



HAL
open science

Patients hémophiles A sévères traités par Emicizumab (HEMLIBRA®) : quid de l'anticoagulation

Bettina Leroy

► **To cite this version:**

Bettina Leroy. Patients hémophiles A sévères traités par Emicizumab (HEMLIBRA®) : quid de l'anticoagulation. Médecine humaine et pathologie. 2021. dumas-03333867

HAL Id: dumas-03333867

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03333867>

Submitted on 3 Sep 2021

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.

UNIVERSITÉ de CAEN NORMANDIE

UFR SANTÉ

FACULTÉ de MÉDECINE

Année 2020/2021

THÈSE POUR L'OBTENTION
DU GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement le : 11 mai 2021

par

Mme Bettina LEROY

Né (e) le 12 Octobre 1988 à La Garenne-Colombes (*Hauts de Seine*)

TITRE DE LA THÈSE :

**Patients hémophiles A sévères traités par Emicizumab (HEMLIBRA®) :
quid de l'anticoagulation**

Président : Monsieur le Professeur Yohann REPESSE

Membres : Madame le Professeur Pascale SCHUMMAN-BARD

Monsieur le Professeur Achille AOUBA

Madame le Docteur Marie BRIONNE-FRANCOIS

Monsieur le Docteur Philippe GAUTIER

Directeur de thèse : Pr Yohann REPESSE

Année Universitaire 2020/2021**Doyen**

Professeur Emmanuel TOUZÉ

Assesseurs

Professeur Paul MILLIEZ (pédagogie)

Professeur Guy LAUNOY (recherche)

Professeur Sonia DOLLFUS & Professeur Evelyne EMERY (3^{ème} cycle)**Directrice administrative**

Madame Sarah CHEMTOB

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

M.	AGOSTINI Denis	Biophysique et médecine nucléaire
M.	AIDE Nicolas	Biophysique et médecine nucléaire
M.	ALEXANDRE Joachim	Pharmacologie clinique
M.	ALLOUCHE Stéphane	Biochimie et biologie moléculaire
M.	ALVES Arnaud	Chirurgie digestive
M.	AOUBA Achille	Médecine interne
M.	BABIN Emmanuel	Oto-Rhino-Laryngologie
M.	BÉNATEAU Hervé	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
M.	BENOIST Guillaume	Gynécologie - Obstétrique
M.	BERGER Ludovic	Chirurgie vasculaire
M.	BERGOT Emmanuel	Pneumologie
M.	BIBEAU Frédéric	Anatomie et cytologie pathologique
Mme	BRAZO Perrine	Psychiatrie d'adultes
M.	BROUARD Jacques	Pédiatrie
M.	BUI Thanh-huy Eric	Psychiatrie d'adultes
M.	BUSTANY Pierre	Pharmacologie
Mme	CHAPON Françoise	Histologie, Embryologie
Mme	CLIN-GODARD Bénédicte	Médecine et santé au travail
M.	DAMAJ Ghandi Laurent	Hématologie
M.	DAO Manh Thông	Hépatologie-Gastro-Entérologie
M.	DEFER Gilles	Neurologie
M.	DELAMILLIEURE Pascal	Psychiatrie d'adultes
M.	DENISE Pierre	Physiologie
Mme	DOLLFUS Sonia	Psychiatrie d'adultes
Mme	DOMPMARTIN-BLANCHÈRE Anne	Dermatologie

M. DREYFUS Michel	Gynécologie - Obstétrique
M. DU CHEYRON Damien	Réanimation médicale
Mme ÉMERY Evelyne	Neurochirurgie
M. ESMAIL-BEYGUI Farzin	Cardiologie
Mme FAUVET Raffaèle	Gynécologie – Obstétrique
M. FISCHER Marc-Olivier	Anesthésiologie et réanimation
M. GÉRARD Jean-Louis	Anesthésiologie et réanimation
M. GUÉNOLÉ Fabian	Pédopsychiatrie
Mme GUITTET-BAUD Lydia	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
M. HAMON Martial	Cardiologie
Mme HAMON Michèle	Radiologie et imagerie médicale
M. HANOUCZ Jean-Luc	Anesthésie et réa. médecine péri-opératoire
M. HITIER Martin	Anatomie –ORL Chirurgie Cervico-faciale
M. HULET Christophe	Chirurgie orthopédique et traumatologique
M. ICARD Philippe	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
M. JOIN-LAMBERT Olivier	Bactériologie - Virologie
Mme JOLY-LOBBEDEZ Florence	Cancérologie
M. JOUBERT Michael	Endocrinologie
M. LAUNOY Guy	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
M. LE HELLO Simon	Bactériologie-Virologie
Mme LE MAUFF Brigitte	Immunologie
M. LOBBEDEVZ Thierry	Néphrologie
M. LUBRANO Jean	Chirurgie viscérale et digestive
M. MAHE Marc-André	Cancérologie
M. MANRIQUE Alain	Biophysique et médecine nucléaire
M. MARCÉLLI Christian	Rhumatologie
M. MARTINAUD Olivier	Neurologie
M. MAUREL Jean	Chirurgie générale
M. MILLIEZ Paul	Cardiologie
M. MOREAU Sylvain	Anatomie/Oto-Rhino-Laryngologie
M. MOUTEL Grégoire	Médecine légale et droit de la santé
M. NORMAND Hervé	Physiologie
M. PARIENTI Jean-Jacques	Biostatistiques, info. médicale et tech. de communication
M. PELAGE Jean-Pierre	Radiologie et imagerie médicale

Mme PIQUET Marie-Astrid	Nutrition
M. QUINTYN Jean-Claude	Ophthalmologie
Mme RAT Anne-Christine	Rhumatologie
M. REPESSE Yohann	Hématologie
M. REZNIK Yves	Endocrinologie
M. ROD Julien	Chirurgie infantile
M. ROUPIE Eric	Médecine d'urgence
Mme THARIAT Juliette	Radiothérapie
M. TILLOU Xavier	Urologie
M. TOUZÉ Emmanuel	Neurologie
Mme VABRET Astrid	Bactériologie - Virologie
M. VERDON Renaud	Maladies infectieuses
Mme VERNEUIL Laurence	Dermatologie
M. VIVIEN Denis	Biologie cellulaire

PROFESSEURS ASSOCIÉS DES UNIVERSITÉS A MI-TEMPS

Mme BELLOT Anne	Pédiatrie
M. DE LA SAYETTE Vincent	Neurologie
M. GUILLAUME Cyril	Médecine palliative
M. LE BAS François	Médecine Générale
M. SABATIER Rémi	Cardiologie

PRCE

Mme LELEU Solveig	Anglais
-------------------	---------

PROFESSEURS ÉMÉRITES

M. DERLON Jean-Michel	Neurochirurgie
M. GUILLOIS Bernard	Pédiatrie
M. HABRAND Jean-Louis	Cancérologie option Radiothérapie
M. HURAUULT de LIGNY Bruno	Néphrologie
Mme KOTTLER Marie-Laure	Biochimie et biologie moléculaire
M. LE COUTOUR Xavier	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
M. LEPORRIER Michel	Hématologie
M. RAVASSE Philippe	Chirurgie infantile
M. TROUSSARD Xavier	Hématologie
M. VIADER Fausto	Neurologie

Année Universitaire 2020/2021**Doyen**

Professeur Emmanuel TOUZÉ

Assesseurs

Professeur Paul MILLIEZ (pédagogie)

Professeur Guy LAUNOY (recherche)

Professeur Sonia DOLLFUS & Professeur Evelyne EMERY (3^{ème} cycle)**Directrice administrative**

Madame Sarah CHEMTOB

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme BENHAÏM Annie	Biologie cellulaire
M. BESNARD Stéphane	Physiologie
Mme BONHOMME Julie	Parasitologie et mycologie
M. BOUVIER Nicolas	Néphrologie
M. BROSSIER David	Pédiatrie
M. COULBAULT Laurent	Biochimie et Biologie moléculaire
M. CREVEUIL Christian	Biostatistiques, info. médicale et tech. de communication
M. DE BOYSSON Hubert	Médecine interne
Mme DINA Julia	Bactériologie - Virologie
Mme DUPONT Claire	Pédiatrie
M. ÉTARD Olivier	Physiologie
M. GABEREL Thomas	Neurochirurgie
M. GRUCHY Nicolas	Génétique
M. ISNARD Christophe	Bactériologie Virologie
M. JUSTET Aurélien	Pneumologie
Mme KRIEGER Sophie	Pharmacie
M. LEGALLOIS Damien	Cardiologie
Mme LELONG-BOULOUARD Véronique	Pharmacologie fondamentale
Mme LEVALLET Guénaëlle	Cytologie et Histologie
M. MACREZ Richard	Médecine d'urgence
M. MITTRE Hervé	Biologie cellulaire
M. MOLIN Arnaud	Génétique
M. SAINT-LORANT Guillaume	Pharmacie

M. SESBOÛÉ Bruno	Physiologie
M. TOUTIRAIS Olivier	Immunologie
M. VEYSSIERE Alexis	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie

MAITRE DE CONFERENCES DES UNIVERSITÉS DE MÉDECINE GÉNÉRALE

M. HUMBERT Xavier

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIÉS DES UNIVERSITÉS A MI-TEMPS

Mme ABBATE-LERAY Pascale	Médecine générale
M. BANSARD Mathieu	Médecine générale
M. COUETTE Pierre-André	Médecine générale
Mme NOEL DE JAEGHER Sophie	Médecine générale
M. PITHON Anni	Médecine générale
M. SAINMONT Nicolas	Médecine générale
Mme SCHONBRODT Laure	Médecine générale

MAITRES DE CONFERENCES ÉMÉRITES

Mme DEBRUYNE Danièle	Pharmacologie fondamentale
Mme DERLON-BOREL Annie	Hématologie
Mme LEPORRIER Nathalie	Génétique

LISTE DES ENSEIGNANTS-CHERCHEURS

Directeur de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques
Professeur Michel BOULOUARD

Assesseurs

Professeur Pascale SCHUMANN-BARD
Professeur Anne-Sophie VOISIN-CHIRET

Directrice administrative
Madame Sarah CHEMTOB

Directrice administrative adjointe
Madame Emmanuelle BOURDON

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

BOULOUARD Michel	Physiologie, Pharmacologie
BUREAU Ronan	Biophysique, Chémoinformatique
COLLOT Valérie	Pharmacognosie
DALLEMAGNE Patrick	Chimie médicinale
DAUPHIN François	Physiologie, Pharmacologie
DELEPEE Raphaël	Chimie analytique
FABIS Frédéric	Chimie organique
FRERET Thomas	Physiologie, Pharmacologie
GARON David	Botanique, Mycologie, Biotechnologies
GIARD Jean-Christophe	Bactériologie, Virologie
MALZERT-FREON Aurélie	Pharmacie galénique
ROCHAS Christophe	Chimie organique
SCHUMANN-BARD Pascale	Physiologie, Pharmacologie
SICHEL François	Toxicologie
SOPKOVA Jana	Biophysique, Drug design
VOISIN-CHIRET Anne-Sophie	Chimie médicinale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

ANDRE Véronique – HDR	Biochimie, Toxicologie
BOUET Valentine – HDR	Physiologie, Pharmacologie
CAILLY Thomas – HDR	Chimie bio-inorganique, Chimie organique

DENOYELLE Christophe – HDR	Biologie cellulaire et moléculaire, Biochimie, Cancérologie
DHALLUIN Anne	Bactériologie, Virologie, Immunologie
ELDIN de PECOULAS Philippe – HDR	Parasitologie, Mycologie médicale
GROO Anne-Claire	Pharmacie galénique
KIEFFER Charline	Chimie médicinale
KRIEGER Sophie (Praticien hospitalier) – HDR	Biologie clinique
LAPORTE-WOJCIK Catherine	Chimie bio-inorganique
LEBAILLY Pierre – HDR	Santé publique
LECHEVREL Mathilde – HDR	Toxicologie
LEGER Marianne	Physiologie, Pharmacologie
LEPAILLEUR Alban – HDR	Modélisation moléculaire
N’DIAYE Monique	Parasitologie, Mycologie médicale, Biochimie clinique
PAIZANIS Eleni	Physiologie, Pharmacologie
PEREIRA-ROSENFELD Maria de Fatima	Chimie organique et thérapeutique
POTTIER Ivannah	Chimie et toxicologie analytiques
PREVOST Virginie – HDR	Chimie analytique, Nutrition, Education thérapeutique du patient
QUINTIN Jérôme	Pharmacognosie
RIOULT Jean-Philippe	Botanique, Mycologie, Biotechnologies
SINCE Marc	Chimie analytique
VILLEDIEU Marie – HDR	Biologie et thérapies innovantes des cancers

PROFESSEUR AGREGÉ (PRAG)

PRICOT Sophie	Anglais
----------------------------	---------

PERSONNEL ASSOCIÉ À TEMPS PARTIEL (PAST)

SAINT-LORANT Guillaume	Pharmacie clinique
SEDILLO Patrick	Pharmacie officinale
SEGONZAC Virginie	Pharmacie officinale

ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE

JOURDAN Jean-Pierre

Remerciements

A monsieur le Professeur Yohann REPESSE, Directeur de thèse et Président du jury,
Merci d'avoir accepté de diriger et présider ma thèse, et pour tout ce que tu m'as apporté durant ma formation. Un remerciement particulier pour ton accompagnement durant ce travail et tout au long de mon parcours. Sois assuré de ma sincère gratitude.

