactivation par chauffage sous tension de vapeur consiste à exposer certaines fractions plasmatiques lyophilisées et préalablement purifiées à des paramètres de températures (60°C à 80°C), de pression (de 1190 mbar à 1375 mbar) et de durée (généralement 10 heures) définis. Des cas sporadiques de transmission d'hépatites B ou C ayant été répertoriés (106,107), ce traitement a laissé place à des techniques d'inactivation existantes plus sûres.

b. **L'inactivation par solvant-détergent (SD)**

(14,68,82,89)

La technique par solvant-détergent s'inscrit comme la référence en matière d'inactivation des virus enveloppés et constitue la méthode de choix pour de nombreux concentrés plasmatiques. Elle est autorisée depuis 1987 en France (14). Cette technique inactive les virus enveloppés par l'action concomitante d'un solvant organique (*Tri-N-butyl phosphate* (TNBP)) et d'un détergent. Ces produits chimiques vont dégrader de manière irréversible la membrane lipidique virale en faisant perdre toute infectiosité aux virus enveloppés tels que le VIH ou le virus des hépatites B et C (108–112). De par son mécanisme d'action, la méthode SD n'a pas d'effet sur les virus non enveloppés, tels que le parvovirus B19 (90) et le VHA (110,113), pour lesquels des étapes plus spécifiques doivent être introduites. Ce traitement s'effectue sur 6 heures à des températures de 24 à 37°C. Le solvant et le détergent sont ensuite éliminés par chromatographie, précipitation ou ultrafiltration. L'inactivation par solvant-détergent présente de nombreux avantages : une bonne conservation de l'activité biologique des facteurs, une absence de dénaturation protéique, une bonne efficacité par rapport aux virus enveloppés et une réalisation industrielle aisée.

c. La nanofiltration (filtration à 15 ou 35 nm)

(14,68,83,90)

La nanofiltration est un procédé physique de séparation consistant à filtrer un produit via des membranes de porosité extrêmement réduite. Les seuils de filtration sont de 15 ou 35 nm dans le cas de complexes de haut poids moléculaire, tel que le complexe FVIII/vWF. Ainsi, toute particule virale de taille supérieure à ces seuils est retenue. Cela permet d'éliminer les virus de petite taille, incluant des virus non enveloppés tels que le VHA et le parvovirus B19 (114,115). Par ailleurs, des études expérimentales ont montré que la nanofiltration présentait une certaine efficacité par rapport à l'élimination des prions (116,117). L'introduction de la nanofiltration dans les procédés de fabrication des concentrés plasmatiques permet de compléter les traitements d'inactivation virale dans le but d'améliorer la sécurité vis-à-vis de virus non enveloppés, insensibles par définition au traitement SD et relativement thermorésistants (parvovirus). C'est une méthode applicable à une large gamme de virus, indépendamment de leur structure. La nanofiltration permet également d'assurer un rendement élevé tout en conservant l'intégrité et l'efficacité des protéines.

d. Avantages et limites des techniques d'inactivation et d'élimination virales

TABLEAU III : AVANTAGES ET LIMITES DES MÉTHODES D'INACTIVATION ET D'ÉLIMINATION VIRALES (82)

Méthode d'inactivation et d'élimination virales	Principaux avantages	Limites majeures
Chauffage à sec	<ul style="list-style-type: none">- Réalisation possible sur le produit fini (ajout de stabilisant non nécessaire avec conservation d'une activité biologique acceptable).- Inactivation possible du VHA.	<ul style="list-style-type: none">- Faible efficacité par rapport à l'inactivation de virus résistants à la chaleur dont le parvovirus B19.- Perte de 10 à 15% de l'activité biologique du FVIII.- Contrôle strict du taux d'humidité du produit.

Pasteurisation	Inactivation possible des virus enveloppés et certains virus non-enveloppés.	<ul style="list-style-type: none"> - Ajout de stabilisants nécessaires pour maintenir la fonction biologique du FVIII, du fait du pouvoir dénaturant de la pasteurisation. - Faible efficacité par rapport à l'inactivation de virus résistants à la chaleur dont le parvovirus B19.
Chauffage sous tension de vapeur	Inactivation possible des virus enveloppés et certains virus non-enveloppés.	<ul style="list-style-type: none"> - Efficacité limitée par rapport aux VHB et C et aux virus résistants à la chaleur. - Processus relativement complexe.
Solvant-Détergent (SD)	<ul style="list-style-type: none"> - Efficacité importante par rapport aux virus enveloppés. - Relativement facile à mettre en place. 	<ul style="list-style-type: none"> - Inefficacité par rapport aux virus non enveloppés. - Nécessité d'une étape d'élimination des agents d'inactivation (chromatographie, ultrafiltration).
Nanofiltration à 15nm	<ul style="list-style-type: none"> - Procédé d'élimination virale. - Elimination des virus de petite taille incluant des virus non enveloppés tels que le VHA et le parvovirus B19. - Rendement excellent. - Procédé non dénaturant. 	<ul style="list-style-type: none"> - Non applicable aux fractions de très haut poids moléculaire. - Coût élevé des filtres.
Nanofiltration à 35nm	<ul style="list-style-type: none"> - Similaires aux avantages de la nanofiltration à 15nm. - Applicable aux fractions de très haut poids moléculaire telles que le complexe FVIII/vWF. 	<ul style="list-style-type: none"> - Risque d'élimination partielle et non totale des virus de très petite taille. - Coût élevé des filtres.

E. La pharmacovigilance

(14,82,89)

La pharmacovigilance est un élément essentiel du dispositif de sécurité sanitaire, mis en place dès la mise sur le marché du médicament (ou dans le cas d'ATU). Elle est d'une grande importance dans le cas des MDS, puisque c'est par ce système de surveillance que peuvent notamment être notifiés les accidents de transmission d'agents pathogènes. Des mesures appropriées peuvent alors être instaurées en conséquence afin d'assurer la sécurité d'utilisation du médicament ; elles peuvent aller jusqu'au rappel de lots. L'hémovigilance participe également, de manière complémentaire, à la pharmacovigilance et à la sécurisation des dérivés plasmatiques. Elle comprend l'ensemble des mesures de surveillance, de la collecte du sang au suivi des receveurs. Pour se faire, une centralisation et un échange de données sont effectués entre l'ANSM (Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé) et les EFS. La traçabilité est une notion importante qui est obligatoirement appliquée dans le cas des MDS. Elle permet d'établir le lien entre le donneur et le receveur, notamment dans le cas de survenue d'un évènement indésirable de type infectieux. La signalisation de tout effet indésirable lié à l'utilisation des MDS est obligatoire.

F. Les concentrés plasmatiques de FVIII disponibles sur le marché français actuel pour le traitement de l'hémophilie A

TABLEAU IV : LES CONCENTRÉS PLASMATIQUES DE FVIII DISPONIBLES SUR LE MARCHÉ FRANÇAIS ACTUEL POUR LE TRAITEMENT DE L'HÉMOPHILIE A (14)

FVIII plasma-tiques	AS (UI/mg)	Indication(s)	Etapas de purification	Etapas d'inactivation virale	Rq
Factane® (118) <u>Fabricant :</u> LFB	> 100	<ul style="list-style-type: none">- Traitement et prévention des hémorragies.- En situation chirurgicale.- Le traitement d'un inhibiteur par induction de tolérance immune (ITI).	Adsorption sur gel d'hydroxyde d'aluminium, CEI	SD, double nanofiltration (35 et 15 nm)	Présence de vWF, pas d'ajout de stabilisant de type albumine

Octanate® (119) <u>Fabricant</u> : Octapharma	> 100	Traitement et prophylaxie des épisodes hémorragiques.	Précipitations, CEI	SD, chauffage à sec à 100°C pendant 30 minutes en phase terminale	Présence de vWF, pas d'ajout de stabilisant de type albumine
Voncento® (120) <u>Fabricant</u> : CSL Behring Complexe FVIII/vWF	Environ 70 UI avant ajout de stabilisant	« Avis défavorable à l'inscription sur la liste des spécialités agréées à l'usage des collectivités dans l'indication : prophylaxie et traitement des hémorragies chez les patients atteints d'hémophilie A. » (121). L'intérêt de ce médicament dans les ITI en échec n'est pas bien documenté. Pas de place établie dans la stratégie thérapeutique de l'hémophilie A en France.	Précipitations, CE	Traitement SD, chauffage à sec et filtration en profondeur	Stabilisé avec de l'albumine . Ratio FVIII/vWF de 1/2,4
Haemate® P (122) <u>Fabricant</u> : CSL Behring Complexe FVIII/vWF	Entre 2 et 6 environ	ATU nominative en induction de tolérance immune (ITI), après l'échec d'au moins une tentative d'ITI chez des patients atteints d'hémophilie A sévère (123).	Précipitations multiples	Pasteurisation pendant 10 heures à 60°C	Stabilisé avec de l'albumine . Ratio FVIII/vWF de 1/2,4.

Les abréviations : CEI = chromatographie par échange d'ions, CE = chromatographie d'exclusion, SD = traitement par solvant-détergent.

5. Les facteurs recombinants

A. Le contexte d'apparition et l'évolution de ces facteurs

(44,58,59,62,64,125)

Le clonage du gène du FVIII, réalisé par deux groupes de chercheurs de manière indépendante en 1984 (125,126), a permis d'initier la fabrication industrielle de FVIII par des techniques de génie génétique. Cela a été un réel exploit au vue de la complexité du gène (Partie 1, IV, 2) et de la protéine (Partie 1, V, 1). La production de protéines recombinantes, contrairement aux protéines plasmatiques, présente l'avantage de ne pas dépendre de l'approvisionnement en plasma humain. Par conséquent, leur disponibilité quasi-illimitée a permis de développer le traitement de type prophylactique (Partie 2, I, 6, A, a) dans les pays développés. Le premier facteur VIII recombinant est injecté à Chapel Hill aux Etats-Unis en 1987 (61), suivi de la première publication démontrant l'efficacité de ces produits chez deux patients atteints d'hémophilie A en 1989 (127). La fabrication des produits recombinants de « première génération » implique l'utilisation de protéines animales dans le milieu de culture et d'albumine humaine pour stabiliser la formule finale. Ils ne peuvent donc pas être considérés comme totalement exempts de risque vis-à-vis de la transmission d'un agent infectieux. C'est pourquoi de nouvelles générations de produits recombinants, associées à une restriction de plus en plus importante de l'utilisation d'albumine humaine et de produits d'origine animale, ont ensuite été développées. Cette démarche est mise en place afin de limiter le risque de transmission d'agents infectieux et de réduire le risque d'immunogénicité des protéines étrangères (hamster, protéines murines...) impliquées dans la biosynthèse et la purification de ces produits. Les protéines recombinantes possèdent une activité biologique similaire à celle des protéines plasmatiques (128) et représentent actuellement le traitement substitutif de choix de l'hémophilie A en Europe de l'Ouest (environ 85% du marché en France (129)) et en Amérique du Nord (44,46). Il y a cependant de grandes disparités d'approvisionnement au niveau mondial, les pays en développement n'ayant pas forcément accès à ces produits par manque de moyens financiers (129).

B. Le procédé général de fabrication

(34,58,59,64,89,131,132)

La production de FVIII recombinants s'effectue en introduisant par génie génétique le gène du FVIII à l'intérieur d'une lignée cellulaire, qui va ensuite sécréter la protéine dans le milieu de culture afin qu'elle puisse être isolée par différentes méthodes extractives. Cela nécessite

d'introduire l'ADN complémentaire du gène du FVIII, c'est-à-dire la copie de l'ARN messager mature se présentant sous la forme d'un brin d'ADN dépourvu d'intron, à l'intérieur d'une lignée cellulaire par l'intermédiaire d'un vecteur plasmidique. On parle de transfection. Les cellules de mammifères sont préférentiellement utilisées puisque, contrairement aux bactéries et levures, elles sont capables de synthétiser des protéines complexes fortement glycosylées et de grande taille, comme le FVIII. Il s'agit soit de cellules ovariennes de hamster chinois (CHO = *Chinese Hamster Ovary cell*), soit de cellules de rein de hamster nouveau-né (BHK = *Baby Hamster Kidney Cell*), ou plus récemment de cellules rénales embryonnaires humaines (HEK-293 = *Human Embryonic Kidney*) (**Tableau V**).

TABLEAU V : LES LIGNÉES CELLULAIRES UTILISÉES POUR LA PRODUCTION DES FVIII RECOMBINANTS

	CHO	BHK	HEK-293
Recombinat [®] , Advate [®]	X		
Kogenate [®] , Kovaltry [®]		X	
ReFacto [®]	X		
Helixate [®]		X	
NovoEight [®]	X		
Nuwiq [®]			X

Dans le cas de Recombinat[®] et Advate[®], l'ADNc du gène du FVIII est associé à celui du vWF dans le but de faciliter la sécrétion du FVIII recombinant intact par les cellules, en le stabilisant naturellement par le vWF (131). Celui-ci est ensuite séparé du FVIII lors de la phase de purification et ne se retrouve pas dans le produit final.

Les étapes de fabrication du FVIII recombinant suivent un schéma bien défini, représenté ci-dessous (**Figure 10**). La première étape correspond à la transfection du gène d'intérêt (gène du FVIII) dans la lignée cellulaire voulue. Pour permettre la sélection des cellules ayant subi une transfection stable, un gène de sélection est également ajouté dans le plasmide. Le gène de sélection le plus fréquemment utilisé est celui de la dihydrofolate réductase (DHFR), une enzyme importante pour la réplication de l'ADN et donc pour la survie des cellules. Ainsi, la culture cellulaire est réalisée dans un milieu dépourvu de nucléosides où seules les cellules exprimant le gène DHFR, et donc le gène du FVIII, survivent. Les cellules sélectionnées subissent ensuite une phase de propagation et d'expansion dans des flasques. Une fois qu'un nombre suffisamment important de cellules actives est obtenu, les

cultures cellulaires sont transférées à l'intérieur de bioréacteurs industriels, dans les conditions optimales pour favoriser la biosynthèse protéique. Dans le passé, le sérum foetal bovin était principalement utilisé pour permettre la multiplication cellulaire du fait de sa richesse en facteurs nutritionnels et en facteurs de croissance essentiels au développement des cellules. Cependant, du fait d'un risque potentiel de transmission d'agents infectieux tels que le prion, la plupart des cultures cellulaires sont à présent réalisées dans des milieux dépourvus de sérum (130). Le facteur VIII, qui a été sécrété par les cellules, est ensuite isolé du milieu de culture par le biais de différentes étapes d'extraction et de purification.

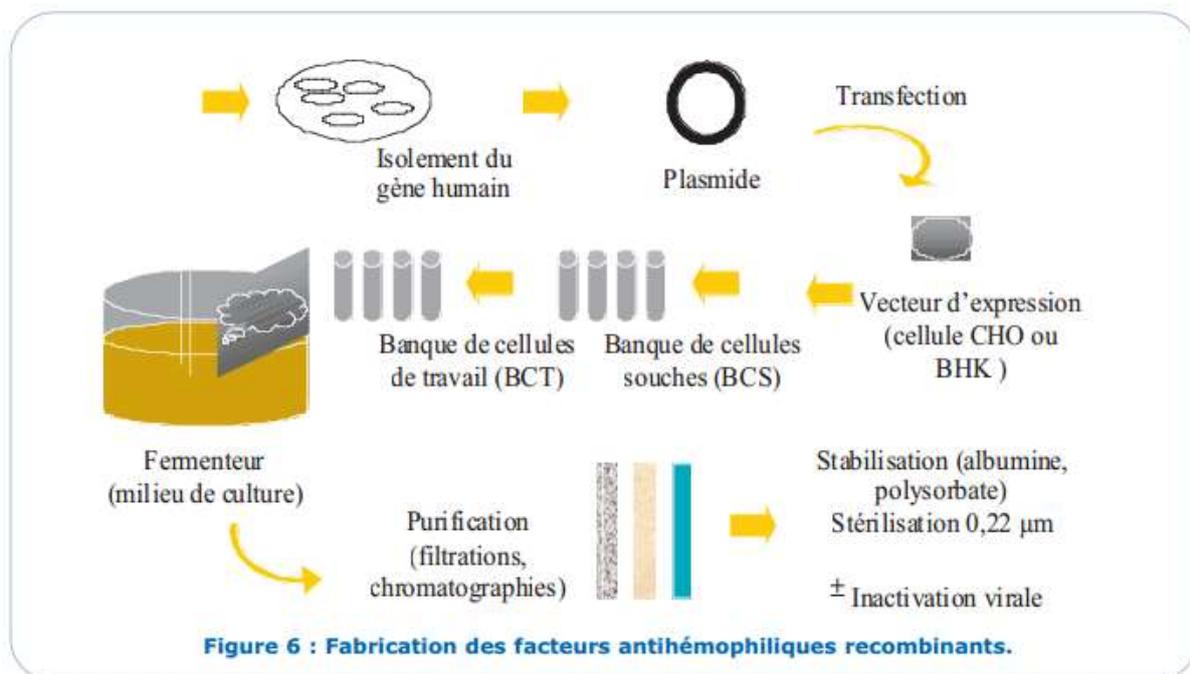


FIGURE 10 : LES DIFFÉRENTES ÉTAPES DE LA FABRICATION DES FVIII RECOMBINANTS (14)

C. Le processus de purification

(14,34)

Le processus de purification est un élément clé de la fabrication des molécules recombinantes. Il permet d'isoler les protéines d'intérêt et d'éliminer au maximum les impuretés liées au produit (protéines dégradées, fragments) ainsi que celles liées au processus de fabrication (débris de cellules, composants du milieu de culture, ADN et protéines humaines ou animales...) et même de purification (immunoglobulines murines, peptides de synthèse ...). Le procédé de purification débute toujours par une étape dite de « clarification » correspondant à une filtration et/ou une centrifugation du milieu de culture. Cela va permettre de séparer les cellules et débris cellulaires en suspension des protéines

d'intérêt secrétées. Plusieurs étapes de purification, d'inactivation et d'élimination virales sont associées et participent à la minimisation du risque infectieux.

Les méthodes utilisées sont similaires à celles retrouvées pour les produits d'origine plasmatique (Partie 2, I, 4, C, c) :

- La chromatographie d'immuno-affinité

C'est l'étape la plus cruciale du processus de purification. Elle va permettre d'extraire sélectivement le FVIII recombinant par liaison à des anticorps monoclonaux ou des ligands polypeptidiques de synthèse spécifiques (Partie 2, I, 5, E, c) fixés sur la colonne. La majorité des protéines et des molécules d'ADN qui dérivent des cellules hôtes vont rester dans l'éluat et être éliminées.

- La chromatographie par échange d'ions

La chromatographie par échange d'anions permet de se débarrasser de la plupart des protéines issues du milieu de culture, d'une partie des molécules d'ADN des cellules hôtes mais aussi, dans certains cas, des anticorps murins qui auraient pu se détacher de la colonne d'immuno-affinité.

La chromatographie par échange de cations permet de fixer le FVIII et d'élué les impuretés.

- La chromatographie d'exclusion ou de filtration sur gel

Cette méthode n'est employée que si les protéines à séparer ont des tailles très différentes.

Comme dans le cas des concentrés d'origine plasmatique (Partie 2, I, 4, D), la technique par solvant-détergent (SD) et la nanofiltration sont les méthodes d'inactivation/élimination virales les plus utilisées.

D. Le contrôle de la qualité

(14,132–134)

Le contrôle de la qualité est un point essentiel du processus de fabrication des produits recombinants, dont le but est d'assurer la qualité mais surtout la sécurité du produit. De nombreux contrôles vont être effectués afin de pouvoir valider chaque étape du procédé : de la sélection de la lignée cellulaire (identité, performance, présence et identification du gène transfecté, stabilité, pureté, absence de virus pathogènes...) et des composants du milieu de culture (contrôle de l'origine des produits humains ou animaux ...) à l'obtention du produit final (test d'identité du produit formé, stérilité, stabilité...), en passant par les phases de

production (fermentation, purification, formulation ...). Ces tests sont réalisés selon les normes internationales ICH (*International Conference on Harmonisation*) concernant les spécifications (CPMP-ICH-365-96) (135) ainsi que la qualité et la sécurité virale des produits issus des biotechnologies (CPMP-ICH-295-95) (136).

Les contrôles qualité doivent suivre trois lignes directrices principales (136) afin d'assurer une sécurité optimale des produits :

- Sélectionner et tester les lignées cellulaires ainsi que les composants des milieux de culture utilisés par rapport à l'absence de virus indésirables.
- S'assurer de la capacité des procédés de production à éliminer les virus potentiellement infectieux pour l'homme.
- Tester le produit à des étapes de production appropriées vis-à-vis de l'absence de contamination par des virus infectieux.

E. Les différentes générations de facteurs recombinants

a. Les facteurs recombinants de « première génération »

(14,47,88,131,134,137,138)

Les produits recombinants de « première génération » se caractérisent par l'utilisation de protéines animales durant le processus de fabrication et de purification, ainsi que par l'ajout d'albumine humaine (HSA = *Human Serum Albumin*) comme stabilisateur lors des phases de purification et de formulation. L'albumine va permettre de stabiliser la formule finale. On retrouve des produits d'origine animale dans le milieu de culture mais aussi lors de l'étape d'immunopurification. En effet, cette dernière se caractérise généralement par l'utilisation d'anticorps monoclonaux murins, de la même manière que pour les FVIII plasmatiques immunopurifiés (Partie 2, I, 4, C, c, ii) (47,88).

L'utilisation d'albumine humaine peut paraître inadaptée par rapport à l'amélioration attendue de la part des facteurs recombinants, à savoir l'absence de risque de contamination par des agents infectieux d'origine humaine. Tout d'abord, il faut savoir qu'au début des années 90, il est encore techniquement difficile de ne pas utiliser l'albumine pour stabiliser le FVIII, une protéine très fragile du fait de la présence de nombreux sites de clivage protéolytique (131). De plus, l'albumine utilisée provient de dons sécurisés de plasma (Partie 2, I, 4, B) et subit préalablement à son utilisation une étape d'inactivation virale par pasteurisation à 60°C pendant 10 heures, afin d'éviter le risque éventuel de contamination. Il est important de souligner qu'aucun cas de transmission d'agents infectieux lié à l'utilisation d'albumine

humaine n'a encore été observé (68) ; un risque théorique n'est cependant pas totalement exclu. L'ajout d'albumine va également entraîner une diminution de l'activité spécifique du produit final, celle-ci va passer de plus de 3000 à 5 – 10 UI/mg de protéines (47,88,131).

Le produit final contient, en plus du FVIII recombinant et de l'albumine humaine, des traces d'ADN ainsi que de protéines de souris et de hamster. On retrouve également des traces de protéines bovines dans le premier produit recombinant de « première génération » Recombinate[®], du fait de l'emploi d'albumine bovine (BSA = *Bovine Serum Albumin*) dans le milieu de culture (14). Le risque de transmission de virus d'origine animale est présent mais reste limité du fait de la spécificité de ces virus et de la présence de nombreuses étapes assurant la sécurité du produit (purification, inactivation virale, contrôle qualité...). La présence de protéines animales dans le produit peut néanmoins augmenter le risque immunogène. L'efficacité et la durée de vie sont similaires aux produits d'origine plasmatique (131).

Deux facteurs recombinants de « première génération » de pleine longueur ont été développés sous la dénomination commune internationale *octocog alfa* : Recombinate[®] et Kogenate[®] (**Tableau VII**). Recombinate[®] (139), commercialisé par l'entreprise américaine Baxter, est le premier FVIII recombinant de « première génération » à avoir eu une AMM en France en 1993 (131). Comme nous l'avons vu précédemment, la fabrication de cette molécule résulte de l'introduction concomitante des gènes du FVIII et du vWF à l'intérieur de cellules CHO. Le procédé de fabrication est différent en ce qui concerne Kogenate[®], qui est produit à l'intérieur de cellules BHK et pour lequel on ne retrouve pas la co-transfection avec le gène du vWF. Celui-ci est commercialisé depuis 1994 en France (131) par l'entreprise allemande Bayer. Une étape d'inactivation virale à 40°C pendant 8 heures (47) a été ajoutée au procédé de fabrication du Kogenate[®], contrairement au Recombinate[®] qui ne présente aucune étape spécifique d'inactivation virale.

b. Les facteurs recombinants de « deuxième génération »

(14,47,88,140)

Les produits recombinants de « première génération » vont progressivement laisser place à une « deuxième génération ». Celle-ci se caractérise par la suppression de l'albumine humaine en tant que stabilisateur lors du processus final de formulation. D'autres molécules, notamment le saccharose, vont être utilisées à cette fin. Cette démarche permet non seulement d'améliorer la sécurité infectieuse mais aussi de préserver l'activité spécifique élevée du produit recombinant obtenu. Celle-ci peut aller de 4000 à plus de 10000 UI/mg de

protéines dans le cas du ReFacto[®], premier recombinant de « deuxième génération » commercialisé en Europe (88). Des protéines humaines, dont l'albumine, sont toutefois encore employées dans le milieu de culture. Le produit final contient des impuretés, telles que des molécules d'ADN et des protéines de hamster issues des cellules hôtes ainsi qu'une faible quantité de protéines murines libérées par la colonne d'immuno-affinité.

Trois produits de « deuxième génération » ont été commercialisés en Europe (**Tableau VII**) :

- ReFacto[®] (*moroctocog alfa*) en 1999, par l'entreprise américaine Wyeth Pharmaceuticals puis par la société Pfizer (141).
- Kogenate[®] Bayer ou Kogenate[®] FS et Helixate[®] NexGen en 2000 (142). Ils correspondent à un seul et même produit fabriqué par l'entreprise Bayer. Helixate[®] NexGen est distribué par le laboratoire CSL Behring. Kogenate[®] Bayer ou Kogenate[®] FS remplace le produit de « première génération » Kogenate[®]. Outre les améliorations liées à la différence de génération, on retrouve également une simplification du processus de purification (6 étapes chromatographiques au lieu de 9 pour Kogenate[®]), ce qui a pour avantage de limiter les risques de dégradation protéolytique du FVIII (133,134). De plus, l'étape d'inactivation virale par la chaleur a été remplacée par une inactivation par SD (133,134).

c. **Les facteurs recombinants de « troisième génération »**

Les produits recombinants de « troisième génération » se caractérisent par l'absence de protéines humaines et animales à tous les stades de fabrication, de la culture cellulaire à la formulation finale en passant par la purification. Cette démarche permet d'éliminer le risque de transmission d'agents infectieux et de réduire le risque d'immunogénicité (132,143).

Les protéines humaines ou animales sont remplacées par des produits de synthèse ou des molécules issues de l'ingénierie génétique. Des modifications sont également apportées aux techniques de purification, notamment au niveau de la chromatographie d'immuno-affinité. Ainsi, dans le cas de NovoEight[®] (*turoctocog alfa*), les anticorps monoclonaux murins sont remplacés par des anticorps monoclonaux recombinants (F25), dirigés contre la partie C-terminale du domaine A2 de la chaîne lourde du FVIII (144). Cela permet d'assurer l'homogénéité du produit par la sélection des protéines recombinantes dont le domaine A2 est intact et l'élimination des protéines dégradées et dénuées d'activité (145). Il s'agit principalement des protéines clivées au niveau de l'acide aminé 720, le site de clivage majeur du domaine A2 (144). De plus, cet anticorps recombinant est produit par la même lignée cellulaire CHO que le *turoctocog alfa* et dans les mêmes conditions de fabrication, en

n'utilisant aucune protéine animale et humaine (146). Dans le cas du ReFacto[®] AF, une chromatographie d'affinité employant un dérivé polypeptidique de synthèse remplace la chromatographie d'immuno-affinité (140,147). Ainsi, l'exclusion des immunoglobulines murines, pouvant se retrouver en faible quantité dans le produit final, permet d'éliminer les risques potentiels d'immunogénicité et de contamination virale qui leur sont liés.

On retrouve quatre produits de « troisième génération » commercialisés en Europe (**Tableau VII**) :

- Advate[®] (Baxter) en 2004 (148), qui remplace le produit de « première génération » Recombinate[®]. Ils sont équivalents du point de vue fonctionnel (149).
- ReFacto[®] AF (Pfizer) en 2009 (141) pour lequel des modifications du processus de purification ont été apportées par rapport à ReFacto[®].
- NovoEight[®] (Novo Nordisk) en 2013 (150). Il s'agit d'un FVIII recombinant à domaine B tronqué produit par la lignée cellulaire CHO (Partie 2, I, 5, F, a, ii, 1).
- Kovaltry[®] (Bayer) et Iblis[®] (CSL Behring) en février 2016 (151). Il s'agit de la nouvelle version de Kogenate[®] FS ou Kogenate[®] Bayer et d'Helixate[®] NexGen. La séquence protéique est la même mais une modification majeure a été apportée pour produire ces facteurs. Elle porte sur l'introduction du gène *human heat shock protein 70* (HSP70) dans la lignée cellulaire utilisée pour produire le Kogenate[®] FS (Partie 2, I, 5, F, b).

d. **Le facteur recombinant de « quatrième génération » : Nuwiq[®]**

Depuis juillet 2014, le premier produit de « quatrième génération » a été commercialisé en Europe, sous l'appellation Nuwiq[®] (*simoctocog alfa*), par le laboratoire suisse Octapharma AG (152). Il s'agit d'une avancée majeure puisque ce concentré de FVIII recombinant à domaine B tronqué (Partie 2, I, F, a, ii, 2) provient d'une lignée cellulaire humaine : HEK-293. Ces cellules rénales embryonnaires humaines correspondent au plus haut niveau de sécurité virale, selon les normes internationales ICH (Partie 2, I, 5, D).

L'objectif principal du développement de cette quatrième génération est de relever les défis actuels majeurs du traitement substitutif de l'hémophilie, à savoir le développement d'inhibiteurs (Partie 2, II) et la fréquence élevée des injections nécessaires au traitement prophylactique (153,154).

i. La sécurité virale du produit

Aucun additif d'origine humaine ou animale n'est utilisé tout au long du processus de fabrication (155). L'étape clé du processus de purification, à savoir l'étape d'immunopurification, est également exempte de protéines d'origine animale. Le ligand utilisé est un anticorps monoclonal recombinant dont le système de production implique la levure *Saccharomyces cerevisiae* (156).

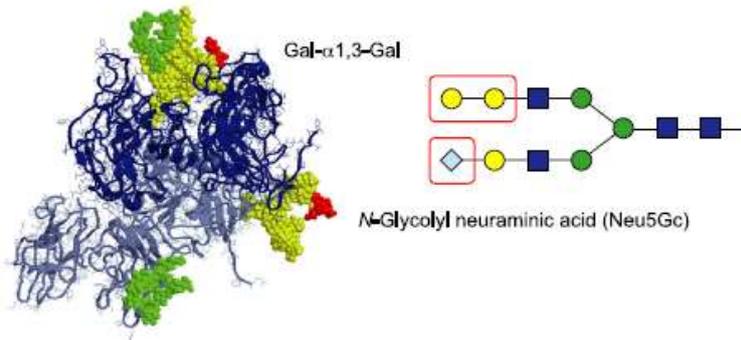
ii. Les modifications post-traductionnelles

L'utilisation de cellules hôtes d'origine humaine présenterait un avantage important par rapport aux modifications post-traductionnelles (PTM pour « *post-translational modifications* ») subies par le FVIII après sa synthèse, en particulier les glycosylations et les sulfatations. Celles-ci étant spécifiques au système d'expression utilisé, une même séquence protéique synthétisée par des cellules de hamster ne va pas présenter les mêmes modifications post-traductionnelles que celle exprimée par des cellules humaines (155).

1) Glycosylations

L'étude réalisée par Kannicht et son équipe a permis de caractériser les modifications post-traductionnelles présentes au sein du *simoctocog alfa* (157). Cette étude montre que les glycosylations majeures présentes au niveau des facteurs plasmatiques (158), à savoir quatre N-glycosylations complexes à forte teneur en mannose au niveau des résidus asparagine (Asn41 et Asn239 dans le domaine A1, Asn1810 dans le domaine A3 et Asn2118 dans le domaine C1) et une O-glycosylation (Ser750) dans le domaine B, sont retrouvées de manière similaire au niveau du *simoctocog alfa* (**Figure 13**). Cette observation est d'une grande importance puisque le processus de glycosylation peut notamment affecter l'activité biologique, la fonction et la stabilité du produit (159–162). L'absence de glycosylations normalement présentes ou la présence de glycosylations incorrectes peut amener à des conformations instables et/ou non fonctionnelles (157).

De plus, l'utilisation de cellules hôtes d'origine humaine permet d'éviter l'expression d'épitopes non humains potentiellement antigéniques au sein du FVIII recombinant. Ainsi, les épitopes antigéniques généralement retrouvés au niveau des facteurs dérivés des cellules de hamster, Neu5Gc (*N-glycolylneuraminic acid*) dans le cas des CHO ou α -Gal dans le cas des BHK (*Gal α 1-3Gal β 1-GlcNAc-R*), sont absents au niveau du *simoctocog alfa* (**Figure 11**).



Product	Gal- α 1-3-Gal	Neu5Gc
Human-cl rhFVIII from HEK293F cells	Not found [15,19]	Not found [15,19]
rhFVIII from CHO cells	Not found [15,19]	Present [15,19]
rhFVIII from BHK cells	Present [15,19,21]	Not found [15,19]

FIGURE 11 : LES ÉPITOPES ANTIGÉNIQUES PRÉSENTS AU NIVEAU DES FVIII RECOMBINANTS SELON LE TYPE DE CELLULES PRODUCTRICES (153). RÉFÉRENCES : 15(157), 19(163), 21(164).

Il faut savoir que les anticorps anti- α -Gal sont naturellement présents en quantité significative chez l'homme, ils représentent jusqu'à 1% de l'ensemble des immunoglobulines circulantes (164,165). Cette forte prévalence s'explique par une exposition environnementale importante. En effet, l'épitope α -Gal se retrouve chez la quasi-totalité des mammifères sauf les primates. L'homme va donc y être couramment exposé, notamment lors de l'ingestion de produits issus de ces animaux (porc, bœuf...) (164–166). Selon les données de l'étude faite par Hironaka et son équipe, 3% des sites N-glycosylés des facteurs recombinants dérivés des cellules BHK présentent l'épitope α -Gal (164). Les cellules CHO, quant à elles, ne sont pas capables de produire cet épitope (165). Elles expriment par contre l'épitope Neu5Gc. L'exposition à des produits dérivés de mammifères présentant cet épitope entraîne une production variable mais souvent importante d'anticorps anti-Neu5Gc chez l'homme (167).

La présence d'une quantité importante de ces anticorps (anti- α -Gal ou anti-Neu5Gc) dans le sang humain constitue un problème potentiel par rapport à l'efficacité et à l'immunogénicité des produits recombinants issus des cellules de hamster (164,168). Ce problème n'est pas présent dans le cas de Nuwiq®.

2) Sulfatations

Le FVIII plasmatique présente six sites de sulfatation ayant des fonctions propres décrites dans le **tableau VI** ci-dessous.

TABLEAU VI : LES FONCTIONS SPÉCIFIQUES DES SITES DE SULFATATION DU FVIII AU NIVEAU PHYSIOLOGIQUE (144,158,169,170)

Sites de sulfatation (résidus tyrosine)	Fonctions spécifiques
Tyr346 et 1664	Augmentation du taux de FVIII activé par la thrombine.
Tyr718, 719 et 723	Augmentation de l'activité de cofacteur du FVIIIa au sein du « complexe ténase intrinsèque ».
Tyr1680	Augmentation de l'affinité pour le vWF favorisant la formation du complexe vWF-FVIII.

La sulfatation de l'ensemble de ces six sites est nécessaire pour que le FVIII puisse présenter une activité et une stabilité optimales. La sulfatation du résidu Tyr1680, présent au niveau de la région a3, est cruciale puisqu'elle détermine le degré d'affinité du FVIII pour le vWF ; celui-ci étant divisé par cinq dans le cas où il n'y a pas de sulfatation (147,157,171). Contrairement aux facteurs recombinants issus des cellules de hamster, *simoctocog alfa* présente une sulfatation complète au niveau du résidu Tyr1680 et possède donc un haut degré d'affinité pour le vWF (154). Cette liaison au facteur Willebrand, indispensable pour maintenir un taux plasmatique en FVIII stable (Partie 1, V, 4), aurait également une importance quant à son immunogénicité. En effet, l'interaction du FVIII recombinant avec le vWF endogène masquerait les épitopes potentiellement antigéniques, prévenant ainsi l'endocytose par les cellules dendritiques, qui sont des cellules présentatrices d'antigène (CPA), et empêchant l'initiation d'une réponse immunitaire (172,173). Les FVIII circulants non liés au vWF sont plus facilement repérés par le système immunitaire, entraînant un risque accru de développer des anticorps anti-FVIII (174). Le FVIII recombinant *simoctocog alfa* présente une affinité importante pour le vWF, seule une faible quantité de ce facteur devrait par conséquent se trouver libre dans le plasma du patient traité, réduisant ainsi le risque de survenue d'un inhibiteur ou anticorps anti-FVIII neutralisant (147).

iii. La demi-vie du produit

Des données cliniques très prometteuses suggèrent que la demi-vie moyenne de Nuwiq® atteindrait 17,1 heures (154), ce qui est comparable aux facteurs recombinants à demi-vie prolongée actuels. En comparaison, la demi-vie du FVIII plasmatique dans la circulation sanguine, lorsqu'il est lié au vWF, est comprise entre 10 et 16 heures (14). Des études (NuPreviq) sont actuellement en cours par rapport à la mise en place d'une prophylaxie

personnalisée avec Nuwiq[®], dans l'espoir de diminuer la fréquence des injections. Les premiers résultats obtenus sont prometteurs : deux perfusions hebdomadaires, voire moins, seraient suffisantes pour deux tiers des patients traités, sans augmentation du nombre de saignements (153).

F. Les modifications apportées à certains facteurs recombinants

a. La délétion partielle ou totale du domaine B

On retrouve des FVIII recombinants de différentes tailles, ceux-ci peuvent être de pleine longueur (Advate[®], Kogenate[®], Helixate[®], Kovaltry[®]) ou présenter un domaine B tronqué (NovoEight[®] et Nuwiq[®]) ou délété (ReFacto[®]). Le domaine B constitue la grande région centrale de la structure primaire du FVIII (**Figure 6**). Il est très fortement glycosylé et comprend 19 des 25 sites de N-glycosylations présents sur le FVIII (157,175). Celui-ci n'intervient pas dans les fonctions procoagulantes du facteur (30). Ainsi, une délétion partielle ou totale du domaine B n'est pas associée à une modification significative des propriétés procoagulantes du facteur (31,176). Cette délétion présente également l'intérêt d'augmenter la sécrétion de FVIII dans la plupart des systèmes d'expression (31), aboutissant à une optimisation du rendement.

Cette région semble cependant avoir un rôle dans le développement et le transport intracellulaires du FVIII ainsi que dans sa sécrétion (31).

i. Un facteur recombinant à domaine B délété : ReFacto[®] et ReFacto[®] AF (*moroctocog alfa*)

Moroctocog alfa est un facteur VIII recombinant totalement dépourvu du domaine B. La taille de la molécule est par conséquent extrêmement réduite, elle passe de 2332 à 1438 acides aminés (176).

Le gène introduit pour la production de *moroctocog alfa* a été génétiquement modifié afin d'assurer l'expression de la plus petite des multiples formes actives du FVIII retrouvées dans les concentrés d'origine plasmatique (177,178). Cela amène à une homogénéité du produit. De plus, étant donné que la majorité des sites de N-glycosylation se trouvent dans le domaine B, la complexité structurale est réduite dans le cas de *moroctocog alfa*.

ii. Les facteurs recombinants à domaine B tronqué

1) *NovoEight*[®] (*turoctocog alfa*)

Turoctocog alfa est un FVIII recombinant à domaine B tronqué (**Figure 12**). La séquence d'environ 980 acides aminés constituant le domaine B du FVIII plasmatique est réduite à 21 dans le cas du *turoctocog alfa*, par liaison entre les 10 acides aminés de l'extrémité N-terminale et les 11 acides aminés de l'extrémité C-terminale (144,146).

La séquence correspondant aux 4 derniers acides aminés situés à l'extrémité C-terminale du domaine B tronqué est d'une grande importance puisqu'elle correspond au site de clivage des protéases de type furine aboutissant à la forme hétérodimérique du FVIII (146,179).

Pour finir, l'activation du FVIII par la thrombine entraîne la libération du domaine B tronqué et aboutit à la formation d'un FVIIIa recombinant structurellement similaire au FVIIIa endogène (145,146,180).

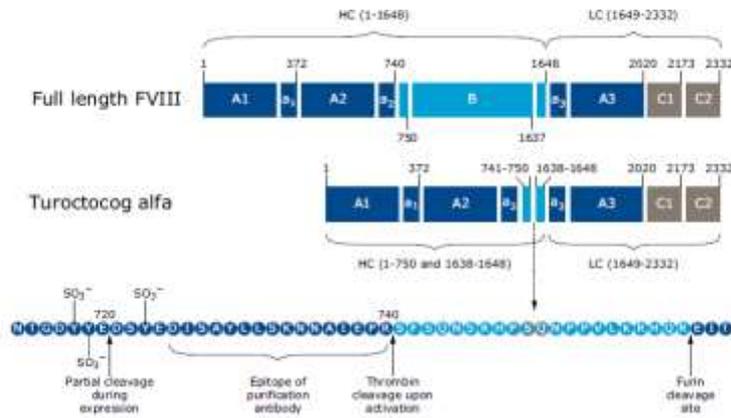


FIGURE 12 : LES STRUCTURES MOLÉCULAIRES DU FVIII DE PLEINE LONGUEUR ET DU *TUROCTOCOG ALFA* (145)

2) *Nuwiq*[®] (*simoctocog alfa*)

Simoctocog alfa est un FVIII recombinant à domaine B tronqué de 170 kDa (147). Il comprend les domaines A et C ainsi qu'une séquence de 16 acides aminés insérée entre les domaines A2 et A3 (**Figure 13**). Les 8 premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale de la séquence dérivent du domaine B original, tandis que les 8 autres ont été déterminés de telle sorte à former une homologie avec une séquence retrouvée au sein d'une protéine présente dans des cellules nerveuses humaines (181). L'introduction de cette séquence, reconnue par les protéases de type furine, a l'avantage de présenter un risque immunogène considéré comme faible du fait de son homologie avec une séquence de protéine humaine (147).

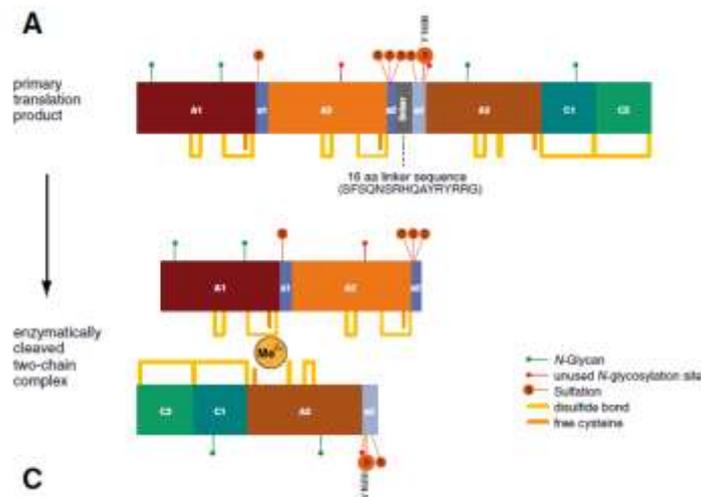


FIGURE 13 : LE SIMOCTOCOG ALFA DE LA STRUCTURE PRIMAIRE À LA STRUCTURE DIMÉRIQUE (147)

iii. L'implication potentielle de la délétion du domaine B dans l'immunogénicité du FVIII

L'implication du domaine B dans l'immunogénicité du FVIII a fait l'objet de nombreux débats. En effet, les résultats d'une méta-analyse d'études prospectives, publiés en 2011 par Aledort LM *et al.* (182), suggèrent que la délétion du domaine B (ReFacto[®] *versus* FVIII recombinant de pleine longueur) entraînerait une augmentation conséquente de l'immunogénicité du FVIII chez des patients préalablement traités (durée d'exposition au concentré de FVIII supérieure à 50 jours (183)). Ces résultats contestés (184,185) n'ont pas été confirmés par une étude de cohorte prospective réalisée au Royaume-Uni et publiée en 2015 (186). Cette étude a été initiée en 2010, du fait de la mise en place d'une nouvelle politique d'approvisionnement relative aux facteurs anti-hémophiliques au niveau national, impliquant la généralisation de l'usage du ReFacto[®] AF. Les FVIII recombinants de pleine longueur (Advate[®] ou Kogenate[®] FS/Helixate[®] NexGen) ont été remplacés par le FVIII recombinant à domaine B délété (ReFacto[®] AF) pour près de la moitié des patients. C'est dans ce contexte qu'une étude comparative de l'incidence de survenue d'inhibiteurs des patients ayant changé de traitement (domaine B délété) ou non (pleine longueur) a pu être mise en place. Les résultats obtenus ne sont pas en faveur d'une augmentation du risque immunogène, le passage au ReFacto[®] AF n'ayant pas été associé à une élévation du développement d'inhibiteurs.

L'étude RODIN (*Research Of Determinants of INhibitor Development*), réalisée entre 2000 et 2010 sur 574 enfants non préalablement traités (187,188), s'appuie sur le registre PedNet (réseau pédiatrique européen pour la prise en charge de l'hémophilie) et englobe 29 centres de soins hémophiliques dans 16 pays européens, au Canada et en Israël. Sa publication en

janvier 2013 évoque un risque similaire d'immunogénicité, que le domaine B soit présent ou non (ReFacto®).

Une étude comparative de l'immunogénicité prédictive de ReFacto® AF (189) par rapport à deux facteurs recombinants de pleine longueur (Helixate® et Advate®) a été publiée en juillet 2014. Celle-ci se base sur des expérimentations *in vitro*, réalisées sur des cellules humaines, afin d'étudier deux aspects :

- Dans un premier temps, l'aptitude des différents facteurs à se lier au récepteur du mannose CD206, récemment identifié comme étant un récepteur endocyttaire du FVIII, et à être endocytés par des cellules présentatrices d'antigène.
- Puis, la capacité de ces facteurs endocytés à être présentés aux lymphocytes T spécifiques du FVIII.

Ces expérimentations ont montré des résultats différents selon la concentration de FVIII utilisée. En effet, ReFacto® AF est moins endocyté que les facteurs recombinants de pleine longueur à des concentrations élevées. Ceci n'est pas le cas à des concentrations plus faibles où chaque produit va être endocyté et activer les lymphocytes T de la même manière. Pour finir, des expériences sont réalisées sur des souris déficientes en FVIII afin d'évaluer la faculté de ces différents facteurs à provoquer la formation d'anticorps inhibiteurs. Les taux d'immunoglobulines G (IgG) induits par ReFacto® AF sont plus faibles ou similaires à ceux induits par les autres facteurs.

Ainsi, comme le montrent également des études antérieures faites sur des souris déficientes en FVIII (190) ou des cellules dendritiques humaines dérivées des monocytes immatures qui ont la capacité d'endocyter les FVIII et d'initier la réponse immunitaire aux FVIII thérapeutiques (191), l'immunogénicité prédictive du facteur recombinant à domaine B délété de « troisième génération » (ReFacto® AF) est identique voire même inférieure à celle des deux facteurs recombinants de pleine longueur étudiés (Helixate® et Advate®) (189).

b. *L'introduction du gène de la protéine humaine HSP70 (human heat shock protein 70) : Kovaltry®*

Kovaltry® est le premier FVIII recombinant commercialisé à être issu d'une lignée cellulaire dans laquelle a été co-introduit le gène de la protéine humaine HSP70. Les protéines de choc thermique constituent une famille de protéines dont l'expression est induite par un stress cellulaire (chaleur, UV, cytotoxiques,...) (192).

HSP70 est une protéine chaperonne intracellulaire qui, dans les conditions physiologiques normales, favorise le repliement des polypeptides nouvellement formés afin qu'ils acquièrent une conformation tridimensionnelle normale (193). Elle participe aussi à la régulation du cycle cellulaire, facilite la translocation des protéines au travers des membranes, ... (193). Lors d'un stress cellulaire, on observe une dénaturation de nombreuses protéines. Certaines peuvent même former des agrégats nocifs pour la cellule. HSP70 va alors être mobilisée, elle va soit faciliter le réarrangement des protéines dénaturées, soit favoriser leur dégradation (192–194). Elle a également une activité anti-apoptotique (195).

L'introduction du gène de HSP70 dans la lignée cellulaire a donc pour but d'augmenter la production de FVIII recombinants en favorisant une conformation tridimensionnelle adéquate de ces protéines, empêchant leur agrégation, ainsi qu'en réduisant l'apoptose des cellules. Les résultats des travaux réalisés par Ishaque et son équipe ont montré que ce but était atteint puisqu'une augmentation de la sécrétion de FVIII recombinants a été observée en comparaison avec une lignée cellulaire n'exprimant pas le gène HSP70 (196).

De plus, des études cliniques (197) ont montré une amélioration des propriétés pharmacocinétiques par rapport à Kogenate[®] FS. Cette amélioration s'explique par le fait que Kovaltry[®] présente des modifications post-traductionnelles plus développées avec des ramifications hautement sialylées plus nombreuses que Kogenate[®] FS. Le degré de sialylation aurait un impact sur la demi-vie de certaines protéines issues de mammifères (198).

Même si la protéine HSP70 n'est pas détectée dans le produit final, une surveillance de l'apparition d'anticorps anti-HSP70 est également associée aux études cliniques de Kovaltry[®] (LEOPOLD) (199–201). Il est important de rappeler que la plupart des patients possèdent un faible taux d'anticorps anti-HSP70, qui tend à augmenter avec l'âge (202), avant même d'être exposés au FVIII recombinant en question. En effet, ces immunoglobulines sont communément rencontrées chez les individus sains (203) et résultent le plus souvent d'une exposition aux protéines HSP70 libérées dans le sang lors de processus infectieux (204) et/ou inflammatoires (205). Une augmentation de l'expression de HSP70 est également observée chez des individus atteints de certaines pathologies telles que l'hypertension artérielle (206) ou la polyarthrite rhumatoïde (207). Les résultats des études montrent que 5% des patients traités présentent une augmentation sporadique des anticorps anti-HSP70 supérieure au seuil limite défini dans l'étude. L'utilisation de Kovaltry[®] ne semble pas entraîner de modifications significatives du taux d'anticorps anti-HSP70. De plus, le développement de ces anticorps n'a pas été associé à l'apparition de symptômes cliniques (205).

G. Les FVIII recombinants actuellement disponibles en France

En France, les FVIII recombinants actuellement disponibles sont au nombre de sept : Advate[®], Kogenate[®] Bayer ou Kogenate[®] FS qui va très prochainement être remplacé par Kovaltry[®], Helixate[®] NexGen, Refacto[®] AF, NovoEight[®], Nuwiq[®] et Elocta[®] (*efmoroctocog alfa*) (**Tableau VII**). Ce dernier est un FVIII à demi-vie prolongée dont nous parlerons dans la prochaine partie de ce travail (Partie 2, I, 6, B, a, i).

L'ensemble de ces facteurs sont indiqués dans le traitement et la prophylaxie des épisodes hémorragiques chez les patients atteints d'hémophilie A.

Cependant, suite à la publication de l'étude de cohorte du registre FranceCoag en septembre 2014 (208) et à l'étude RODIN en 2013 (187), associant les FVIII recombinants de « deuxième génération » Kogenate[®] FS et Helixate[®] NexGen à un risque potentiel plus élevé de développement d'inhibiteurs chez les patients non préalablement traités (Partie 2, II, 3, B, b, ii), leur place dans la stratégie thérapeutique a été modifiée. Ainsi, « au vu des données cliniques actuellement disponibles, ces spécialités représentent des traitements :

- De première intention chez les patients hémophiles A préalablement traités (ayant accumulé au moins 75 jours de traitement), quelle que soit la sévérité de l'hémophilie, et chez les patients non préalablement traités atteints d'une forme mineure ou modérée d'hémophilie ;
- De dernière intention chez les patients avec une hémophilie A sévère non préalablement traités. Ces spécialités ne doivent être utilisées chez ces patients qu'en cas d'urgence fonctionnelle ou vitale et en l'absence d'autres FVIII disponibles » (209,210).

TABLEAU VII : LES FVIII RECOMBINANTS QUI ONT ÉTÉ ET QUI SONT ACTUELLEMENT COMMERCIALISÉS EN FRANCE (144)

Produit	G	FVIII	Cellules hôtes utilisées	Milieu de culture	Stabilisateur	Purification et inactivation virale	CIA avec Ig murines
Recombinat [®] (<i>octocog alfa</i>) (139)	1	Pleine longueur	CHO	BSA	HSA	CIA - double CEI	+
REPLACE PAR :							
Advate[®] (149)	3	Pleine longueur	CHO	-	Tréhalose	CIA-CEI-SD-CEI	+
Kogenat [®] (<i>octocog alfa</i>) (138)	1	Pleine longueur	BHK	HPPS	HSA	CEI-chaleur-CIA-CE-CEI	+
REPLACE PAR :							
Kogenat[®] FS ou Kogenat[®] Bayer (134)	2	Pleine longueur	BHK	HPPS	Sacch.	CEI-SD-CIA-CEI-CEI-CEI-UF	+
Prochainement REPLACE PAR :							
Kovaltry [®] (205)	3	Pleine longueur	BHK	-	Sacch.	Identique à Kogenat [®] FS + NF	+
ReFacto [®] (<i>morococog alfa</i>) (211)	2	Domaine B délété	CHO	BSA	Sacch.	CEI-SD-CIA-CEI-BC-CE	+
REPLACE PAR :							
ReFacto[®] AF (140)	3	Domaine B délété	CHO	-	Sacch.	CEI-SD-CA-CEI-BC-CE-NF	-
Helixate[®] NexGen (<i>octocog alfa</i>)	2	Pleine longueur	BHK	HPPS	Sacch.	Identique à Kogenat [®] FS	+

NovoEight® (<i>turoctocog alfa</i>) (132)	3	Domaine B tronqué	CHO	-	Sacch.	SD-CIA-CEI- NF-CE	-
Nuwiq® (<i>simoctocog alfa</i>) (156)	4	Domaine B tronqué	HEK-293	-	Sacch.	Double CEI- SD-CIA-NF- CEI-CE	-

Les abréviations : G = génération, Sacch. = saccharose, CIA = chromatographie d'immuno-affinité, CEI = chromatographie par échange d'ions, CE = chromatographie d'exclusion, CA = chromatographie d'affinité, BC = Butyl Sepharose chromatographie, SD = solvant/détergent, NF = nanofiltration, UF = Ultrafiltration, BSA = albumine de sérum bovin, HSA = albumine de sérum humain, HPPS = *human plasma protein solution*.

6. Les facteurs VIII recombinants à demi-vie prolongée

A. Le contexte d'apparition de ces facteurs

a. Un point sur la prise en charge actuelle de l'hémophilie A : traitement prophylactique versus traitement « à la demande »

Le traitement substitutif de l'hémophilie A repose sur deux approches thérapeutiques distinctes : le traitement prophylactique et le traitement « à la demande ». Ce dernier se caractérise par des injections ponctuelles de FVIII lorsque survient un accident hémorragique. Cette approche curative est encore utilisée de nos jours pour certains patients. Le régime prophylactique constitue le traitement de choix des patients hémophiles sévères (212). En effet, différentes études évaluant l'évolution du statut orthopédique des patients selon l'approche thérapeutique utilisée (prophylactique ou « à la demande ») ont confirmé l'avantage de la prophylaxie par rapport à la prévention des dommages articulaires (213–215). Le traitement prophylactique a initialement été mis en place en Suède à la fin des années 50 (216,217) dans le but de prévenir les saignements et, par conséquent, la destruction articulaire. Cette méthode consiste à administrer un concentré de FVIII de manière régulière de façon à corriger le niveau de sévérité de la pathologie, afin de passer d'une hémophilie sévère à une forme modérée (activité plasmatique du FVIII > 1 UI/dL), pour laquelle les hémorragies spontanées sont rares (16).

Au-delà de l'amélioration du pronostic orthopédique, le traitement prophylactique entraîne une amélioration considérable de la qualité de vie des patients (218,219) permettant de réduire la fréquence des arrêts de travail et des absences scolaires et de favoriser la pratique d'activités physiques. De plus, la mise en place d'une prophylaxie chez des patients plus âgés, préalablement traités « à la demande », semble freiner l'évolution des lésions articulaires existantes et donc réduire la perte de mobilité qui y est associée (220), tout en diminuant la fréquence des saignements et en protégeant les articulations non atteintes (221).

On distingue la prophylaxie à court terme, correspondant à l'administration de FVIII en prévention d'une hémorragie dans le cadre d'une chirurgie ou lors d'un acte invasif, de la prophylaxie à long terme où l'administration de FVIII se fait de manière régulière selon différents protocoles. C'est cette dernière qui a été adoptée en France en 2002, selon les recommandations de la CoMETH (Coordination Médicale pour l'Étude et le Traitement des maladies Hémorragiques constitutionnelles). La mise en place précoce (avant 2 (6) ou 3 ans) d'une prophylaxie primaire de longue durée (au moins jusqu'à la fin de la croissance) est recommandée chez les enfants hémophiles sévères, en respectant un schéma

d'intensification progressive (**Tableau VIII**) (222). L'objectif principal est de prévenir l'apparition d'hémarthroses spontanées, permettant à long terme d'empêcher la survenue d'une « arthropathie hémophilique » (Partie 1, II, 1).

TABLEAU VIII : SCHÉMA THÉRAPEUTIQUE DE LA PROPHYLAXIE DE MISE EN PLACE PRÉCOCE ET D'INTENSIFICATION PROGRESSIVE (222)

	Hémophilie A	Hémophilie B
Palier 1	50 UI/kg 1 fois par semaine	70 UI/kg 1 fois par semaine
Palier 2	30 UI/kg 2 fois par semaine	Soit 50 UI/kg 2 fois par semaine (jours fixes) Soit 50 UI/kg toutes les 96 h (4 j)
Palier 3	Soit 30 UI/kg 3 fois par semaine (jours fixes) Soit 30 UI/kg toutes les 72 h	50 UI/kg toutes les 72 h
Palier 4	25 à 30 UI/kg toutes les 48 h	

L'intensification s'effectue palier par palier, dès la survenue d'une nouvelle hémarthrose. La désescalade ne s'envisage qu'après une année sans hémarthrose, sous-réserve de l'intégrité clinique et radiologique des 6 articulations principales. Pour les paliers 3 et 4 (hémophilie A) et paliers 2 et 3 (hémophilie B), une insuffisance d'efficacité clinique fait vérifier les paramètres pharmacocinétiques, notamment pour vérifier que le taux de facteur VIII (FVIII) ou IX (FIX) résiduel est détectable, alors que cela n'est pas nécessaire pour les paliers inférieurs ou en cas d'efficacité clinique.

b. Les inconvénients majeurs du traitement prophylactique actuel

(221,223–225)

La durée de vie limitée des FVIII standards (environ 12 heures chez l'adulte (226)) impose un régime prophylactique soutenu, d'en moyenne 3 injections par semaine (212,227). Des injections plus fréquentes peuvent même être nécessaires chez les enfants, pour lesquels la demi-vie du FVIII est généralement réduite. Il s'agit d'une réelle contrainte pour les patients et leurs parents. Par ailleurs, la difficulté d'accès veineux, surtout rencontrée dans la population pédiatrique, est aussi un sujet de préoccupation majeur. En effet, la mise en place d'un cathéter central permanent, lié à un risque infectieux et thrombotique (228), peut s'avérer nécessaire.

C'est dans ce contexte que les FVIII à demi-vie prolongée ont été développés dans l'espoir de limiter le recours aux cathéters centraux, d'améliorer l'adhésion au traitement ainsi que la qualité de vie des patients et de leur famille (229).

B. Les transformations apportées aux FVIII recombinants pour prolonger leur demi-vie

Différentes techniques ont été mises en place pour prolonger la demi-vie des FVIII recombinants :

- La conjugaison avec des groupements PEGylés (PEG pour polyéthylène glycol) ou PEGylation (N8-GP, BAY 94-9027, BAX 855).
- La fusion avec une protéine plasmatique présentant une longue durée de vie tels que le fragment Fc des immunoglobulines G (Elocta[®], *efmoroctocog alfa*) ou encore l'albumine humaine.
- La formation d'un FVIII recombinant à chaîne unique (CSL627).
- La polysialylation (BAX 826).

a. **Fusion avec le fragment Fc des immunoglobulines G**

(230–232)

Cette méthode d'allongement de la demi-vie consiste à fusionner le FVIII avec un fragment Fc recombinant d'immunoglobuline humaine G1 (IgG1) (**Figure 14**).

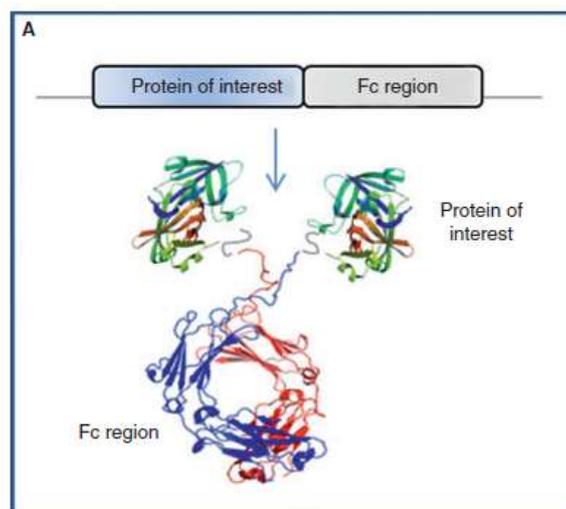


FIGURE 14 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE D'UNE PROTÉINE DE FUSION AU FRAGMENT Fc DES IMMUNOGLOBULINES (233)

La présence de ce fragment Fc permet au facteur de coagulation de se lier au récepteur néonatal Fc (FcRn) et d'être relargué dans la circulation à travers la voie de recyclage physiologique des immunoglobulines (234,235). Celle-ci protège les Ig de la dégradation lysosomale des protéines et leur permet d'atteindre une durée de vie plasmatique de 3 semaines (236). C'est ce mécanisme qui est exploité pour prolonger la durée de vie du facteur recombinant dans la circulation sanguine.

Les récepteurs FcRn s'expriment notamment au niveau des cellules endothéliales et des monocytes circulants. Ces cellules vont endocyter de manière non spécifique les Igs et les protéines de fusion, les fragments Fc vont alors se lier aux FcRn d'une manière pH-dépendante. Dans un compartiment endosomal acide, cette liaison présente une haute affinité, ce qui n'est pas le cas à pH neutre. Ainsi, lors de la fusion du lysosome avec la membrane cellulaire durant la phase de recyclage, le pH neutre entraîne la dissociation du fragment Fc, permettant la libération de l'IgG ou de la protéine de fusion dans la circulation sanguine (237). Les protéines non liées au FcRn, quant à elles, sont dégradées dans le lysosome. Il est important de souligner que les fragments Fc finissent par se dégrader sans s'accumuler dans l'organisme (238) (**Figure 15**).

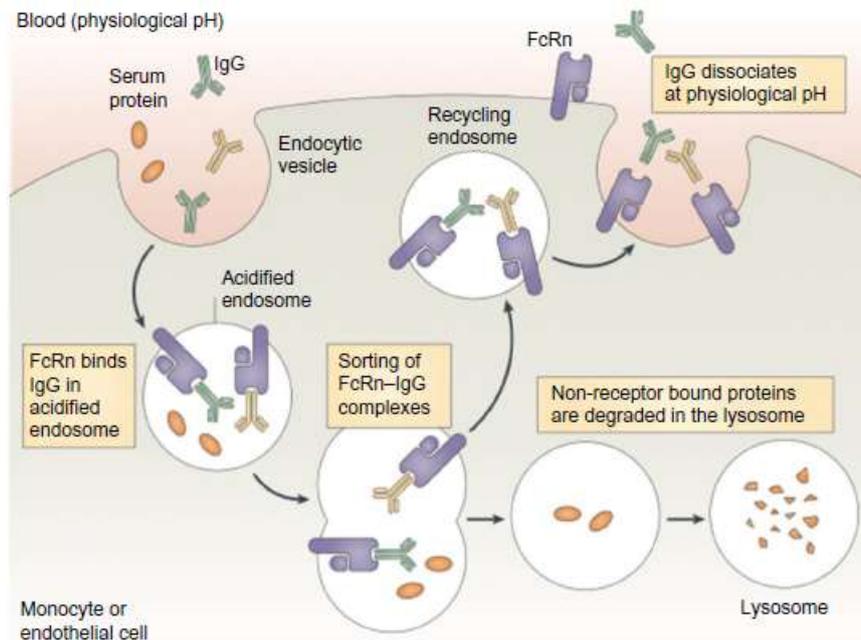


FIGURE 15 : LA VOIE DE RECYCLAGE PHYSIOLOGIQUE DES IMMUNOGLOBULINES VIA LE RÉCEPTEUR FcRn (42)

Cette méthode, déjà utilisée pour différentes molécules telles que l'étanercept, est appliquée aux FVIII et IX. Un FVIII recombinant fusionné au fragment Fc est actuellement sur le marché : Elocta® (*efmoroctocog alfa*).

i. Elocta® (*efmoroctocog alfa*)

L'*efmoroctocog alfa* est le premier FVIII « long-acting » à avoir obtenu une AMM en Europe en novembre 2015 (43), sous le nom commercial Elocta®, par les laboratoires Sobi (Swedish

Orphan Biovitrum) et Biogen Idec. Il est indiqué dans le « traitement et la prophylaxie des épisodes hémorragiques chez les patients atteints d'hémophilie A dans tous les groupes d'âges » (239).