A Madame le Professeur Pascale SCHUMANN-BARD, membre du jury,
Vous me faites l'honneur de juger mon travail. Veuillez trouver ici l'expression de mes sentiments respectueux.

A Monsieur le Professeur Achille AOUBA, membre du jury,
Vous me faites l'honneur de juger mon travail. Je vous en remercie et vous assure de mon profond respect.

A Madame le Docteur Marie BRIONNE-FRANCOIS, membre du jury,
Merci d'avoir accepté de juger mon travail et pour tout ce que tu m'as transmis lors de ma formation. Je tiens particulièrement à te remercier pour ta disponibilité et ton accompagnement, qui m'ont permis de prendre confiance dans mon travail. Sois assurée de ma sincère reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Philippe GAUTIER, membre du jury,
Merci d'avoir accepté de juger mon travail et d'avoir contribué à ma formation avec bienveillance. Sois assuré de ma sincère reconnaissance.

Je remercie toute l'équipe du laboratoire d'hématologie, les biologistes ainsi que les techniciennes et techniciens du laboratoire qui ont contribué à ma formation. Sonia, Joëlle et Nicolas, merci pour votre aide durant ces années. A mes co-internes, merci de m'avoir accompagnée et soutenue jusqu'au bout. C'était un plaisir de travailler à vos côtés.

Je remercie mes nouveaux collègues, de m'avoir permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions.

A mes amis, vous qui m'apportez tant au quotidien, merci. Laure-Marine, Rémy et Maël, merci pour votre amitié si sincère. Tant de moments et d'émotions partagés ensemble qui font la richesse de notre amitié.

Claire et la famille DUGAST, ma deuxième famille, nos années passées ensemble font ce que je suis aujourd'hui. Merci.

Luc et Sophie, sans vous je n'y serais pas arrivé. Merci d'être présents à mes côtés et de me permettre d'évoluer dans un environnement serein et chaleureux.

Je remercie ma maman pour son soutien toutes ces longues années d'études et pour sa bienveillance au quotidien qui m'aide tant.

Abréviations

AAV : Adenovirus Associated Virus

ABR : Annualized Bleeding Rate (taux annualisé de saignements)

ADAMTS : A Disintegrin And Metalloprotease with Thrombospondin type 1 repeats

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AMC : Z-Gly-gly-Arg-7-amino-4-methylcoumarin

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

AOD : Anticoagulants Oraux Directs

ARNi : ARN interférent

AT : antithrombine

AVK : anti-vitamine K

AXa : anti-Xa

BS : Bleedscreen

CAT : Calibrated Automated Thrombogram

CIQ : Contrôle Interne de Qualité

CIVD : Coagulation Intravasculaire Disséminée

COH : Cellules Ovariennes de Hamster chinois

CPPa : Concentrés de Complexe Prothrombinique Activé

DDAVP : 1-déamino-8-D-argino vasopressine ou Desmopressine

DMSO : Dimethylsulfoxyde

DS : Drugscreen

EP : Embolie Pulmonaire

ETP : Endogenous Thrombin Potential (potentiel de thrombine endogène)

FA : Fibrillation Atriale

HA : Hémophilie A

HBPM : Héparines de Bas Poids Moléculaire

HNF : Héparines Non Fractionnées

IgG : Immunoglobuline de type G

IMC : Indice de Masse Corporelle

INR : International Normalized Ratio

IV : intraveineuse

F1+2 : fragments 1 et 2 de la prothrombine

F8 : gène du facteur VIII

F9 : gène du facteur IX

FAH : Facteurs Anti-Hémophiliques

FII : facteur II ou prothrombine
FIIa : facteur II activé ou thrombine
FIX : facteur IX
FIXa : facteur IX activé
FMH : Fédération Mondiale de l'Hémophilie
FT : facteur tissulaire
FV : facteur V
FVa : facteur V activé
FVII : facteur VII
FVIII : facteur VIII
FVIIIa : facteur VIII activé
FX : facteur X
FXa : facteur X activé
FXI : facteur XI
FXII : facteur XII
FXIII : facteur XIII
FXIIIa : facteur XIII activé
GP : glycoprotéine
GT : Génération de Thrombine
LT : Lag time
MAT : microangiopathies thrombotiques
MTEV : Maladie Thromboembolique Veineuse
PAI : inhibiteurs de l'activateur du plasminogène
PDF : Produits de Dégradation de la Fibrine
rFVIIa : facteur VII activé recombinant
rFVIII : facteur VIII recombinant
SC : sous-cutanée
TAFI : Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor
TAT : complexes Thrombine-Antithrombine
TCA : Temps de Céphaline Activé
TFPI : Tissue Factor Pathway Inhibitor
TGT : Tests de Génération de Thrombine
TP : Taux de Prothrombine
t-PA : activateur tissulaire du plasminogène
TVP : Thrombose Veineuse Profonde
UB : unité Bethesda

u-PA : urokinase

VHB : virus de l'hépatite B

VHC : virus de l'hépatite C

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

VWF : facteur Willebrand

Tableaux et figures

Figure 1. Physiologie de l'hémostase primaire. ³	2
Figure 2. Modèle cellulaire de la coagulation. ³	4
Figure 3. Interaction entre le FVIII et le facteur Willebrand. ⁶	5
Figure 4. Représentation schématique de la fibrinolyse ⁹	6
Figure 5. Prévalence mondiale et prévalence mondiale à la naissance de l'hémophilie selon la FMH. ¹¹	8
Figure 6. Corrélation du phénotype hémorragique avec le taux de FVIII ou FIX circulant. ¹³	9
Figure 7. Schéma thérapeutique de la prophylaxie de longue durée précoce et progressivement intensifiée ¹⁴	14
Figure 8. Technologies pour allonger la demi-vie du FVIII ou du FIX et produits disponibles ²⁶	15
Figure 9. Mécanisme d'action du Concizumab ²⁸	18
Figure 10. Structure du BIVV001 ³¹	20
Figure 11. Mécanisme d'action de l'Emicizumab ³⁴	21
Figure 12. Résultats des tests de coagulation modifiés ou non par Emicizumab ⁴⁰	24
Figure 13. Exemple du ST Génésia® de STAGO : automate de GT ⁴⁷	27
Figure 14. Valeurs médianes (percentile 25-75) pour chaque paramètre de génération de thrombine ⁵⁰	29
Figure 15. Approche de l'anticoagulation chez le patient hémophile en fonction des taux de FVIII/FIX. ²¹ Rouge : à éviter ; Vert : autorisé	36
Figure 16. Principe général des tests de génération de thrombine ⁴⁷	43
Figure 17. Détail du substrat fluorogénique générateur de fluorescence après clivage de la thrombine ⁶⁵	44
Figure 18. Thrombogramme et phases de la coagulation <i>in vitro</i> ⁴⁴	45

Figure 19. Courbes de génération de thrombine : courbe normale et courbe d'un patient hémophile A sévère ⁶⁴	46
Figure 20. Dosage chromogénique de l'héparinémie par l'activité anti-Xa ⁶⁶	47
Figure 21. Courbes de génération de thrombine : concentrations croissantes de FVIII..	50
Figure 22. Variation des paramètres de génération de thrombine en fonction de la concentration en ARIXTRA®.....	54
Figure 23. Comparaison des pourcentages d'inhibition de l'ETP en présence d'héparines	57
Figure 24. Comparaison des pourcentages d'inhibition du pic de thrombine en présence d'héparines.....	58
Figure 25. Comparaison des pourcentages d'augmentation du Lag time en présence d'HBPM	59
Figure 26. Comparaison des pourcentages de variation des paramètres de génération de thrombine (ETP, pic de thrombine, Lag time) en présence d'ARIXTRA®.....	61
Figure 27. Comparaison des pourcentages d'inhibition de l'ETP après ajout d'AOD	63
Figure 28. Comparaison des pourcentages d'inhibition du pic de thrombine après ajout d'AOD.....	64
Figure 29. Comparaison des pourcentages d'augmentation du Lag time après ajout d'AOD.....	65
Tableau 1. Concentrations en héparines (HNF et HBPM) mesurées.....	41
Tableau 2. Concentrations en Fondaparinux mesurées.....	42
Tableau 3. Concentrations en AOD mesurées.....	43
Tableau 4. Paramètres de GT avec des concentrations croissantes de FVIII et en comparaison d'un plasma normal	51
Tableau 5. Paramètres de GT avec des concentrations croissantes d'Emicizumab et en comparaison d'un plasma normal	52

Sommaire

Introduction.....	1
I. Physiologie de l'hémostase.....	1
a. Hémostase primaire	1
b. Coagulation plasmatique.....	3
c. Fibrinolyse	6
II. L'hémophilie : maladie hémorragique constitutionnelle.....	7
a. Définition	7
b. Épidémiologie.....	7
c. Diagnostic clinique.....	8
d. Diagnostic biologique et génétique.....	9
e. Complications.....	10
i. Arthropathie hémophilique.....	10
ii. Infectieuses.....	11
iii. Inhibiteurs.....	11
f. Prise en charge thérapeutique.....	12
i. Objectifs.....	12
ii. Outils thérapeutiques	12
1) Desmopressine.....	13
2) Acide tranexamique.....	13
3) Facteurs anti-hémophiliques (FAH)	14
4) Agents by-passants.....	16
5) Nouvelles approches thérapeutiques.....	16
III. Nouveaux traitements de l'hémophilie A : place de l'Emicizumab (HEMLIBRA®).....	21
a. Mécanisme d'action.....	21
b. Essais cliniques : les études HAVEN.....	21
c. Indications thérapeutiques, posologies d'administration.....	22
d. Complications du traitement.....	23

i.	Immunogénicité.....	23
ii.	Microangiopathies thrombotiques.....	23
iii.	Évènements thrombotiques graves.....	24
e.	Suivi biologique des patients traités.....	24
i.	Tests de coagulation en présence d'Emicizumab.....	24
ii.	Apport des tests de génération de thrombine (TGT).....	25
IV.	Tests de génération de thrombine (TGT)	25
a.	Exploration de la coagulation et limites des tests courants.....	25
b.	Historique des tests de génération de thrombine.....	26
c.	Influence des conditions expérimentales.....	28
d.	Applications cliniques.....	29
i.	TGT et maladie thrombotique.....	29
ii.	TGT et maladies hémorragiques.....	31
iii.	TGT pour le suivi des traitements anticoagulants.....	32
V.	Maladie Thromboembolique Veineuse (MTEV) chez le patient hémophile.....	33
a.	Epidémiologie.....	33
b.	MTEV en contexte chirurgical : exemple de la chirurgie orthopédique.....	34
c.	MTEV et traitements de l'hémophilie.....	35
d.	Traitements : problématiques de l'anticoagulation du patient hémophile.....	36
	Objectifs.....	38
	Matériel et méthodes.....	39
I.	Matériel.....	39
a.	Pool de plasmas normaux.....	39
b.	Plasma déficient en FVIII.....	39
c.	FVIII recombinant.....	40
d.	Emicizumab (HEMLIBRA®).....	40
e.	Anticoagulants	40
i.	Héparines (HNF et HBPM).....	40

ii. Fondaparinux (ARIXTRA®).....	41
iii. Anticoagulants Directs Oraux (AOD).....	42
II. Techniques utilisées.....	43
a. Tests de génération de thrombine (TGT).....	43
b. Tests d'hémostase	47
i. Mesure de l'activité anti-Xa.....	47
ii. Mesure de l'activité anti-IIa.....	48
Résultats.....	49
I. Profil hémostatique de patients hémophiles A.....	49
a. Patients hémophiles A sévères, modérés et mineurs non traités.....	49
b. Patients hémophiles A sévères traités par Emicizumab.....	52
II. Profil hémostatique de patients sains traités par anticoagulants.....	53
III. Profil hémostatique de patients hémophiles sévères traités par Emicizumab et anticoagulants.....	56
a. Plasmas déficients en FVIII traités par Héparines.....	56
b. Plasmas déficients en FVIII traités par Fondaparinux (ARIXTRA®).....	60
c. Plasmas déficients en FVIII traités par Anticoagulants Oraux Directs (AOD).....	62
Discussion.....	68
Conclusion.....	79
Bibliographie.....	80

Introduction

I. Physiologie de l'hémostase

L'hémostase est un processus dynamique permettant la formation d'un caillot au niveau d'une brèche vasculaire. Ce processus doit être rapide, localisé et hautement régulé. Différentes phases ont lieu¹ :

- La formation du clou plaquettaire au cours de l'hémostase primaire
- La consolidation du clou plaquettaire par la formation de fibrine au cours de la coagulation plasmatique
- La terminaison du processus de coagulation grâce à l'intervention des inhibiteurs physiologiques de la coagulation
- La dissolution du caillot lors de l'étape de fibrinolyse.

a. Hémostase primaire

L'hémostase primaire recouvre l'ensemble des interactions entre les plaquettes et le vaisseau lésé. Elle est responsable de la focalisation initiale du processus hémostatique par formation du clou plaquettaire, parfois appelé « thrombus blanc ». Ces phénomènes suffisent, au niveau des vaisseaux de petit calibre à assurer l'arrêt du saignement après une effraction vasculaire.²

Différents facteurs sont impliqués dans l'interaction entre les plaquettes et le vaisseau pour la formation du clou plaquettaire : l'endothélium vasculaire, les plaquettes et le facteur Willebrand (VWF).

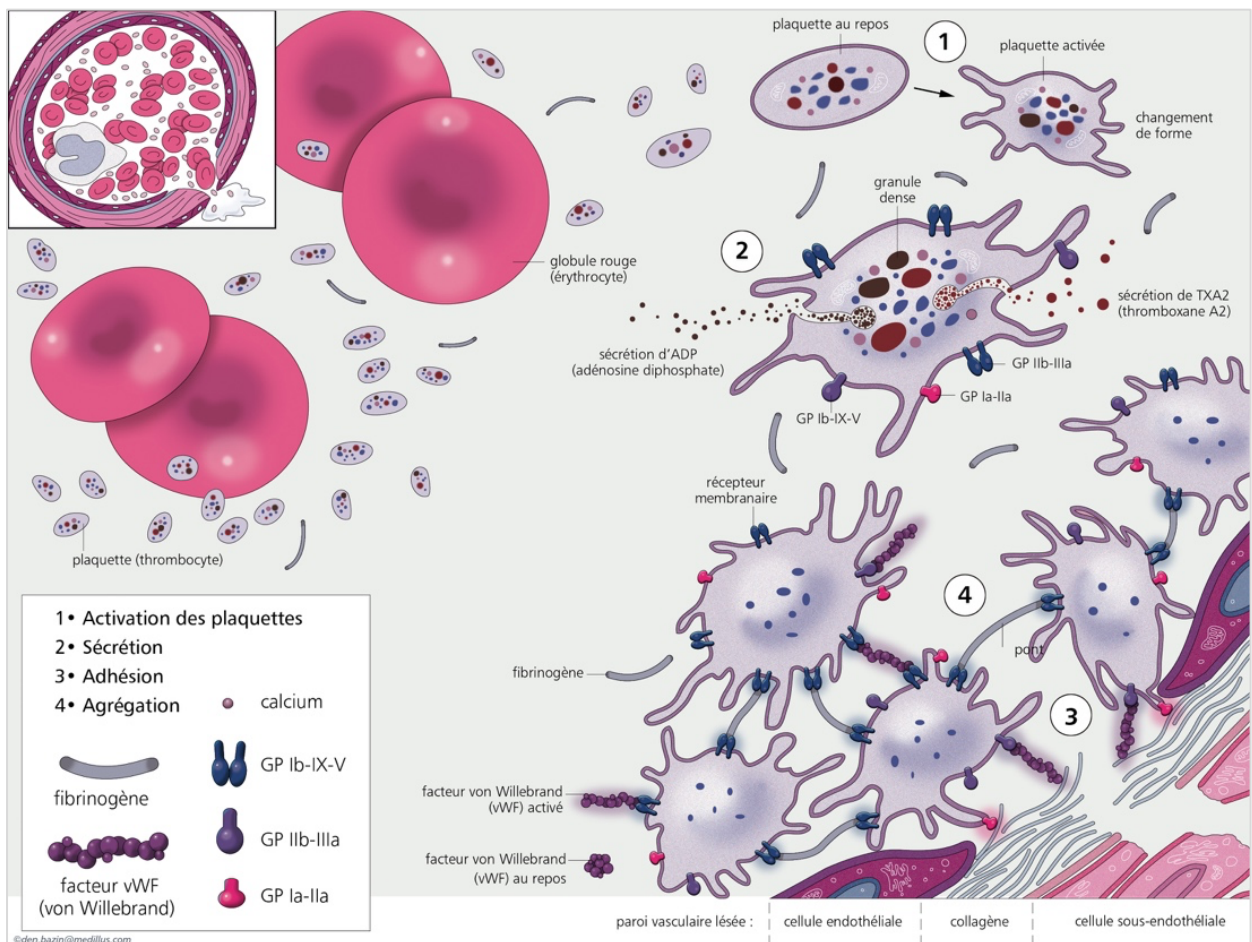


Figure 1. Physiologie de l'hémostase primaire.³

Plusieurs étapes sont nécessaires à la formation du clou plaquettaire.^{2,4} (Fig.1)

Le premier processus mis en jeu lors d'une brèche vasculaire est une étape de vasoconstriction réflexe localisée visant à limiter l'hémorragie et favoriser l'accumulation de substances hémostatiques.

La mise à nu des constituants du sous-endothélium comme le collagène va très rapidement favoriser le recrutement des plaquettes et du facteur Willebrand plasmatique sur le site de la brèche vasculaire. Dans le même temps, les forces de cisaillement élevées vont induire un changement de conformation du facteur Willebrand, alors lié au collagène, d'une forme globulaire à une forme étendue. Ce changement de conformation du VWF va permettre l'exposition sur les multimères des sites de liaison à la Gp1b-IX plaquettaire au niveau des domaines A1. Les multimères de VWF constituent alors une surface adhésive

pour les plaquettes circulantes, permettant leur adhésion (réversible) au sous-endothélium.

Parallèlement la liaison des multimères de VWF à la GpIb-IX plaquettaire va entraîner une activation des plaquettes. Cette activation plaquettaire va entraîner la dégranulation des organelles intra-cytoplasmiques plaquettaires (granules alpha et granules denses), la transformation des phospholipides membranaires par le métabolisme des prostaglandines donnant naissance à une substance pro-agrégante le thromboxane A2 et l'expression de la GpIIb/IIIa à la surface de la membrane plaquettaire. Les multimères de VWF libérés des granules alpha vont alors amplifier le phénomène d'adhésion plaquettaire en se liant à la GpIIb/IIIa plaquettaire via leur domaine C4. La liaison VWF-GpIIb/IIIa va permettre l'adhésion (irréversible) des plaquettes au sous-endothélium.

Les différentes substances libérées après activation des plaquettes et la liaison du fibrinogène aux GpIIb/IIIa plaquettaires vont permettre l'agrégation des plaquettes entre elles. Le clou plaquettaire est formé.

b. Coagulation plasmatique

La coagulation plasmatique, étape concomitante et complémentaire de l'hémostase primaire, permet la formation de fibrine qui va s'organiser en réseau autour du clou plaquettaire pour former l'armature du caillot et donc le stabiliser.

Dans les conditions physiologiques *in vivo*, les mécanismes de la coagulation sont indissociables des phénomènes de l'hémostase primaire.²

L'enzyme responsable de la transformation du fibrinogène soluble en fibrine insoluble est la thrombine (Facteur II activé-FIIa) qui provient d'un précurseur inactif la prothrombine (Facteur II-FII), au terme d'une suite de réactions enzymatiques faisant intervenir un facteur déclenchant (Facteur tissulaire-FT), des zymogènes de sérine protéases et des cofacteurs (Facteur V-FV- et Facteur VIII-FVIII-).^{1,2}

Le modèle de la cascade de coagulation a été revu récemment en un modèle cellulaire comprenant différentes phases⁵ : (Fig. 2)

- Une phase d'initiation assurée par la liaison du FT au Facteur VII lorsque les cellules exprimant le FT sont exposées aux composants sanguins.
- Une phase d'amplification initiée par la libération de traces de thrombine et faisant intervenir les cofacteurs FV et FVIII.
- Une phase de propagation caractérisée par la production des complexes Ténase et Prothrombinase à la surface des plaquettes activées convertissant des taux importants de prothrombine en thrombine, l'explosion de génération de thrombine (ou « burst ») responsable du clivage du fibrinogène en monomères de fibrine.
- Enfin une phase de stabilisation des monomères de fibrine en fibrine insoluble via l'intervention du Facteur XIII activé (FXIIIa).

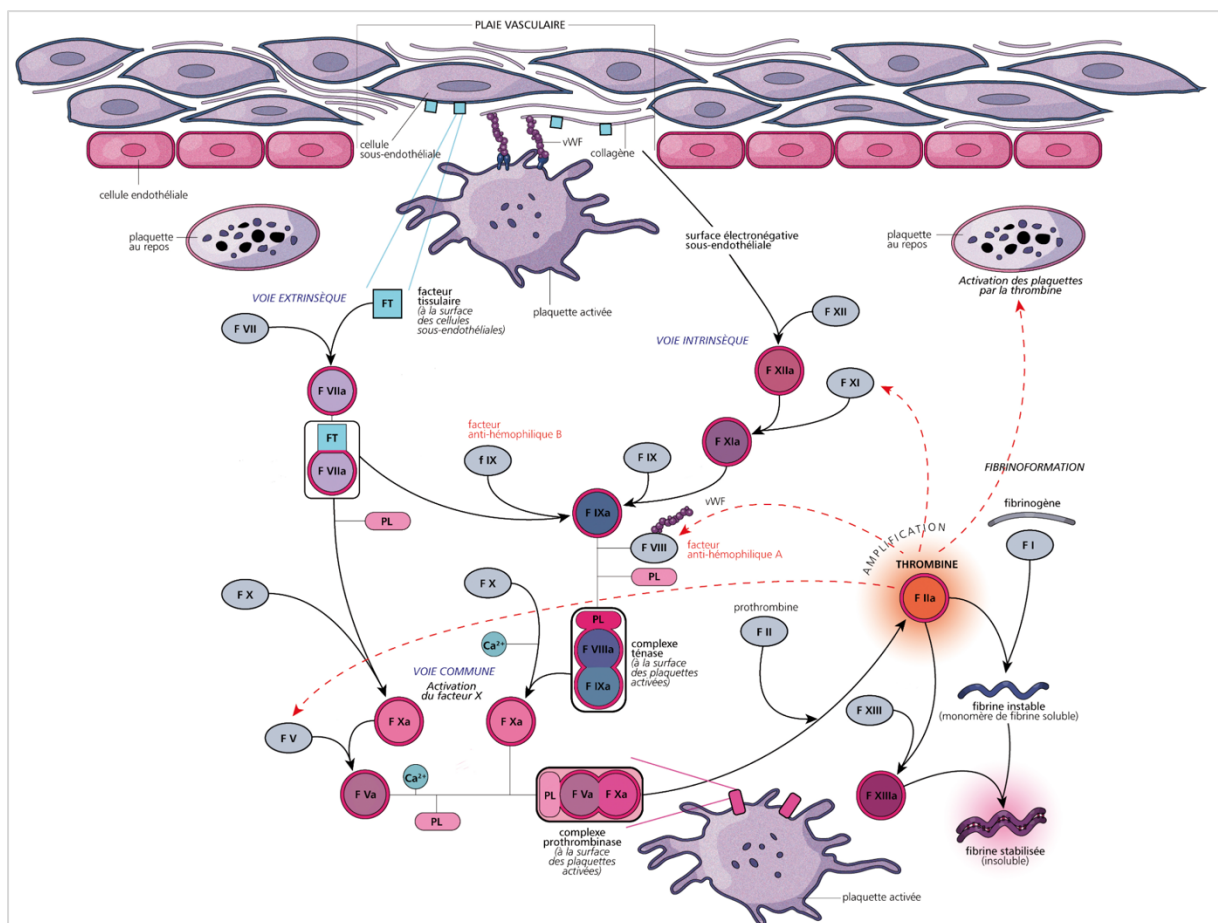


Figure 2. Modèle cellulaire de la coagulation.³

Le phénomène de coagulation reste limité au site de la brèche vasculaire grâce à l'intervention de plusieurs inhibiteurs physiologiques de la coagulation, l'Antithrombine inhibant les FX activé (FXa), le FIX activé (FIXa) et la thrombine, la Protéine C et son cofacteur la Protéine S inhibant les FV activé (FVa) et FVIII activé (FVIIIa), donc les complexes Ténase et Prothrombinase, et le Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) inhibant le FXa et le complexe FT/FVIIIa une fois complexé au FXa.¹

Le FVIII, cofacteur important de la coagulation, circule sous forme d'un hétérodimère d'une chaîne lourde (domaines A1, A2 et B) et une chaîne légère (domaines A3, C1 et C2) liées par un ion divalent sous forme d'un complexe non-covalent avec le VWF. (Fig. 3) Le facteur Willebrand joue le rôle de protéine chaperonne du FVIII, il empêche sa dégradation prématurée par les protéases circulantes, dont la Protéine C activée, permettant d'allonger sa demi-vie plasmatique.⁶

Une fois activé par clivage par les premières traces de thrombine, le FVIII se détache du VWF pour promouvoir et permettre le maintien d'une hémostase efficace lors d'une brèche vasculaire via l'amplification de la formation de FXa et donc de thrombine au sein de complexe Ténase avec le FIXa à la surface des plaquettes activées.⁷