Il s'agit d'un FVIII recombinant, délété du domaine B, issu d'une lignée de cellules rénales embryonnaires humaines (HEK-293) dans laquelle a été co-exprimé le fragment Fc de l'immunoglobuline humaine IgG1. L'*efmoroctocog alfa* se présente sous la forme d'une molécule chimérique dans laquelle le fragment Fc est lié à l'extrémité C-terminale du FVIII (232) (**Figure 16**). Il s'agit d'une protéine de fusion à Fc de « deuxième génération », que l'on qualifie de « monomère de fusion Fc ». Cela se traduit par une configuration dimérique par rapport au fragment Fc mais monomérique par rapport à la protéine thérapeutique, par opposition à la « première génération » qui est toujours dimérique. Cette modification a été apportée afin d'améliorer la demi-vie du produit en augmentant l'efficacité du trafic vésiculaire par diminution du poids moléculaire de la protéine de fusion (42,231,240). De plus, une amélioration de l'activité biologique a été observée dans le cas de plusieurs monomères de fusion Fc par rapport à la configuration dimérique (240,241).

L'ensemble du processus de fabrication (culture cellulaire, purification, formulation finale) est dépourvu de l'utilisation de protéines exogènes d'origine humaine ou animale (34).

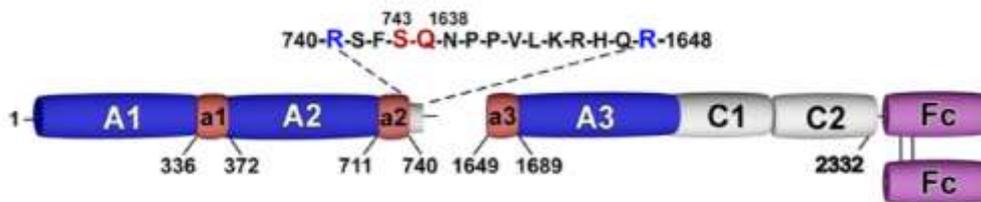


FIGURE 16 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE L'*EFMOROCTOCOG ALFA* (42)

ii. FVIII-Fc-vWF-XTEN

XTEN est une nouvelle classe de polymères d'acides aminés hydrophiles et biodégradables, récemment développée par l'entreprise de biotechnologies Amunix. La fusion de ces polymères aux protéines d'intérêt permet de prolonger leur demi-vie en formant un « nuage aqueux » autour de ces protéines, ce qui les protège de la clairance par les récepteurs ainsi que de l'action protéolytique des enzymes. Le mécanisme d'action est similaire à celui des molécules de PEG (Partie 2, I, 6, B, d) ou des produits polysialylés (Partie 2, I, 6, B, e)

(242,243). La nature recombinante de XTEN permet un contrôle précis de la composition, de la longueur ainsi que de l'emplacement d'insertion du polymère (244).

A l'heure actuelle, un FVIII recombinant utilisant la technologie XTEN™ est en phase d'étude préclinique : le FVIII-Fc-vWF-XTEN. Celui-ci est constitué de deux chaînes polypeptidiques (245) :

- Une chaîne unique FVIII-Fc-XTEN constituée d'un FVIII à domaine B délété, fusionné à un fragment Fc d'Ig, sur lequel est inséré un polymère XTEN,
- Une chaîne vWF D'D3-XTEN-Fc avec un second polymère XTEN inséré entre le domaine D'D3 du vWF et le fragment Fc.

Cette molécule a été développée dans le but de diminuer la fréquence des injections mais aussi de favoriser éventuellement une voie d'administration moins invasive : la voie sous-cutanée (244).

Les études précliniques sur des modèles murins ont montré un allongement de la demi-vie d'un facteur 4 par rapport à un FVIII recombinant non modifié (245). De plus, une augmentation de 20% de la biodisponibilité par voie sous-cutanée a été observée (<1% pour les FVIII recombinants non modifiés) (245). Ces résultats prometteurs font de cette molécule une candidate potentielle au traitement de l'hémophilie A, par voie intraveineuse ou sous-cutanée.

b. Fusion à l'albumine

La technique de fusion à l'albumine, une protéine plasmatique à longue durée de vie plasmatique, est également employée pour prolonger la durée de vie des facteurs de la coagulation (246) (**Figure 17**). Cette fusion est réalisée par des techniques de génie génétique en introduisant les gènes du facteur et de l'albumine au sein de la lignée cellulaire voulue.

La longue demi-vie plasmatique de l'albumine (environ 20 jours (247)) résulte non seulement de son haut poids moléculaire, limitant son élimination par filtration glomérulaire, mais aussi de son interaction avec le récepteur FcRn (Partie 2, I, 6, B, a).

De plus, l'albumine est la plus abondante des protéines présentes dans la circulation sanguine (environ 50% des protéines plasmatiques totales (247)). Une immunogénicité moindre est donc attendue lors de son utilisation (248).

A ce jour, cette technique n'est pas appliquée au FVIII mais uniquement aux FIX (249) et VIIa (250), du fait d'une perte d'activité significative (232).

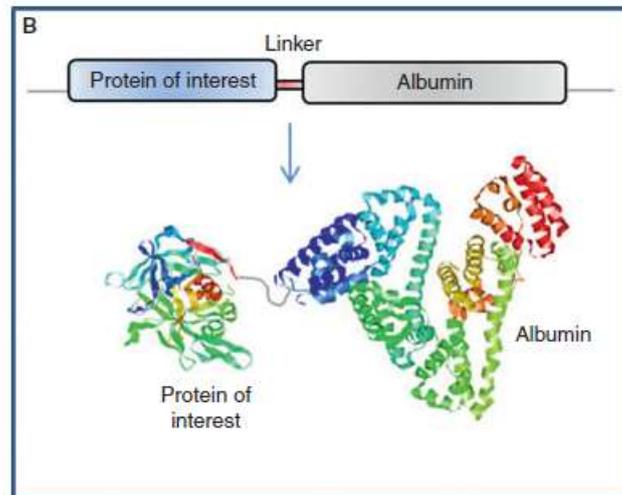


FIGURE 17 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE D'UNE PROTÉINE DE FUSION À L'ALBUMINE (233)

c. *FVIII recombinant à chaîne unique*

Le FVIII endogène est sécrété sous la forme d'un hétérodimère dont les chaînes sont reliées entre elles par des liaisons ioniques relativement instables (Partie 1, V, 1). L'ensemble des FVIII recombinants actuellement sur le marché se présentent sous cette forme. Le FVIII recombinant à chaîne unique est issu de l'incorporation d'une liaison covalente entre la chaîne lourde et la chaîne légère dans le but d'améliorer la stabilité du facteur, aussi bien durant le processus de fabrication que *in vivo* (251). Sa forme activée, après clivage par la thrombine, est similaire à celle du FVIII endogène afin que celle-ci puisse assurer sa fonction (252).

Une molécule a récemment été commercialisée aux Etats-Unis et au Canada par le laboratoire CSL Behring : CSL 627, sous l'appellation commerciale Afstyla[®]. Un avis positif (novembre 2016) a également été émis par le CHMP (*Committee for Medicinal Products for Human Use*) quant à l'obtention d'une AMM en Europe (253). Il s'agit d'un FVIII à domaine B délété produit par une lignée cellulaire de hamster (CHO).

Des études précliniques ont montré que ce FVIII recombinant à chaîne unique présente une affinité plus importante pour le vWF qu'un autre facteur recombinant (Advate[®]) (254). Etant donné le caractère protecteur du vWF par rapport au FVIII (Partie 1, V, 4), l'amélioration de

sa liaison avec le CSL 627 permettrait d'augmenter la durée de vie de cette molécule. C'est ce que confirment les études *in vivo* faites sur des modèles animaux montrant une durée de vie presque doublée par rapport au FVIII recombinant de pleine longueur Advate® (254). De plus, le haut degré d'affinité pour le vWF comparé à d'autres facteurs recombinants (254,255) pourrait entraîner une réduction du risque immunogène (Partie 2, I, 5, E, d, ii, 2) (172,256).

d. **PEGylation**

(253,259,260)

La PEGylation est une technique visant à brancher de manière covalente des groupements PEGylés sur une molécule thérapeutique, dans le but de réduire sa clairance *in vivo* et donc de prolonger sa durée de vie.

Les molécules de polyéthylène glycol (PEG) sont des polymères synthétiques de poids moléculaires variés, formés à partir de monomères d'éthylène glycol (**Figure 18**).

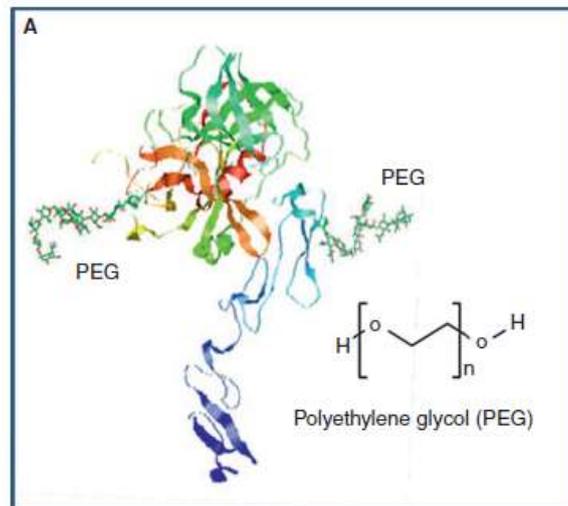


FIGURE 18 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE D'UNE PROTÉINE PEGYLÉE (233)

Leur caractère hydrosoluble leur permet d'incorporer de nombreuses molécules d'eau dans leur structure, aboutissant à une augmentation considérable de volume (259). C'est cette particularité qui est utilisée pour prolonger la durée de vie des molécules PEGylées, dont l'augmentation de taille limite leur élimination par filtration glomérulaire, leur dégradation

protéolytique ainsi que leur clairance par des récepteurs spécifiques aux protéines tels que les LRP (*low density lipoprotein receptor-related proteins*). Il faut savoir que la majorité des FVIII administrés sont éliminés par le foie à travers leur interaction avec les récepteur LRP. La technique de PEGylation permettrait donc de réduire l'internalisation cellulaire du FVIII via ce récepteur, limitant sa dégradation (**Figure 19**).

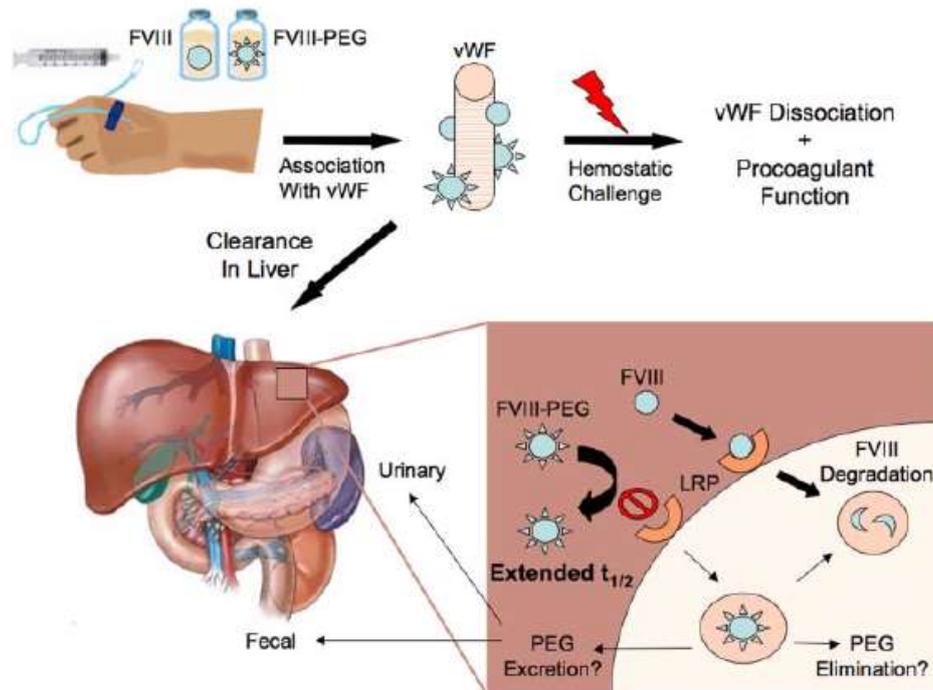


FIGURE 19 : MÉCANISME D'ACTION RESPONSABLE DE L'ALLONGEMENT DE LA DURÉE DE VIE DU FVIII PAR PEGYLATION (258)

On rencontre plusieurs stratégies de PEGylation, appliquées aussi bien au FVIII qu'au FIX :

- La première approche est une méthode de PEGylation non spécifique (« *random PEGylation* »), les groupements PEGylés vont se fixer au niveau des résidus lysine exposés à la surface. Cette absence de spécificité par rapport aux sites de liaison peut s'avérer problématique puisque certains sites sont essentiels à l'activité procoagulante du FVIII : site de clivage par la thrombine pour l'activation du FVIII, sites nécessaires à l'interaction avec le vWF, ...
- La deuxième approche est une méthode de PEGylation spécifique (« *site-specific PEGylation* ») permettant de cibler les groupes fonctionnels non essentiels à la surface de la protéine, au niveau des résidus cystéines libres, ou via des techniques d'ingénierie des protéines (260). Le domaine B est une cible attractive pour la PEGylation puisqu'il n'intervient pas dans les fonctions procoagulantes du FVIII (30).

L'association de FVIII recombinants avec un liposome PEGylé (**Figure 20**) est une technique qui a également été étudiée. Elle a cependant été abandonnée durant l'essai clinique de phase II (*Kogenate Liplong Study*) du fait d'un manque d'efficacité (261). Le principe de cette technique était d'attacher des FVIII de manière non covalente à la surface externe des liposomes PEGylés (257). Ces vésicules lipidiques artificielles permettent de stabiliser et d'améliorer les propriétés pharmacocinétiques des molécules thérapeutiques qu'elles transportent (262).

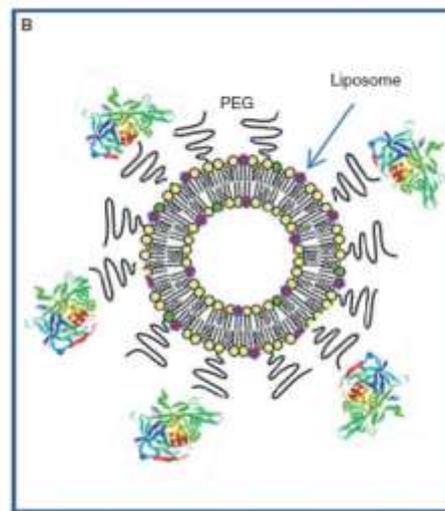


FIGURE 20 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE D'UN LIPOSOME PEGYLÉ SUR LEQUEL SONT ATTACHÉES LES PROTÉINES D'INTÉRÊT (233)

Trois molécules utilisant la technique de PEGylation sont actuellement à l'étude : N8-GP (*turoctocog alfa pegol*), BAX 94-9027 (*damoctocog alfa pegol*) et BAX 855 (*rurioctocog alfa pegol*).

i. BAX 855 (*rurioctocog alfa pegol*)

(34,232,251)

BAX 855 est produit par PEGylation du FVIII recombinant de pleine longueur Advate[®]. Il est commercialisé aux Etats-Unis depuis novembre 2015 par le laboratoire Baxalta, sous le nom commercial Adynovate[®]. Il est également soumis à une demande d'AMM en Europe depuis mars 2016, sous le nom commercial Adynovi[®].

La technique de PEGylation utilisée est brevetée par l'entreprise américaine Nektar Therapeutics et consiste à cibler prioritairement les groupements epsilon-aminés des résidus lysine accessibles à la surface du FVIII (263).

BAX 855 se présente sous la forme d'un FVIII recombinant de pleine longueur conjugué de manière covalente à une ou plusieurs molécules de PEG de 20 kDa, dans la limite d'environ 2 moles de PEG par molécule. Près de 60% des molécules de PEG se trouvent au niveau du domaine B et sont donc éliminées lors de l'activation du FVIII (264).

ii. BAY 94-9027 (*damoctocog alfa pegol*)

(34,223,232,251)

BAY 94-9027 est un FVIII recombinant PEGylé à domaine B délété développé par le laboratoire Bayer. Une technique de mutagenèse dirigée a été utilisée afin que la PEGylation soit ciblée au niveau de résidus cystéine introduits à la surface des différents domaines du FVIII. 23 variants conjugués de manière spécifique à une molécule de PEG ont ainsi été étudiés (265). Un variant efficacement exprimé et PEGylé, avec une activité procoagulante et une interaction avec le vWF préservées, a été sélectionné : BAY 94-9027. Il s'agit d'un FVIII recombinant à domaine B délété sur lequel a été introduit un unique groupement cystéine au niveau de l'acide aminé 1804 (domaine A3), conjugué de manière spécifique à une molécule de PEG de 60 kDa (265).

iii. N8-GP (*turoctocog alfa pegol*)

(145, 233, 253)

N8-GP est produit par glycoPEGylation du *turoctocog alfa* ou NovoEight[®], un FVIII recombinant de « troisième génération » à domaine B tronqué (Partie 2, I, 5, F, a, ii, 1). Cette technique spécifique va permettre de lier une molécule de PEG de 40 kDa à un O-glycane se trouvant sur l'un des 21 acides aminés du domaine B tronqué. Le mécanisme d'action est le suivant : l'acide sialique terminal se trouvant sur une structure O-glycosylée du domaine B est remplacé par une molécule d'acide sialique conjuguée à un PEG de 40 kDa, par le biais d'une sialyltransférase.

De ce procédé résulte un produit très spécifique comprenant une unique molécule de PEG fixée au niveau du domaine B du FVIII. Ce domaine va être clivé lors de l'activation par la thrombine générant un FVIII activé similaire au FVIIIa endogène.

e. *Polysialylation*

(233,257)

L'acide polysialique (PSA) (**Figure 21**) est constitué de polymères linéaires et hydrophiles d'acide N-acétylneuraminique (NeuNAc). Ces polymères sont naturellement présents et abondants à la surface des cellules de mammifères et de nombreuses protéines. Ils sont donc biocompatibles et biodégradables (266), ce qui en fait une alternative intéressante à la PEGylation.

Son mécanisme d'action est semblable à celui de la PEGylation (Partie 2, I, 6, B, d). La réduction de la liaison du PSA-FVIII au récepteur LRP, impliqué dans la clairance et la régulation du FVIII dans le plasma, a été confirmée sur des modèles murins (267).

Les études précliniques, réalisées sur des souris, ont montré un allongement de la demi-vie d'un facteur 4 par rapport à un FVIII recombinant non modifié (233).

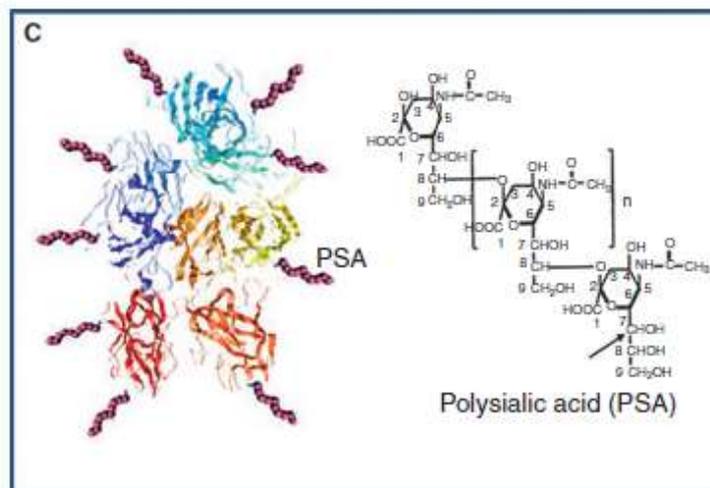


FIGURE 21 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE D'UNE PROTÉINE POLYSIALYLÉE (233)

Un FVIII recombinant polysialylé est actuellement à l'étude sous la dénomination BAX 826 ou SHP 656. Il s'agit du second FVIII à demi-vie prolongée développé par le laboratoire Baxalta qui se base sur le FIII recombinant non modifié de pleine longueur : Advate®. L'étude clinique de phase I a débuté en mars 2016 (268).

C. Etat des lieux des études cliniques réalisées sur les FVIII à demi-vie prolongée

a. Les résultats obtenus dans la population adulte (≥12 ans)

i. Données pharmacocinétiques

Les données pharmacocinétiques des différents FVIII à demi-vie prolongée, issues des études cliniques récemment publiées, sont consignées dans le tableau ci-dessous (**Tableau IX**). Globalement, ces facteurs présentent une demi-vie 1,1 à 1,6 fois plus longue que les FVIII recombinants standards, le temps de demi-vie moyen étant compris entre 12,9 et 19 heures. Le temps estimé pour atteindre une activité plasmatique du FVIII de 1%, après une dose de 50 UI/kg, est environ 1,3 à 1,8 fois plus long qu'avec les FVIII recombinants non modifiés.

TABLEAU IX : DONNÉES PHARMACOCINÉTIQUES DES ÉTUDES CLINIQUES SUR LES FVIII À DEMI-VIE PROLONGÉE - POPULATION ADULTE

Produit	Technique utilisée	Temps de demi-vie moyen = $T_{1/2}$	Allongement du $T_{1/2}$ par rapport au FVIII standard étudié	Temps estimé pour atteindre une activité plasmatique de 1% après une dose de 50 UI/kg
ELOCTA [®] <i>Efmoroctocog alfa</i> (269)	Fusion au fragment Fc d'IgG	19,0 h	1,5 fois par rapport à Advate [®]	4,9 jours (<i>versus</i> 3,3 jours avec Advate [®])
BAX 855 (270,271)	PEGylation	16,0 h	1,4 fois par rapport à Advate [®]	Donnée non disponible
BAY 94-9027 (272)	PEGylation	18,7 h	1,4 fois par rapport à Kogenate FS [®]	Donnée non disponible
N8-GP (273)	PEGylation	19,0 h	1,6 fois par rapport aux FVIII de référence (Advate [®] , Kogenate FS [®] , ReFacto AF [®] , Haemate P [®] et un FVIII plasmatique)	6,5 jours (<i>versus</i> 3,7 jours avec les FVIII de référence)
CSL 627 (274)	rFVIII à chaîne unique	12,9 - 14,1 h	1,1 – 1,2 fois par rapport à Advate [®]	Environ 4,3 jours (<i>versus</i> 3,3 jours avec Advate [®])

ii. Efficacité et données concernant le traitement prophylactique

La durée ainsi que les modalités de traitement sont regroupées dans le **tableau X**.

Pour ce qui est de l'efficacité des produits à demi-vie prolongée, l'étude des taux de saignements annualisés médians des patients sous traitement prophylactique a montré que des épisodes hémorragiques ont été rencontrés en moyenne moins de 4 fois par an, avec des taux compris entre 1,14 et 3,9 (**Tableau XI**).

En ce qui concerne le traitement des épisodes hémorragiques, les études cliniques ont montré que l'utilisation d'un FVIII à longue durée d'action permettait de résoudre l'hémorragie dans plus de 90% des cas avec une ou deux injections de produit (**Tableau XI**).

17,4% des patients sous prophylaxie à long terme comprenant un schéma à une injection par semaine (65,8 UI/kg/semaine en moyenne) n'ont rapporté aucun épisode hémorragique sous Elocta[®]. Dans le cas d'une prophylaxie à long terme d'au moins 2 injections par semaine à raison d'une consommation moyenne de près de 90 UI/kg/semaine (85,4 – 89,12 UI/kg/semaine), ce pourcentage s'élève à plus de 40% (**Tableau XI et XII**).

TABLEAU X : SCHÉMAS THÉRAPEUTIQUES DES ÉTUDES CLINIQUES SUR LES FVIII À DEMI-VIE PROLONGÉE - POPULATION ADULTE

Produit	Schéma thérapeutique de l'étude par rapport au traitement prophylactique (Nombre de patients)
ELOCTA® (269)	<u>Cohorte 1</u> : 25-65 UI/kg tous les 3 à 5 jours (N = 118) <u>Cohorte 2</u> : 65 UI/kg 1 fois par semaine (N = 24) pendant 50 jours ou plus.
BAX 855 (270)	45 +/- 5 UI/kg 2 fois par semaine pendant plus de 50 jours et jusqu'à 6 mois (N = 120).
BAY 94-9027 (275)	Période de pré-inclusion de 10 semaines : 25 UI/kg 2 fois par semaine (N = 114) - Si > 1 hémorragie spontanée pendant cette période : 30-40 UI/kg 2 fois par semaine (N = 24) - Si ≤ 1 hémorragie spontanée : 45-60 UI/kg tous les 5 jours (N = 43) ou 60 UI/kg tous les 7 jours (N = 43) pendant 26 semaines.
N8-GP (271)	Une dose de 50 UI/kg tous les 4 jours ³ pendant 50 jours ou plus (N = 175).
CSL 627 (274)	1. Une dose 3 fois par semaine (N = 79) 2. Une dose 2 fois par semaine (N = 47) 3. Une dose tous les 2 jours (N = 9) 4. Selon un schéma défini par l'investigateur (N = 11) pendant 50 jours ou plus (N total = 146).

³ Un schéma à 2 injections par semaine est admis selon l'appréciation du médecin investigateur.

**TABLEAU XI : DONNÉES RELATIVES À L'EFFICACITÉ DES FVIII À DEMI-VIE PROLONGÉE LORS DES ÉTUDES CLINIQUES
- POPULATION ADULTE**

Produit	Taux de saignements annualisés médians des patients sous prophylaxie	% d'épisodes hémorragiques contrôlés par 1 ou 2 injections de FVIII à demi-vie prolongée	% de patients sous prophylaxie n'ayant présenté aucun saignement durant l'étude
ELOCTA® (269)	1,6 pour la cohorte 1 3,6 pour la cohorte 2	87,3% après 1 injection 97,8% après 2 injections	<u>Cohorte 1</u> : 45,3% <u>Cohorte 2</u> : 17,4%
BAX 855 (270)	1,9	95,9% après 1 ou 2 injections	39,6%
BAY 94-9027 (275)	- 3,9 quand tous les 7 jours - 1,9 quand tous les 5 jours - 1,9 quand 2 fois par semaine	81,1% après 1 injection 90,6% après 2 injections	- 46% quand 2 fois par semaine - 44% quand tous les 5 jours
N8-GP (271)	1,18 - 1,33	77,5% après 1 injection 93,6% après 2 injections ⁴	40%
CSL 627 (274)	1,14 1,93 pour le schéma 1 0 pour le schéma 2	80,9% après 1 injection 93,5% après 2 injections	43%

⁴ 97,0% dans le cas du traitement « à la demande »

TABLEAU XII : DONNÉES RELATIVES À LA PROPHYLAXIE PROVENANT DES ÉTUDES CLINIQUES RÉALISÉES SUR LES FVIII À DEMI-VIE PROLONGÉE - POPULATION ADULTE

Produit	Dose de FVIII administrée par semaine en moyenne	Nombre moyen de perfusions par semaine
ELOCTA® (269)	<u>Cohorte 1</u> : 85,4 UI/kg <u>Cohorte 2</u> : 65,8 UI/kg	<u>Cohorte 1</u> : 2 durant les 3 derniers mois de l'étude <u>Cohorte 2</u> : 1
BAX 855 (270)	87,4 UI/kg (44,6 UI/kg par dose)	1,96
BAY 94-9027 (275)	- 31,5 à 38,9 UI/dose quand 2 fois par semaine soit 63 à 77,8 UI/semaine - 45,3 UI/dose quand tous les 5 jours - 56,8 UI/dose quand tous les 7 jours	Selon le schéma thérapeutique déterminé suite à la période de pré-inclusion
N8-GP (271)	89,12 UI/kg (52,2 UI/kg tous les 4,1 jours en moyenne)	1,70
CSL 627 (274)	4494 IU/kg/an 1. 4769 UI/kg/an 2. 3974 UI/kg/an	Donnée non disponible

iii. Sécurité : formation d'inhibiteurs et d'anticorps non neutralisants (ANN)

Un seul patient a développé un inhibiteur sur l'ensemble des études cliniques (**Tableau XIII**), dans le cas du N8-GP après 93 jours d'exposition (223,271). Il est également important de souligner que les patients présentant des antécédents ou une présence d'inhibiteurs du FVIII ont été exclus. La durée d'exposition aux FVIII à demi-vie prolongée était supérieure ou égale à 50 jours.

Des anticorps non neutralisants (ANN) se sont développés durant chacune de ces études, ceux-ci n'ont cependant pas eu d'impact sur la clinique ou la thérapeutique (pas de diminution d'efficacité).

En ce qui concerne la toxicité des produits, deux réactions d'hypersensibilité corrélées au traitement par BAY 94-9027 ont été observées : un épisode d'urticaire après la 1^{ère} injection

ainsi qu'une douleur de poitrine associée à un essoufflement après la 4^{ème} injection (patient avec antécédents d'asthme) (223). Les patients concernés se sont retirés de l'étude (275).

TABLEAU XIII : DONNÉES RELATIVES À LA SÉCURITÉ DES FVIII À DEMI-VIE PROLONGÉE LORS DES ÉTUDES CLINIQUES - POPULATION ADULTE

Produit	Nb de cas d'inhibiteurs (≥ 0,6 UB/mL)	Nb de cas d'ANN avant l'étude	Nb de cas d'ANN pendant l'étude	Nb de cas d'ANN d'apparition transitoire	Observations
ELOCTA® (269)	0	5	6	4	Tous les Acs sont anti-FVIII et non anti-Fc
BAX 855 (270)	0	9	7		Combinaison d'Acs anti-FVIII et anti-PEG
BAY 94-9027 (275)	0	1	5		Tous les Acs sont anti-PEG 2 réactions d'hypersensibilité
N8-GP (271)	1	3	1		Apparition de l'inhibiteur après 93 jours d'exposition, titre max : 13,5 UB/mL. Réaction croisée au rFVIII pour tous les Acs
CSL 627 (274)	0	8	4	2	Tous les Acs sont anti-FVIII

b. **Les résultats obtenus dans la population pédiatrique (<12 ans)**

i. **Données pharmacocinétiques**

Les données pharmacocinétiques de certains FVIII à demi-vie prolongée (Elocta[®], BAX 855, CSL 627), issues des études cliniques récemment publiées, sont regroupées dans le tableau ci-dessous (**Tableau XIV**). En ce qui concerne les autres facteurs (N8-GP et BAY 94-9027), des études cliniques sont actuellement en cours. De la même manière que pour la population adulte, ces facteurs présentent une demi-vie environ 1,5 fois plus longue que les FVIII recombinants standards, le temps de demi-vie moyen étant compris entre 10,2 et 14,9 heures.

TABLEAU XIV : DONNÉES PHARMACOCINÉTIQUES DES ÉTUDES CLINIQUES SUR LES FVIII À DEMI-VIE PROLONGÉE - POPULATION PÉDIATRIQUE

Produit	Temps de demi-vie moyen = T _{1/2} (heures)	Allongement du T _{1/2} par rapport au FVIII étudié
ELOCTA [®] (276)	< 6 ans : 12,67 h Entre 6 et 12 ans : 14,88 h	Entre 0,79 et 2,98 fois (1,63 par rapport à Advate [®] < 6 ans, 1,51 entre 6 et 12 ans)
BAX 855 (277)	12,6 – 13,9 h	Entre 1,3 et 1,5 fois par rapport à Advate [®]
CSL 627 (278)	< 6 ans : 10,4 h Entre 6 et 12 ans : 10,2 h	Donnée non disponible

ii. **Efficacité et données concernant le traitement prophylactique**

La durée ainsi que les modalités de traitement sont regroupées dans le **tableau XV**. Des doses plus élevées et une administration plus fréquente sont généralement nécessaires chez les enfants âgés de moins de 12 ans, du fait d'une clairance plus importante des FVIII par rapport à la population adulte (279).