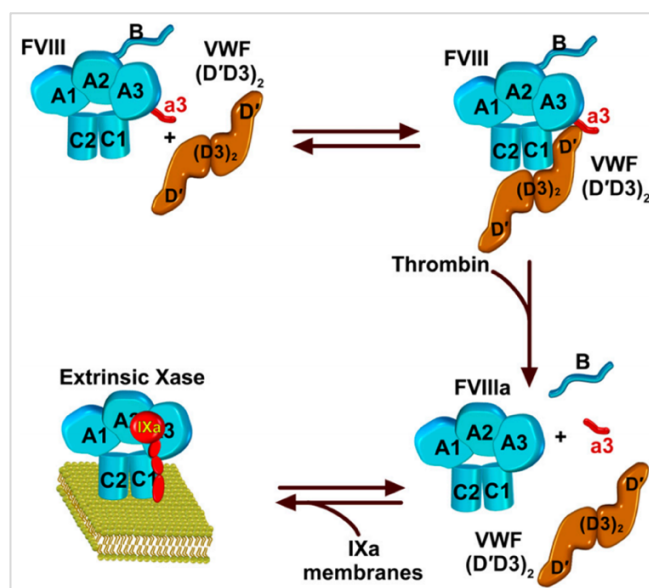


Figure 3. Interaction entre le FVIII et le facteur Willebrand.⁶

c. Fibrinolyse

En parallèle de la coagulation plasmatique, le processus de fibrinolyse se met en place afin de dissoudre le caillot de fibrine et restaurer la perméabilité du vaisseau. (Fig. 4)

L'enzyme protéolytique responsable est la plasmine dégradant la fibrine et le fibrinogène en produits de dégradation de la fibrine (PDF) et D-Dimères. La plasmine dégrade également les facteurs de coagulation.¹

La plasmine provient d'un précurseur enzymatique inactif, le plasminogène. L'activation du plasminogène en plasmine peut se dérouler dans le compartiment intravasculaire où le plasminogène se lie à la fibrine avec l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) sécrété par les cellules endothéliales vasculaires pour former un complexe activant la transformation du plasminogène en plasmine.¹

L'activation du plasminogène en plasmine peut également se dérouler dans le compartiment extravasculaire par l'intermédiaire d'un autre activateur du plasminogène, l'Urokinase (u-PA).¹

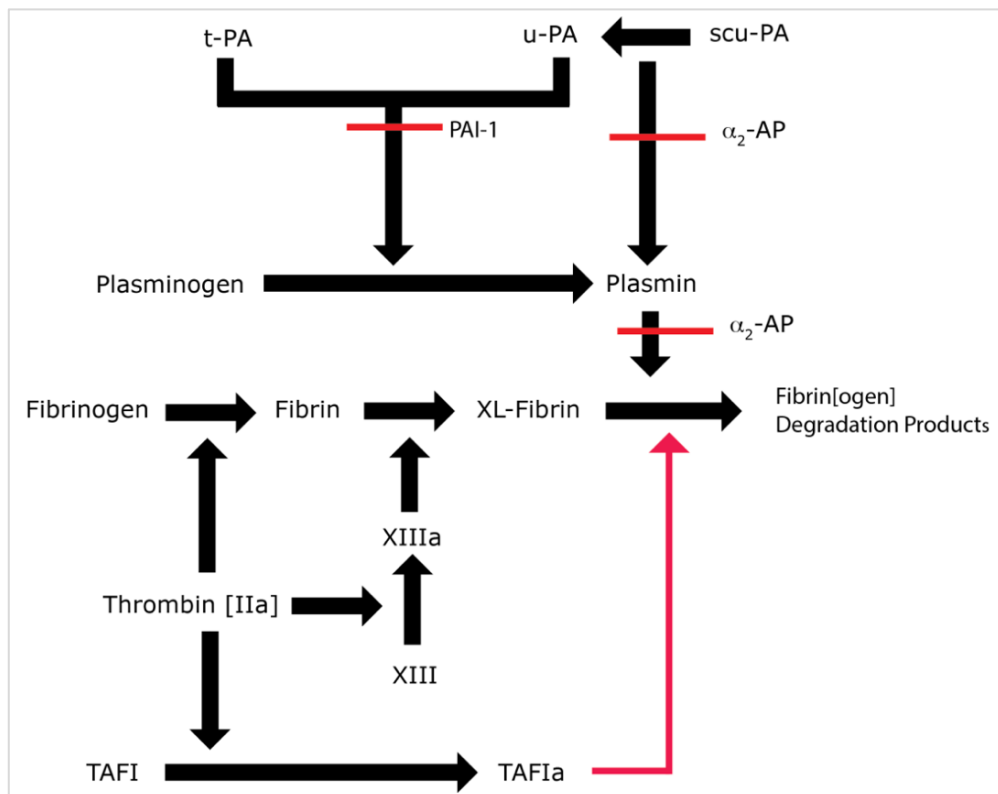


Figure 4. Représentation schématique de la fibrinolyse⁸

L'activité de la plasmine est régulée par la sécrétion des inhibiteurs des activateurs du plasminogène (PAI-1 et PAI-2) et par la libération d'alpha-2-antiplasmine.¹

Un autre système régulateur, le TAFI (Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor), a pour rôle de ralentir la fibrinolyse en éliminant les sites lysines et arginine en position C-terminale de la fibrine en cours de dégradation, ce qui entraîne une diminution de la fixation du plasminogène sur la fibrine et donc de formation de plasmine.⁹

II. L'hémophilie : maladie hémorragique constitutionnelle

a. Définition

L'hémophilie est une maladie hémorragique rare causée par un déficit en facteur de la coagulation, un déficit en FVIII définit l'hémophilie A alors qu'un déficit en FIX définit l'hémophilie B. Il s'agit d'une maladie le plus souvent héréditaire de transmission récessive liée au chromosome X.¹⁰

b. Épidémiologie

L'hémophilie A est plus fréquente que l'hémophilie B avec une prévalence mondiale estimée à 24,6 pour 100 000 naissances masculines pour toute forme d'hémophilie A et 5 pour 100 000 naissances masculines pour toute forme d'hémophilie B. Ainsi, l'hémophilie affecterait environ 1 125 000 d'hommes dans le monde.¹¹ (Fig. 5)

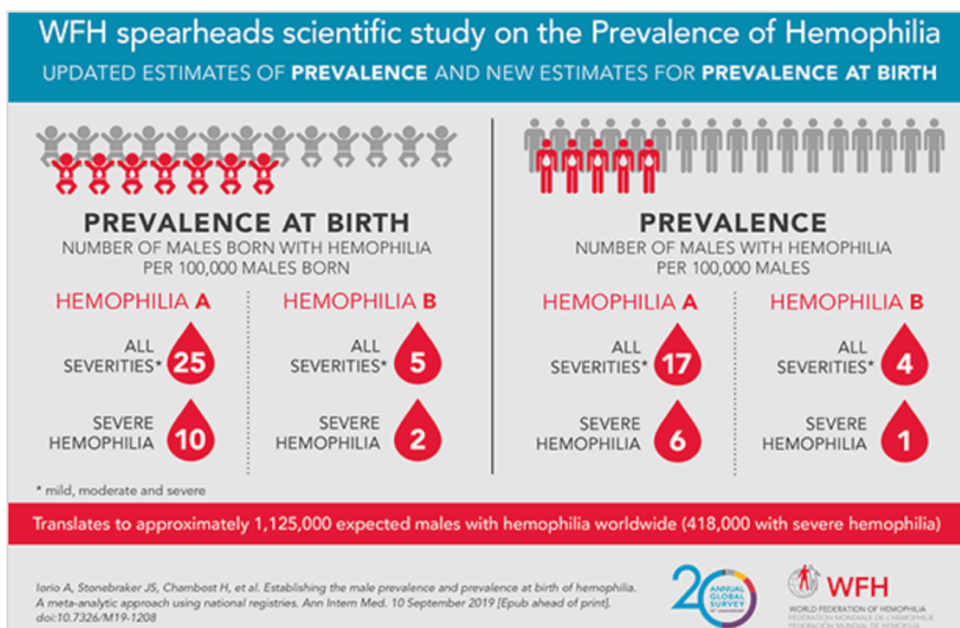


Figure 5. Prévalence mondiale et prévalence mondiale à la naissance de l'hémophilie selon la FMH.¹¹

La sévérité de la maladie est classée suivant les taux de FVIII ou de FIX plasmatiques. Nous parlerons ainsi d'hémophilie sévère si le taux de FVIII ou FIX est inférieur à 1%, d'hémophilie modérée si le taux de FVIII ou FIX est compris entre 1% et 5% et d'hémophilie mineure si le taux de FVIII ou FIX est compris entre 6% et 40%.¹⁰

La prévalence de l'hémophilie sévère est plus importante en cas d'hémophilie A (50%) que d'hémophilie B (30%).¹²

c. Diagnostic clinique

Les manifestations cliniques hémorragiques rencontrées dans l'hémophilie résultent d'une hémostase inefficace en lien avec un déficit en FVIII ou FIX. Les manifestations hémorragiques les plus fréquentes sont les saignements profonds articulaires (hémarthroses) et musculaires (hématomes). Les hémarthroses représentent 80% de l'ensemble des saignements et touchent plus particulièrement les articulations porteuses comme les genoux et les chevilles.¹²

Les localisations à risque vital ou fonctionnel sont les saignements intracérébraux, les saignements digestifs, les saignements musculaires.¹³

Le phénotype hémorragique de chaque patient est le plus souvent bien corrélé avec la sévérité de la maladie. Ainsi les hémophiles sévères auront tendance à faire des saignements spontanés alors que les hémophiles modérés et mineurs auront le plus souvent des saignements provoqués par un traumatisme plus ou moins important. (Fig. 6) Il existe néanmoins, pour la même sévérité de la maladie, une variabilité inter-individuelle parfois importante en terme de phénotype hémorragique.¹³

GRAVITÉ	TAUX DES FACTEURS DE COAGULATION	ÉPISODES HÉMORRAGIQUES
Sévère	< 1 IU/dl (< 0,01 IU/ml) ou < 1 % du taux normal	Saignement spontané dans les articulations ou les muscles, principalement en l'absence de cause hémorragique identifiable
Modérée	1-5 IU/dl (0,01 à 0,05 IU/ml) ou 1 à 5 % du taux normal	Saignement spontané occasionnel ; saignement prolongé lors d'un traumatisme mineur ou d'une intervention chirurgicale
Légère	5-40 IU/dl (0,05 à 0,40 IU/ml) ou 5-40 % du taux normal	Hémorragie lors d'un traumatisme majeur ou d'une intervention chirurgicale. Le saignement spontané est rare.

Figure 6. Corrélation du phénotype hémorragique avec le taux de FVIII ou FIX circulant.¹³

d. Diagnostic biologique et génétique

Le diagnostic est évoqué devant un allongement isolé du TCA avec un rapport malade/témoin supérieur à 1,2. Par ailleurs, la sensibilité du TCA au dépistage de l'hémophilie est très variable selon la méthode et les réactifs utilisés, ainsi un résultat de TCA normal n'exclut pas le diagnostic.

Le dosage spécifique de l'activité fonctionnelle du FVIII ou du FIX permettra de confirmer le diagnostic d'hémophilie si le taux de FVIII ou de FIX est inférieur à 40% (soit 0,4 UI/mL).¹⁴ Le diagnostic de sévérité sera fonction du taux de FVIII ou de FIX comme mentionné précédemment.

Cette classification est nécessaire et suffisante pour proposer une prise en charge adaptée au patient et lui établir la carte d'hémophilie. Il est recommandé de compléter le diagnostic phénotypique par une analyse génétique moléculaire afin d'optimiser la prise en charge à long terme (conseil génétique, diagnostic des femmes conductrices, évaluation du risque de développement d'un inhibiteur).¹⁴

La confirmation du diagnostic repose sur la recherche des mutations du gène du FVIII (*F8*) ou du FIX (*F9*) situés sur le bras long du chromosome X. L'anomalie génétique responsable de l'hémophilie A sévère retrouvée dans plus de 50% des cas est une inversion de l'intron 22.¹⁵

e. Complications

Les complications à long terme de l'hémophilie comprennent des complications en lien avec la maladie elle-même comme l'arthropathie hémophilique et les séquelles de saignements graves particulièrement après des saignements intracrâniens, ou des complications en lien avec le traitement, particulièrement le développement d'allo-anticorps anti-FVIII ou plus rarement aujourd'hui des complications infectieuses en lien avec la transfusion de concentrés de facteurs dérivés de plasmas humains.

i. Arthropathie hémophilique

Malgré l'accès aux traitements par concentrés de FVIII, les hémarthroses répétées au sein de la même articulation peuvent conduire au développement d'une arthropathie hémophilique. En effet l'accumulation de fer dans l'articulation va être toxique et entraîner des dommages du cartilage, de l'os sous-chondral et la membrane synoviale.¹⁶

Il s'agit de l'une des complications les plus handicapantes de l'hémophilie où la destruction du cartilage et les atteintes osseuses associées entraînent des douleurs invalidantes et des limitations significatives des amplitudes articulaires.¹⁷

ii. Infectieuses

L'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), par les hépatites B (VHB) et C (VHC) et les complications qui en découlent, affectent un nombre important de patients hémophiles ayant reçu des concentrés de facteurs dérivés de plasma humain dans les années 70 et 80, avant l'apparition des méthodes de sécurisation des produits sanguins labiles.¹⁸

L'arrivée des concentrés de facteurs recombinants, en 1992 pour les concentrés de FVIII et en 1997 pour les concentrés de FIX, a permis de réduire considérablement l'incidence de ces infections chez les patients hémophiles. Aujourd'hui, selon de nombreuses études, le risque de transmission du VIH, du VHB et du VHC par des concentrés de facteurs est presque complètement éliminé.¹⁹

iii. Inhibiteurs

Dans le cas de l'hémophilie, les « inhibiteurs » désignent les anticorps IgG neutralisant les facteurs de coagulation. L'apparition d'un auto-anticorps anti-FVIII ou anti-FIX neutralisant le FVIII ou FIX endogène définit l'hémophilie acquise alors que l'apparition d'un allo-anticorps anti-FVIII ou anti-FIX neutralisant le FVIII ou FIX exogène est une complication du traitement de l'hémophilie. L'apparition d'un allo-anticorps anti-FVIII ou anti-FIX est une complication majeure et sévère du traitement par concentrés de FVIII ou FIX car elle rend l'administration de ces traitements inefficace avec un risque hémorragique accru.