En ce qui concerne l'efficacité des produits à demi-vie prolongée, l'étude des taux de saignements annualisés médians des enfants sous traitement prophylactique a montré que des épisodes hémorragiques ont été rencontrés moins de 4 fois par an en moyenne, avec des taux compris entre 1,96 et 3,69 (**Tableau XVI**).

Par rapport au traitement des épisodes hémorragiques, les études cliniques ont montré que l'utilisation d'un FVIII à longue durée d'action permettait de résoudre l'hémorragie dans plus de 90% des cas avec une ou deux injections de produit (**Tableau XVI**).

Ces résultats sont similaires à ceux observés dans la population adulte.

38 à 46,4% des patients sous prophylaxie à long terme d'au moins 2 injections par semaine n'ont rapporté aucun épisode hémorragique, avec une consommation moyenne de près de 90 à 100 UI/kg/semaine (88,11 – 97,47 UI/kg/semaine) (**Tableaux XVI et XVII**).

TABLEAU XV : SCHEMAS THERAPEUTIQUES DES ETUDES CLINIQUES SUR LES FVIII A DEMI-VIE PROLONGEE - POPULATION PEDIATRIQUE

Produit	Schéma thérapeutique de l'étude – Prophylaxie (Nombre de patients)
ELOCTA® (276)	2 doses par semaine pendant au moins 50 jours : - 1 ^{er} jour : 25 UI/kg - 4 ^e jour : 50 UI/kg ⁵ (N = 71 dont 36 < 6 ans).
BAX 855 (277)	Une dose de 50 +/- 10 UI/kg 2 fois par semaine pendant au moins 50 jours ⁶ (N = 73 dont 36 < 6 ans).
CSL 627 (278)	Une dose de 15 à 50 UI/kg tous les 2 jours ou 2 à 3 fois par semaine ou schéma selon le médecin investigateur pendant au moins 50 jours (N = 81).

⁵ Un ajustement de la dose (80 UI/kg au maximum) et de la fréquence d'injections (au minimum tous les 2 jours) est possible durant l'étude.

⁶ Un ajustement de la dose (80 UI/kg au maximum) est toléré.

TABLEAU XVI : DONNÉES RELATIVES À L'EFFICACITÉ DES FVIII À DEMI-VIE PROLONGÉE LORS DES ÉTUDES CLINIQUES - POPULATION PÉDIATRIQUE

Produit	Taux de saignements annualisés médians	% d'épisodes hémorragiques contrôlés par 1 ou 2 injections de FVIII à demi-vie prolongée	% de patients sous prophylaxie n'ayant présenté aucun saignement durant l'étude
ELOCTA® (276)	1,96	81,4% après 1 injection 93,0% après 2 injections	46,4%
BAX 855 (277)	2,0	82,9% après 1 injection 91,5% après 2 injections	38,0%
CSL 627 (278)	3,69	85,9% après 1 injection 95,7% après 2 injections	Donnée non disponible

TABLEAU XVII : DONNÉES RELATIVES À LA PROPHYLAXIE PROVENANT DES ÉTUDES CLINIQUES FAITES SUR LES FVIII À DEMI-VIE PROLONGÉE - POPULATION PÉDIATRIQUE

Produit	Dose de FVIII administrée par semaine en moyenne	Nombre moyen de perfusions par semaine
ELOCTA® (276)	88,11 UI/kg	2 (tous les 3,5 jours)
BAX 855 (277)	97,47 UI/kg (51,3 UI/kg/dose)	1,9
CSL 627 (278)	71 UI/kg quand 2 fois/semaine 96 UI/kg quand 3 fois/semaine	2 pour 54% des patients 3 pour 30% des patients

iii. Sécurité : formation d'inhibiteurs et d'anticorps non neutralisants (ANN)

Aucune formation d'inhibiteurs n'a été reportée au cours des études après une durée d'exposition supérieure ou égale à 50 jours (**Tableau XVIII**). Comme dans le cas des adultes, les patients présentant des antécédents ou une présence d'inhibiteurs du FVIII ont été exclus de ces études cliniques.

Des anticorps non neutralisants (ANN) se sont développés durant la majorité des études, sans impact sur la clinique ou la thérapeutique.

En ce qui concerne la toxicité des produits, aucune réaction grave relative à l'utilisation des FVIII à longue durée d'action n'a été décrite.

TABLEAU XVIII : DONNÉES RELATIVES À LA SÉCURITÉ DES FVIII RECOMBINANTS LORS DES ÉTUDES CLINIQUES - POPULATION PÉDIATRIQUE

Produit	Nb de cas d'inhibiteurs (≥ 0,6 UB/mL)	Nb de cas d'ANN avant l'étude	Nb de cas d'ANN pendant l'étude	Nb de cas d'ANN d'apparition transitoire	Observations
ELOCTA® (276)	0	7	0	0	Tous les Acs sont anti-FVIII et non anti-Fc
BAX 855 (277)	0	16	5	2	Combinaison d'Acs anti-FVIII et anti-PEG
CSL 627 (278)	0 ⁷	10	10	Donnée non disponible	Acs anti-FVIII 1 arthralgie à l'origine de l'arrêt du traitement

c. **Conclusion**

Les études cliniques actuelles ont montré une bonne efficacité et une bonne tolérance des FVIII à demi-vie prolongée, que ce soit chez l'adulte ou chez l'enfant. Mises à part les deux réactions d'hypersensibilité rencontrées dans le cas de BAY 94-9027, aucun effet indésirable grave (réaction allergique sévère, réaction anaphylactique ou événement thromboembolique grave), directement corrélé à l'utilisation de ces produits, n'a été rapporté. Un plus grand nombre de patients traités sur une période plus longue est cependant nécessaire pour évaluer la sécurité réelle de ces produits. Ces conditions ne pourront être réunies qu'après

⁷ La présence d'un inhibiteur a été détectée chez un patient. Une réévaluation du dossier a révélé que cet inhibiteur était déjà présent avant l'étude (erreur du laboratoire) et n'est donc pas lié à l'exposition au CSL 627.

leur mise sur le marché. De plus, la sécurité liée à l'utilisation de ces facteurs chez les patients non préalablement traités, correspondant à la population la plus à risque de développer un inhibiteur, n'a pas encore été établie. La survenue d'un inhibiteur étant l'effet indésirable principal du traitement substitutif actuel (Partie 2, II), son évaluation dans le cadre de l'emploi des FVIII à demi-vie prolongée présente donc un intérêt majeur.

D. L'implication clinique des FVIII « long-acting » : les différentes stratégies thérapeutiques possibles

L'arrivée des FVIII à demi-vie prolongée sur le marché des produits anti-hémophiliques s'accompagne de la nécessité de mettre en place une prophylaxie individualisée. Le phénotype hémorragique du patient, la présence ou non de saignements articulaires répétés, son profil pharmacocinétique mais aussi son mode de vie et son âge sont autant de paramètres qui devront être pris en compte pour la mise en place d'une stratégie thérapeutique adaptée (279–282). Une détermination individuelle de la demi-vie du FVIII à longue durée d'action, par une analyse pharmacocinétique, pourra être effectuée afin de définir de manière optimale les modalités du traitement (dose, fréquence des injections).

On rencontre deux stratégies thérapeutiques : diminuer le nombre d'injections ou maintenir le nombre d'injections dans le but d'atteindre une concentration plasmatique minimale de FVIII plus élevée que le seuil thérapeutique défini à l'heure actuelle (activité plasmatique de FVIII supérieure à 1 UI/dL (212)).

a. La première stratégie thérapeutique : minimiser le nombre d'injections

(42,224)

La première stratégie thérapeutique consiste à allonger l'intervalle de temps entre les perfusions de manière à réduire le nombre d'injections, tout en maintenant un taux plasmatique minimal de FVIII supérieur à 1%.

Cette approche est à privilégier pour les patients ayant un accès veineux difficile, tels que les enfants, ainsi que pour les patients dont le mode de vie est relativement sédentaire.

La demi-vie de ces produits étant environ 1,5 fois plus longue que les FVIII traditionnels (Partie 2, I, 6, C, a, i), une réduction du nombre d'injections à deux fois par semaine ou une fois tous les 3 à 5 jours est possible dans le cadre d'une prophylaxie à long terme. En comparaison, la prophylaxie standard actuelle comprend 3 à 4 injections par semaine (224).

Un traitement prophylactique comprenant une injection par semaine semble être possible pour certains patients sélectionnés selon le profil pharmacocinétique et le phénotype hémorragique (223). Cette approche peut notamment être bénéfique pour les patients préalablement traités « à la demande » (225).

b. *La seconde stratégie thérapeutique : atteindre une concentration plasmatique minimale de FVIII plus élevée*

(42,223,224,280)

La seconde stratégie consiste à maintenir un schéma prophylactique standard (grand nombre d'injections) dans le but d'atteindre un taux plasmatique de FVIII minimal encore plus élevé que le seuil thérapeutique actuel de 1%.

Il est important de souligner que certains patients n'atteignent pas ce seuil avec le régime prophylactique actuel, l'emploi d'un facteur à longue durée d'action pourrait leur permettre de résoudre ce problème.

De plus, un taux plasmatique de FVIII plus élevé est nécessaire pour certains patients du fait de la présence d'hémorragies fréquentes, de saignements répétés au niveau d'une articulation (articulation « cible ») ou d'une activité physique importante (283). La mise en place de cette seconde stratégie thérapeutique est intéressante pour ces patients puisqu'elle permet d'améliorer la « couverture hémostatique ». Dans ce contexte, le taux plasmatique minimal de FVIII à atteindre n'est pas encore défini à l'heure actuelle.

E. *Les limites des FVIII à longue durée d'action*

a. *Un allongement de la demi-vie limité*

Les résultats cliniques obtenus par rapport à l'amélioration des propriétés pharmacocinétiques des FVIII à demi-vie prolongée sont modérés et quelque peu décevants, en particulier par rapport aux FIX dont la demi-vie a été allongée jusqu'à 5 fois, par opposition à moins de 2 fois pour le FVIII (232).

Cet allongement limité serait en grande partie lié à l'interaction étroite du FVIII avec le vWF. En effet, étant donné que la majorité des FVIII forment un complexe avec ce facteur dans le plasma, leur demi-vie dépend en grande partie de la demi-vie du vWF (284,285). Celle-ci est comprise entre 10 et 25 heures environ, selon le groupe sanguin de l'individu (286). Il a aussi

été démontré qu'un taux plasmatique de vWF élevé était corrélé à une durée de vie plus importante du FVIII administré chez des patients hémophiles sévères (287), que ce facteur soit modifié ou non (226, 271, 275, 276).

b. La sécurité des facteurs à demi-vie prolongée

i. Les propriétés immunogènes et toxiques potentielles des facteurs PEGylés

La molécule de PEG est un produit de synthèse, contrairement à l'albumine et au fragment Fc d'immunoglobuline qui sont des molécules organiques. Au-delà du fait que cette molécule de synthèse ne soit pas considérée comme immunogène en elle-même (244), différents cas de développement d'anticorps anti-PEG ont été reportés chez des patients traités avec des molécules PEGylées (288,289). La spécificité et le caractère inhibiteur des anticorps détectés sont cependant controversés (méthode peu standardisée) (232,290). De plus, des anticorps anti-PEG ont également été détectés au sein d'une population non traitée par ce type de molécule (291,292). L'exposition accrue à des produits contenant du PEG, tels que certains produits cosmétiques et alimentaires, semblerait être à l'origine de la survenue de ces anticorps (289), dont l'impact clinique reste à définir.

L'effet toxique potentiel de ces molécules a également été étudié sur des modèles animaux auxquels ont été administrées de fortes doses de PEG. Une vacuolisation de certaines cellules, telles que les cellules tubulaires rénales, a été observée en raison de l'accumulation de PEG (289). Cet effet ne s'est cependant pas révélé nocif chez l'animal. Les mécanismes d'élimination des molécules de PEG sont complexes et varient en fonction de leur poids moléculaire (293). La majorité de ces molécules sont excrétées par voie rénale mais une grande partie est aussi éliminée par la voie hépato-biliaire. Les molécules de haut poids moléculaire présentent ainsi un risque plus élevé d'accumulation intracellulaire du fait d'une clairance rénale réduite. Il est important de souligner que la taille des molécules de PEG utilisées pour modifier les FVIII permet une élimination rénale (282) et que les doses administrées lors du traitement ne sembleraient pas pouvoir engendrer de vacuolisation (294). Cet effet indésirable n'a d'ailleurs pas été observé lors des études précliniques (294). L'effet d'une administration fréquente et répétée des FVIII PEGylés sur le long terme, selon le schéma prophylactique, n'est pas encore connu. Cependant aucune toxicité à long terme ne semble avoir été répertoriée à ce jour vis-à-vis de l'utilisation d'autres molécules thérapeutiques PEGylées (295,296).

A l'inverse, une réduction de l'immunogénicité suite à l'utilisation d'une molécule PEGylée, par comparaison avec son homologue non PEGylé, a été observée lors de différentes

études (293,296). Cette réduction peut s'expliquer de différentes manières. Tout d'abord, les polymères de PEG hydratés seraient susceptibles de masquer des épitopes potentiellement reconnus par les cellules présentatrices de l'antigène (CPA), de la même manière que le vWF (232,265). Une autre approche serait que les peptides PEGylés présentés à la surface des CPA ne seraient pas reconnus par les lymphocytes T, prévenant ainsi leur activation ainsi que celle des lymphocytes B spécifiques et limitant par conséquent le risque de formation d'inhibiteurs (247). Des études *in vitro* et *in vivo* réalisées sur des modèles murins, vis-à-vis de l'immunogénicité des FVIII PEGylés, semblent confirmer ces hypothèses (247,297).

ii. L'immunogénicité potentielle du FVIII fusionné au fragment Fc d'immunoglobuline

Bien que le fragment Fc d'Ig soit une molécule organique, son risque immunogène au sein de la protéine de fusion n'est pas écarté. En effet, certaines molécules thérapeutiques liées à ces fragments Fc, tels que les anticorps monoclonaux humains, induisent la formation d'anticorps neutralisants chez un grand nombre de patients (298).

D'un autre côté, des études ont montré que la fusion d'un fragment Fc au FVIII recombinant pouvait diminuer l'immunogénicité et induire une tolérance sur des modèles animaux (299) mais aussi dans le cas d'un enfant (300).

Cette fusion permettrait d'apporter un caractère immunomodulateur à la molécule. En effet, il semblerait que le fragment Fc contienne des épitopes atypiques dont la reconnaissance entraînerait l'activation de lymphocytes T régulateurs spécifiques (Tregs) (301,302). Ces cellules participent à la tolérance immunitaire par leur caractère immunosuppresseur et sont impliquées dans la prévention des réactions auto-immunes.

L'étude INHIBIT (*Hemophilia Inhibitor Prevention Trial*) a récemment été mise en place afin d'évaluer l'effet de l'*efmoroctocog alfa* sur la formation d'inhibiteurs chez des enfants hémophiles sévères non préalablement traités (42,247).

c. L'aspect économique

(42, 226, 233)

L'impact du coût des facteurs à demi-vie prolongée sur leur introduction dans la pratique clinique n'est pas encore élucidé à l'heure actuelle. Son évaluation est en effet compliquée puisqu'elle dépend de nombreux facteurs. Parmi ceux-ci, on retrouve notamment le profil du

patient mais aussi l'objectif thérapeutique voulu, à savoir une diminution du nombre d'injections ou la volonté d'atteindre une concentration plasmatique de FVIII élevée par des injections plus régulières. Dans ce dernier cas, le coût du traitement sera forcément plus élevé. Cependant, la diminution du nombre de complications hémorragiques, liée à une concentration plasmatique de FVIII élevée, devrait permettre de réduire le coût de la prise en charge globale : réduction du nombre d'hospitalisations et de visites médicales (303), ...

Des études additionnelles sont nécessaires pour évaluer le coût global réel de l'utilisation de ces facteurs.

d. **Les méthodes de mesure**

(232, 283, 305)

L'évaluation de l'activité procoagulante du FVIII se base principalement sur deux techniques distinctes : la méthode chronométrique en un temps et la méthode chromogénique.

La méthode chronométrique en un temps permet de tester la capacité du FVIII de l'échantillon à raccourcir ou corriger le temps de coagulation d'un plasma totalement dépourvu de FVIII (plasma de référence). Le résultat obtenu s'exprime en pourcentage d'activité par rapport au plasma de référence utilisé. La méthode chromogénique, quant à elle, est une méthode en deux temps permettant d'évaluer l'activité cofacteur du FVIII dans l'activation du FX par le FIXa. Cette technique se base sur la mesure de la quantité de FXa générée, après incubation de l'échantillon à tester dans un milieu présentant un excès de FX, FIXa, phospholipides et calcium. La génération de FXa est alors proportionnelle à la quantité de FVIII présente dans l'échantillon.

La technique la plus pratiquée en routine dans les laboratoires d'hémostase est la méthode chronométrique en un temps. Cependant, la précision de cette méthode par rapport aux facteurs à demi-vie prolongée fait l'objet de nombreux débats. Les modifications apportées aux facteurs recombinants (délétion du domaine B) ainsi que les technologies utilisées pour améliorer leur demi-vie, semblent exacerber les discordances observées entre les taux mesurés par la méthode chronométrique en un temps. Une sous-estimation de l'activité coagulante et de l'efficacité thérapeutique de certains facteurs à domaine B délété, notamment des facteurs PEGylés, a en effet été observée. Ce qui ne semble globalement pas être le cas pour la méthode chromogénique (305).

Le débat actuel porte sur la nécessité éventuelle de généraliser la méthode chromogénique au sein des laboratoires d'hémostase.

F. Le statut des FVIII à demi-vie prolongée à l'heure actuelle

TABLEAU XIX : TABLEAU RÉCAPITULATIF DE L'ENSEMBLE DES FVIII RECOMBINANTS À DEMI-VIE PROLONGÉE ACTUELLEMENT À L'ÉTUDE OU AYANT OBTENU UNE AMM (306,307)

Produit	Fabricant	Technique utilisée	FVIII	Lignée cellulaire	Purification + inactivation / élimination virale	AMM / Etude clinique
ELOCTA® <i>Efmoroctocog alfa</i> ou <i>Efraloctocog alfa</i> (308)	Biogen Idec/Sobi (<i>Swedish Orphan Biovitrum</i>)	Fusion au fragment Fc d'IgG	Domaine B délété	HEK	SD – CIA – CEI – NF – CIH – UF	AMM
rFVIII Fc-XTEN-vWF	Biogen Idec/Sobi	Fusion au fragment Fc d'IgG associée à technologie XTEN	Domaine B délété	HEK	Donnée non disponible	Phase pré-clinique
BAY 94-9027 <i>Damoctocog alfa pegol</i>	Bayer	PEGylation (PEG 60 kDa)	Domaine B délété	BHK	Donnée non trouvée	Phase III
BAX 855 <i>Rurioctocog alfa pegol</i> (309) <u>Basé sur :</u> Advate®	Baxalta/ Shire	PEGylation (PEG 20 kDa)	Pleine longueur	CHO	CIA-CEI-SD-CEI (149)	Phase III
N8-GP <i>Turoctocog alfa pegol</i> <u>Basé sur :</u> NovoEight®	Novo Nordisk	Glyco-PEGylation (PEG 40 kDa)	Domaine B tronqué	CHO	SD-CIA-CEI-NF-CE (132)	Phase III
CSL 627 (310)	CSL Behring	FVIII recombinant à chaîne unique	Domaine B tronqué	CHO	Multiples chromat. + 2 étapes d'inactivation virale	Phase III
BAX 826 <u>Basé sur :</u> Advate®	Baxalta/ Shire	Polysialylation	Pleine longueur	CHO	CIA-CEI-SD-CEI (149)	Phase I/IIa

II. La problématique majeure du traitement substitutif actuel : la survenue d'inhibiteurs

1. Contexte et épidémiologie

A l'heure actuelle, l'apparition d'anticorps anti-FVIII neutralisants ou inhibiteurs est la complication majeure du traitement substitutif de l'hémophilie A. En limitant l'efficacité du traitement anti-hémophilique, ces inhibiteurs ont un impact considérable sur la qualité de vie ainsi que sur le pronostic vital et fonctionnel du patient immunisé. Cette complication surviendrait chez environ 30% des patients atteints d'une hémophilie A sévère (311). La survenue d'inhibiteurs chez les patients atteints d'une forme modérée ou mineure est moins fréquente (5-10%) et peut potentiellement aggraver le phénotype hémorragique (239).

2. Les différents types d'anticorps anti-FVIII et leur impact clinique

(35, 37, 313)

A. Les anticorps anti-FVIII neutralisants ou inhibiteurs

Les anticorps neutralisants sont des immunoglobulines G (IgG) dirigées contre le FVIII. Ces inhibiteurs vont s'opposer à l'action du FVIII en compromettant son interaction avec les constituants indispensables à son activité procoagulante : vWF, phospholipides, FIX ou X. Il est admis que la majorité des épitopes reconnus par ces IgG sont localisés au niveau des domaines A2, C2 et A3 (313). Selon l'épitope ciblé, les anticorps vont présenter des mécanismes d'inhibition différents :

- Les anticorps anti-A2 : ils bloquent l'interaction avec le FIXa et certains vont, par gêne stérique, empêcher l'activation du FVIII par la thrombine (314).
- Les anticorps anti-C2 : ils empêchent la liaison du FVIII au vWF (315) ou son interaction avec les phospholipides (316).
- Les anticorps anti-A3 : ils semblent principalement empêcher l'interaction avec le FIXa (317).

B. Les anticorps non neutralisants (ANN)

Les anticorps non neutralisants représentent une catégorie d'anticorps dénuée d'activité inhibitrice. Ils n'ont pas d'impact sur la fonction procoagulante du FVIII et ne réduisent donc

pas l'efficacité du traitement substitutif. Ces anticorps sont dirigés contre des épitopes « non fonctionnels » du FVIII. Leurs conséquences cliniques restent inconnues à l'heure actuelle. L'hypothèse d'une augmentation de la clairance plasmatique du FVIII par ces anticorps est émise par certains auteurs. Leur détection par des techniques immunologiques n'est pas systématique et n'a pas de répercussion sur la prise en charge du patient.

3. Les facteurs de risque

La connaissance des facteurs de risque d'apparition d'inhibiteurs est indispensable pour pouvoir minimiser l'incidence de cette complication. On distingue les facteurs de risque génétiques, qui sont non modifiables, des facteurs non génétiques liés aux modalités de traitement ainsi qu'à la nature du FVIII utilisé. C'est sur ces derniers facteurs que l'on peut agir dans le but de prévenir ou de réduire la survenue et l'évolution de cette complication.

A. Les facteurs de risque génétiques

(312,318)

Les facteurs de risque génétiques ont un impact important sur l'immunisation. Leur connaissance est indispensable pour identifier les patients à haut risque immunogène, pour lesquels une vigilance accrue doit être mise en place tout au long du traitement.

Les principaux facteurs de risque génétiques identifiés sont multiples :

- Le type de mutation affectant le gène du FVIII (Partie 1, IV, 3) : les mutations non-sens, les délétions étendues ainsi que les inversions sont les plus à risque car elles empêchent toute synthèse de FVIII.
- L'existence d'antécédents familiaux d'inhibiteurs représente un facteur de risque important (319).
- L'ethnie : les populations non-caucasiennes sont plus à risque, plus particulièrement les populations afro-américaines (320).
- Le système HLA (*human leukocyte antigen*) : les haplotypes H3 et H4 sont associés à un risque plus élevé d'immunisation (321).
- Le polymorphisme génétique de certaines cytokines et de certains facteurs immunomodulateurs : certains polymorphismes de l'interleukine 10 (IL10) (322) et du TNF- α (323) ont un risque plus élevé tandis que certains polymorphismes de la CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte associated protein-4*) réduiraient le risque d'immunisation (324).

B. Les facteurs de risque liés au traitement

Les facteurs de risque liés au traitement sont potentiellement modifiables. C'est donc par la connaissance et la prise en compte de ces facteurs que l'on pourrait envisager une réduction du risque d'apparition d'inhibiteurs. Ils sont liés aux modalités de traitement et au produit substitutif utilisé (188,313,325).

a. Les facteurs de risque liés aux modalités du traitement substitutif

i. Un traitement intensif précoce

(312,318)

L'intensité du traitement est définie par deux paramètres majeurs : le nombre de jours consécutifs avec une injection journalière de FVIII (« *peak treatment moments* ») ainsi que la quantité cumulée de FVIII administrée sur une période de temps donnée. La précocité de l'exposition, quant à elle, est définie dans la période des 50 premiers jours de traitement. C'est durant cette période que près de 95% des inhibiteurs sont détectés (318).

Les traitements intensifs précoces ont été associés à un risque plus important de développement d'inhibiteurs au cours de différentes études (326–328).

L'étude CANAL (*Concerted Action on Neutralizing Antibodies in severe hemophilia A*) (326) a montré que les patients recevant un premier traitement durant au moins 5 jours consécutifs présentaient un risque 3,3 fois plus élevé que les patients traités durant un ou deux jours consécutifs. Ce risque était d'autant plus important que la dose de FVIII utilisée était élevée : une dose moyenne supérieure à 50 UI/kg durant 5 jours consécutifs entraînait un risque 3,3 fois plus élevé que dans le cas d'une dose inférieure à 35 UI/kg.

L'étude RODIN (*Research of Determinants of Inhibitor Development*) (328) a également confirmé l'effet néfaste des traitements intensifs précoces. Un premier traitement intensif durant 3 à 5 jours consécutifs était associé à une augmentation du risque de survenue d'anticorps inhibiteurs de 40%, ce risque était doublé après 5 à 10 jours de traitement. La dose administrée avait également son importance puisqu'une administration moyenne supérieure à 50 UI/kg s'accompagnait d'un risque 2,3 fois plus élevé que dans le cas d'une dose moyenne de 35 UI/kg.

La théorie de la discontinuité a récemment été présentée comme un élément de réponse potentiel à cette réaction immunogène (329). Selon cette théorie, l'induction d'une réponse immunitaire est directement corrélée à la variation antigénique en fonction du temps :

- Dans le cas où une molécule portant des motifs structurellement différents de ceux retrouvés dans l'organisme est administrée en grande quantité et de manière soudaine, une réponse immunitaire importante se produit (**Cas a de la Figure 22**). Tel est le cas lors de l'administration de FVIII de manière intensive et précoce.
- Si le motif antigénique est présent de manière persistante sur le long terme, la réponse immunitaire s'éteint rapidement (**Cas b de la Figure 22**).
- Dans le cas où l'antigène est présenté lentement, de manière persistante et en petite quantité, une tolérance immunitaire peut se mettre en place (**Cas c de la Figure 22**). Ce dernier cas de figure se rapproche du schéma prophylactique de l'hémophilie (Partie 2, II, 6, A, a).

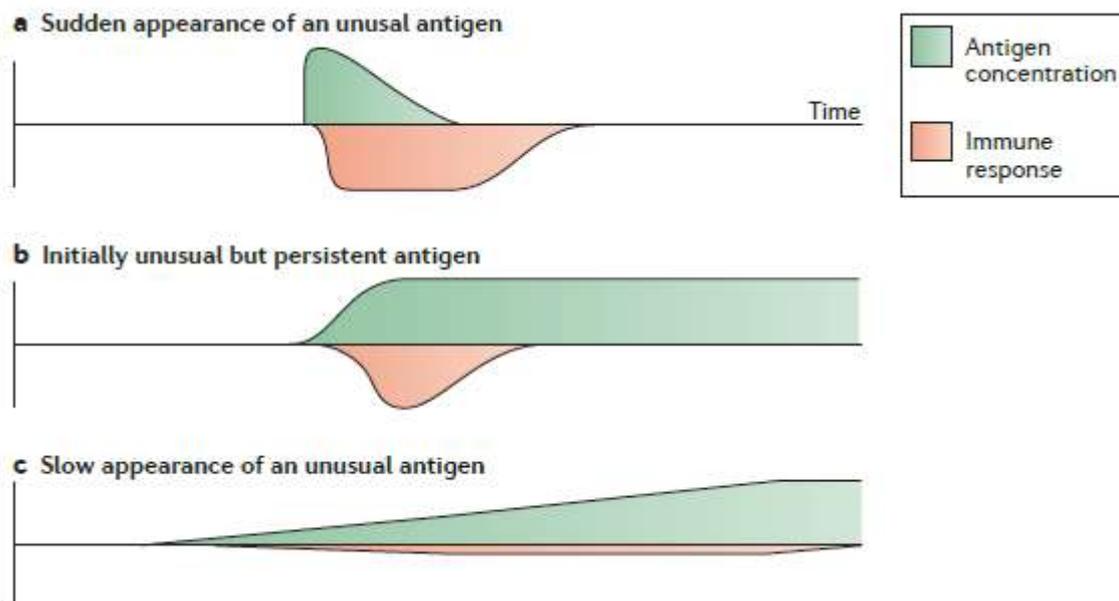


FIGURE 22 : LA THÉORIE DE LA DISCONTINUITÉ (329)

La raison de la mise en place d'un traitement intensif précoce serait également un élément important pour définir le risque de développement d'un inhibiteur. En effet, les résultats d'une méta-analyse ont démontré que ce risque était augmenté dans le cas d'une intervention chirurgicale en comparaison au traitement d'un épisode hémorragique sévère (330).

ii. L'administration de FVIII dans un contexte inflammatoire (« Signal de danger »)

(312,331)

Le contexte inflammatoire présent lors d'un traumatisme, d'une situation chirurgicale ou lors d'un épisode hémorragique sévère, pourrait expliquer le risque immunogène accru associé à l'administration d'une dose élevée de FVIII durant une période plus ou moins longue. L'inflammation peut également être provoquée par une infection concomitante. Les situations où le FVIII est administré en contexte inflammatoire sont associées à la notion du « signal de danger » (332,333). Selon la théorie du danger (334), l'environnement dans lequel a lieu la présentation de l'antigène a une influence majeure sur la réponse immunitaire. Ainsi, dans le cas de l'hémophilie A, le FVIII est introduit aux cellules présentatrices de l'antigène (CPA) au niveau des sites hémorragiques où sont présents des cellules endommagées et des composants (TNF α , IL-1 α , ...) pouvant activer la réponse immunitaire (331).

Le rôle du « signal de danger » dans le risque immunogène lié au traitement n'est pas encore complètement élucidé à l'heure actuelle.

iii. Le traitement prophylactique

(312,331)

L'instauration précoce d'un traitement prophylactique de longue durée semble avoir un rôle protecteur par rapport au développement d'inhibiteurs. En effet, les études observationnelles CANAL (326) et RODIN (328), ainsi qu'une étude cas-témoin italienne (335), ont montré une diminution du risque immunogène chez les patients sous prophylaxie par rapport à ceux traités « à la demande ». L'effet protecteur serait lié à l'induction d'une tolérance immunitaire par rapport au FVIII (318), selon le principe de la théorie de la discontinuité vu précédemment (Partie 2, II, 3, B, a, i).

Selon l'étude RODIN (328), cet effet protecteur n'apparaît pas directement mais seulement après les 20 premières journées d'exposition au FVIII. De plus, il concernerait surtout les patients dont la mutation du gène du FVIII est considérée comme à faible risque de survenue d'inhibiteurs.

Les informations relatives à l'effet protecteur d'une prophylaxie précoce et de longue durée sont cependant incomplètes à l'heure actuelle et nécessitent la réalisation d'études complémentaires.

b. **Les facteurs de risque liés au facteur VIII utilisé**

La nature du FVIII administré fait l'objet de nombreux débats quant à son implication en tant que facteur de risque de survenue d'inhibiteurs. L'origine du facteur (plasmatique ou recombinante), le type de facteur recombinant utilisé (seconde *versus* troisième génération) ainsi que la délétion du domaine B (Partie 2, I, 5, F, a, iii) dans le cas des facteurs recombinants, auraient une incidence sur le développement des anticorps neutralisants (189).

i. **L'origine du facteur VIII : plasmatique *versus* recombinant**

1) *Un point sur les données actuelles : état des lieux des études*

(336)

L'administration de FVIII à un patient hémophile, qu'il soit plasmatique ou recombinant, présente un risque d'induction d'inhibiteurs (24). De nombreuses études ont été réalisées sur des patients non préalablement traités afin d'évaluer le rôle de l'origine du facteur dans la survenue d'anticorps inhibiteurs. Cette évaluation présente une importance clinique majeure, du fait de son implication dans le choix des produits.