L'incidence cumulative de formation d'un inhibiteur dans le cas de l'hémophilie A sévère est de 20 à 30%, 5 à 10% dans le cas de l'hémophilie A modérée ou mineure et moins de 5% dans le cas d'une hémophilie B toute sévérité confondue.¹³

L'inhibiteur peut être transitoire ou permanent, causant d'importants problèmes de prise en charge avec un taux important de morbi-mortalité et une altération de la qualité de vie du patient.²⁰

f. Prise en charge thérapeutique

L'amélioration du traitement et de la prise en charge des patients hémophiles s'est traduite par une augmentation de l'espérance de vie, se rapprochant de celle des individus non hémophiles.²¹

i. Objectifs

Les objectifs de la prise en charge thérapeutique sont fondés sur une amélioration constante de la qualité de vie de la personne. Ils comprennent¹⁴ :

- L'identification des situations à risque hémorragique et le traitement précoce des saignements, en particulier les hémarthroses
- La discussion des modalités thérapeutiques adaptées au type et à la sévérité de l'hémophilie
- La prévention, le dépistage et le traitement précoce de l'arthropathie hémophilique et des douleurs
- La prévention, le dépistage et le traitement des complications liées au traitement
- L'organisation de la prise en charge des gestes invasifs
- L'accompagnement éducatif et psychologique au patient et/ou parents

La réalisation de l'ensemble de ces objectifs nécessite une prise en charge multidisciplinaire.

ii. Outils thérapeutiques

Le traitement d'un accident hémorragique ou l'encadrement d'une chirurgie chez le patient hémophile est le plus souvent réalisé par des perfusions de concentrés de facteurs. Il peut également faire appel à des thérapies comme la Desmopressine ou les agents by-passants. L'acide tranexamique est souvent utilisé en complément d'une thérapie substitutive, notamment en cas d'hémorragie muqueuse.

1) Desmopressine

La Desmopressine (1-déamino-8-D-argino vasopressine ou DDAVP) est un analogue synthétique de la vasopressine, hormone antidiurétique, utilisée dans le traitement de l'hémophilie A mineure et modérée ainsi que dans la maladie de Willebrand de type 1. Elle a été utilisée pour la première fois en 1977 dans la prévention des saignements post-opératoires lors d'interventions chirurgicales chez des hémophiles A mineurs ou des patients atteints de la maladie de Willebrand. Elle agit en augmentant les taux circulants de facteur VIII et de facteur Willebrand en mobilisant les stocks présents au niveau des cellules endothéliales. Des modifications structurales au niveau de la vasopressine ont permis d'augmenter sa durée d'action et de diminuer ses effets secondaires (vasoconstriction, hypertension artérielle...). Elle peut être administrée par voie intraveineuse, nasale ou sous-cutanée mais son utilisation requiert une restriction hydrique au vu de ses propriétés antidiurétiques et un suivi biologique strict du fait du phénomène de tachyphylaxie pouvant apparaître dès la première injection ou après quelques jours de traitement.²²

2) Acide tranexamique

L'acide tranexamique est un antifibrinolytique de synthèse, analogue de la lysine, qui bloque les récepteurs à la lysine du plasminogène, de la plasmine et de l'activateur tissulaire du plasminogène. Il inhibe donc la formation de plasmine, limitant ainsi la dégradation de la fibrine ce qui retarde la dégradation naturelle du caillot formé. Il peut être utilisé seul quand le risque hémorragique est très faible ou en tant que thérapie adjuvante pour obtenir une action synergique avec les concentrés de facteurs devant des saignements muqueux ou des chirurgies avec effraction muqueuse.²³

3) Facteurs anti-hémophiliques (FAH)

Les FAH sont des concentrés de FVIII ou de FIX, employés à visée substitutive de la protéine déficiente. Il existe deux grandes catégories de FAH administrés par voie intraveineuse (IV) : les FAH d'origine plasmatique et les FAH recombinant produits par biotechnologie. Deux grands schémas thérapeutiques peuvent être entrepris :

- L'administration à la demande lors d'un accident hémorragique
- L'administration en prophylaxie à court, moyen ou long terme afin de prévenir l'apparition d'un accident hémorragique ou couvrir un geste invasif.

La prophylaxie de longue durée dans le cas d'une hémophilie sévère est dite primaire si elle débute avant l'âge de 3 ans et avant la deuxième hémarthrose et secondaire dans toutes les autres situations.

Il a été montré, chez les patients hémophiles modérés et sévères, qu'un traitement prophylactique bien conduit entraînait une diminution significative du taux annualisé de saignements (ABR) en comparaison des patients traités à la demande et donc limitait l'apparition d'une arthropathie hémophilique.^{24,25}

La posologie de FAH administrés est calculée en fonction de la sévérité de l'hémophilie et de la gravité de l'accident hémorragique ou du degré invasif de la chirurgie en sachant que l'injection d'1 UI/kg de FVIII ou FIX entraîne une augmentation moyenne d'environ 2% du taux de FVIII circulant et de 0,8 à 1% du taux de FIX circulant.¹⁴

SCHEMA THÉRAPEUTIQUE DE LA PROPHYLAXIE LONGUE DURÉE PRÉCOCE ET PROGRESSIVEMENT INTENSIFIÉE		
	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 (jours fixes)	Soit 50 UI/kg 2 fois par semaine (jours fixes) Soit 50 UI/kg toutes les 96 heures (tous les 4 jours)
Palier 3	Soit 30 UI/kg 3 fois par semaine (jours fixes) Soit 30 UI/kg toutes les 72 heures (tous les 3 jours)	50 UI/kg toutes les 72 heures
Palier 4	25 à 30 UI/kg toutes les 48 heures	

Figure 7. Schéma thérapeutique de la prophylaxie de longue durée précoce et progressivement intensifiée¹⁴

Dans le cas d'une prophylaxie primaire ou secondaire, le schéma thérapeutique est divisé en palier. (Fig. 7) Le traitement est débuté selon le palier 1. Au cours du suivi, si l'objectif clinique n'est pas atteint avec la survenue d'un ou plusieurs accidents hémorragiques, le traitement est augmenté au palier suivant et ainsi de suite.

La lourdeur du traitement prophylactique par FAH du fait des injections IV répétées a permis le développement de voies d'amélioration. La première a été de proposer des FAH recombinants à demi-vie allongée permettant une optimisation de la prophylaxie, avec une meilleure protection contre les saignements et moins d'injections IV. Les traitements disponibles en France sont les FVIII ou FIX fusionnés à un fragment Fc d'immunoglobuline où les FIX fusionnés à une albumine recombinante.²⁶ (Fig. 8)

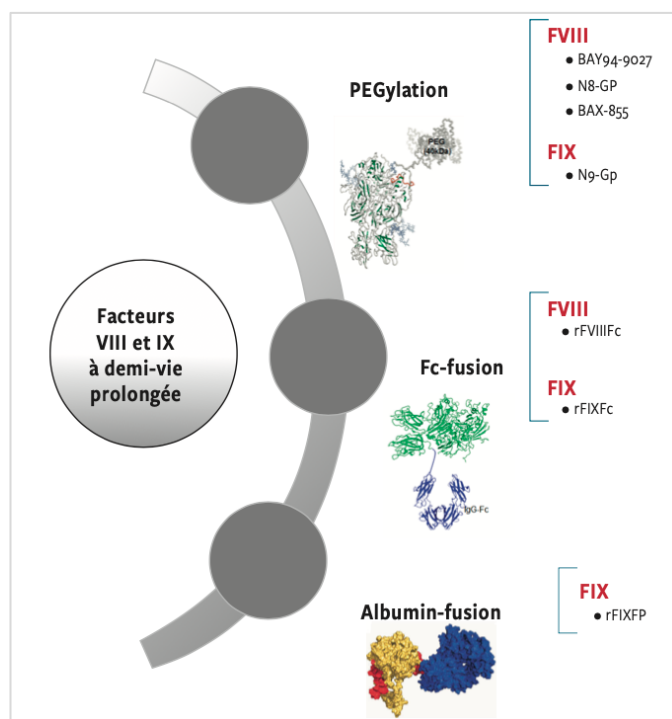


Figure 8. Technologies pour allonger la demi-vie du FVIII ou du FIX et produits disponibles²⁶

La disponibilité de ces produits a également offert la possibilité de schémas thérapeutiques plus flexibles, adaptables aux besoins cliniques et sociaux des patients, contribuant à une personnalisation plus facile du traitement pour améliorer l'observance, ce qui a un effet significatif sur les résultats du traitement.²⁶

4) Agents by-passant

La présence d'un inhibiteur fort répondeur chez un patient hémophile complique la prise en charge ne permettant plus la possibilité d'un traitement substitutif par concentrés de FVIII ou FIX. En effet au-delà de 5 UB/mL, il est souvent nécessaire de recourir à d'autres stratégies thérapeutiques qui court-circuitent l'effet de l'inhibiteur, tels que les « agents by-passants ».

Les agents by-passant induisent la formation d'une activité procoagulante via la formation de thrombine tout en court-circuitant l'action des FVIII et FIX. Deux médicaments peuvent être utilisés :

- Le Complexe Prothrombinique Activé ou CPPa (FEIBA®) d'origine plasmatique contenant les facteurs II, VII, IX et X sous forme activée et non activée
- L'Eptacog alpha (rFVIIa) (NOVOSEVEN®) ou facteur VII activé d'origine recombinante

L'efficacité de ces traitements dans le traitement d'accident hémorragique ou dans un contexte chirurgical chez un patient hémophile avec inhibiteur est comparable. Néanmoins il a été montré que ces traitements pouvaient favoriser la survenue d'évènements thromboemboliques de type coagulation intravasculaire disséminée (CIVD), thrombose veineuse, embolie pulmonaire, infarctus du myocarde et accident vasculaire cérébral, en particulier chez les patients recevant des doses élevées de FEIBA®. Le suivi clinique et biologique de ces patients traités est primordial.¹⁴

5) Nouvelles approches thérapeutiques

L'avènement des concentrés de facteurs à demi-vie allongée a amélioré l'efficacité et la faisabilité de la prophylaxie. Néanmoins, la voie d'administration intraveineuse, le risque de développement d'inhibiteurs et la nécessité d'individualiser le traitement représentent toujours un fardeau pour les patients et les cliniciens.

À la lumière de ces défis, les nouvelles thérapies non substitutives (Fitusiran, Concizumab, Emicizumab) présentent de nombreux avantages, comprenant la voie d'administration sous-cutanée, une efficacité similaire sur une large tranche d'âge, la possibilité de mettre en œuvre une prophylaxie dès le jeune âge (dès la naissance) et la disponibilité de régimes à dose fixe pour tous, y compris les patients avec inhibiteurs.²⁵

Ces nouvelles approches thérapeutiques ont pour objectif d'améliorer la qualité de vie des patients hémophiles tout en permettant une meilleure prévention des accidents hémorragiques et donc des complications articulaires. L'objectif est d'obtenir un ABR le plus faible possible, correspondant à des taux de FVIII le plus élevé le plus longtemps possible. Certains de ces nouveaux traitements sont en cours d'étude, d'autres ont obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) récente.

Fitusiran: ARN interférent anti-AT (ARNi)

L'antithrombine (AT) étant un inhibiteur physiologique de la coagulation, il a été supposé que des niveaux réduits de celle-ci pourraient améliorer la génération de thrombine et donc favoriser une restauration de l'hémostase dans l'hémophilie. Un ARN interférent dirigé contre le gène de l'AT est donc actuellement en cours d'essai dans le traitement de l'hémophilie. Il s'agit du Fitusiran (ALN-AT3SC), qui cible spécifiquement l'ARN messager de l'antithrombine (codé par SERPINC1) afin d'en inhiber la production hépatique. Des études non cliniques sur le Fitusiran ont montré une diminution dose-dépendante des taux d'AT chez plusieurs espèces. Dans les modèles d'hémophilie murine, cette réduction des taux d'AT est associée à une production accrue de thrombine et à une hémostase améliorée, suggérant un bénéfice thérapeutique potentiel.²⁷

Cependant des complications thrombotiques ont été observées pendant l'essai clinique de phase 2 avec un cas de thrombose cérébrale mortelle survenue chez un patient sous prophylaxie par le Fitusiran ayant reçu une perfusion de concentrés de FVIII.²⁵

Concizumab : anticorps monoclonal anti-TFPI

Le Concizumab est un anticorps monoclonal visant à bloquer l'interaction inhibitrice du TFPI avec le site actif du FXa et donc d'obtenir une coagulation efficace par augmentation de la génération de thrombine. (Fig. 9)

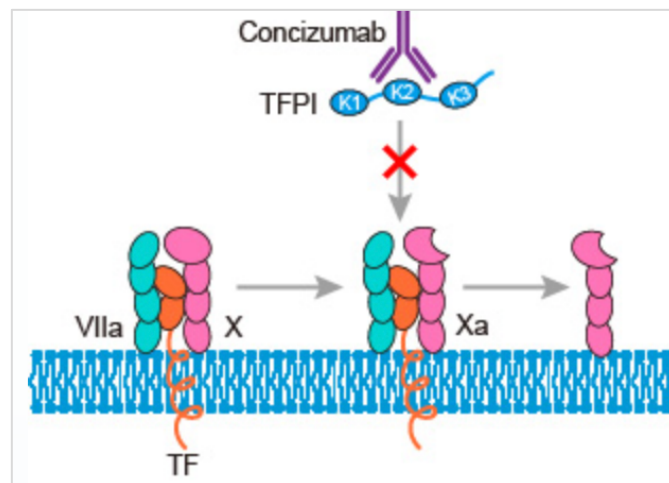


Figure 9. Mécanisme d'action du Concizumab²⁸

Les premiers résultats étaient prometteurs, cependant l'an dernier, des événements indésirables à type de thromboses non mortelles ont été rapportés chez 3 patients traités obligeant une interruption des essais cliniques de phase 3.²⁹

Emicizumab (HEMLIBRA®) :

Plus récemment l'arrivée d'un anticorps monoclonal mimant le rôle du FVIII au sein de la coagulation, l'Emicizumab (HEMLIBRA®), a révolutionné le traitement de l'hémophilie A sévère du fait de sa demi-vie très longue et d'une administration sous-cutanée (SC). Les résultats très encourageants des essais précliniques et cliniques en font aujourd'hui un traitement de choix de l'hémophilie A. A ce jour, il s'agit du seul traitement non substitutif qui dispose d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) dans le traitement de l'hémophilie A sévère avec ou sans inhibiteurs.²⁵

Des études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques réalisées chez des patients traités par Emicizumab, Fitusiran et anticorps anti-TFPI montrent que l'ampleur de la correction hémostatique apportée par ces molécules aux doses utilisées en prophylaxie est en moyenne similaire à celle de patients atteints d'hémophilie mineure. Des accidents hémorragiques surviennent encore et le niveau de protection de ces traitements peut ne pas être adéquat pour certaines interventions chirurgicales. Ainsi, de tels événements nécessitent l'utilisation d'agents hémostatiques en complément, sous forme de concentrés de FVIII et de FIX ou agents by-passants, en fonction du statut d'inhibiteur du patient.

D'autres innovations sont à l'étude pour le traitement de l'hémophilie, dans le but spécifique de fournir un degré élevé de protection contre les saignements avec des schémas thérapeutiques allégés, qui devraient continuer à améliorer les résultats et la qualité de vie.

BIVV001 : FVIII associé au domaine D'D3 du facteur von Willebrand

Une molécule, BIVV001, est en cours d'étude et en phase pré-clinique. Cette molécule a été bio-conçue comme une protéine de fusion unique consistant en un domaine VWF-D'D3 fusionné au rFVIII via des domaines d'immunoglobuline Fc et 2 polypeptides XTEN (Amunix Pharmaceuticals, Inc, Mountain View, CA) dans le but d'offrir une nouvelle protection contre la clairance plasmatique rapide du FVIII (Fig. 10). Le BIV001 est le premier rFVIII ayant le potentiel de modifier considérablement le paradigme de traitement de l'hémophilie A sévère en offrant une protection optimale contre tous types de saignements, avec des injections moins fréquentes.³⁰

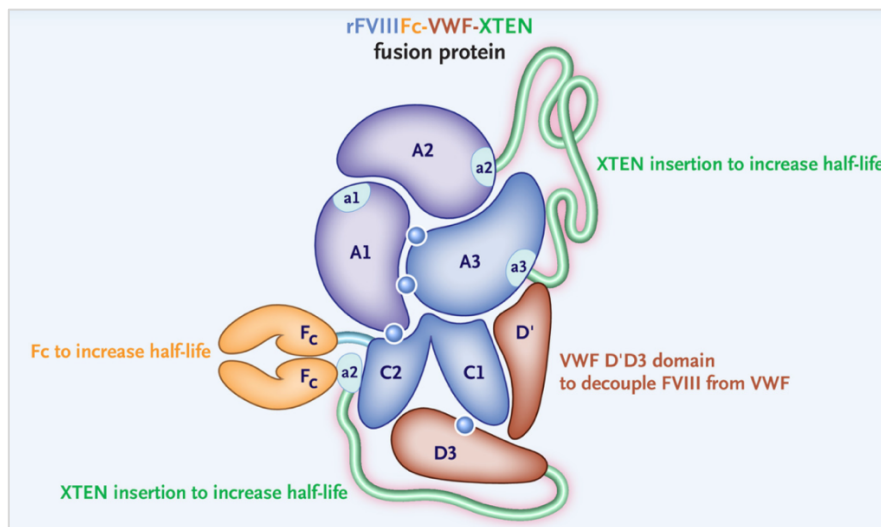


Figure 10. Structure du BIVV001³¹

Dans une étude menée par Yee *et al.*, il a été montré qu'un fragment (D'D3) ne contenant qu'environ 20% de vWF est suffisant pour soutenir la stabilité du FVIII *in vivo* et que l'expression de celui-ci fusionné à son extrémité C-terminale avec le fragment Fc d'une l'IgG1 entraîne une augmentation marquée de la survie dans la circulation ($t_{1/2} > 7$ jours) ainsi que des taux plasmatiques élevés de FVIII ($> 25\%$ à 7 jours)³².

Thérapie génique

La thérapie génique offre la possibilité d'une guérison fonctionnelle ou phénotypique de l'hémophile en rétablissant une expression endogène continue du facteur VIII ou du facteur IX après le transfert d'un gène fonctionnel *F8* ou *F9* pour remplacer le gène défectueux.³³

Malgré des résultats positifs à ce jour, certaines limites et préoccupations potentielles en matière de sécurité empêcheront probablement l'utilisation généralisée d'une telle approche. Pour cette raison, il existe un intérêt continu pour le développement de nouvelles thérapies substitutives et non substitutives.²⁵

III. Nouveaux traitements de l'hémophilie A : place de l'Emicizumab (HEMLIBRA®)

a. Mécanisme d'action

L'Emicizumab (ACE910) est un anticorps monoclonal humanisé de type immunoglobuline G4 (IgG4) présentant une structure d'anticorps bispécifique produit par la technologie de l'ADN recombinant sur des cellules ovariennes de hamster chinois (COH). Il se lie au facteur IXa et au facteur X pour restaurer la fonction du facteur VIIIa nécessaire pour une hémostase efficace. (Fig. 11)

L'Emicizumab n'a pas de relation structurelle ni d'homologie de séquence avec le facteur VIII. Par conséquent, il n'induit pas ni ne favorise le développement d'inhibiteurs dirigés contre le facteur VIII.³⁴

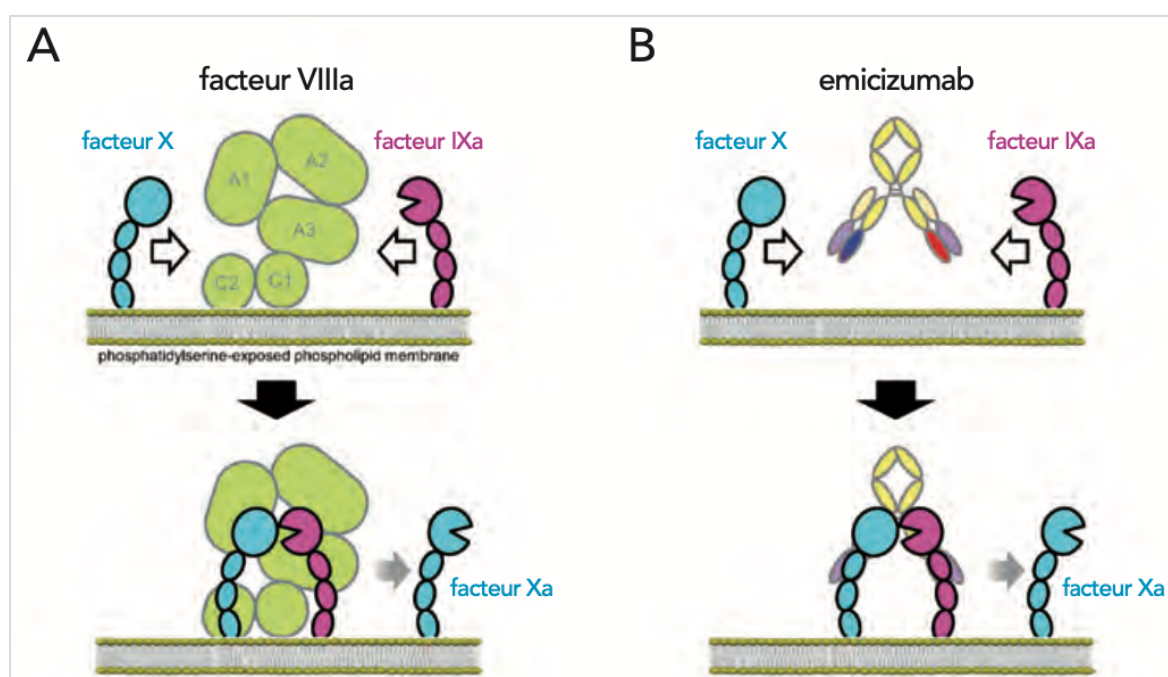


Figure 11. Mécanisme d'action de l'Emicizumab³⁴

b. Essais cliniques : les études HAVEN

Les études HAVEN, au nombre de 4, sont des essais cliniques multicentriques avec pour objectif d'évaluer l'efficacité, la sécurité d'emploi, le profil pharmacocinétique et pharmacodynamique d'une prophylaxie au long cours par Emicizumab (HEMLIBRA®) chez l'adulte et l'enfant atteint d'hémophile A (HA) avec ou sans inhibiteur.³⁵⁻³⁸

Les résultats montrent que la prophylaxie par HEMLIBRA® est associée à :

- Une réduction significative du nombre de saignements chez les patients HA avec ou sans inhibiteurs comparé aux patients n'ayant reçu aucune prophylaxie par HEMLIBRA®
- Une réduction significative du nombre de saignements pour un même patient sous prophylaxie par Emicizumab ayant reçu un traitement prophylactique antérieur par agent by-passant
- Une efficacité similaire en cas d'administration tous les 7, 14 ou 28 jours chez l'enfant et l'adulte
- Une amélioration de la qualité de vie des patients

HEMLIBRA® a une demi-vie estimée de 30 jours avec une phase en plateau de la concentration du médicament à 50 microgramme/mL après 5 semaines permettant d'espacer les injections SC, en théorie, à 1 injection/4 semaines³⁵⁻³⁸.

c. Indications thérapeutiques, posologies d'administration

L'Emicizumab est indiqué en prophylaxie pour prévenir les épisodes hémorragiques chez les patients, enfants et adultes³⁹ :

- Atteints d'hémophilie A avec inhibiteur anti-facteur VIII
- Atteints d'hémophilie A sévère sans inhibiteur anti-facteur VIII

Le médicament doit être administré par voie sous-cutanée avec une posologie recommandée de 3 mg/kg une fois par semaine au cours des quatre premières semaines (dose de charge), suivie d'une dose d'entretien de 1,5 mg/kg une fois par semaine, ou 3 mg/kg toutes les 2 semaines, ou 6 mg/kg toutes les 4 semaines.⁴⁰

d. Complications du traitement

Le traitement a fait ses preuves concernant la sécurité d'emploi lorsqu'il est administré seul ou avec du NOVOSEVEN®. Des cas de microangiopathies thrombotiques et événements thrombotiques graves ont été observés en cas d'utilisation épisodique à fortes doses du FEIBA® pendant la prophylaxie par HEMLIBRA® chez des patients présentant des facteurs de risques cardiovasculaires tels un surpoids, une hypertension artérielle, une dyslipidémie ou un diabète.³⁵⁻³⁸

i. Immunogénicité

Il existe, comme avec toutes les protéines thérapeutiques, un risque de réponse immunitaire chez les patients traités par Emicizumab. Au total, 189 patients ont été testés vis-à-vis de la formation d'anticorps anti-Emicizumab au cours des études cliniques. Quatre patients (2,1%) ont présenté des résultats positifs aux anticorps anti-Emicizumab, tous non neutralisants, dans les essais de phase I/II.⁴¹

ii. Microangiopathies thrombotiques

Des microangiopathies thrombotiques (MAT) ont été rapportées chez 1,6% des patients (3/189) dans les études cliniques et chez 8,3% des patients (3/36) ayant reçu au moins une dose de FEIBA® lors du traitement par Emicizumab. Les 3 cas de MAT sont survenus lorsqu'une dose cumulée moyenne de FEIBA® supérieure à 100 U/kg/24 heures était administrée pendant 24 heures ou plus pour traiter un épisode hémorragique. Les patients ont présenté une thrombopénie, une anémie hémolytique et une insuffisance rénale aiguë, sans déficit sévère de l'activité de l'ADAMTS13.⁴¹

iii. Évènements thrombotiques graves

Des événements thrombotiques graves ont été rapportés chez 1,1 % des patients (2/189) au cours des études cliniques et chez 5,6% des patients (2/36) ayant reçu au moins une dose de FEIBA® lors du traitement par Emicizumab. Les 2 cas d'évènements thrombotiques graves sont survenus lorsqu'une dose cumulée moyenne de FEIBA® supérieure à 100 U/kg/24 heures était administrée pendant 24 heures ou plus pour traiter un épisode hémorragique.⁴¹

e. Suivi biologique des patients traités

i. Tests de coagulation en présence d'Emicizumab

Le suivi biologique du patient hémophile A, habituellement réalisé par les mesures chronométriques du TCA, dosage de FVIII et recherche d'un anticorps anti-FVIII, ne peut pas être effectué par ces mêmes tests chez un patient traité par Emicizumab du fait de l'interférence de la molécule sur les tests chronométriques d'hémostase. Les tests modifiés ou non par Emicizumab sont résumés dans le tableau ci-dessous. (Fig. 12)