Les études multicentriques observationnelles : CANAL, RODIN ainsi que l'étude publiée en 2015 par l'EUHASS, n'ont pas montré de différences significatives par rapport à l'immunogénicité des facteurs plasmatiques et recombinants (**Tableau XX**). Cependant, il est important de souligner que le nombre de patients traités par un FVIII plasmatique au cours de ces études était bien plus faible que le nombre de patients sous FVIII recombinants, ce qui rend la comparaison difficile.

Différentes méta-analyses et revues systématiques, basées sur la comparaison d'études individuelles, ont présenté des résultats variables (337–339). Ces analyses sont confrontées à de nombreuses limitations (hétérogénéité au niveau des critères d'inclusion, des caractéristiques des études, ...), ce qui rend leur interprétation compliquée et insuffisante pour conclure à une différence d'immunogénicité entre les facteurs plasmatiques et recombinants.

La première étude randomisée, portant sur la comparaison du risque immunogène selon l'origine du facteur, a été publiée en mai 2016. Il s'agit de l'étude internationale multicentrique et prospective : SIPPET (*Survey of Inhibitors in Plasma-Products Exposed Toddlers*), qui a été réalisée de 2010 à 2015 sur 251 patients. Les résultats de l'étude (**Tableau XX**) ont montré que les FVIII recombinants étaient associés à une incidence

d'inhibiteurs plus élevée de 87% par rapport aux FVIII d'origine plasmatique contenant du vWF, chez des patients atteints d'hémophilie A sévère non préalablement traités (340). Le choix du produit semble donc être un facteur essentiel à la minimisation de l'apparition d'inhibiteurs chez ces patients.

Il est important de souligner que les FVIII recombinants récents (NovoEight[®], Nuwiq[®] et Kovaltry[®]/Iblias[®]), ceux à demi-vie prolongée ainsi que les FVIII d'origine plasmatique de haute pureté ne contenant pas de vWF n'ont pas fait l'objet de l'étude SIPPET. Les conclusions de cette étude ne sont donc pas applicables à ces produits.

TABLEAU XX : TABLEAU RÉCAPITULATIF DES RÉSULTATS DES ÉTUDES OBSERVATIONNELLES CANAL, RODIN ET EUHASS AINSI QUE DE L'ÉTUDE RANDOMISÉE SIPPET PAR RAPPORT AU DÉVELOPPEMENT D'INHIBITEURS SELON L'ORIGINE DU FVIII UTILISÉ.

Etude	Caractéristiques de l'étude	Nombre de patients ayant développé un inhibiteur (%) :		
		Au total	Sous FVIII plasmatique	Sous FVIII recombinant
CANAL (341)	Etude de cohorte, multicentrique, rétrospective.	82/316 (25,9%)	29/135 (21,5%)	53/181 (29,3%)
RODIN (187)	Etude multicentrique, prospective.	177/574 (30,8%)	29/88 (33,0%)	145/476 (30,5%)
EUHASS (342)	Etude multicentrique, prospective.	108/417 ⁸ (25,9%)	11/51 (21,6%)	97/366 (26,5%)
SIPPET (340)	Etude prospective, multicentrique, <u>randomisée</u> et contrôlée.	76/251 (30,3%)	29/125 (23,2%)	47/126 (37,3%)

⁸ Tous les patients non préalablement traités reportés dans l'EUHASS, y compris ceux inclus dans l'étude RODIN.

2) *L'origine potentielle de cette différence d'immunogénicité*

L'impact des modifications post-traductionnelles (Partie 2, I, 5, E, d, ii), caractérisées par un degré de sulfatation différent ainsi que par la présence d'épitopes non humains, pourrait en partie expliquer la différence d'immunogénicité observée entre les FVIII recombinants et ceux d'origine plasmatisque.

3) *L'impact sur la stratégie thérapeutique*

Selon la déclaration de la Fédération Mondiale de l'Hémophilie (FMH), la stratégie thérapeutique devrait être ajustée aux données de l'étude SIPPET (343) :

- Pour les patients hémophiles sévères n'ayant jamais été sous traitement substitutif, il est recommandé de débiter le traitement avec un FVIII d'origine plasmatisque contenant du vWF ou avec un FVIII recombinant.
- Pour les patients déjà traités par un FVIII recombinant, une poursuite du traitement en cours devrait être envisagée.
- Dans le cas où un seul FVIII est disponible, il faut l'administrer quelle qu'en soit l'origine.

ii. **Le type de facteur recombinant utilisé : « deuxième génération » versus « troisième génération »**

(312,344,345)

Trois études observationnelles (RODIN, FranceCoag et UKHCDO) ont récemment montré que le type de FVIII recombinant utilisé avait une influence sur le risque de survenue d'un inhibiteur (Partie 2, I, 5, G). Les produits de « deuxième génération », Kogenate[®] Bayer et Helixate[®] NexGen, ont été associés à une incidence plus élevée de développement d'anticorps neutralisants par rapport au FVIII de « troisième génération » Advate[®] (**Tableau XXI**), chez les patients non préalablement traités.

Ces produits (Advate[®] et Kogenate[®] Bayer/Helixate[®] NexGen) présentent deux caractéristiques différentes :

- Un acide aminé situé au niveau du domaine B est différent entre les séquences polypeptidiques des produits (344). Les deux variants sont néanmoins naturellement présents chez l'homme ainsi que dans les concentrés d'origine plasmatisque (344).

- Les cultures cellulaires utilisées diffèrent. Advate[®] est produit par des cellules CHO tandis que Kogenate[®] Bayer/Helixate[®] NexGen sont produits par des cellules BHK. On retrouve par conséquent des variations au niveau des modifications post-traductionnelles pouvant influencer l'immunogénicité de ces facteurs (Partie 2, I, 5, E, d, ii).

Aucun mécanisme physiopathologique permettant d'expliquer cette différence d'immunogénicité n'a cependant pu être mis en évidence à ce jour.

Les résultats de l'étude issue du programme de pharmacovigilance européen EUHASS ne confirment pas les résultats des études précédentes. L'incidence de développement d'inhibiteurs entre les deux types de produits est quasiment similaire dans cette étude (**Tableau XXI**).

L'ensemble de ces études observationnelles ne permettent pas de confirmer de manière absolue que les FVIII recombinants de « deuxième génération » (Kogenate[®] Bayer et Helixate[®] NexGen) sont associés à un risque plus élevé de développement d'inhibiteurs par rapport aux autres FVIII recombinants. Compte tenu de cette incertitude, leur place dans la stratégie thérapeutique a été modifiée en juillet 2015, comme nous l'avons vu précédemment (Partie 2, I, 5, G).

TABLEAU XXI : TABLEAU RÉCAPITULATIF DES RÉSULTATS DES ÉTUDES RODIN, FRANCECOAG, UKHCDO ET EUHASS PAR RAPPORT AU DÉVELOPPEMENT D'INHIBITEURS SELON LE TYPE DE FVIII UTILISÉ.

Etude	Nombre de patients ayant développé un inhibiteur sous FVIII recombinant de pleine longueur (%) :			
	Au total	1 ^{ère} génération ⁹	2 ^{ème} génération ¹⁰	3 ^{ème} génération ¹¹
RODIN (187)	177/574 (30,8%)	17/59 (28,8%)	64/183 (35,0%)	41/157 (26,1%)
UKHCDO (346)	118/407 (29,0%)	4/11 (36,4%)	45/128 (35,2%)	42/172 (24,4%)
EUHASS (342)	108/417 ¹² (25,9%)	1/24 (4,2%)	44/143 (30,8%)	37/141 (26,2%)

4. Les stratégies thérapeutiques actuellement utilisées lors d'une allo-immunisation

(16,312)

Le choix de la stratégie thérapeutique repose sur le dosage de l'inhibiteur par la méthode de Bethesda-Nijmegen (6). Le titre mesuré permet de faire la distinction entre les patients forts (> 5 unités Bethesda/mL) et faibles répondeurs (\leq 5 UB/mL), afin d'orienter la conduite thérapeutique (24).

Dans le cas des patients faibles répondeurs, le traitement substitutif de référence par les concentrés de FVIII préserve généralement son efficacité. Des doses plus élevées doivent cependant être administrées de manière à atteindre un taux plasmatique de FVIII suffisant, après neutralisation des inhibiteurs.

⁹ Recombinate®

¹⁰ Kogenate® Bayer et Helixate® NexGen

¹¹ Advate®

¹² Tous les patients non préalablement traités reportés dans l'EUHASS, y compris ceux inclus dans l'étude RODIN.

Les patients forts répondeurs ont développé une importante réponse immunitaire contre le FVIII. Le traitement substitutif de référence devient inefficace, il est alors nécessaire de mettre en place d'autres stratégies thérapeutiques :

- Le traitement des épisodes hémorragiques nécessite l'utilisation d'agents « by-passant » ayant la capacité d'activer le système de coagulation en l'absence de FVIII. Ces agents sont de deux types : le complexe prothrombique activé (Feiba[®]) et le facteur VII activé recombinant (NovoSeven[®]). Le complexe prothrombique activé est un concentré d'origine plasmatique contenant notamment les facteurs II, IX, X, VII et VIII sous des formes activées et non activées.
- La mise en place d'un protocole d'induction de tolérance immune (ITI) est également nécessaire afin d'aboutir à l'éradication de l'inhibiteur sur le long terme. Il repose sur l'administration régulière de doses plus ou moins élevées de FVIII pendant plusieurs mois voire quelques années. L'ITI est efficace pour environ 70 à 80 % des patients immunisés dans le cas de l'hémophilie A (347).

**PARTIE 3 : L'AVENIR
THÉRAPEUTIQUE DE
L'HÉMOPHILIE A**

I. La thérapie génique

(283,349,350)

L'hémophilie n'est pas une maladie curable à l'heure actuelle, le traitement substitutif permet de prévenir ou de traiter les épisodes hémorragiques mais ne permet pas de guérir la pathologie. C'est dans cet espoir que de vastes travaux sur la thérapie génique ont été entrepris. Le principe de cette technique consiste, de manière très simplifiée, à transférer une copie fonctionnelle du gène du FVIII à certaines cellules du patient de manière à induire une synthèse endogène persistante. L'hémophilie est une maladie monogénique, il s'agit donc d'une candidate idéale pour la thérapie génique. De plus, le fait qu'une légère augmentation du taux plasmatique du facteur déficitaire suffise à améliorer le phénotype de la pathologie concourt également à faire de l'hémophilie un modèle de choix pour cette thérapie.

La modification des cellules peut se faire selon différentes approches (**Figure 23**). Cependant, la plupart des thérapies étudiées ne sont qu'à l'aube de leur développement clinique.

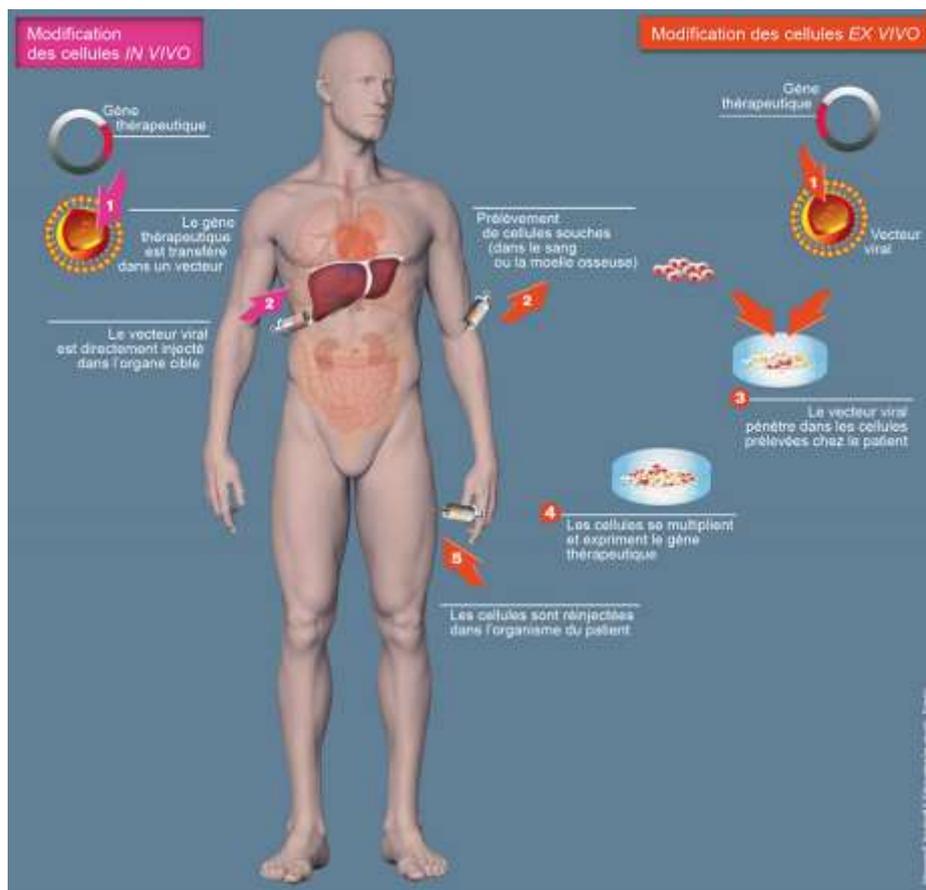


FIGURE 23 : LES DEUX PRINCIPALES STRATÉGIES DE THÉRAPIE GÉNIQUE : LA MODIFICATION DES CELLULES *IN VIVO* OU *EX VIVO* (349)

1. La modification des cellules *in vivo* à travers un vecteur viral : le virus associé à l'adénovirus (AAV)

(348,350)

Cette approche se base sur le transfert du gène d'intérêt via un vecteur viral : le virus associé à l'adénovirus (AAV). Ce vecteur est spécifiquement dirigé vers les hépatocytes dans le but de restaurer ou d'augmenter la production hépatique de FVIII fonctionnels de manière permanente.

Dans la pratique, la mise en place de cette technique est un processus très complexe qui se heurte à trois limites majeures (348) :

- La taille du transgène est restreinte et ne doit pas excéder 5 kb environ (351). C'est une limitation non négligeable dans le cas du FVIII dont le gène s'étend sur 186 kb (19). Des modifications telles que la délétion du domaine B ont été apportées afin de surpasser cette limite (282).
- Les difficultés par rapport à l'efficacité du transfert génétique et à l'expression du gène au sein de la cellule transfectée. En effet, des résultats cliniques ont montré que l'expression du gène n'était pas permanente. Ceci s'expliquerait par le fait que le génome viral porteur du gène d'intérêt se retrouve principalement sous une forme épisomale pouvant rapidement être perdue lors de la division cellulaire (350). L'utilisation de doses relativement élevées de produit est donc nécessaire pour obtenir une expression efficace du transgène.
- Les effets secondaires liés à l'administration de fortes doses de vecteurs. Un effet hépatotoxique a été observé (352).

Différentes thérapies géniques se basant sur la vectorisation par AAV sont en cours d'étude (**Tableau XXII**). BMN 270 est le premier vecteur AAV-facteur VIII à avoir été testé sur l'homme, l'essai clinique de phase I/II a débuté en 2015. Cette thérapie, initialement sous licence détenue par l'*University College* de Londres et *St. Jude Children's Research Hospital*, est développée par l'entreprise américaine Biomarin. Il s'agit d'une molécule d'ADN simple brin codant pour le FVIII à domaine B délété, englobée dans une capsid d'AAV5 et produite par un système d'expression propre aux cellules d'insectes : le baculovirus.

Des résultats intermédiaires concernant l'essai de phase I/II pour l'hémophilie A ont été présentés par Biomarin lors du congrès de la WFH (*World Federation of Hemophilia*) de juillet 2016. Sur les sept patients traités avec une dose élevée de BMN 270 (6×10^{13} vg/kg), six avaient des taux plasmatiques de FVIII supérieurs à 50 % et le septième supérieur à 10%. La durée d'observation après traitement était comprise entre 12 et 28 semaines. Le

taux annualisé médian de saignements a considérablement diminué, il est passé de 20 à 5. De plus, aucun évènement indésirable grave, ni aucune augmentation significative des taux d'enzymes hépatiques, n'ont été observés. Les patients ayant reçu des doses élevées ont été traités de manière concomitante par des stéroïdes afin de lutter contre une réaction immunitaire potentielle (353).

Ces résultats sont très prometteurs pour l'avenir du traitement de l'hémophilie A. Il est cependant important de souligner qu'une partie de la population (estimation : 10 - 20 %) est immunisée contre le vecteur AAV5 et ne peut donc pas être traitée avec cette forme de thérapie génique.

L'essai clinique va se poursuivre, la phase IIb visant à évaluer la dose optimale de BMN 270 à administrer devrait débuter au courant de l'année 2017.

TABLEAU XXII : LES THÉRAPIES GÉNIQUES PAR MODIFICATION DES CELLULES *IN VIVO* ACTUELLEMENT À L'ÉTUDE (354)

Produit	Société	Vecteur	Gène thérapeutique	Production	Etude clinique – Phase I/II
BMN 270	BioMarin	AAV5	FVIII à domaine B délété	Baculovirus	2015
SPK-8011	Spark Therapeutics	Vecteur AAV de bio-ingénierie	FVIII à domaine B délété	HEK-293	Décembre 2016
DTX-201	Dimension Therapeutics /Bayer	AAV	FVIII à domaine B délété	Cellules HeLa ¹³	Prévue pour 2017
BAX 888	Shire	AAV8	FVIII à domaine B délété	HEK-293	Prévue pour 2017
SB-525	Sangamo BioSciences	AAV6	FVIII à domaine B délété	Baculovirus	Prévue pour 2017

¹³ Première lignée de cellules malignes humaines cultivée, issue du carcinome cervical d'une patiente nommée Henrietta Lacks, d'où le nom « HeLa ».

2. La modification des cellules *ex vivo*

(282,348)

Le principe de cette technique est de transférer un gène d'intérêt dans les cellules souches prélevées chez un individu, puis de les lui réimplanter. Les cellules souches, par leurs capacités d'auto-renouvellement illimitées et de différenciation en différents types cellulaires spécialisés, permettraient un transfert stable et unique du gène. Cette technique est donc envisagée dans le cadre du traitement de l'hémophilie A, afin de permettre une production durable de FVIII. Les cellules souches hématopoïétiques sont de bonnes candidates puisqu'elles permettraient de sécréter le FVIII directement dans la circulation sanguine.

Le transfert de gène est assuré par un vecteur lentiviral qui se différencie du vecteur AAV par sa plus grande capacité de stockage ainsi que par son intégration dans le génome de la cellule cible. Il présente également une bonne efficacité et une bonne tolérance.

D'après des études faites sur des modèles murins, cette technique *ex vivo* pourrait être particulièrement efficace chez les patients hémophiles avec inhibiteurs (355,356).

3. L'ingénierie ciblée des génomes

(350,351,358)

L'ingénierie ciblée des génomes est une approche récente qui permet non seulement de corriger ou d'inactiver un gène délétère mais aussi d'insérer un gène d'intérêt directement au sein de la cellule (**Figure 24**). C'est une technique très précise qui repose sur l'utilisation d'enzymes dénommées « nucléases » : les nucléases à doigt de zinc (ZFN pour *zinc finger nucleases*), les nucléases effectrices de type activateur de transcription (TALEN pour *transcription activator-like effector nucleases*), les méganucléases ainsi que le système CRISPR–Cas9 (CRISPR pour *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*). Ces enzymes sont capables de reconnaître et de couper l'ADN à un endroit précis. Les systèmes de réparation de la cellule vont ensuite entrer en jeu afin de ressouder l'ADN soit par recombinaison homologue, soit par jonction d'extrémités non homologues (**Figure 24**).

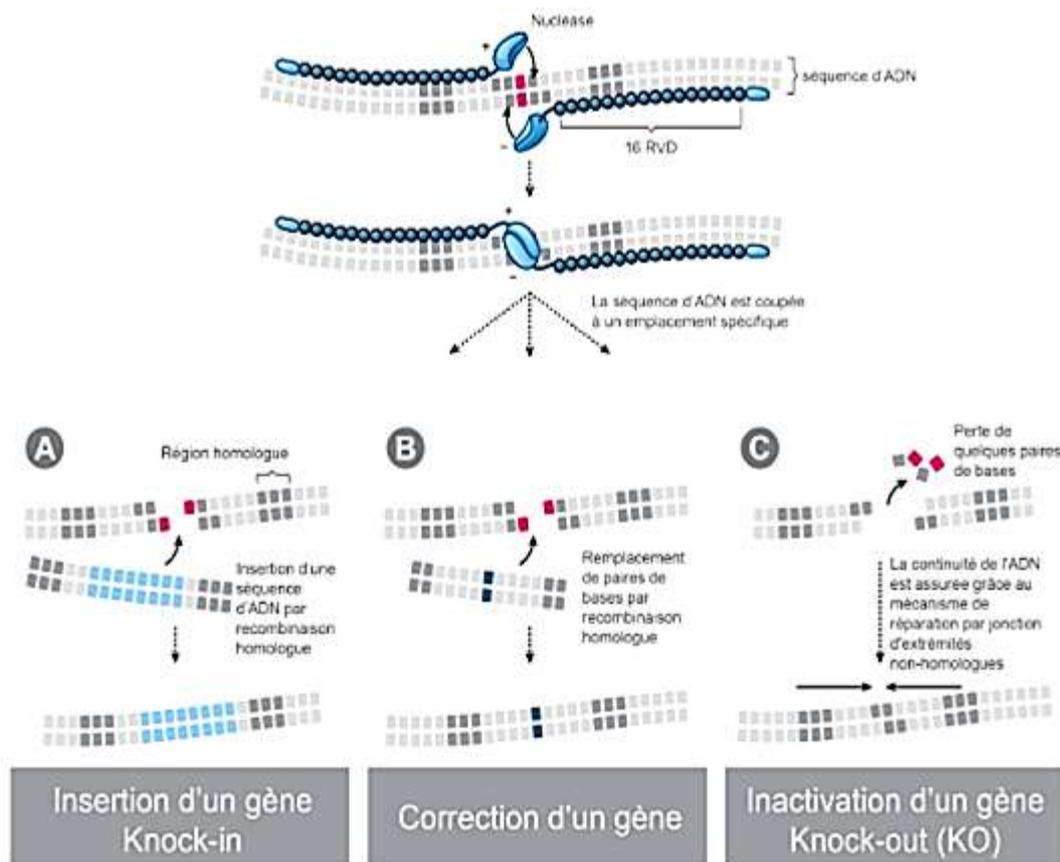


FIGURE 24 : L'INGÉNIERIE CIBLÉE DES GÉNOMES (358)

Cette technique, possible aussi bien *in vivo* qu'*ex vivo*, fait l'objet de différentes études dans le domaine de l'hémophilie. En ce qui concerne l'hémophilie A, plusieurs stratégies sont étudiées :

- L'insertion d'un gène fonctionnel du FVIII au sein du gène de l'albumine, à l'aide de nucléases à doigt de zinc. Le gène de l'albumine est fortement exprimé au niveau des cellules hépatiques. Ainsi, une perte d'expression au sein d'un faible pourcentage de cellules n'aurait pas de conséquences néfastes pour le patient. Des résultats encourageants ont été obtenus sur des modèles murins (359).
- La correction des mutations de type inversion (Partie 1, IV, 3), responsables d'environ 50% des cas d'hémophilie A sévère (357). Des études sur des cellules souches pluripotentes induites, provenant de patients atteints d'hémophilie A liée à ce type de mutation, ont été réalisées en utilisant le système CRISPR-Cas9. Les cellules souches modifiées et différenciées en cellules endothéliales exprimaient le gène du FVIII *in vitro*. De plus, une transplantation de ces cellules sur des modèles

murins atteints d'une forme d'hémophilie A sévère a permis d'améliorer leur phénotype hémorragique (360).

L'ingénierie ciblée du génome est donc une technique très prometteuse. L'état actuel des connaissances est cependant limité. La détermination de l'efficacité et de la sécurité de cette technique est un préalable indispensable à son utilisation chez l'homme.

II. Les stratégies thérapeutiques alternatives

(232,282)

Parallèlement aux recherches faites sur la thérapie génique, des stratégies thérapeutiques alternatives, permettant la restauration de l'hémostase sans avoir recours à une thérapie substitutive, sont à un stade avancé du développement clinique. Les données cliniques préliminaires relatives à ces thérapies sont présentées dans le **tableau XXIII**.

Ces nouvelles stratégies reposent sur deux approches différentes :

- Imiter l'activité cofacteur du FVIII par l'utilisation d'un anticorps bispécifique : ACE910.
- Limiter l'action de certains inhibiteurs physiologiques de la coagulation : l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI) dans le cas de l'anticorps NN-7415 et l'antithrombine (AT) dans le cas de l'ARN interférant ALN-AT3.

1. Les molécules actuellement à l'étude

A. Anticorps bispécifique : ACE 910 (*emicizumab*)

(233,253,283)

Un anticorps bispécifique humanisé imitant le rôle de cofacteur du FVIII a été élaboré par l'entreprise japonaise Chugai Pharmaceutical Co., il s'agit de l'*emicizumab* ou ACE 910. Cet anticorps va se lier aux FIXa et X, ce qui va entraîner une proximité étroite entre ces facteurs de manière à favoriser l'activation du FX et l'amplification de la génération de thrombine.

Au niveau de la structure, l'*emicizumab* est très différent du FVIII et n'est donc pas impacté par la présence d'inhibiteurs. Cette molécule peut donc être utilisée que le patient hémophile soit immunisé ou non.

Les résultats de l'essai clinique de phase I/II ont montré qu'un traitement prophylactique, basé sur une administration sous-cutanée hebdomadaire d'*emicizumab*, permettait de réduire de manière considérable le nombre d'hémorragies annuelles chez les patients avec ou sans inhibiteurs. Ainsi, dans la cohorte ayant reçu les doses les plus importantes, le taux annualisé médian de saignements est passé de 15,2 à 0,0 (361).

L'*emicizumab* fait actuellement l'objet d'un essai clinique de phase III évaluant l'efficacité, la sécurité et les données pharmacocinétiques du traitement prophylactique chez des patients hémophiles avec inhibiteurs (HAVEN 1).

B. Anticorps anti-TFPI

(233,283,363)

L'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI pour « *tissue factor pathway inhibitor* ») est l'inhibiteur naturel majeur de la phase d'initiation de la coagulation. Son action inhibitrice est dirigée non seulement contre l'activité du complexe VIIa – facteur tissulaire mais aussi contre celle du FXa.

Le TFPI présente différents domaines de Kunitz ayant chacun une fonction particulière. Le domaine de Kunitz II se fixe au FXa et l'inhibe dans un premier temps puis le complexe TFPI-Xa se fixe au complexe VIIa – facteur tissulaire, via l'interaction du domaine de Kunitz I, en inhibant son activité (363).

Etant donné qu'une inhibition du TFPI pourrait augmenter la génération de thrombine malgré un déficit en FVIII, différents anticorps dirigés contre ce facteur ont été développés :

- Concizumab : mAb-2021 ou NN-7415

L'entreprise pharmaceutique Novo Nordisk a élaboré un anticorps monoclonal humanisé et bispécifique. Celui-ci présente une grande affinité pour le domaine de Kunitz II du TFPI, impliqué dans l'inhibition du FXa (282). Par son action, NN-7415 va permettre de bloquer l'interaction entre le FXa et le TFPI.

Les résultats de l'essai clinique de phase I montrent une décroissance de la concentration plasmatique de TFPI libres de manière dose-dépendante, aussi bien chez les patients sains que chez les patients hémophiles (364).

- BAY 1093884

L'anticorps monoclonal humanisé BAY 1093884 a été développé par la société allemande Bayer et fait l'objet de sa première étude clinique sur l'homme. Cet essai clinique a débuté en octobre 2015 (365).

C. ARN interférant : ALN-AT3 (fitusiran)

(236,283,367)

L'antithrombine (AT) est, comme le TFPI, un inhibiteur physiologique de la coagulation. Il inhibe principalement la thrombine et le FXa, mais agit aussi sur les formes activées des facteurs IX, XI et XII.

L'entreprise américaine Alnylam Pharmaceuticals a développé *fitusiran*, un petit ARN interférant (siRNA pour *small interfering RNA*) permettant de diminuer la synthèse hépatique

d'AT par extinction transcriptionnelle (TGS pour *transcriptional gene silencing*) du gène en question. Cette molécule a été créée dans le but de générer une quantité suffisante de thrombine pour restaurer une hémostase correcte chez les patients hémophiles (A ou B) avec ou sans inhibiteurs. Le tropisme hépatique a été rendu possible par la conjugaison de l'ARNi avec une molécule de N-acétylgalactosamine, le ligand des récepteurs asialoglycoprotéiques exprimés au niveau des hépatocytes (367).

Les résultats intermédiaires de l'essai clinique de phase I/II datant de décembre 2016 montrent qu'une administration sous-cutanée mensuelle de *fitusiran* à des doses de 50 ou 80 mg entraîne une diminution du taux d'AT d'environ 80% chez les patients hémophiles avec inhibiteurs. De plus, une réduction considérable du taux annualisé de saignements a été observée dans cette population. Le taux médian est en effet passé de 31 à 0 pour l'ensemble des 16 patients étudiés (368).

2. Etat des lieux des principales données cliniques actuelles

TABLEAU XXIII : ETAT DES LIEUX DES PRINCIPALES DONNÉES CLINIQUES ACTUELLES CONCERNANT LES STRATÉGIES THÉRAPEUTIQUES ALTERNATIVES

	Anticorps bispécifique : ACE 910 (<i>emicizumab</i>)	Anti-TFPI : NN-7415 (<i>concizumab</i>) (364)	ARNi : ALN-AT3 (<i>fitusiran</i>) (368)
Société	Roche - Chugai Pharmaceutical Co.	Novo Nordisk	Alnylam Pharmaceuticals
Mode d'action	Anticorps bispécifique qui se lie aux FIXa et X et imite l'action du FVIII	Anticorps monoclonal anti-TFPI	ARN interférant visant à bloquer la production d'antithrombine (AT)
Indications possibles – Hémophilie	Hémophilie A avec ou sans inhibiteur	Hémophilie A et B avec ou sans inhibiteur	Hémophilie A et B avec ou sans inhibiteur
Fréquence d'administration étudiée	1 à 2 fois par semaine, voire 1 fois par mois (354)	Jusqu'à 1 fois par semaine (1000 - 3000 µg/kg)	Hebdomadaire à mensuelle
Administration	Sous-cutanée (361,369)	Sous-cutanée	Sous-cutanée
Survenue d'un anticorps neutralisant lors de l'étude	1 cas lors de l'étude de phase I réalisée sur une population saine (369) Aucun cas reporté lors de l'étude de phase I/II sur des patients hémophiles (361)	Pas de donnée	Aucun cas reporté
Complication(s) thrombo-embolique(s)	<u>02/10/16</u> : 2 événements thromboemboliques et 2 microangiopathies thrombotiques (MAT). <u>21/02/17</u> : Hémorragie rectale sévère suivie d'une MAT chez un même patient.	Pas de donnée	Aucun cas reporté
Phase essai clinique	Phase III (HAVEN 1)	Phase I terminée en mars 2017	Phase I/II

Des précisions concernant les complications thromboemboliques liées à l'utilisation de l'*emicizumab* sont nécessaires. Les deux évènements thromboemboliques ainsi que les deux microangiopathies thrombotiques (MAT), décrits en novembre 2016, ont été observés lors de l'administration concomitante d'un agent « by-passant » avec l'*emicizumab* dans le but de traiter un épisode hémorragique. Ces évènements seraient uniquement survenus lors de l'utilisation d'un concentré de protéines du complexe prothrombique activé (APCC) Feiba[®], et non lors de l'utilisation de FVII activé recombinant (NovoSeven[®]) comme seul agent « by-passant » (370). Un effet synergique de l'*emicizumab* et du Feiba[®] aboutissant à une production excessive de thrombine a été observé *in vitro* et pourrait en partie expliquer la survenue de ces complications thromboemboliques (371). De plus, il est important de souligner que Feiba[®] contient les substrats de l'*emicizumab*, à savoir les FIXa et X.

Un nouveau cas de microangiopathie thrombotique a été annoncé en février 2017. Il serait apparu suite à l'utilisation d'agents « by-passant », incluant des doses répétées du complexe prothrombique activé. Le décès du patient a été annoncé durant le mois de février et fait l'objet d'une enquête pour en déterminer la cause exacte. Dans ce contexte, le laboratoire recommande d'éviter de recourir au complexe prothrombique activé lors d'un traitement avec l'*emicizumab*, si cela est possible (372).