Résultats modifiés par emicizumab	Résultats non modifiés par emicizumab
<ul style="list-style-type: none">- Temps de céphaline avec activateur (TCA)- Recherche et titrage de l'inhibiteur anti FVIII par la méthode Bethesda (basée sur la mesure du FVIII : C en 1 temps)- Dosages chronométriques des facteurs de coagulation en un temps basé sur le TCA- Résistance à la protéine C activée (RPCa) basée sur le TCA- Temps de coagulation activé (ACT)	<ul style="list-style-type: none">- Recherche et titrage de l'inhibiteur anti FVIII par la méthode de Bethesda chromogénique utilisant un réactif d'origine bovine- Temps de thrombine (TT)- Dosages chronométriques des facteurs de coagulation en un temps basé sur le taux de prothrombine- Dosages chromogéniques d'un seul facteur, autre que le FVIII¹- Dosages immunologiques (ex : ELISA, méthodes immunoturbidimétriques)- Analyse moléculaire des facteurs de coagulation (exemple : Facteur V Leiden, Prothrombin G20210A)

Figure 12. Résultats des tests de coagulation modifiés ou non par Emicizumab⁴⁰

En effet l'Emicizumab affecte les tests chronométriques de mesure du TCA et toutes les analyses basées sur le TCA comme la mesure de l'activité du facteur VIII en un temps.

Ces tests ne doivent pas être utilisés pour surveiller l'activité d'Emicizumab. Cependant le dosage des facteurs de coagulation (ou titrage d'inhibiteur anti-FVIII) utilisant des méthodes chromogéniques avec réactifs bovins ou méthodes immunologiques ne sont pas perturbés par Emicizumab et peuvent donc être utilisés pour surveiller les paramètres de la coagulation pendant le traitement.³⁹

ii. Apports des tests de génération de thrombine (TGT)

Les tests globaux d'exploration de l'hémostase comme les tests de génération de thrombine (TGT), pourraient avoir un intérêt dans le suivi thérapeutique chez ces patients. Les premières études de TGT *ex vivo* chez les patients hémophiles A avec inhibiteurs traités par Emicizumab ont montré que la capacité de génération de thrombine induite par la prophylaxie par Emicizumab était plus élevée que celle observée en l'absence de traitement procoagulant avec une augmentation dose-dépendante du potentiel de thrombine endogène (ETP) après ajout d'agents by-passants. La capacité de coagulation individuelle des patients recevant l'association Emicizumab et agents by-passants peut être différente, ainsi les tests de génération de thrombine pourraient aider à la personnalisation du traitement en cas d'accident hémorragique ou d'intervention chirurgicale nécessitant l'utilisation de ces traitements au cours de la prophylaxie par Emicizumab.⁴²

IV. Tests de génération de thrombine (TGT)

a. Exploration de la coagulation et limites des tests courants

Les tests courants de laboratoire (TP, TCA) mesurent le temps nécessaire à l'apparition de fibrine dans le plasma après activation de la coagulation et donnent un aperçu de l'activité globale du système de coagulation. Ils ont l'avantage d'être faciles à obtenir et familiers. Cependant, leur inconvénient est qu'ils sont mal corrélés avec le tableau clinique : une tendance thrombotique ne se traduit pas par un temps de

coagulation raccourci, les troubles hémorragiques légers prolongent à peine le temps de coagulation et un temps de coagulation normal ne garantit pas l'absence de tendance hémorragique.⁴³

Le manque de sensibilité de ces tests s'explique par une exploration limitée à l'étape initiale de la coagulation où le temps de coagulation correspond au temps de latence (Lag time) de la génération de thrombine. La coagulation du plasma est due à la polymérisation de la fibrine qui ne nécessite qu'une faible quantité de thrombine. La majeure partie de la thrombine se forme ultérieurement au sein du caillot et échappe aux tests de coagulation classiques. L'inhibition de la coagulation est pour l'essentiel postérieure à la fin de la phase d'initiation et n'est donc pas perceptible dans son ensemble par les temps de coagulation.⁴⁴

Des preuves de plus en plus nombreuses montrent que la quantité d'activité de thrombine qui se développe est un meilleur marqueur de la fonction du système de coagulation que ne l'est le temps de coagulation, on peut dire simplement : plus il y a de thrombine, plus il y a de thrombose ; moins il y a de thrombine, plus il y a de saignement.⁴³

b. Historique des tests de génération de thrombine

Depuis la fin du 19^{ème} siècle, la thrombine est détectée par sa capacité à coaguler les préparations contenant du fibrinogène.

La génération de thrombine (GT) *in vitro* fut utilisée il y a un demi-siècle pour étudier la coagulation défectueuse notamment chez les patients hémophiles. Elle a ensuite été totalement supplantée par les temps de coagulation, tests dits en un temps. HC Hemker et son équipe ont réadapté la technique afin de mesurer la capacité du sang à générer et inhiber de la thrombine. Les groupes de Kenneth Mann et Harold Roberts ont aussi contribué à faire renaître cette approche par l'étude des surfaces cellulaires et des plaquettes.⁴⁴

Décrit pour la 1ère fois en 1953, le test de génération de thrombine mesure l'ensemble du processus de génération de thrombine et explore tant la phase d'initiation, d'amplification que celle d'inhibition. Cependant, ce test, appelé le « thromboplastin generation test » avait de nombreuses limitations, tant au niveau technique qu'en termes de temps d'analyse.⁴⁵ Ce test fût remplacé par une variante chromogénique. Néanmoins, ce dernier demandait une défibrination du plasma pouvant avoir un impact sur les résultats obtenus.⁴⁶

Une amélioration capitale a été apportée par l'arrivée des substrats fluorogéniques avec mesure en continu de la fluorescence dans le plasma en réponse à la génération de thrombine. Néanmoins, l'utilisation d'un substrat fluorogénique a amené d'autres contraintes puisqu'il n'existe pas de corrélation directe entre l'intensité du signal fluorogénique et l'activité de la thrombine. Pour surmonter cela, le clivage du substrat est comparé à l'activité d'une thrombine à concentration connue dans un puit parallèle permettant d'extrapoler la concentration en thrombine générée au cours du temps. Ce test se fait communément appeler le « Calibrated Automated Thrombogram » ou « CAT ».⁴³

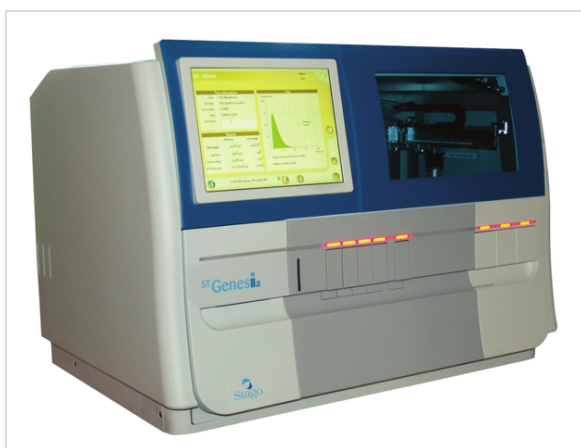


Figure 13. Exemple du ST Génésia® de STAGO : automate de GT⁴⁷

Les derniers automates de GT complètement automatisés, comme le ST-Génésia® de STAGO (Fig. 13), permettent de faire de la génération de thrombine de façon très standardisée. Ils nécessitent des réactifs dédiés pour déclencher la coagulation et un

fluoromètre équipé d'un logiciel informatique pour enregistrer et calculer les paramètres issus du thrombogramme.

Le principe de ces tests ainsi que la description des différents paramètres analysés sont détaillés dans la partie « Matériel et méthodes ».

c. Influence des conditions expérimentales

Les tests de génération de thrombine peuvent être réalisés de différentes façons selon les centres. Des variations pré-analytiques en termes de température, d'utilisation de plasma pauvre ou riche en plaquettes ou la concentration en activateurs de la coagulation (FT, phospholipides) peut entraîner de grandes variations dans les résultats obtenus.⁴⁸

La concentration en FT est un élément primordial pour l'interprétation des résultats. Les substances utilisées pour déclencher la coagulation sont diluées plusieurs fois par rapport à celles utilisées dans les tests de coagulation conventionnels. Par exemple, le FT dans les TGT est dérivé d'une thromboplastine qui est diluée au 1/5000^{ème} pour atteindre la concentration de de 1 pmol/L (pM).⁴⁹ Cette concentration est habituellement utilisée car il est généralement admis que des concentrations faibles de FT reproduisent le plus fidèlement l'activation de la coagulation et se rapprochent au mieux des conditions physiologiques.⁵⁰

Une étude réalisée chez l'enfant et l'adulte a montré qu'une augmentation de la concentration en FT à 5 pM induisait une augmentation du pic de thrombine, de la vitesse et une diminution du Lag time dans les 2 groupes enfants et adultes par rapport aux valeurs obtenues avec une concentration de 1 pM. Par contre, l'augmentation de la concentration finale en FT n'induisait une augmentation de l'ETP que chez les enfants.⁵⁰ (Fig. 14)

	Enfants (N = 90)		Adultes (N = 72)	
	1 pM FT	5 pM FT	1 pM FT	5 pM FT
ETP (nM x min.)	917 (1.080-1.261)***	1.513 (1.182-1.859)***	1.968 (1.782-2.371)	2.002 (1.803-2.263)
Pic (nM)	190 (152-239)***	321 (262-384)***	300 (252-359)	416 (370-447)
TMax (min.)	7,7 (6,9-8,8)	4,8 (4,4-5,2)	8,2 (7,0-9,4)	4,8 (4,5-5,2)
Vélocité (nM/min.)	66 (42-85)***	137 (110-172)***	83 (60-112)	181 (160-210)
Lag time (min.)	4,0 (4,5-5,0)	2,4 (2,2-2,7)	4,3 (3,8-5,1)	2,5 (2,3-2,8)
*** : P < 0,001 (Mann-Whitney t test) pour la comparaison des valeurs chez les enfants et les adultes.				

Figure 14. Valeurs médianes (percentile 25-75) pour chaque paramètre de génération de thrombine⁵⁰

d. Applications cliniques

La puissance de la génération de thrombine dans le plasma (GT *ex vivo*) ne doit pas être confondue avec l'ampleur de la formation continue de thrombine dans le corps (GT *in vivo*). En effet une GT *in vivo* accrue avec détection des fragments 1 et 2 de la prothrombine (F1+2), les complexes thrombine-antithrombine (TAT) indique un processus pathologique en cours alors qu'une GT *ex vivo* élevée ou diminuée implique que la fonction du processus de coagulation est anormale, indiquant un risque accru de thrombose ou de saignement.⁴³

Les applications potentielles de cette technique sont vastes, variant de l'exploration de coagulopathies à risque hémorragique à la surveillance thérapeutique des patients hémophiles ou des patients traités par anticoagulants ou encore d'évaluer le risque de récurrence de maladie thromboembolique veineuse (MTEV).⁴⁹

i. TGT et maladie thrombotique

Trouver un paramètre prédictif de récurrence de thrombose veineuse serait souhaitable pour décider de la poursuite de l'anticoagulation chez ces patients. La génération de thrombine, mesurant l'effet cumulatif des facteurs pro-thrombotiques, peut convenir à cette fin.