3. Les avantages de ces stratégies et leur implication clinique potentielle

(307,318)

Au vu des données cliniques préliminaires, ces nouvelles stratégies thérapeutiques semblent présenter de nombreux avantages par rapport aux traitements substitutifs actuels :

- Elles possèdent tout d'abord une bonne biodisponibilité par voie sous-cutanée, permettant d'éviter les complications liées aux injections intraveineuses fréquentes.
- Un allègement du schéma prophylactique, avec une fréquence d'injections hebdomadaire voire mensuelle, semble également possible avec ces produits au vu de leur demi-vie particulièrement longue.
- Leur efficacité chez les patients hémophiles, indépendamment de la présence d'inhibiteurs, est un atout majeur pour les patients immunisés dont les options thérapeutiques sont actuellement limitées.
- L'anticorps monoclonal anti-TFPI (NN-7415) et l'ARN interférant visant à bloquer la production d'antithrombine (ALN-AT3) ont la particularité de pouvoir être utilisés efficacement chez l'ensemble des patients hémophiles, qu'ils soient atteints d'une

hémophilie A ou B. Ils pourraient même avoir une efficacité dans d'autres troubles hémorragiques.

La combinaison de ces avantages fait de ces molécules des avancées thérapeutiques potentielles considérables. Les études cliniques actuelles et futures sont nécessaires à la confirmation de l'efficacité ainsi qu'à l'évaluation de la sécurité de ces produits. Les thérapies interagissant sur le système inhibiteur naturel de la coagulation pourraient présenter un risque thromboembolique accru qu'il est nécessaire d'évaluer.

L'apparition de ces produits laisse présager un changement drastique de la stratégie thérapeutique actuelle de l'hémophilie. Ils constituent une alternative intéressante, que les patients soient immunisés ou non, contournant les limites du schéma prophylactique actuel et réduisant potentiellement l'immunogénicité liée au traitement substitutif. De plus, la possibilité d'une administration sous-cutanée est un atout majeur, notamment pour les patients dont l'accès veineux est difficile.

CONCLUSION

La prise en charge de l'hémophilie a beaucoup évolué durant les 50 dernières années. Le traitement des hémorragies, initialement limité à la transfusion de sang total puis de plasma frais, a subi une avancée considérable avec l'arrivée des concentrés de FVIII d'origine plasmatique. Malheureusement, le début des années 80 est marqué par le drame du sang contaminé mettant fin à l'optimisme lié à l'utilisation de ces facteurs. A partir de ce moment, la sécurité des produits dérivés du sang devient une priorité absolue menant au développement de concentrés plasmatiques de très haute pureté.

L'introduction des concentrés de FVIII recombinants dans les années 90 représente un progrès thérapeutique immense. Leur utilisation permet non seulement de réduire le risque de transmission d'agent infectieux mais aussi de généraliser le traitement prophylactique, associé à une amélioration du pronostic orthopédique. Ce régime prophylactique est cependant relativement contraignant, il nécessite en moyenne 3 injections par semaine (224), du fait de la faible demi-vie des concentrés de FVIII. C'est dans ce contexte que les FVIII recombinants à demi-vie prolongée viennent de faire leur apparition sur le marché des produits anti-hémophiliques.

La complication majeure du traitement substitutif actuel, caractérisé par l'utilisation de concentrés de FVIII d'origine plasmatique ou recombinante, n'est plus liée à la transmission d'agents infectieux mais au développement d'inhibiteurs limitant l'efficacité du traitement. La recherche de méthodes alternatives permettant de contourner la présence d'inhibiteurs a conduit au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, qui ne sont plus basées sur le remplacement du FVIII déficitaire. Ces thérapies présentent de nombreux avantages tels que la possibilité d'administration par voie sous-cutanée, la longue demi-vie et l'efficacité chez les patients hémophiles qu'ils soient immunisés ou non. Elles font actuellement l'objet d'études cliniques dont les résultats sont très prometteurs pour l'avenir thérapeutique. En parallèle, la thérapie génique constitue une voie de recherche pouvant offrir un traitement curatif définitif de la pathologie.

L'émergence de ces nouveaux traitements potentiels ouvre de nouvelles perspectives d'avenir aux patients hémophiles. Elle apporte l'espoir d'une optimisation considérable de la prise en charge de l'hémophilie A à travers le monde. Le pourcentage mondial de patients hémophiles ne bénéficiant pas d'un traitement adapté est estimé à 75% (373), l'amélioration de l'accès aux thérapies anti-hémophiliques est donc un défi majeur à l'heure actuelle.

BIBLIOGRAPHIE

1. Négrier C. Orphanet : Forme symptomatique d'hémophilie A de la femme porteuse [En ligne]. Paris : Orphanet ; 2016 [cité le 13 oct 2016]. Disponible sur: http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=fr&Expert=177926
2. Institut de veille sanitaire, Centre coordinateur du Réseau FranceCoag. Protocole V2 du Réseau FranceCoag [En ligne]. Saint-Maurice : InVS; 2008 [cité le 13 oct 2016]. Disponible sur: https://www.francecoag.org/SiteWebPublic/pdfs/1_Protocole_general/Protocole_genera l.pdf
3. Réseau FranceCoag. Statistiques Nationales - Nombre de patients actuellement suivis dans le Réseau FranceCoag [En ligne]. Saint-Maurice : InVS ; 2017 [cité le 24 févr 2017]. Disponible sur: <https://www.francecoag.org/SiteWebPublic/public/StatGlobale.action>
4. Négrier C. Orphanet : Hémophilie A [En ligne]. Paris : Orphanet ; 2009 [cité le 23 oct 2016]. Disponible sur: http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Expert=98878&Lng=FR
5. Orphanet. Prévalence des maladies rares : Données bibliographiques. Les cahiers d'Orphanet, Série Maladies Rares, Novembre 2016, Numéro 1 : Classement par ordre alphabétique des maladies ou groupes de maladies [En ligne]. [cité le 24 févr 2017]; Disponible sur: http://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/FR/Prevalence_des_maladies_rares_par_ordre_alphabetique.pdf
6. Haute Autorité de Santé. Hémophilies et affections constitutionnelles de l'hémostase graves. Protocole national de diagnostic et de soins pour une maladie rare. Guide affection longue durée [En ligne]. Saint-Denis La Plaine : HAS; 2007 [cité le 13 oct 2016]. Disponible sur: http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/07-030_hemophilies-guide_edite_sans_lap.pdf
7. Lambert T, Rafowicz A, Dommergues J-P. Enfant hémophile. Dans : EMC - Pédiatrie - Maladies infectieuses. 1999 : p. 1-8. [Article 4-080-B-20].
8. Caritoux L. Les manifestations hémorragiques de l'hémophilie et leurs traitements. Cahiers de la puéricultrice. Mai 2007;(207):16-9.
9. Guérois C. L'hémophilie aujourd'hui. Kinésithérapie, la revue. Avril 2009;9(88):32-6.
10. Alcalay M, Durand G. Manifestations musculaires, articulaires et osseuses de l'hémophilie. Dans : EMC - Appareil locomoteur. 2008 : p. 1-15. [Article 14-280-A-10].
11. Drouet L. Troubles de l'hémostase et de la coagulation - Orientation diagnostique. La Revue du Praticien. Avril 2003;(8):873-82.
12. Camus V. Les facteurs VIII dans le traitement de l'hémophilie A [thèse]. Nancy : Université de Lorraine; 2000.
13. Fédération mondiale de l'hémophilie. Lignes directrices pour la prise en charge de l'hémophilie - 2ème édition [En ligne]. Montréal : FMH; 2012 [cité le 13 oct 2016]. Disponible sur: <http://www1.wfh.org/publication/files/pdf-1489.pdf>

14. Centre National Hospitalier d'Information sur le Médicament. Facteurs antihémophiliques : traitement substitutif de l'hémophilie A et B Évaluation clinique Évaluation pharmaco-économique - Tome XXIV, 3-4 [En ligne]. Paris : CNHIM; 2003 [cité le 13 oct 2016]. Disponible sur: <http://www.cnhim.org/Dossier%20du%20CNHIM%20-%20PDF/dossiers/DOSSIER%202003%20n%B03-4.pdf>
15. Swystun LL, James PD. Genetic diagnosis in hemophilia and von Willebrand disease. *Blood Reviews*. 2017;31(1):47-56.
16. Chambost H, Meunier S. Enjeux d'une prise en charge pédiatrique précoce de l'hémophilie sévère. *Archives de Pédiatrie*. nov 2006;13(11):1423-30.
17. Société Canadienne de l'Hémophilie. L'hérédité de l'hémophilie [En ligne]. Montréal (Québec): SCH; 2016 [cité le 20 oct 2016]. Disponible sur: <http://www.hemophilia.ca/fr/troubles-de-la-coagulation/hemophilie-a-et-b/l-heredite-de-l-hemophilie/>
18. Lannoy N, Hermans C. Principles of genetic variations and molecular diseases: applications in hemophilia A. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;104:1-8.
19. J.-F. Schved. Hémophilie : physiopathologie et bases moléculaires. Dans : EMC-Hématologie. 2008 : p. 1-14. [Article 13-021-B-10].
20. Trossaert M. Etude phénotypique et génotypique de patients hémophiles A modérés ou atténués avec anomalie qualitative : rapports structure / fonction du facteur VIII [thèse en ligne]. [Nantes]: Université de Nantes - Faculté de Médecine de Nantes; 2008 [cité le 20 oct 2016]. Disponible sur: <http://archive.bu.univ-nantes.fr/pollux/show.action?id=d419cf7d-5c0d-4ff8-9dc2-eb8ec96ddd97>
21. Chen M, Chang S-P, Ma G-C, Lin W-H, Chen H-F, Chen S-U, et al. Preimplantation genetic diagnosis of hemophilia A. *Thrombosis Journal*. 2016;14 Suppl 1:33.
22. Graw J, Brackmann H-H, Oldenburg J, Schneppenheim R, Spannagl M, Schwaab R. Haemophilia A: from mutation analysis to new therapies. *Nat Rev Genet*. 2005;6(6):488-501.
23. The European Association for Haemophilia and Allied Disorders (EAHAD). Factor VIII (F8) Variant Database [En ligne]. Londres : EAHAD; 2016 [cité le 20 oct 2016]. Disponible sur: <http://www.factorviii-db.org/statistics.html.php>
24. Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé. Développement des inhibiteurs et prise en charge chez les patients hémophiles traités par facteur VIII ou IX d'origine plasmatique ou recombinante [En ligne]. Saint-Denis : AFSSAPS; 2006 [cité le 20 oct 2016]. Disponible sur: http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/ec94eda837a7c67a8faaa130b9f211dc.pdf
25. Lakich D, Kazazian HH, Antonarakis SE, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nat Genet*. 1993;5(3):236-41.
26. Naylor JA, Buck D, Green P, Williamson H, Bentley D, Giannelli F. Investigation of the factor VIII intron 22 repeated region (int22h) and the associated inversion junctions. *Human Molecular Genetics*. 1995;4(7):1217-24.

27. Bolton-Maggs PH, Pasi KJ. Hemophilias A and B. *The Lancet*. 2003;361:1801-9.
28. Fang H, Wang L, Wang H. The protein structure and effect of factor VIII. *Thromb Res*. 2007;119(1):1-13.
29. Church WR, Jernigan RL, Toole J, Hewick RM, Knopf J, Knutson GJ, et al. Coagulation factors V and VIII and ceruloplasmin constitute a family of structurally related proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984;81(22):6934-7.
30. Toole JJ, Pittman DD, Orr EC, Murtha P, Wasley LC, Kaufman RJ. A large region (approximately equal to 95 kDa) of human factor VIII is dispensable for in vitro procoagulant activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. août 1986;83(16):5939-42.
31. Pipe SW. Functional roles of the factor VIII B domain. *Haemophilia*. nov 2009;15(6):1187-96.
32. Shima M, Scandella D, Yoshioka A, Nakai H, Tanaka I, Kamisue S, et al. A factor VIII neutralizing monoclonal antibody and a human inhibitor alloantibody recognizing epitopes in the C2 domain inhibit factor VIII binding to von Willebrand factor and to phosphatidylserine. *Thromb Haemost*. 1 mars 1993;69(3):240-6.
33. Arruda VR. The search for the origin of factor VIII synthesis and its impact on therapeutic strategies for hemophilia A. *Haematologica*. juill 2015;100(7):849-50.
34. Orlova NA, Kovnir SV, Vorobiev II, Gabibov AG, Vorobiev AI. Blood Clotting Factor VIII: From Evolution to Therapy. *Acta Naturae*. 2013;5(2):19-39.
35. Lapalud P, Schved J-F, Granier C, Villard-Saussine S, Lavigne-Lissalde G. Les anticorps anti-FVIII : caractérisation, mécanismes d'action et méthodes de détection. *Hématologie*. 2008;14(6):453-66.
36. Schved J-F. Maladies hémorragiques constitutionnelles. *La Revue du Praticien*. Mai 2015;65(5):613-7.
37. Lebreton A, Lavigne G. Les anticorps anti-FVIII et anti-FIX. *Revue Francophone des Laboratoires*. juin 2012;2012(443):55-62.
38. Rauch A, Caron C, Susen S, Goudemand J. Facteur von Willebrand et maladie de Willebrand : nouvelles approches. *Revue Francophone des Laboratoires*. 1 juin 2014;2014:53-63.
39. Koedam JA, Hamer RJ, Beeser-Visser NH, Bouma BN, Sixma JJ. The effect of von Willebrand factor on activation of factor VIII by factor Xa. *Eur J Biochem*. 30 avr 1990;189(2):229-34.
40. Koppelman SJ, Koedam JA, van Wijnen M, Stern DM, Nawroth PP, Sixma JJ, et al. von Willebrand factor as a regulator of intrinsic factor X activation. *J Lab Clin Med*. avr 1994;123(4):585-93.
41. Chamouard V. Historique du traitement de l'hémophilie. *STV*. 2016;28:9.
42. George LA, Camire RM. Profile of efralocog alfa and its potential in the treatment of hemophilia A. *Journal of Blood Medicine*. 2015;2015:131-41.

43. European Medicines Agency (EMA). Elocta [En ligne]. Londres : EMA ; 2016 [cité le 1 mars 2017]. Disponible sur:
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/003964/human_med_001928.jsp&mid=WC0b01ac058001d124
44. Franchini M, Mannucci PM. Past, present and future of hemophilia: a narrative review. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2012;7(1):1-8.
45. Schramm W. The history of haemophilia - a short review. *Thromb Res*. nov 2014;134 Suppl 1:S4-9.
46. Mannucci PM. Back to the future: a recent history of haemophilia treatment. *Haemophilia*. juill 2008;14 Suppl 3:10-8.
47. Négrier C. Le traitement de l'hémophilie : des dérivés du plasma à la thérapie génique. *Hématologie*. 1996;2(1):17-27.
48. Lane S. Hæmorrhagic Diathesis. *The Lancet*. 31 oct 1840;35(896):185-8.
49. Landsteiner K. Über Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes. *Wien Klin Wochenschr*. 1901;14:1132-4.
50. Ottenberg R, Kaliski D. Die Gefahren der Transfusionen und deren Verhütung. *DtschMed Wochenschr*. 1913;39:2243-7.
51. Feissly R. Beiträge Zum Hämophilie-Problem. *Klinische Wochenschrift*. 1925;4(18):879.
52. Patek AJ, Taylor FHL. The blood in hemophilia. *Science*. 1936;84:271-272.
53. Patek AJ Jr, Taylor FHL. Hemophilia. II. Some properties of a substance obtained from normal human plasma effective in accelerating the coagulation of hemophilic blood. *J Clin Invest*. 1 janv 1937;16(1):113-24.
54. Cohn EJ, Strong LE, Hughes WL, Mulford DJ, Ashworth JN, Melin M, et al. Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. IV. A System for the Separation into Fractions of the Protein and Lipoprotein Components of Biological Tissues and Fluids^{1a,b,c,d}. *J Am Chem Soc*. 1 mars 1946;68(3):459-75.
55. Kekwick RA, Wolf P. A concentrate of human antihæmophilic factor; its use in six cases of hæmophilia. *The Lancet*. 30 mars 1957;272(6970):647-50.
56. Soulier JP. A new adsorption agent for coagulation factors. *J Clin Pathol*. 1959;12:303-6.
57. Blombäck B, Blombäck M, Nilsson IM. Note on the purification of human antihemophilic globulin. *Acta Chem Scand*. 1958;12:1878-1878.
58. Blombäck M, Nilsson IM. Treatment of hemophilia A with human antihemophilic globulin. *Acta Med Scand*. 30 juin 1958;161(4):301-21.
59. Macfarlane RG, Biggs R, Bidwell E. Bovine antihæmophilic globulin in the treatment of hæmophilia. *The Lancet*. 26 juin 1954;266(6826):1316-9.
60. Pool JG, Gershgold EJ, Pappenhagen AR. High-potency Antihæmophilic Factor Concentrate prepared from Cryoglobulin Precipitate. *Nature*. 18 juill 1964;203:312-312.

61. Schved J-F, Meyer Michel S, Auzanneau M. Histoire de l'hémophilie et de ses traitements. *Hémophilie*. sept 2005;(171):11-4.
62. Franchini M, Mannucci PM. Hemophilia A in the third millennium. *Blood Rev*. juill 2013;27(4):179-84.
63. Franchini M. The modern treatment of haemophilia: a narrative review. *Blood Transfusion*. avr 2013;11(2):178-82.
64. Key NS, Negrier C. Coagulation factor concentrates: past, present, and future. *The Lancet*. 4 août 2007;370(9585):439-48.
65. Webster WP, Roberts HR, Thelin GM, Wagner RH, Brinkhous KM. Clinical use of a new glycine-precipitated antihemophilic fraction. *Am J Med Sci*. déc 1965;250(6):643-51.
66. Brinkhous KM, Shanbrom E, Roberts HR, Webster WP, Fekete L, Wagner RH. A new high-potency glycine-precipitated antihemophilic factor (ahf) concentrate: Treatment of classical hemophilia and hemophilia with inhibitors. *JAMA*. 26 août 1968;205(9):613-7.
67. Mannucci PM. Hemophilia: treatment options in the twenty-first century. *J Thromb Haemost*. juill 2003;1(7):1349-55.
68. Barin F. Mise au point: La sécurité virale des médicaments d'origine biologique. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 1 janv 2008;66:129-39.
69. Pneumocystis carinii pneumonia among persons with hemophilia A. *MMWR Morbidity And Mortality Weekly Report*. 16 juill 1982;31(27):365-7.
70. Barre-Sinoussi F, Chermann J, Rey F, Nugeyre M, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 20 mai 1983;220(4599):868-71.
71. Gallo R, Salahuddin S, Popovic M, Shearer G, Kaplan M, Haynes B, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*. 4 mai 1984;224(4648):500-3.
72. Choo Q, Kuo G, Weiner A, Overby L, Bradley D, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 21 avr 1989;244(4902):359-62.
73. Chauveau S. Du don à l'industrie: La transfusion sanguine en France depuis les années 1940. *Terrain*. 2011;(56):74-89.
74. Le Parlement Européen, Le Conseil de l'Union Européenne. Directive 2002/98/CE du Parlement européen et du Conseil du 27 janvier 2003 établissant des normes de qualité et de sécurité pour la collecte, le contrôle, la transformation, la conservation et la distribution du sang humain, et des composants sanguins, et modifiant la directive 2001/83/CE. *Journal officiel de l'Union européenne*. 2003;L33/30-40.
75. Etablissement français du sang. Le don de plasma [En ligne]. Paris : EFS ; 2016 [cité le 11 nov 2016]. Disponible sur: <https://dondesang.efs.sante.fr/le-don-de-plasma>

76. Le Conseil des Communautés Européennes. Directive Européenne n°89-381 du 14 juin 1989 NO 89381 élargissant le champ d'application des directives 6565 CEE et 75319 CEE concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives aux spécialités pharmaceutiques, et prévoyant des dispositions spéciales pour les médicaments dérivés du sang ou du plasma humain [En ligne]. Paris : Legifrance ; 1989 [cité le 11 nov 2016]. Disponible sur: [https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000704964&cat](https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000704964&categorieLien=id)
[egorieLien=id](https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000704964&categorieLien=id)
77. Code de la Santé Publique. Loi n° 93-5 du 4 janvier 1993 relative à la sécurité en matière de transfusion sanguine et de médicament. [En ligne]. Paris : Legifrance ; 1993 [cité le 11 nov 2016]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000178299>
78. Institut de veille sanitaire. Donneurs de sang [En ligne]. Saint-Maurice : InVS ; 2008 [cité le 10 nov 2016]. Disponible sur: <http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/VIH-sida-IST/Donneurs-de-sang/Points-sur-les-connaissances>
79. Girard J-F. Arrêté du 22 septembre 1993 portant homologation du règlement de l'Agence française du sang relatif aux bonnes pratiques de prélèvement et pris en application de l'article L. 668-3 du code de la santé publique [En ligne]. 1993 [cité le 10 nov 2016]. Disponible sur: https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do;jsessionid=EDD5A4EBA0DEC5BD4704B941BBDC09FA.tpdila13v_3?cidTexte=JORFTEXT000000483092&dateTexte=20030930
80. Touraine M. Arrêté du 5 avril 2016 fixant les critères de sélection des donneurs de sang [En ligne]. 2016 [cité le 10 nov 2016]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/eli/arrete/2016/4/5/AFSP1608360A/jo/texte>
81. Trouvin J-H. Le concept de sécurité vitale. Application à la transfusion sanguine et aux médicaments dérivés du sang. *La Revue du Praticien*. nov 2005;55(18):2033-8.
82. Burnouf T, Radosevich M. La prévention des risques infectieux des dérivés plasmatiques. *Hématologie*. 2000;6(4):289-99.
83. Beauplet A, Courbil R, Ouazan J-M. *La médecine transfusionnelle : le modèle français*. Montrouge: John Libbey Eurotext; 2013.
84. Beauplet A. La chaîne transfusionnelle : du donneur au receveur. *La Revue du Praticien*. juin 2001;51(12):1294-8.
85. Chudy M., Budek I., Keller-Stanislawski B, Mccaustland K., Neidhold S., Robertson B., et al. A new cluster of hepatitis A infection in hemophiliacs traced to a contaminated plasma pool. *Journal of medical virology*. 1999;57(2):91-9.
86. Azzi A, Morfini M, Mannucci PM. The transfusion-associated transmission of parvovirus B19. *Transfusion Medicine Reviews*. 1999;13(3):194-204.
87. Blümel J, Schmidt I, Effenberger W, Seitz H, Willkommen H, Brackmann HH, et al. Parvovirus B19 transmission by heat-treated clotting factor concentrates. *Transfusion*. nov 2002;42(11):1473-81.
88. Poullin P, Lefevre P. Médicaments dérivés du plasma. Dans : *EMC - Anesthésie-Réanimation*. 2002 : p. 1-13. [Article 36-730-A-20].

89. Mannucci PM. The choice of plasma-derived clotting factor concentrates. *Baillière's Clinical Haematology*. juin 1996;9(2):273-90.
90. Azzi A, Ciappi S, Zakvrzewska K, Morfini M, Mariani G, Mannucci PM. Human parvovirus B19 infection in hemophiliacs first infused with two high-purity, virally attenuated factor VIII concentrates. *American Journal Of Hematology*. mars 1992;39(3):228-30.
91. Peden A, McCardle L, Head MW, Love S, Ward HJT, Cousens SN, et al. Variant CJD infection in the spleen of a neurologically asymptomatic UK adult patient with haemophilia. *Haemophilia*. 2010;16(2):296-304.
92. European Haemophilia Safety Surveillance (EUHASS). EUHASS [En ligne]. Sheffield : EUHASS. 2017 [cité le 12 nov 2016]. Disponible sur: <https://www.euhass.org/index.html>
93. Mariani G., Ghirardini A., Mandelli F., Verani P., Butto S., Rossi GB, et al. Heated clotting factors and seroconversion for human immunodeficiency virus in three hemophilic patients. *Annals of Internal Medicine*. 1 juill 1987;107(1):113-113.
94. Williams MD, Skidmore SJ, Hill FG. HIV seroconversion in haemophilic boys receiving heat-treated factor VIII concentrate. *Vox Sanguinis*. 1990;58(2):135-6.
95. Dietrich SL, Mosley JW, Lusher JM, Hilgartner MW, Operskalski EA, Habel L, et al. Transmission of human immunodeficiency virus type 1 by dry-heated clotting factor concentrates. *Transfusion Safety Study Group. Vox Sanguinis*. 1990;59(3):129-35.
96. Preston FE, Hay CR, Dewar MS, Greaves M, Triger DR. Non-A, non-B hepatitis and heat-treated factor VIII concentrates. *The Lancet*. 27 juill 1985;2(8448):213-213.
97. Colombo M, Mannucci PM, Carnelli V, Savidge GF, Gazengel C, Schimpf K. Transmission of non-A, non-B hepatitis by heat-treated factor VIII concentrate. *The Lancet*. 6 juill 1985;2(8445):1-4.
98. Blanchette VS, Vorstman E, Shore A, Wang E, Petric M, Jett BW, et al. Hepatitis C infection in children with hemophilia A and B. *Blood*. 15 juill 1991;78(2):285-9.
99. Kim IS, Choi YW, Kang Y, Sung HM, Shin JS. Dry-heat treatment process for enhancing viral safety of an antihemophilic factor VIII concentrate prepared from human plasma. *Journal Of Microbiology And Biotechnology*. mai 2008;18(5):997-1003.
100. Berntorp E, Archey W, Auerswald G, Federici AB, Franchini M, Knaub S, et al. A systematic overview of the first pasteurised VWF/FVIII medicinal product, Haemate P/ Humate -P: history and clinical performance. *Eur J Haematol Suppl*. mai 2008;(70):3-35.
101. Hilfenhaus J, Herrmann A, Mauler R, Prince AM. Inactivation of the AIDS-causing retrovirus and other human viruses in antihemophilic plasma protein preparations by pasteurization. *Vox Sanguinis*. 1986;50(4):208-11.
102. Schimpf K, Brackmann HH, Kreuz W, Kraus B, Haschke F, Schramm W, et al. Absence of anti-human immunodeficiency virus types 1 and 2 seroconversion after the treatment of hemophilia A or von Willebrand's disease with pasteurized factor VIII concentrate. *The New England Journal of Medicine*. 1989;321(17):1148-52.

103. Schimpf K, Mannucci PM, Brackmann HH, Auerswald G, Ciavarella N. Absence of hepatitis after treatment with a pasteurized factor VIII concentrate in patients with hemophilia and no previous transfusions. *The New England Journal of Medicine*. 1987;316(15):918-22.
104. Mannucci PM, Schimpf KK, Brettler DB, et al. Low risk for hepatitis c in hemophiliacs given a high-purity, pasteurized factor viii concentrate. *Annals of Internal Medicine*. 1 juill 1990;113(1):27-32.
105. Mauler R, Merkle W, Hilfenhaus J. Inactivation of HTLV-III/LAV, hepatitis B and non-A/non-B viruses by pasteurization in human plasma protein preparations. *Developments in biological standardization*. 1987;67:337-51.
106. Mannucci PM, Zanetti AR, Colombo M. Prospective study of hepatitis after factor VIII concentrate exposed to hot vapour. *Br J Haematol*. avr 1988;68(4):427-30.
107. Mannucci P, Zanetti A, Colombo M, Chistolini A, De Biasi R, Musso R, et al. Antibody to hepatitis C virus after a vapour-heated factor VIII concentrate. *The Study Group of the Fondazione dell'Emofilia. Thrombosis and haemostasis*. oct 1990;64(2):232-4.
108. Horowitz B, Wiebe ME, Lippin A, Stryker MH. Inactivation of viruses in labile blood derivatives. I. Disruption of lipid-enveloped viruses by tri(n-butyl)phosphate detergent combinations. *Transfusion*. 11 déc 1985;25(6):516-22.
109. Prince AM, Horowitz B, Horowitz MS, Zang E. The development of virus-free labile blood derivatives — A review. *European Journal of Epidemiology*. 1987;3(2):103-18.
110. Pehta JC. Clinical studies with solvent detergent-treated products. *Transfusion Medicine Reviews*. oct 1996;10(4):303-11.
111. Maisonneuve P, Laurian Y, Guerois C, Verroust F, Ferrer Le Coeur F, Couroucé AM, et al. Antibody to hepatitis C (anti C 100-3) in French hemophiliacs. *Nouv Rev Fr Hematol*. 1991;33(3):263-6.
112. Horowitz B, Prince AM, Horowitz MS, Watklevicz C. Viral safety of solvent-detergent treated blood products. *Developments In Biological Standardization*. 1993;81:147-61.
113. Mannucci PM, Gdovin S, Gringeri A, Colombo M, Mele A, Schinaia N, et al. Transmission of hepatitis A to patients with hemophilia by factor VIII concentrates treated with organic solvent and detergent to inactivate viruses. *The Italian Collaborative Group. Annals Of Internal Medicine*. 1 janv 1994;120(1):1-7.
114. Burnouf-Radosevich M, Appourchaux P, Huart JJ, Burnouf T. Nanofiltration, a New Specific Virus Elimination Method Applied to High-Purity Factor IX and Factor XI Concentrates. *Vox Sanguinis*. août 1994;67(2):132-8.
115. Burnouf T, Radosevich M. Nanofiltration of plasma-derived biopharmaceutical products. *Haemophilia*. janv 2003;9(1):24-37.
116. Tateishi J, Kitamoto T, Ishikawa G, Manabe S. Removal of causative agent of Creutzfeldt- Jakob disease (CJD) through membrane filtration method. *membrane*. 1993;18(6):357-62.
117. Tateishi J, Kitamoto T, Mohri S, Satoh S, Sato T, Shepherd A, et al. Scrapie Removal using Planova®Virus Removal Filters. *Biologicals*. 1 mars 2001;29(1):17-25.

118. Laboratoire français du fractionnement et des biotechnologies. Résumé des Caractéristiques du Produit : FACTANE [En ligne]. Les Ulis : LFB ; 2011 [cité le 27 févr 2017]. Disponible sur: <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0197442.htm>
119. Octapharma France. Résumé des Caractéristiques du Produit : OCTANATE [En ligne]. Boulogne Billancourt : Octapharma France ; 2013 [cité le 27 févr 2017]. Disponible sur: <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0227895.htm>
120. CSL Behring. Résumé des Caractéristiques du Produit : VONCENTO [En ligne]. Marburg (Germany): CSL Behring ; 2015 [cité le 27 févr 2017]. Disponible sur: http://www.ema.europa.eu/docs/fr_FR/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002493/WC500151230.pdf
121. Haute Autorité de Santé. VONCENTO 250 UI / 600 UI, poudre et solvant pour solution injectable/perfusion (solvant 5 mL) Boîte de 1 flacon (verre) de poudre + 1 flacon (verre) 5 mL de solvant (CIP : 34009 585 637 8 2) VONCENTO 500 UI / 1 200 UI, poudre et solvant pour solution injectable/perfusion (solvant 5 mL) Boîte de 1 flacon (verre) de poudre + 1 flacon (verre) 5 mL de solvant (CIP : 34009 585 638 4 3) VONCENTO 1 000 UI / 2 400 UI, poudre et solvant pour solution injectable/perfusion (solvant 10 mL) Boîte de 1 flacon (verre) de poudre + 1 flacon (verre) 10 mL de solvant (CIP : 34009 585 639 0 4) - Avis de la commission de la transparence du 28 mai 2014 [En ligne]. Saint-Denis La Plaine : HAS ; 2014 [cité le 27 févr 2017]. Disponible sur: http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/evamed/CT-13234_VONCENTO_INS%20COLL_CT13234_Avis2_POST_Audition.pdf
122. CSL Behring. Résumé des Caractéristiques du Produit : HAEMATE P. Marburg (Germany) : CSL Behring ; 2016.
123. Rothschild C, D'Oiron R, Borel-Derlon A, Gruel Y, Navarro R, Negrier C. Use of Haemate(®) P as immune tolerance induction in patients with severe haemophilia A who failed previous induction attempts: a multicentre observational study. *Haemophilia: The Official Journal Of The World Federation Of Hemophilia*. mars 2013;19(2):281-6.
124. De Moerloose P. Génie génétique et hémophilie: possibilités de traitement et espoir de guérison. *Journal de Pédiatrie et de Puériculture*. 1 oct 1993;6(7):406-9.
125. Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, et al. Characterization of the human factor VIII gene. *Nature*. 22 nov 1984;312(5992):326-30.
126. Toole JJ, Knopf JL, Wozney JM, Sultzman LA, Buecker JL, Pittman DD, et al. Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. *Nature*. 22 nov 1984;312(5992):342-7.
127. White GC, McMillan CW, Kingdon HS, Shoemaker CB. Use of Recombinant Antihemophilic Factor in the Treatment of Two Patients with Classic Hemophilia. *N Engl J Med*. 19 janv 1989;320(3):166-70.
128. Frampton JE, Wagstaff AJ. Sucrose-Formulated Octocog Alfa : a review of its use in patients with haemophilia A. *Drugs*. 2008;68(6):839-53.
129. Schved J-F. Maladies hémorragiques congénitales : quel avenir pour les dérivés plasmatiques par rapport aux recombinants et aux produits sanguins labiles ? *Transfusion Clinique et Biologique*. août 2015;22(3):85-9.

130. Wurm FM. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol.* nov 2004;22(11):1393-8.
131. Gazengel C, Rothschild C, Torchet M-F. Apport des nouvelles technologies au traitement substitutif des hémophilies. *Revue Francaise des Laboratoires.* 1995;1995(275):121-5.
132. Ellgaard TW, Bindslev L, Kamstrup S. Evaluation of the virus clearance capacity and robustness of the manufacturing process for the recombinant factor VIII protein, turoctocog alfa. *Protein Expression and Purification.* janv 2017;129:94-100.
133. Lee DC, Miller JLA, Petteway SR Jr. Pathogen safety of manufacturing processes for biological products: special emphasis on KOGENATE Bayer. *Haemophilia.* mars 2002;8 Suppl 2:6-9.
134. Jiang R, Monroe T, McRogers R, Larson PJ. Manufacturing challenges in the commercial production of recombinant coagulation factor VIII. *Haemophilia.* mars 2002;8 Suppl 2:1-5.
135. European Medicines Agency. ICH Topic Q 6 B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products (CPMP/ICH/365/96) [En ligne]. London: EMEA; 1999 [cité le 27 févr 2017]. Disponible sur: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002824.pdf
136. European Medicines Agency. ICH Topic Q 5 A (R1) Quality of Biotechnological Products: Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin (CPMP/ICH/295/95) [En ligne]. London: EMEA; 1997 [cité le 27 févr 2017]. Disponible sur: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002801.pdf
137. Arnold D. Virus safety considerations for recombinant factor VIII (rFVIII, Kogenate). *Haemophilia.* 1995;1 Suppl 2:22-3.
138. Boedeker BGD. The Manufacturing of the Recombinant Factor VIII, Kogenate. *Transfusion Medicine Reviews.* 1 oct 1992;6(4):256-60.
139. Gomperts E, Lundblad R, Adamson R. The Manufacturing Process of Recombinant Factor VIII, Recombinate. *Transfusion Medicine Reviews.* 1 oct 1992;6(4):247-51.
140. Kelley B, Jankowski M, Booth J. An improved manufacturing process for Xyntha/ReFacto AF. *Haemophilia.* 1 sept 2010;16(5):717-25.
141. European Medicines Agency. ReFacto AF [En ligne]. Londres: EMA; 2017 [cité le 11 janv 2017]. Disponible sur: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000232/human_med_001019.jsp&mid=WC0b01ac058001d124
142. European Medicines Agency. Kogenate Bayer [En ligne]. Londres: EMA; 2017 [cité le 11 janv 2017]. Disponible sur: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000275/human_med_000879.jsp&mid=WC0b01ac058001d124

143. Morfini M. Innovative approach for improved rFVIII concentrate. *Eur J Haematol.* nov 2014;93(5):361-8.
144. Santagostino E. A new recombinant factor VIII: from genetics to clinical use. *Drug Design, Development And Therapy.* 12 déc 2014;8:2507-15.
145. Ezban M, Vad K, Kjalke M. Turoctocog alfa (NovoEight®)-from design to clinical proof of concept. *Eur J Haematol.* nov 2014;93(5):369-76.
146. Thim L, Vandahl B, Karlsson J, Klausen NK, Pedersen J, Krogh TN, et al. Purification and characterization of a new recombinant factor VIII (N8). *Haemophilia.* mars 2010;16(2):349-59.
147. Sandberg H, Kannicht C, Stenlund P, Dadaian M, Oswaldsson U, Cordula C, et al. Functional characteristics of the novel, human-derived recombinant FVIII protein product, human-cl rhFVIII. *Thrombosis Research.* nov 2012;130(5):808-17.
148. European Medicines Agency. Advate [En ligne]. Londres : EMA ; 2017 [cité le 11 janv 2017]. Disponible sur:
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000520/human_med_000630.jsp&mid=WC0b01ac058001d124
149. Shapiro AD. Anti-hemophilic factor (recombinant), plasma/albumin-free method (octocog-alpha; ADVATE®) in the management of hemophilia A. *Vascular Health and Risk Management.* oct 2007;3(5):555-65.
150. European Medicines Agency. NovoEight [En ligne]. Londres : EMA ; 2017 [cité le 11 janv 2017]. Disponible sur:
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002719/human_med_001701.jsp&mid=WC0b01ac058001d124
151. European Medicines Agency. Kovaltry [En ligne]. Londres : EMA ; 2017 [cité le 11 janv 2017]. Disponible sur:
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/003825/human_med_001959.jsp&mid=WC0b01ac058001d124
152. European Medicines Agency. Nuwiq [En ligne]. Londres : EMA ; 2017 [cité le 11 janv 2017]. Disponible sur:
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002813/human_med_001781.jsp&mid=WC0b01ac058001d124
153. Kessler C, Oldenburg J, Ettingshausen CE, Tiede A, Khair K, Negrier C, et al. Spotlight on the human factor: building a foundation for the future of haemophilia A management: Report from a symposium on human recombinant FVIII at the World Federation of Hemophilia World Congress, Melbourne, Australia on 12 May 2014. *Haemophilia.* 2015;21 Suppl 1:1-12.
154. Schwartz BA, Sandberg H, Agerkvist I, Kannicht C, Ramström M, Stenlund P, et al. The First Human Cell Line Recombinant Factor VIII (Human-cl rhFVIII) - Functional Properties and Differences From Currently Available Recombinant Factor VIII Products. *Blood.* 5 oct 2015;114(22):1298.
155. Tiede A, Oldenburg J, Lissitchkov T, Knaub S, Bichler J, Manco-Johnson MJ. Prophylaxis vs. on-demand treatment with Nuwiq[R] (Human-cl rhFVIII) in adults with severe haemophilia A. *Haemophilia.* 2016;22(3):374-80.

156. Winge S, Yderland L, Kannicht C, Hermans P, Adema S, Schmidt T, et al. Development, upscaling and validation of the purification process for human-cl rhFVIII (Nuwiq®), a new generation recombinant factor VIII produced in a human cell-line. *Protein Expression and Purification*. 1 nov 2015;115:165-75.
157. Kannicht C, Ramström M, Kohla G, Tiemeyer M, Casademunt E, Walter O, et al. Characterisation of the post-translational modifications of a novel, human cell line-derived recombinant human factor VIII. *Thrombosis Research*. janv 2013;131(1):78-88.
158. Kaufman RJ. Post-translational modifications required for coagulation factor secretion and function. *Thromb Haemost*. juin 1998;79(6):1068-79.
159. Brooks SA. Protein glycosylation in diverse cell systems: implications for modification and analysis of recombinant proteins. *Expert Rev Proteomics*. juin 2006;3(3):345-59.
160. Walsh G, Jefferis R. Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nat Biotech*. oct 2006;24(10):1241-52.
161. Solá RJ, Griebenow K. Glycosylation of therapeutic proteins: an effective strategy to optimize efficacy. *BioDrugs*. 1 févr 2010;24(1):9-21.
162. Brooks SA. Appropriate glycosylation of recombinant proteins for human use: implications of choice of expression system. *Mol Biotechnol*. nov 2004;28(3):241-55.
163. Valentino LA, Negrier C, Kohla G, Tiede A, Liesner R, Hart D, et al. The first recombinant FVIII produced in human cells-an update on its clinical development programme. *Haemophilia*. janv 2014;20 Suppl 1:1-9.
164. Hironaka T, Furukawa K, Esmon PC, Fournel MA, Sawada S, Kato M, et al. Comparative study of the sugar chains of factor VIII purified from human plasma and from the culture media of recombinant baby hamster kidney cells. *J Biol Chem*. 25 avr 1992;267(12):8012-20.
165. Macher BA, Galili U. The Galalpha1,3Galbeta1,4GlcNAc-R (alpha-Gal) epitope: a carbohydrate of unique evolution and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta*. févr 2008;1780(2):75-88.
166. Chung CH, Mirakhur B, Chan E, Le Q-T, Berlin J, Morse M, et al. Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose-alpha-1,3-galactose. *N Engl J Med*. 13 mars 2008;358(11):1109-17.
167. Diaz SL, Padler-Karavani V, Ghaderi D, Hurtado-Ziola N, Yu H, Chen X, et al. Sensitive and Specific Detection of the Non-Human Sialic Acid N-Glycolylneuraminic Acid In Human Tissues and Biotherapeutic Products. *PLoS ONE*. 2009;4(1):e4241.
168. Schilow WF, Schoerner-Burkhardt E, Seitz R. Charge analysis of N-glycans from human recombinant coagulation factor VIII and human FVIII standards. *Thromb Haemost*. août 2004;92(2):427-8.
169. Michnick DA, Pittman DD, Wise RJ, Kaufman RJ. Identification of individual tyrosine sulfation sites within factor VIII required for optimal activity and efficient thrombin cleavage. *J Biol Chem*. 5 août 1994;269(31):20095-102.

170. Pittman DD, Wang JH, Kaufman RJ. Identification and functional importance of tyrosine sulfate residues within recombinant factor VIII. *Biochemistry*. 7 avr 1992;31(13):3315-25.
171. Leyte A, van Schijndel HB, Niehrs C, Huttner WB, Verbeet MP, Mertens K, et al. Sulfation of Tyr1680 of human blood coagulation factor VIII is essential for the interaction of factor VIII with von Willebrand factor. *J Biol Chem*. 15 janv 1991;266(2):740-6.
172. Dasgupta S, Repessé Y, Bayry J, Navarrete A-M, Wootla B, Delignat S, et al. VWF protects FVIII from endocytosis by dendritic cells and subsequent presentation to immune effectors. *Blood*. 15 janv 2007;109(2):610-2.
173. Gringeri A, Ofosu FA, Grancha S, Oldenburg J, Ewing NP, Federici AB. Understanding FVIII/VWF complex-report from a symposium of XXIX WFH meeting 2010. *Haemophilia*. mai 2012;18(3):469-75.
174. Lacroix-Desmazes S, Repessé Y, Kaveri SV, Dasgupta S. The role of VWF in the immunogenicity of FVIII. *Thromb Res*. 2008;122 Suppl 2:S3-6.
175. Kosloski MP, Miclea RD, Balu-Iyer SV. Role of Glycosylation in Conformational Stability, Activity, Macromolecular Interaction and Immunogenicity of Recombinant Human Factor VIII. *The AAPS Journal*. sept 2009;11(3):424-31.
176. Sandberg H, Almstedt A, Brandt J, Castro VM, Gray E, Holmquist L, et al. Structural and functional characterization of B-domain deleted recombinant factor VIII. *Seminars in Hematology*. 1 avr 2001;38:4-12.
177. Andersson LO, Forsman N, Huang K, Larsen K, Lundin A, Pavlu B, et al. Isolation and characterization of human factor VIII: molecular forms in commercial factor VIII concentrate, cryoprecipitate, and plasma. *Proc Natl Acad Sci USA*. mai 1986;83(9):2979-83.
178. Österberg T, Fatouros A, Neidhardt E, Warne N, Mikaelsson M. B-domain deleted recombinant factor VIII formulation and stability. *Seminars in Hematology*. 1 avr 2001;38:40-3.
179. Lenting PJ, van Mourik JA, Mertens K. The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. *Blood*. 1 déc 1998;92(11):3983-96.
180. Christiansen MLS, Balling KW, Persson E, Hilden I, Bagger-Sørensen A, Sørensen BB, et al. Functional characteristics of N8, a new recombinant FVIII. *Haemophilia*. nov 2010;16(6):878-87.
181. Nagase T, Nakayama M, Nakajima D, Kikuno R, Ohara O. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XX. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res*. 27 avr 2001;8(2):85-95.
182. Aledort LM, Navickis RJ, Wilkes MM. Can B-domain deletion alter the immunogenicity of recombinant factor VIII? A meta-analysis of prospective clinical studies. *J Thromb Haemost*. nov 2011;9(11):2180-92.

183. White GC, Rosendaal F, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild C, Ingerslev J, et al. Definitions in hemophilia. Recommendation of the scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost.* mars 2001;85(3):560.
184. Iorio A, Marcucci M, Makris M. Concentrate-related inhibitor risk: is a difference always real? *J Thromb Haemost.* nov 2011;9(11):2176-9.
185. Aledort LM, Navickis RJ, Wilkes MM. Best evidence on B-domain deletion and the immunogenicity of recombinant factor VIII. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2011;9(11):2325-7.
186. Hay CRM, Palmer BP, Chalmers EA, Hart DP, Liesner R, Rangarajan S, et al. The incidence of factor VIII inhibitors in severe haemophilia A following a major switch from full-length to B-domain-deleted factor VIII: a prospective cohort comparison. *Haemophilia.* 2015;21(2):219-26.
187. Gouw SC, van der Bom JG, Ljung R, Escuriola C, Cid AR, Claeysens-Donadel S, et al. Factor VIII Products and Inhibitor Development in Severe Hemophilia A. *N Engl J Med.* 16 janv 2013;368(3):231-9.
188. Kessler CM, Iorio A. The Rodin (Research Of Determinants of INhibitor Development among PUPs with haemophilia) study: the clinical conundrum from the perspective of haemophilia treaters. *Haemophilia.* mai 2013;19(3):351-4.
189. Delignat S, Repessé Y, Gilardin L, Dimitrov JD, Lone YC, Kaveri SV, et al. Predictive immunogenicity of Refacto AF. *Haemophilia.* juill 2014;20(4):486-92.
190. Delignat S, Dasgupta S, André S, Navarrete A-M, Kaveri SV, Bayry J, et al. Comparison of the immunogenicity of different therapeutic preparations of human factor VIII in the murine model of hemophilia A. *Haematologica.* oct 2007;92(10):1423-6.
191. Repessé Y, Dasgupta S, Navarrete A-M, Delignat S, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S. Mannose-sensitive receptors mediate the uptake of factor VIII therapeutics by human dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol.* avr 2012;129(4):1172-1173; author reply 1174-1175.
192. Lanneau D, Wettstein G, Bonniaud P, Garrido C. Heat shock proteins: cell protection through protein triage. *ScientificWorldJournal.* 3 août 2010;10:1543-52.
193. Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences.* mars 2005;62(6):670-84.
194. Willmund F, del Alamo M, Pechmann S, Chen T, Albanèse V, Dammer EB, et al. The cotranslational function of ribosome-associated Hsp70 in eukaryotic protein homeostasis. *Cell.* 17 janv 2013;152(1-2):196-209.
195. Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Denis-Larose C, Massie B. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Biology.* sept 1997;17(9):5317-27.
196. Ishaque A, Thrift J, Murphy JE, Konstantinov K. Over-expression of Hsp70 in BHK-21 cells engineered to produce recombinant factor VIII promotes resistance to apoptosis and enhances secretion. *Biotechnol Bioeng.* 1 mai 2007;97(1):144-55.

197. Shah A, Delesen H, Garger S, Lalezari S. Pharmacokinetic properties of BAY 81-8973, a full-length recombinant factor VIII. *Haemophilia*. 2015;21(6):766-71.
198. Bovenschen N, Rijken DC, Havekes LM, van Vlijmen BJM, Mertens K. The B domain of coagulation factor VIII interacts with the asialoglycoprotein receptor. *J Thromb Haemost*. juin 2005;3(6):1257-65.
199. Kavakli K, Yang R, Rusen L, Beckmann H, Tseneklidou-Stoeter D, Maas Enriquez M, et al. Prophylaxis vs. on-demand treatment with BAY 81-8973, a full-length plasma protein-free recombinant factor VIII product: results from a randomized trial (LEOPOLD II). *J Thromb Haemost*. mars 2015;13(3):360-9.
200. Saxena K, Lalezari S, Oldenburg J, Tseneklidou-Stoeter D, Beckmann H, Yoon M, et al. Efficacy and safety of BAY 81-8973, a full-length recombinant factor VIII: results from the LEOPOLD I trial. *Haemophilia*. sept 2016;22(5):706-12.
201. Ljung R, Kenet G, Mancuso ME, Kaleva V, Rusen L, Tseneklidou-Stoeter D, et al. BAY 81-8973 safety and efficacy for prophylaxis and treatment of bleeds in previously treated children with severe haemophilia A: results of the LEOPOLD Kids Trial. *Haemophilia*. mai 2016;22(3):354-60.
202. Rea IM, McNerlan S, Pockley AG. Serum heat shock protein and anti-heat shock protein antibody levels in aging. *Exp Gerontol*. févr 2001;36(2):341-52.
203. Pockley AG, Shepherd J, Corton JM. Detection of heat shock protein 70 (Hsp70) and anti-Hsp70 antibodies in the serum of normal individuals. *Immunol Invest*. déc 1998;27(6):367-77.
204. Njemini R, Lambert M, Demanet C, Mets T. Elevated serum heat-shock protein 70 levels in patients with acute infection: use of an optimized enzyme-linked immunosorbent assay. *Scand J Immunol*. déc 2003;58(6):664-9.
205. Maas Enriquez M, Thrift J, Garger S, Katterle Y. Review article: BAY 81-8973, a full-length recombinant factor VIII: Human heat shock protein 70 improves the manufacturing process without affecting clinical safety. *Protein Expression and Purification*. 1 nov 2016;127:111-5.
206. Pockley AG, De Faire U, Kiessling R, Lemne C, Thulin T, Frostegård J. Circulating heat shock protein and heat shock protein antibody levels in established hypertension. *J Hypertens*. sept 2002;20(9):1815-20.
207. Schett G, Redlich K, Xu Q, Bizan P, Gröger M, Tohidast-Akrad M, et al. Enhanced expression of heat shock protein 70 (hsp70) and heat shock factor 1 (HSF1) activation in rheumatoid arthritis synovial tissue. Differential regulation of hsp70 expression and hsf1 activation in synovial fibroblasts by proinflammatory cytokines, shear stress, and antiinflammatory drugs. *Journal of Clinical Investigation*. 15 juill 1998;102(2):302-11.
208. Calvez T, Chambost H, Claeysens-Donadel S, d'Oiron R, Goulet V, Guillet B, et al. Recombinant factor VIII products and inhibitor development in previously untreated boys with severe hemophilia A. *Blood*. 27 nov 2014;124(23):3398-408.

209. Haute Autorité de Santé. KOGENATE Bayer 250 UI, poudre et solvant pour solution injectable B/1 flacon de poudre avec système Bio-Set + 1 seringue pré remplie (CIP : 34009 566 190 1 6) KOGENATE Bayer 500 UI, poudre et solvant pour solution injectable B/1 flacon de poudre avec système Bio-Set + 1 seringue pré remplie (CIP : 34009 566 191 8 4) KOGENATE Bayer 1000 UI, poudre et solvant pour solution injectable B/1 flacon de poudre avec système Bio-Set + 1 seringue pré remplie (CIP : 34009 566 192 4 5) KOGENATE Bayer 2000 UI, poudre et solvant pour solution injectable B/1 flacon de poudre avec système Bio-Set + 1 seringue pré remplie (CIP : 34009 571 784 3 7) KOGENATE Bayer 3000 UI, poudre et solvant pour solution injectable B/1 flacon de poudre avec système Bio-Set + 1 seringue pré remplie (CIP : 34009 578 226 6 8). Avis commission de transparence du 1er juillet 2015 [En ligne]. Saint-Denis La Plaine: HAS; 2015 [cité le 28 févr 2017]. Disponible sur: http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/evamed/CT-13580_KOGENATE_BAYER_PIC_REEV_Avis2_CT13580.pdf
210. Haute Autorité de Santé. HELIXATE NexGen 250 UI, poudre et solvant pour solution injectable B/1 flacon en verre de 2,5 ml avec nécessaire (CIP : 34009 562 096 0 6) HELIXATE NexGen 500 UI, poudre et solvant pour solution injectable B/1 flacon en verre de 2,5 ml avec nécessaire (CIP : 34009 562 097 7 4) HELIXATE NexGen 1000 UI, poudre et solvant pour solution injectable B/1 flacon en verre de 2,5 ml avec nécessaire (CIP : 34009 572 098 3 5) HELIXATE NexGen 2000 UI, poudre et solvant pour solution injectable B/1 flacon en verre de 2,5 ml avec nécessaire (CIP : 34009 572 353 6 9) HELIXATE NexGen 3000 UI, poudre et solvant pour solution injectable B/1 flacon en verre de 2,5 ml avec nécessaire (CIP : 34009 578 747 6 6). Avis commission de transparence du 1er juillet 2015 [En ligne]. Saint-Denis La Plaine : HAS ; 2015 [cité le 28 févr 2017]. Disponible sur: http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/evamed/CT-13917_HELIXATE_NEXGEN_PIC_REEV_Avis2_CT13917.pdf
211. Eriksson R., Fenge C, Lindner-Olsson E, Ljungqvist C, Rosenquist J, Smeds A-L, et al. The manufacturing process for B-domain deleted recombinant factor VIII. *Seminars in Hematology*. 1 avr 2001;38:24-31.
212. Srivastava A, Brewer AK, Mauser-Bunschoten EP, Key NS, Kitchen S, Llinas A, et al. Guidelines for the management of hemophilia. *Haemophilia*. janv 2013;19(1):e1-47.
213. Manco-Johnson MJ, Abshire TC, Shapiro AD, Riske B, Hacker MR, Kilcoyne R, et al. Prophylaxis versus episodic treatment to prevent joint disease in boys with severe hemophilia. *N Engl J Med*. 9 août 2007;357(6):535-44.
214. Manco-Johnson MJ, Abshire TC, Brown D, Buchanan GR, Cohen AR, DiMichele D, et al. Initial Results of a Randomized, Prospective Trial of Prophylaxis To Prevent Joint Disease in Young Children with Factor VIII (FVIII) Deficiency. *Blood*. 2 sept 2015;106(11):3.
215. Smith PS, Teutsch SM, Shaffer PA, Rolka H, Evatt B. Episodic versus prophylactic infusions for hemophilia A: a cost-effectiveness analysis. *J Pediatr*. sept 1996;129(3):424-31.
216. Nilsson IM, Berntorp E, Löfqvist T, Pettersson H. Twenty-five years' experience of prophylactic treatment in severe haemophilia A and B. *J Intern Med*. juill 1992;232(1):25-32.
217. Nilsson IM, Hedner U, Ahlberg Å. Haemophilia prophylaxis in Sweden. *Acta Paediatrica*. mars 1976;65(2):129.

218. Shapiro AD, Donfield SM, Lynn HS, Cool VA, Stehbens JA, Hunsberger SL, et al. Defining the impact of hemophilia: the Academic Achievement in Children with Hemophilia Study. *Pediatrics*. déc 2001;108(6):E105.
219. Gringeri A, von Mackensen S, Auerswald G, Bullinger M, Perez Garrido R, Kellermann E, et al. Health status and health-related quality of life of children with haemophilia from six West European countries. *Haemophilia*. mars 2004;10 Suppl 1:26-33.
220. Richards M, Altisent C, Batorova A, Chambost H, Dolan G, de Moerloose P, et al. Should prophylaxis be used in adolescent and adult patients with severe haemophilia? An European survey of practice and outcome data. *Haemophilia*. sept 2007;13(5):473-9.
221. Blatny J, Ingerslev J, Huth-Kühne A, Lambert T, Windyga J. Traitement de l'hémophilie - Défis actuels et futurs : Rapport basé sur les présentations faites durant le symposium satellite sponsorisé par Bayer Schering Pharma dans le cadre du Consortium Européen sur l'Hémophilie, Septembre 2008 – Dublin. *La Presse Médicale*. 2009;38(9S1):H1-9.
222. Meunier S, Trossaert M, Berger C, Borel-Derlon A, Dirat G, Donadel-Claeyssens S, et al. French guidelines. Long-term prophylaxis for severe haemophilia A and B children to prevent haemophilic arthropathy. *Arch Pediatr*. déc 2009;16(12):1571-8.
223. Tiede A. Half-life extended factor VIII for the treatment of hemophilia A. *Journal of Thrombosis & Haemostasis*. 2 juin 2015;13 Suppl 1:S176-9.
224. Carcao M. Changing paradigm of prophylaxis with longer acting factor concentrates. *Haemophilia*. mai 2014;20 Suppl 4:99-105.
225. Shapiro AD, Ragni MV, Kulkarni R, Oldenberg J, Srivastava A, Quon DV, et al. Recombinant factor VIII Fc fusion protein: extended-interval dosing maintains low bleeding rates and correlates with von Willebrand factor levels. *Journal Of Thrombosis And Haemostasis: JTH*. nov 2014;12(11):1788-800.
226. Björkman S, Folkesson A, Jönsson S. Pharmacokinetics and dose requirements of factor VIII over the age range 3-74 years: a population analysis based on 50 patients with long-term prophylactic treatment for haemophilia A. *Eur J Clin Pharmacol*. oct 2009;65(10):989-98.
227. Miners AH, Krishnan S, Pasi KJ. Predicting the outcomes of using longer-acting prophylactic factor VIII to treat people with severe hemophilia A: a hypothetical decision analysis. *Journal of Thrombosis & Haemostasis*. nov 2016;14(11):2141-7.
228. Petrini P. Identifying and overcoming barriers to prophylaxis in the management of haemophilia. *Haemophilia*. sept 2007;13 Suppl 2:16-22.
229. Pabinger-Fasching I. The story of a unique molecule in hemophilia A: recombinant single-chain factor VIII. *Thromb Res*. mai 2016;141 Suppl 3:S2-4.
230. Guillet B. Mode d'action des facteurs de coagulation à demi-vie prolongée. *STV*. 2016;28:12-3.
231. Mancuso ME, Mannucci PM. Fc-fusion technology and recombinant FVIII and FIX in the management of the hemophilias. *Drug Design, Development And Therapy*. 28 mars 2014;8:365-71.

232. Laffan M. New products for the treatment of haemophilia. *British Journal of Haematology*. janv 2016;172(1):23-31.
233. Peyvandi F, Garagiola I, Seregini S. Future of coagulation factor replacement therapy. *J Thromb Haemost*. juin 2013;11 Suppl 1:84-98.
234. Rath T, Baker K, Dumont JA, Peters RT, Jiang H, Qiao S-W, et al. Fc-fusion proteins and FcRn: structural insights for longer-lasting and more effective therapeutics. *Crit Rev Biotechnol*. juin 2015;35(2):235-54.
235. Powell JS. Longer-acting clotting factor concentrates for hemophilia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2015;13 Suppl 1:S167-75.
236. Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol*. sept 2007;7(9):715-25.
237. Lencer WI, Blumberg RS. A passionate kiss, then run: exocytosis and recycling of IgG by FcRn. *Trends Cell Biol*. janv 2005;15(1):5-9.
238. McGarry T, Hough R, Rogers S, Rechsteiner M. Intracellular distribution and degradation of immunoglobulin G and immunoglobulin G fragments injected into HeLa cells. *J Cell Biol*. févr 1983;96(2):338-46.
239. Haute Autorité de Santé. ELOCTA 250 UI, poudre et solvant pour solution injectable B/1 flacon (poudre) + 1 seringue préremplie (solvant) (CIP : 34009 550 158 0 2) ELOCTA 500 UI, poudre et solvant pour solution injectable B/1 flacon (poudre) + 1 seringue préremplie (solvant) (CIP : 34009 550 158 1 9) ELOCTA 750 UI, poudre et solvant pour solution injectable B/1 flacon (poudre) + 1 seringue préremplie (solvant) (CIP : 34009 550 158 2 6) ELOCTA 1000 UI, poudre et solvant pour solution injectable B/1 flacon (poudre) + 1 seringue préremplie (solvant) (CIP : 34009 550 158 3 3) ELOCTA 1500 UI, poudre et solvant pour solution injectable B/1 flacon (poudre) + 1 seringue préremplie (solvant) (CIP : 34009 550 158 4 0) ELOCTA 2000 UI, poudre et solvant pour solution injectable B/1 flacon (poudre) + 1 seringue préremplie (solvant) (CIP : 34009 550 158 5 7) ELOCTA 3000 UI, poudre et solvant pour solution injectable B/1 flacon (poudre) + 1 seringue préremplie (solvant) (CIP : 34009 550 158 7 1). Avis commission de transparence du 17 février 2016 [En ligne]. Saint-Denis La Plaine : HAS ; 2016 [cité le 3 févr 2017]. Disponible sur: http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/evamed/CT-14817_ELOCTA_PIC_INS_Avis2_CT14817.pdf
240. Peters RT, Low SC, Kamphaus GD, Dumont JA, Amari JV, Lu Q, et al. Prolonged activity of factor IX as a monomeric Fc fusion protein. *Blood*. 11 mars 2010;115(10):2057-64.
241. Bitonti AJ, Dumont JA, Low SC, Peters RT, Kropp KE, Palombella VJ, et al. Pulmonary delivery of an erythropoietin Fc fusion protein in non-human primates through an immunoglobulin transport pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 29 juin 2004;101(26):9763-8.
242. Haeckel A, Appler F, Figge L, Kratz H, Lukas M, Michel R, et al. XTEN-annexin A5: XTEN allows complete expression of long-circulating protein-based imaging probes as recombinant alternative to PEGylation. *J Nucl Med*. mars 2014;55(3):508-14.
243. Schellenberger V, Wang C-W, Geething NC, Spink BJ, Campbell A, To W, et al. A recombinant polypeptide extends the in vivo half-life of peptides and proteins in a tunable manner. *Nat Biotechnol*. déc 2009;27(12):1186-90.

244. Podust VN, Balan S, Sim B-C, Coyle MP, Ernst U, Peters RT, et al. Extension of in vivo half-life of biologically active molecules by XTEN protein polymers. *Journal of Controlled Release*. 28 oct 2016;240:52-66.
245. Drager D, Patarroyo-White S, Chao H, Ismail A, Liu J, Holthaus AM, et al. Recombinant FVIII-Fc-VWF-XTEN Demonstrates Significant Bioavailability Following Subcutaneous Administration in Hemophilia A Mice. *Blood*. 3 déc 2015;126(23):3492.
246. Schulte S. Innovative coagulation factors: albumin fusion technology and recombinant single-chain factor VIII. *Thromb Res*. mars 2013;131 Suppl 2:S2-6.
247. Ing M, Gupta N, Teyssandier M, Maillère B, Pallardy M, Delignat S, et al. Immunogenicity of long-lasting recombinant factor VIII products. *Cellular Immunology*. 1 mars 2016;301:40-8.
248. Schulte S. Challenges for new haemophilia products from a manufacturer's perspective. *Thrombosis Research*. nov 2014;134, Suppl 1:S72-6.
249. Santagostino E, Martinowitz U, Lissitchkov T, Pan-Petes B, Hanabusa H, Oldenburg J, et al. Long-acting recombinant coagulation factor IX albumin fusion protein (rIX-FP) in hemophilia B: results of a phase 3 trial. *Blood*. 7 avr 2016;127(14):1761-9.
250. Weimer T, Wormsbäcker W, Kronthaler U, Lang W, Liebing U, Schulte S. Prolonged in-vivo half-life of factor VIIa by fusion to albumin. *Thromb Haemost*. avr 2008;99(4):659-67.
251. Oldenburg J, Albert T. Novel products for haemostasis - current status. *Haemophilia*. mai 2014;20 Suppl 4:23-8.
252. Schmidbauer S, Witzel R, Robbel L, Sebastian P, Grammel N, Metzner HJ, et al. Physicochemical characterisation of rVIII-SingleChain, a novel recombinant single-chain factor VIII. *Thromb Res*. août 2015;136(2):388-95.
253. European Medicines Agency. The Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) summary of positive opinion for Afstyla [En ligne]. Londres : EMA ; [cité le 2 mars 2017]. Disponible sur:
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/004075/smops/Positive/human_smop_001053.jsp&mid=WC0b01ac058001d127
254. Zollner S, Raquet E, Claar P, Müller-Cohrs J, Metzner HJ, Weimer T, et al. Non-clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of rVIII-SingleChain, a novel recombinant single-chain factor VIII. *Thrombosis Research*. juill 2014;134(1):125-31.
255. Klamroth R, Simpson M, Depka-Prondzinski M, Gill JC, Morfini M, Powell JS, et al. Comparative pharmacokinetics of rVIII-SingleChain and octocog alfa (Advate®) in patients with severe haemophilia A. *Haemophilia*. sept 2016;22(5):730-8.
256. Delignat S, Repessé Y, Navarrete A-M, Meslier Y, Gupta N, Christophe OD, et al. Immunoprotective effect of von Willebrand factor towards therapeutic factor VIII in experimental haemophilia A. *Haemophilia*. mars 2012;18(2):248-54.
257. Saenko EL, Pipe SW. Strategies towards a longer acting factor VIII. *Haemophilia*. juill 2006;12 Suppl 3:42-51.
258. Pipe SW. Go long! A touchdown for factor VIII? *Blood*. 15 juill 2010;116(2):153-4.

259. Delgado C, Francis GE, Fisher D. The uses and properties of PEG-linked proteins. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 1992;9(3-4):249-304.
260. Veronese FM. Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions. *Biomaterials.* mars 2001;22(5):405-17.
261. Powell J, Martinowitz U, Windyga J, Di Minno G, Hellmann A, Pabinger I, et al. Efficacy and safety of prophylaxis with once-weekly BAY 79-4980 compared with thrice-weekly rFVIII-FS in haemophilia A patients. A randomised, active-controlled, double-blind study. *Thromb Haemost.* nov 2012;108(5):913-22.
262. Yatuv R, Robinson M, Dayan-Tarshish I, Baru M. The use of PEGylated liposomes in the development of drug delivery applications for the treatment of hemophilia. *International Journal of Nanomedicine.* 2010;5:581-91.
263. Valentino LA, Cong L, Enockson C, Song X, Scheiflinger F, Muchitsch EM, et al. The biological efficacy profile of BAX 855, a PEGylated recombinant factor VIII molecule. *Haemophilia.* janv 2015;21(1):58-63.
264. Turecek PL, Bossard MJ, Graninger M, Gritsch H, Höllriegl W, Kaliwoda M, et al. BAX 855, a PEGylated rFVIII product with prolonged half-life. Development, functional and structural characterisation. *Hamostaseologie.* 2012;32 Suppl 1:S29-38.
265. Mei B, Pan C, Jiang H, Tjandra H, Strauss J, Chen Y, et al. Rational design of a fully active, long-acting PEGylated factor VIII for hemophilia A treatment. *Blood.* 15 juill 2010;116(2):270-9.
266. Gregoriadis G, Jain S, Papaioannou I, Laing P. Improving the therapeutic efficacy of peptides and proteins: a role for polysialic acids. *Int J Pharm.* 26 août 2005;300(1-2):125-30.
267. Rottensteiner H, Turecek PL, Pendu R, Meijer AB, Lenting P, Mertens K, et al. PEGylation or Polysialylation Reduces FVIII Binding to LRP Resulting in Prolonged Half-Life in Murine Models. *Blood.* 8 sept 2015;110(11):3150.
268. Business Wire. Baxalta Commences Phase 1 Clinical Trial of BAX 826, the Company's Second Extended Half-Life Factor VIII Treatment for Hemophilia A [En ligne]. New York: Business Wire. [cité le 28 févr 2017]. Disponible sur: <http://newsroom.baxalta.com/press-releases/press-release-details/2016/Baxalta-Commences-Phase-1-Clinical-Trial-of-BAX-826-the-Company's-Second-Extended-Half-Life-Factor-VIII-Treatment-for-Hemophilia-A/default.aspx>
269. Mahlangu J, Powell JS, Ragni MV, Chowdary P, Josephson NC, Pabinger I, et al. Phase 3 study of recombinant factor VIII Fc fusion protein in severe hemophilia A. *Blood.* 16 janv 2014;123(3):317-25.
270. Konkle BA, Stasyshyn O, Chowdary P, Bevan DH, Mant T, Shima M, et al. Pegylated, full-length, recombinant factor VIII for prophylactic and on-demand treatment of severe hemophilia A. *Blood.* 27 août 2015;126(9):1078-85.
271. Giangrande P, Andreeva T, Chowdary P, Ehrenforth S, Hanabusa H, Leebeek FWG, et al. Clinical evaluation of glycoPEGylated recombinant FVIII: Efficacy and safety in severe haemophilia A. *Thromb Haemost.* 26 janv 2017;117(2):252-61.

272. Coyle TE, Reding MT, Lin JC, Michaels LA, Shah A, Powell J. Phase I study of BAY 94-9027, a PEGylated B-domain-deleted recombinant factor VIII with an extended half-life, in subjects with hemophilia A. *J Thromb Haemost.* avr 2014;12(4):488-96.
273. Tiede A, Brand B, Fischer R, Kavakli K, Lentz SR, Matsushita T, et al. Enhancing the pharmacokinetic properties of recombinant factor VIII: first-in-human trial of glycoPEGylated recombinant factor VIII in patients with hemophilia A. *J Thromb Haemost.* avr 2013;11(4):670-8.
274. Mahlangu J, Kuliczowski K, Karim FA, Stasyshyn O, Kosinova MV, Lepatan LM, et al. Efficacy and safety of rVIII-SingleChain: results of a phase 1/3 multicenter clinical trial in severe hemophilia A. *Blood.* 4 août 2016;128(5):630-7.
275. Reding MT, Ng HJ, Poulsen LH, Eyster ME, Pabinger I, Shin H-J, et al. Safety and efficacy of BAY 94-9027, a prolonged-half-life factor VIII. *J Thromb Haemost.* mars 2017;15(3):411-9.
276. Young G, Mahlangu J, Kulkarni R, Nolan B, Liesner R, Pasi J, et al. Recombinant factor VIII Fc fusion protein for the prevention and treatment of bleeding in children with severe hemophilia A. *J Thromb Haemost.* juin 2015;13(6):967-77.
277. Mullins ES, Stasyshyn O, Alvarez-Román MT, Osman D, Liesner R, Engl W, et al. Extended half-life pegylated, full-length recombinant factor VIII for prophylaxis in children with severe haemophilia A. *Haemophilia.* 27 nov 2016;23(2):238-46.
278. Stasyshyn O, Khayat CD, Iosava G, Ong J, Abdul Karim F, Fischer K, et al. Safety, efficacy and pharmacokinetics of rVIII-SingleChain in children with severe hemophilia A: results of a multicenter clinical trial. *J Thromb Haemost.* 6 févr 2017;15:1-9.
279. Chowdary P, Fosbury E, Riddell A, Mathias M. Therapeutic and routine prophylactic properties of rFactor VIII Fc (efraloctocog alfa, Eloctate®) in hemophilia A. *J Blood Med.* 2016;7:187-98.
280. Petrini P, Valentino LA, Gringeri A, Re WM, Ewenstein B. Individualizing prophylaxis in hemophilia: a review. *Expert Rev Hematol.* avr 2015;8(2):237-46.
281. Valentino LA. Considerations in individualizing prophylaxis in patients with haemophilia A. *Haemophilia.* sept 2014;20(5):607-15.
282. Hartmann J, Croteau SE. 2017 Clinical trials update: Innovations in hemophilia therapy. *American Journal of Hematology.* 2016;91(12):1252-60.
283. Broderick CR, Herbert RD, Latimer J, Barnes C, Curtin JA, Mathieu E, et al. Association between physical activity and risk of bleeding in children with hemophilia. *JAMA.* 10 oct 2012;308(14):1452-9.
284. Terraube V, O'Donnell JS, Jenkins PV. Factor VIII and von Willebrand factor interaction: biological, clinical and therapeutic importance. *Haemophilia.* janv 2010;16(1):3-13.
285. Lenting PJ, VAN Schooten CJM, Denis CV. Clearance mechanisms of von Willebrand factor and factor VIII. *J Thromb Haemost.* juill 2007;5(7):1353-60.
286. Gallinaro L, Cattini MG, Sztukowska M, Padrini R, Sartorello F, Pontara E, et al. A shorter von Willebrand factor survival in O blood group subjects explains how ABO determinants influence plasma von Willebrand factor. *Blood.* 1 avr 2008;111(7):3540-5.

287. Lalezari S, Martinowitz U, Windyga J, Enriquez MM, Delesen H, Schwartz L, et al. Correlation between endogenous VWF:Ag and PK parameters and bleeding frequency in severe haemophilia A subjects during three-times-weekly prophylaxis with rFVIII-FS. *Haemophilia*. janv 2014;20(1):e15-22.
288. Armstrong JK, Hempel G, Koling S, Chan LS, Fisher T, Meiselman HJ, et al. Antibody against poly(ethylene glycol) adversely affects PEG-asparaginase therapy in acute lymphoblastic leukemia patients. *Cancer*. 1 juill 2007;110(1):103-11.
289. Zhang F, Liu M, Wan H. Discussion about several potential drawbacks of PEGylated therapeutic proteins. *Biol Pharm Bull*. 2014;37(3):335-9.
290. Schellekens H, Hennink WE, Brinks V. The immunogenicity of polyethylene glycol: facts and fiction. *Pharm Res*. juill 2013;30(7):1729-34.
291. Richter AW, Akerblom E. Polyethylene glycol reactive antibodies in man: titer distribution in allergic patients treated with monomethoxy polyethylene glycol modified allergens or placebo, and in healthy blood donors. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1984;74(1):36-9.
292. Garay RP, El-Gewely R, Armstrong JK, Garratty G, Richette P. Antibodies against polyethylene glycol in healthy subjects and in patients treated with PEG-conjugated agents. *Expert Opin Drug Deliv*. nov 2012;9(11):1319-23.
293. Caliceti P, Veronese FM. Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates. *Adv Drug Deliv Rev*. 26 sept 2003;55(10):1261-77.
294. Stidl R, Fuchs S, Bossard M, Siekmann J, Turecek PL, Putz M. Safety of PEGylated recombinant human full-length coagulation factor VIII (BAX 855) in the overall context of PEG and PEG conjugates. *Haemophilia*. 2016;22(1):54-64.
295. Ivens IA, Baumann A, McDonald TA, Humphries TJ, Michaels LA, Mathew P. PEGylated therapeutic proteins for haemophilia treatment: a review for haemophilia caregivers. *Haemophilia*. janv 2013;19(1):11-20.
296. Webster R, Didier E, Harris P, Siegel N, Stadler J, Tilbury L, et al. PEGylated proteins: evaluation of their safety in the absence of definitive metabolism studies. *Drug Metab Dispos*. janv 2007;35(1):9-16.
297. Stennicke HR, Kjalke M, Karpf DM, Balling KW, Johansen PB, Elm T, et al. A novel B-domain O-glycoPEGylated FVIII (N8-GP) demonstrates full efficacy and prolonged effect in hemophilic mice models. *Blood*. 2013;121(11):2108-16.
298. Harding FA, Stickler MM, Razo J, DuBridg RB. The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: Residual immunogenicity resides in the CDR regions. *mAbs*. 2010;2(3):256-65.
299. Krishnamoorthy S, Liu T, Drager D, Patarroyo-White S, Chhabra ES, Peters R, et al. Recombinant factor VIII Fc (rFVIII-Fc) fusion protein reduces immunogenicity and induces tolerance in hemophilia A mice. *Cellular Immunology*. mars 2016;301:30-9.
300. Ragni MV, Alabek M, Malec LM. Inhibitor development in two cousins receiving full-length factor VIII (FVIII) and FVIII-Fc fusion protein. *Haemophilia*. sept 2016;22(5):e462-464.

301. De Groot AS, Moise L, McMurry JA, Wambre E, Van Overtvelt L, Moingeon P, et al. Activation of natural regulatory T cells by IgG Fc-derived peptide « Tregitopes ». *Blood*. 15 oct 2008;112(8):3303-11.
302. De Groot AS, Cousens L, Mingozzi F, Martin W. Tregitope peptides: the active pharmaceutical ingredient of IVIG? *Clin Dev Immunol*. 2013;2013, Article ID 493138:6 pages.
303. Johnson KA, Zhou Z-Y. Costs of care in hemophilia and possible implications of health care reform. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011;2011:413-8.
304. Poret E, Mourey G. Mise en place de la mesure de l'activité du facteur VIII par méthode chromogénique au laboratoire d'hémostase de l'Etablissement Français du Sang de Besançon. Comparaison avec la méthode chromométrique en un temps. *Spectra Biologie*. Mai 2014;208:63-71.
305. Peyvandi F, Oldenburg J, Friedman KD. A critical appraisal of one-stage and chromogenic assays of factor VIII activity. *J Thromb Haemost*. févr 2016;14(2):248-61.
306. Afonja O, Kozak R, Petraro P, Michaels LA, Mathew P, Lemm G, et al. Baby hamster kidney cell-derived recombinant factor VIII: a quarter century of learning and clinical experience. *Expert Rev Hematol*. déc 2016;9(12):1151-64.
307. Peyvandi F, Garagiola I, Biguzzi E. Advances in the treatment of bleeding disorders. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2016;14(11):2095-106.
308. McCue J, Kshirsagar R, Selvitelli K, Lu Q, Zhang M, Mei B, et al. Manufacturing process used to produce long-acting recombinant factor VIII Fc fusion protein. *Biologicals*. juill 2015;43(4):213-9.
309. Baxalta. Adynovate (antihemophilic factor [recombinant], pegylated). Full prescribing information [En ligne]. Westlake Village (CA): Baxalta Inc.; 2015 [cité le 2 mars 2017]. Disponible sur: <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/ApprovedProducts/LicensedProductsBLAs/FractionatedPlasmaProducts/UCM472594.pdf>
310. CSL Behring. Afstyla™(antihemophilic factor [recombinant], Single Chain).Full prescribing information [En ligne]. Marburg (Germany): CSL Behring; 2016 [cité le 2 mars 2017]. Disponible sur: <http://labeling.cslbehring.com/PI/US/Afstyla/EN/Afstyla-Prescribing-Information.pdf>
311. Peyvandi F, Garagiola I, Young G. The past and future of haemophilia: diagnosis, treatments, and its complications. *The Lancet*. 2016;388(10040):187-97.
312. Chambost H, Guillaume Y, Falaise C, Roux C, Monpoux F. Actualité sur le risque de survenue d'inhibiteur à l'initiation du traitement par concentré de facteur VIII dans l'hémophilie A sévère. *Revue d'Oncologie Hématologie Pédiatrique*. juin 2015;3(2):78-87.
313. Dargaud Y, Pavlova A, Lacroix-Desmazes S, Fischer K, Soucie M, Claeysens S, et al. Achievements, challenges and unmet needs for haemophilia patients with inhibitors. *Haemophilia*. 2 janv 2016;22:1-24.
314. Scandella D. Epitope specificity and inactivation mechanisms of factor VIII inhibitor antibodies. *Vox Sang*. 1999;77 Suppl 1:17-20.

315. Saenko EL, Shima M, Rajalakshmi KJ, Scandella D. A role for the C2 domain of factor VIII in binding to von Willebrand factor. *J Biol Chem.* 15 avr 1994;269(15):11601-5.
316. Foster PA, Fulcher CA, Houghten RA, Zimmerman TS. Synthetic factor VIII peptides with amino acid sequences contained within the C2 domain of factor VIII inhibit factor VIII binding to phosphatidylserine. *Blood.* 15 mai 1990;75(10):1999-2004.
317. Zhong D, Saenko EL, Shima M, Felch M, Scandella D. Some human inhibitor antibodies interfere with factor VIII binding to factor IX. *Blood.* 1 juill 1998;92(1):136-42.
318. Franchini M, Lippi G. Prevention of inhibitor development in hemophilia A in 2016. A glimpse into the future? *Thrombosis Research.* déc 2016;148:96-100.
319. Astermark J, Berntorp E, White GC, Kroner BL, MIBS Study Group. The Malmö International Brother Study (MIBS): further support for genetic predisposition to inhibitor development in hemophilia patients. *Haemophilia.* mai 2001;7(3):267-72.
320. Aledort LM, Dimichele DM. Inhibitors occur more frequently in African-American and Latino haemophiliacs. *Haemophilia.* janv 1998;4(1):68.
321. Viel KR, Ameri A, Abshire TC, Iyer RV, Watts RG, Lucher C, et al. Inhibitors of factor VIII in black patients with hemophilia. *N Engl J Med.* 16 avr 2009;360(16):1618-27.
322. Astermark J, Oldenburg J, Pavlova A, Berntorp E, Lefvert A-K, MIBS Study Group. Polymorphisms in the IL10 but not in the IL1beta and IL4 genes are associated with inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood.* 15 avr 2006;107(8):3167-72.
323. Astermark J, Oldenburg J, Carlson J, Pavlova A, Kavakli K, Berntorp E, et al. Polymorphisms in the TNFA gene and the risk of inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood.* 1 déc 2006;108(12):3739-45.
324. Astermark J, Wang X, Oldenburg J, Berntorp E, Lefvert A, MIBS Study Grp. Polymorphisms in the CTLA-4 gene and inhibitor development in patients with severe hemophilia A. *J Thromb Haemost.* 2007;5:263-265.
325. Witmer C, Young G. Factor VIII inhibitors in hemophilia A: rationale and latest evidence. *Therapeutic Advances in Hematology.* févr 2013;4(1):59-72.
326. Gouw SC, van der Bom JG, Marijke van den Berg H. Treatment-related risk factors of inhibitor development in previously untreated patients with hemophilia A: the CANAL cohort study. *Blood.* 23 mai 2007;109(11):4648-54.
327. Gouw SC, van den Berg HM, le Cessie S, van der Bom JG. Treatment characteristics and the risk of inhibitor development: a multicenter cohort study among previously untreated patients with severe hemophilia A. *J Thromb Haemost.* juill 2007;5(7):1383-90.
328. Gouw SC, van den Berg HM, Fischer K, Auerswald G, Carcao M, Chalmers E, et al. Intensity of factor VIII treatment and inhibitor development in children with severe hemophilia A: the RODIN study. *Blood.* 16 mai 2013;121(20):4046-55.
329. Pradeu T, Vivier E. The discontinuity theory of immunity. *Sci Immunol.* 14 juill 2016;1(1).

330. Eckhardt CL, van der Bom JG, van der Naald M, Peters M, Kamphuisen PW, Fijnvandraat K. Surgery and inhibitor development in hemophilia A: a systematic review. *J Thromb Haemost.* oct 2011;9(10):1948-58.
331. Lövgren KM, Søndergaard H, Skov S, Wiinberg B. Non-genetic risk factors in haemophilia A inhibitor management - the danger theory and the use of animal models. *Haemophilia.* sept 2016;22(5):657-66.
332. Gallucci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol.* févr 2001;13(1):114-9.
333. Astermark J, Altisent C, Batorova A, Diniz MJ, Gringeri A, Holme PA, et al. Non-genetic risk factors and the development of inhibitors in haemophilia: a comprehensive review and consensus report. *Haemophilia.* 1 sept 2010;16(5):747-66.
334. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:991-1045.
335. Santagostino E, Mancuso ME, Rocino A, Mancuso G, Mazzucconi MG, Tagliaferri A, et al. Environmental risk factors for inhibitor development in children with haemophilia A: a case-control study. *Br J Haematol.* août 2005;130(3):422-7.
336. Peyvandi F, Ettinghausen CE, Goudemand J, Jimenez-Yuste V, Santagostino E, Makris M. New findings on inhibitor development: from registries to clinical studies. *Haemophilia.* 2017;23 Suppl 1:4-13.
337. Iorio A, Halimeh S, Holzhauer S, Goldenberg N, Marchesini E, Marcucci M, et al. Rate of inhibitor development in previously untreated hemophilia A patients treated with plasma-derived or recombinant factor VIII concentrates: a systematic review. *J Thromb Haemost.* juin 2010;8(6):1256-65.
338. Franchini M, Coppola A, Rocino A, Santagostino E, Tagliaferri A, Zanon E, et al. Systematic review of the role of FVIII concentrates in inhibitor development in previously untreated patients with severe hemophilia a: a 2013 update. *Semin Thromb Hemost.* oct 2013;39(7):752-66.
339. Marcucci M, Mancuso ME, Santagostino E, Kenet G, Elalfy M, Holzhauer S, et al. Type and intensity of FVIII exposure on inhibitor development in PUPs with haemophilia A. A patient-level meta-analysis. *Thromb Haemost.* mai 2015;113(5):958-67.
340. Peyvandi F, Mannucci PM, Garagiola I, El-Beshlawy A, Elalfy M, Ramanan V, et al. A Randomized Trial of Factor VIII and Neutralizing Antibodies in Hemophilia A. *N Engl J Med.* 25 mai 2016;374(21):2054-64.
341. Gouw SC, van der Bom JG, Auerswald G, Ettinghausen CE, Tedgård U, van den Berg HM. Recombinant versus plasma-derived factor VIII products and the development of inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A: the CANAL cohort study. *Blood.* 1 juin 2007;109(11):4693-7.
342. Fischer K, Lassila R, Peyvandi F, Calizzani G, Gatt A, Lambert T, et al. Inhibitor development in haemophilia according to concentrate. Four-year results from the European HAemophilia Safety Surveillance (EUHASS) project. *Thromb Haemost.* mai 2015;113(5):968-75.

343. World Federation of Hemophilia. Déclaration de la FMH au sujet des résultats de l'étude SIPPET [En ligne]. Montréal : WFH ; 2016 [cité le 15 mars 2017]. Disponible sur: <http://www.hemophiliaworld.org/fr/2016/06/declaration-de-la-fmh-au-sujet-des-resultats-de-letude-sippet/>
344. Mathew P, Dinter H, Church N, Humphries TJ, Kulkarni R. Inhibitors in haemophilia A: a perspective on clotting factor products as a potential contributing factor. *Haemophilia*. mai 2016;22(3):334-41.
345. Le Quellec S. Le choix du concentré de facteur VIII recombinant influence-t-il le développement d'inhibiteurs chez les patients hémophiles A? *Hématologie*. 2015;21(1):12-4.
346. Collins PW, Palmer BP, Chalmers EA, Hart DP, Liesner R, Rangarajan S, et al. Factor VIII brand and the incidence of factor VIII inhibitors in previously untreated UK children with severe hemophilia A, 2000-2011. *Blood*. 27 nov 2014;124(23):3389-97.
347. Hay CRM, DiMichele DM, International Immune Tolerance Study. The principal results of the International Immune Tolerance Study: a randomized dose comparison. *Blood*. 9 févr 2012;119(6):1335-44.
348. Spencer HT, Riley BE, Doering CB. State of the art: gene therapy of haemophilia. *Haemophilia*. 4 juill 2016;22:66-71.
349. Institut national de la santé et de la recherche médicale. Thérapie génique [En ligne]. Paris : Inserm ; 2014 [cité le 4 mars 2017]. Disponible sur: <http://www.inserm.fr/thematiques/genetique-genomique-et-bioinformatique/dossiers-d-information/therapie-genique>
350. Park C-Y, Lee DR, Sung JJ, Kim D-W. Genome-editing technologies for gene correction of hemophilia. *Human Genetics*. 2016;135(9):977-81.
351. Daya S, Berns KI. Gene Therapy Using Adeno-Associated Virus Vectors. *Clinical Microbiology Reviews*. oct 2008;21(4):583-93.
352. Nathwani AC, Tuddenham EGD, Rangarajan S, Rosales C, McIntosh J, Linch DC, et al. Adenovirus-Associated Virus Vector-Mediated Gene Transfer in Hemophilia B. *N Engl J Med*. 10 déc 2011;365(25):2357-65.
353. GlobeNewswire. BioMarin Provides Positive Proof-of-Concept Data for BMN 270 Gene Therapy in Hemophilia A in Late Breaking Oral Presentation at the World Federation of Hemophilia (WFH) 2016 World Congress [En ligne]. Montréal : Nasdaq; 2016 [cité le 9 mars 2017]. Disponible sur: <https://globenewswire.com/news-release/2016/07/27/859391/0/en/BioMarin-Provides-Positive-Proof-of-Concept-Data-for-BMN-270-Gene-Therapy-in-Hemophilia-A-in-Late-Breaking-Oral-Presentation-at-the-World-Federation-of-Hemophilia-WFH-2016-World-Co.html?culture=fr-ca>
354. Dolgin E. Early clinical data raise the bar for hemophilia gene therapies. *Nat Biotech*. oct 2016;34(10):999-1001.
355. Shi Q, Wilcox DA, Fahs SA, Weiler H, Wells CW, Cooley BC, et al. Factor VIII ectopically targeted to platelets is therapeutic in hemophilia A with high-titer inhibitory antibodies. *J Clin Invest*. juill 2006;116(7):1974-82.

356. Chen Y, Schroeder JA, Kuether EL, Zhang G, Shi Q. Platelet gene therapy by lentiviral gene delivery to hematopoietic stem cells restores hemostasis and induces humoral immune tolerance in FIX(null) mice. *Mol Ther.* janv 2014;22(1):169-77.
357. Prakash V, Moore M, Yáñez-Muñoz RJ. Current Progress in Therapeutic Gene Editing for Monogenic Diseases. *Molecular Therapy.* mars 2016;24(3):465-74.
358. Collectis. Ingénierie des génomes [En ligne]. Paris : Collectis ; 2017 [cité le 9 mars 2017]. Disponible sur: <http://www.collectis.com/fr/ingenierie-des-genomes>
359. Sharma R, Anguela XM, Doyon Y, Wechsler T, DeKolver RC, Sproul S, et al. In vivo genome editing of the albumin locus as a platform for protein replacement therapy. *Blood.* 8 oct 2015;126(15):1777-84.
360. Park C-Y, Kim DH, Son JS, Sung JJ, Lee J, Bae S, et al. Functional Correction of Large Factor VIII Gene Chromosomal Inversions in Hemophilia A Patient-Derived iPSCs Using CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell.* 6 août 2015;17(2):213-20.
361. Shima M, Hanabusa H, Taki M, Matsushita T, Sato T, Fukutake K, et al. Factor VIII-Mimetic Function of Humanized Bispecific Antibody in Hemophilia A. *The New England Journal Of Medicine.* 26 mai 2016;374(21):2044-53.
362. Maroney SA, Mast AE. New insights into the biology of tissue factor pathway inhibitor. *Journal Of Thrombosis And Haemostasis: JTH.* juin 2015;13 Suppl 1:S200-7.
363. de Prost D, Moatti D, Petit L, Ollivier V. L'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI), molécule clé de défense contre la thrombose. *STV.* 1999;11(7):548-54.
364. Chowdary P, Lethagen S, Friedrich U, Brand B, Hay C, Abdul Karim F, et al. Safety and pharmacokinetics of anti-TFPI antibody (concizumab) in healthy volunteers and patients with hemophilia: a randomized first human dose trial. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2015;13(5):743-54.
365. United States National Library of Medicine. A Single Escalating Dose Study of BAY 1093884 in Subjects With Severe Hemophilia Types A or B, With or Without Inhibitors [En ligne]. Rockville Pike : U.S. National Library of Medicine ; 2017 [cité le 11 mars 2017]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02571569>
366. Sehgal A, Barros S, Ivanciu L, Cooley B, Qin J, Racie T, et al. An RNAi therapeutic targeting antithrombin to rebalance the coagulation system and promote hemostasis in hemophilia. *Nature Medicine.* mai 2015;21(5):492-7.
367. Shima M, Lillicrap D, Kruse-Jarres R. Alternative therapies for the management of inhibitors. *Haemophilia.* 4 juill 2016;22:36-41.
368. Ragni MV, Georgiev P, Mant T, Creagh MD, Lissitchkov T, Bevan D, et al. Fitusiran, an Investigational RNAi Therapeutic Targeting Antithrombin for the Treatment of Hemophilia: Updated Results from a Phase 1 and Phase 1/2 Extension Study in Patients without Inhibitors. *Blood.* 1 déc 2016;128(22):1397.
369. Uchida N, Sambe T, Yoneyama K, Fukazawa N, Kawanishi T, Kobayashi S, et al. A first-in-human phase 1 study of ACE910, a novel factor VIII-mimetic bispecific antibody, in healthy subjects. *Blood.* 31 mars 2016;127(13):1633-41.

370. Carroll J. Severe adverse events mar the end of Roche's PhIII for 'breakthrough' hemophilia drug [En ligne]. Harrisonburg : Endpoints News ; 2016 [cité le 11 mars 2017]. Disponible sur: <https://endpts.com/severe-adverse-events-mar-the-end-of-roches-phiii-for-breakthrough-hemophilia-drug/>
371. Knappe S, Hartmann R, Goldstein B, Ewenstein BM, Valentino L, Scheiflinger F. Synergistic Effects of a Procoagulant Bispecific Antibody and Rescue Therapies on Thrombin Generation- a Potential Safety Risk. Blood. 1 déc 2016;128(22):4952.
372. European Hemophilia Consortium. Roche issues statement on Emicizumab clinical trial EHC - European Haemophilia Consortium [En ligne]. Brussels : EHC ; 2017 [cité le 11 mars 2017]. Disponible sur: <http://www.ehc.eu/roche-issues-statement-on-emicizumab-clinical-trial/>
373. Rosenthal M. U.S. donors and volunteers vital to advancing Treatment For All. Hemophilia Aid - WFH USA. 2012;2012:1-1.

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 10/05/2017

<p align="center">DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE</p> <p>présenté par : Laura PICARD</p> <p><u>Sujet :</u></p> <p align="center">HISTORIQUE ET EVOLUTION DES THERAPEUTIQUES SUBSTITUTIVES DE L'HEMOPHILIE A : DU PLASMA FRAIS A L'ARRIVEE DU « LONG-ACTING FACTOR VIII »</p> <p><u>Jury :</u></p> <p>Président : Pr. FAIVRE Béatrice, Professeur des Universités Directeur : Dr. PERRIN Julien, Maître de conférences Juges : Pr. VIGNERON Claude, Professeur émérite Dr. MARTIN Michèle, Docteur en médecine</p>	<p align="right">Vu, 28/3/2017</p> <p align="center">Nancy, le</p> <p>Le Président du Jury Directeur de Thèse Pr. FAIVRE Béatrice Dr. PERRIN Julien</p>  
<p align="center">Vu et approuvé,</p> <p>Nancy, le 04.04.2017</p> <p align="center">Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lorraine,</p>  <p align="center">Francine PAULUS</p> 	<p align="center">Vu,</p> <p>Nancy, le 11 AVR. 2017</p> <p align="center">Le Président de l'Université de Lorraine,</p>  <p align="center">Pierre MUTZENHARDT</p> <p align="center">N° d'enregistrement : 9710</p>

N° d'identification :

TITRE

Historique et évolution des thérapeutiques substitutives de l'hémophilie A :
du plasma frais à l'arrivée du « *long-acting factor VIII* »

Thèse soutenue le 10 mai 2017

Par Laura PICARD

RESUME :

La prise en charge de l'hémophilie A a beaucoup évolué durant les 50 dernières années. Le traitement des hémorragies, initialement limité à la transfusion de sang total puis de plasma frais, a subi une avancée considérable avec l'arrivée des concentrés de FVIII d'origine plasmatique. Malheureusement, le début des années 80 est marqué par le drame du sang contaminé mettant fin à l'optimisme lié à l'utilisation de ces facteurs. A partir de ce moment, la sécurité des produits dérivés du sang devient une priorité absolue menant au développement de concentrés plasmatiques de très haute pureté.

L'introduction des concentrés de FVIII recombinants dans les années 90 représente un progrès thérapeutique immense. Leur utilisation permet non seulement de réduire le risque de transmission d'agents infectieux mais aussi de généraliser le traitement prophylactique. Celui-ci est cependant relativement contraignant, c'est pourquoi les FVIII recombinants à demi-vie prolongée viennent de faire leur apparition sur le marché des produits anti-hémophiliques.

La complication majeure du traitement substitutif actuel, caractérisé par l'utilisation de concentrés de FVIII d'origine plasmatique ou recombinante, n'est plus liée à la transmission d'agents infectieux mais au développement d'inhibiteurs limitant l'efficacité du traitement. La recherche de méthodes alternatives permettant de contourner la présence d'inhibiteurs a permis de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques, qui ne sont plus basées sur le remplacement du FVIII déficitaire. L'émergence de ces nouveaux traitements potentiels ouvre de nouvelles perspectives d'avenir aux patients hémophiles. Elle apporte l'espoir d'une optimisation considérable de la prise en charge de l'hémophilie A à travers le monde.

MOTS CLES: HEMOPHILIE A, FACTEUR VIII, PLASMA FRAIS CONGELE, CRYOPRECIPITES, FACTEUR VIII A DEMI-VIE PROLONGEE

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Dr PERRIN Julien	Hématologie biologique	Expérimentale <input type="checkbox"/>
		Bibliographique <input checked="" type="checkbox"/>
		Thème <input checked="" type="checkbox"/>

Thèmes

1 – Sciences fondamentales

2 – Hygiène/Environnement

3 – Médicament

4 – Alimentation – Nutrition

5 - Biologie

6 – Pratique professionnelle