Les tests de génération de thrombine ont un intérêt dans l'évaluation du risque de MTEV. Une formation accrue de thrombine dans le plasma induit toujours un risque de thrombose veineuse. La présence d'une mutation du FV Leiden ou du gène de la prothrombine, les déficits héréditaires en protéine C, protéine S et antithrombine, une augmentation des taux de FVIII ou encore la prise d'un traitement hormonal chez la femme ont tous été associés à une augmentation de la génération de thrombine dans diverses études. Cependant, comme chez les patients hémophiles, il existe de grandes différences de potentiel de génération de thrombine entre les patients présentant le même déficit.⁴⁸

La génération de thrombine pourrait être particulièrement importante dans le syndrome des antiphospholipides, un syndrome connu pour l'association entre les anticorps antiphospholipides dans le plasma et la thrombose vasculaire et/ou la morbidité gravidique. Les tests de génération de thrombine ont été décrits comme une excellente méthode pour détecter un anticoagulant lupique.⁴³

Plus globalement, un certain nombre d'études épidémiologiques ont montré qu'il existe une augmentation de la génération de thrombine chez les patients présentant une thrombophilie héréditaire ou acquise, semblant corrélée avec la survenue d'une première thrombose veineuse. Les données sur le risque de récurrence est plus controversé.⁴⁸

Le rôle du système de génération de thrombine plasmatique est plus évident dans la maladie veineuse que dans la maladie artérielle. Des niveaux élevés de génération de thrombine (ETP et pic) étaient associés à un risque accru d'accident vasculaire cérébral ischémique aigu, en particulier chez les femmes, bien qu'aucune association significative n'ait été rapportée entre ces paramètres et les maladies coronariennes. Il existe cependant des arguments pour supposer que la thrombine puisse également jouer un rôle dans la thrombose artérielle.⁴³

ii. TGT et maladies hémorragiques

Chez les patients présentant des déficits constitutionnels en facteurs de coagulation, la relation entre le résultat des tests de dépistage de la coagulation, les taux plasmatiques du facteur déficient et la tendance aux saignements peut varier d'un déficit à l'autre et d'un patient à l'autre avec le même déficit. Les tests de génération de thrombine, reflétant la fonction de l'ensemble des facteurs plasmatiques pro- et anticoagulants, ont donc un intérêt dans l'évaluation de ces patients.

Il a été montré que les propriétés de TGT étaient corrélées avec les taux de facteurs de coagulation, l'apparition et la gravité des symptômes hémorragiques dans une série de cas bien définis de déficits constitutionnels en fibrinogène et en facteurs II, V, VII, X, XI, XII, XIII ainsi que dans les hémophilies A et B.^{43,51,52}

La maladie la plus étudiée par les tests de génération de thrombine est l'hémophilie A. Contrairement à la distinction catégorique entre l'hémophilie mineure, modérée et sévère basée sur l'évaluation des niveaux fonctionnels de FVIII, des caractéristiques propres de génération de thrombine ont été rapportés pour illustrer et refléter l'hétérogénéité clinique de la maladie. Il a été montré qu'il existe une corrélation entre le tableau clinique et la capacité de génération de thrombine à 1 pM de facteur tissulaire, et entre les taux circulants de FVIII ou FIX et les paramètres du thrombogramme avec, chez les hémophiles, une diminution du pic et de l'ETP sans allongement du « Lag Time ».^{51,53}

A l'inverse, une perfusion de concentrés de FVIII de 50 UI/kg est capable de restaurer une génération de thrombine 30 minutes après la perfusion, parallèlement à l'augmentation de la concentration en FVIII. Ces résultats suggèrent l'utilité des TGT dans l'étude de la pharmacocinétique des perfusions de concentrés de FVIII en vue d'une utilisation plus économique de ces traitements très coûteux.⁵¹

L'étude des autres maladies hémorragiques a permis d'observer une diminution de la génération de thrombine dans les thrombopénies, thrombopathies et maladie de

Willebrand. D'après la littérature, il apparaît que tous les patients avec un déficit constitutionnel en facteur de la coagulation et patients hémophiles présentant un phénotype hémorragique sévère ont un ETP inférieur à 20% de la normale et ce indépendamment des taux plasmatiques en facteurs.^{51,52}

iii. TGT pour le suivi des traitements anticoagulants

Le traitement et la prévention de la thrombose veineuse se font par l'inhibition de la synthèse de la prothrombine et des facteurs de coagulation associés (via les antagonistes de la vitamine K-AVK-), en accélérant l'activité de l'antithrombine (héparines) ou par l'inhibition directe de la thrombine ou de l'une des enzymes qui contribuent à son activation (AOD). Le dénominateur commun est la régulation à la baisse de la génération de thrombine.

L'héparine et les AVK sont les anticoagulants les plus couramment utilisés dans le monde. Ces agents ont une fenêtre thérapeutique étroite et nécessitent une surveillance régulière avec respectivement le TCA et l'INR. Ces tests sont loin d'être idéaux et ne peuvent pas être utilisés pour surveiller la plupart des nouveaux anticoagulants oraux. Il serait souhaitable d'avoir un test qui pourrait être sensible à tous les anticoagulants et refléter ce qui se passe *in vivo*.

Les tests de génération de thrombine peuvent avoir un intérêt dans le suivi des patients traités par anticoagulants car ils peuvent détecter des différences dans la cinétique de thrombine générée et donc dans la cinétique du thrombus en formation au-delà de la phase d'initiation de la coagulation, phase explorée par les tests de dépistages comme le TCA.⁵⁴

Il se pose la question des limites physiologiques, en termes de génération de thrombine, au-delà desquelles le risque hémorragique augmente au cours d'un traitement par anticoagulant. Certains auteurs ont montré que dans l'anticoagulation orale les saignements augmentent si l'INR est supérieur à 4, ce qui correspond à un ETP inférieur

à 20% de la normale. De même, au cours d'un traitement par héparines, un allongement du TCA à 2 fois le temps témoin a été défini comme la limite physiologique au-delà de laquelle le risque hémorragique augmente, ce qui correspond encore à environ 80% d'inhibition de l'ETP.

Il est plus difficile de dire à quelle diminution de l'ETP correspond une anticoagulation adéquate. En effet certains auteurs ont montré qu'il existe une grande variabilité des profils de génération de thrombine obtenus à partir de plasmas de volontaires sains traités par héparines de différents poids moléculaires. Il est suggéré que toute diminution de l'ETP s'accompagne d'une diminution proportionnelle du risque de thrombose.^{43,55}

V. Maladie Thromboembolique Veineuse (MTEV) chez le patient hémophile

a. Epidémiologie

La maladie thromboembolique veineuse (MTEV) s'exprime sous deux formes cliniques principales : la thrombose veineuse profonde (TVP) et l'embolie pulmonaire (EP). Dans la population générale, il s'agit d'une maladie fréquente mais dont l'incidence globale tend à diminuer en France (1,57/1000 habitants/an en 2013), essentiellement en raison d'une baisse de l'incidence de la TVP car celle de l'EP demeure stable. La MTEV est un enjeu de santé publique car chaque année, près de 35000 patients sont hospitalisés en France pour une EP avec une mortalité hospitalière globale de 5%.⁵⁶

Parler de thrombose veineuse chez le patient hémophile semble paradoxal, en effet la complication principale chez ces patients, et la plus évidente, est l'hémorragie spontanée ou post-traumatique. Les patients hémophiles présentent très rarement des événements thrombotiques mais il convient de souligner que l'hémophilie ne protège pas totalement contre la maladie thromboembolique veineuse.

Parmi le petit nombre de cas rapportés, la majorité présentait un facteur déclenchant ou surajouté comme une intervention chirurgicale, la présence de matériel étranger, une

perfusion de facteur anti-hémophilique/agent by-passant ou l'existence d'un facteur de risque pro-thrombotique. Des cas exceptionnels d'événements thrombotiques spontanés ont été décrits.⁵⁷

b. MTEV en contexte chirurgical : exemple de la chirurgie orthopédique

La chirurgie orthopédique est considérée à risque particulièrement élevé, en raison de la nature de la chirurgie, de l'immobilisation postopératoire et de la nécessité d'un traitement substitutif par concentrés de facteurs à doses élevées sur une longue période.⁵⁷

Selon les recommandations européennes de prophylaxie anti-thrombotique en contexte chirurgical, l'incidence de la MTEV chez le patient hémophile reste faible avec un risque estimé de thrombose symptomatique après la pose de prothèse articulaire, en l'absence de prophylaxie anti-thrombotique, estimé à 0,5%. Ce risque est bien inférieur au risque cumulatif estimé à 4,3% dans la population générale. L'incidence d'une MTEV subclinique, détectée par la réalisation d'un écho-doppler de manière systématique, reste faible également et estimée entre 0 et 10% avec, le plus souvent, des TVP distales parfois spontanément résolutive.^{26,58,59}

A l'opposé, le risque de saignement est important, même lorsque le traitement par concentrés de facteurs a été soigneusement géré. Dans une évaluation rétrospective de 72 arthroplasties totales du genou chez 51 patients hémophiles A et B utilisant une perfusion continue de concentrés de facteurs et sans thromboprophylaxie, 26 hématomes (36,1%) et deux hémarthroses (2,7%) sont survenus dans 38,8% des cas au cours des 3 premières semaines postopératoires.⁵⁸

Ainsi se pose la question de la prescription d'une prophylaxie anti-thrombotique de façon systématique chez le patient hémophile devant subir une chirurgie orthopédique.

Il existe actuellement aucune recommandation à ce sujet car peu d'études ont été publiées et la grande majorité incluait un petit nombre de patient. Ces études concluent

à la nécessité de réaliser une analyse détaillée des risques pour chaque patient. Certains facteurs peuvent influencer sur la décision de pratiquer une prophylaxie par anticoagulants comme la présence d'antécédents personnels ou familiaux de MTEV, l'âge, l'IMC, une thrombophilie ou un cancer évolutif, le type et la sévérité de l'hémophilie.

Dans la population générale, des taux élevés de FVIII de façon persistante ont été associés à la survenue d'événements thrombotiques. La thromboprophylaxie est plus susceptible d'être justifiée chez les patients atteints d'hémophilie B du fait de l'augmentation importante et non contrôlée des taux de FVIII en période péri- et post-opératoire chez ces patients.^{58,60–62} Bien que cette option n'ait pas encore été validée, si la prophylaxie est jugée nécessaire, elle doit être limitée aux premiers jours post-opératoires lorsque les doses de concentrés de facteurs sont les plus importantes.⁵⁸

c. MTEV et traitements de l'hémophilie

Des cas de thromboses veineuses ont été rapportés au cours d'essais cliniques évaluant l'efficacité et la tolérance des nouveaux traitements de l'hémophilie. Du fait d'une correction hémostatique partielle apportée par ces molécules, il est parfois nécessaire de recourir à un traitement intermittent par des agents procoagulants en cas d'hémorragie ou de chirurgie. Ces situations ont été associées à un risque plus élevé de complications thrombotiques. Des événements thromboemboliques et des microangiopathies thrombotiques ont été observés chez des patients traités par Emicizumab ayant reçu simultanément des perfusions répétées de FEIBA® à plus de 100 UI/kg par jour pendant plus de 24h. Des complications thrombotiques dont une mortelle ont également été observées lors des essais cliniques du Fitusiran et du Concizumab.²⁵

Depuis ces événements, les lignes directrices ont été révisées sur la gestion des saignements au cours d'une prophylaxie par Emicizumab et recommandent des doses réduites de concentrés de FVIII et agents by-passants.²⁵

d. Traitements : problématiques de l'anticoagulation du patient hémophile

L'initiation d'une anticoagulation chez le patient hémophile peut être à visée curative en cas de thrombose artérielle ou veineuse avérée ou à visée prophylactique dans toutes les situations où elle pourrait normalement être indiquée comme en présence d'une fibrillation atriale (FA) ou en contexte chirurgical.

Le traitement des complications thrombotiques chez les patients hémophiles n'est actuellement pas standardisé, principalement en raison de la rareté de ces évènements.

Selon une série de cas publiée en 2016, il est souhaitable de débiter un traitement anticoagulant sous couvert d'une thérapie anti-hémophilique permettant de maintenir des taux de FVIII ou de FIX supérieurs à 30%.²¹ (Fig. 15)

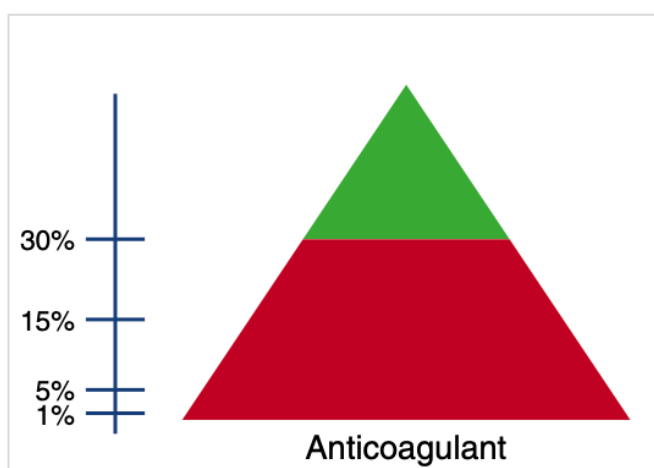


Figure 15. Approche de l'anticoagulation chez le patient hémophile en fonction des taux de FVIII/FIX.²¹ Rouge : à éviter ; Vert : autorisé

Selon cette même étude, plusieurs facteurs sont à prendre en compte, au cas par cas, avant l'initiation d'un traitement anticoagulant : le phénotype hémorragique du patient, les caractéristiques de l'anticoagulant, l'intensité et la durée du traitement prévues.²¹

La prise en compte du phénotype hémorragique de chaque patient permet d'établir le rapport bénéfice/risque de l'anticoagulation, un risque hémorragique important l'emporte donc presque toujours sur le bénéfice de l'anticoagulation, notamment chez le patient hémophile avec inhibiteur.

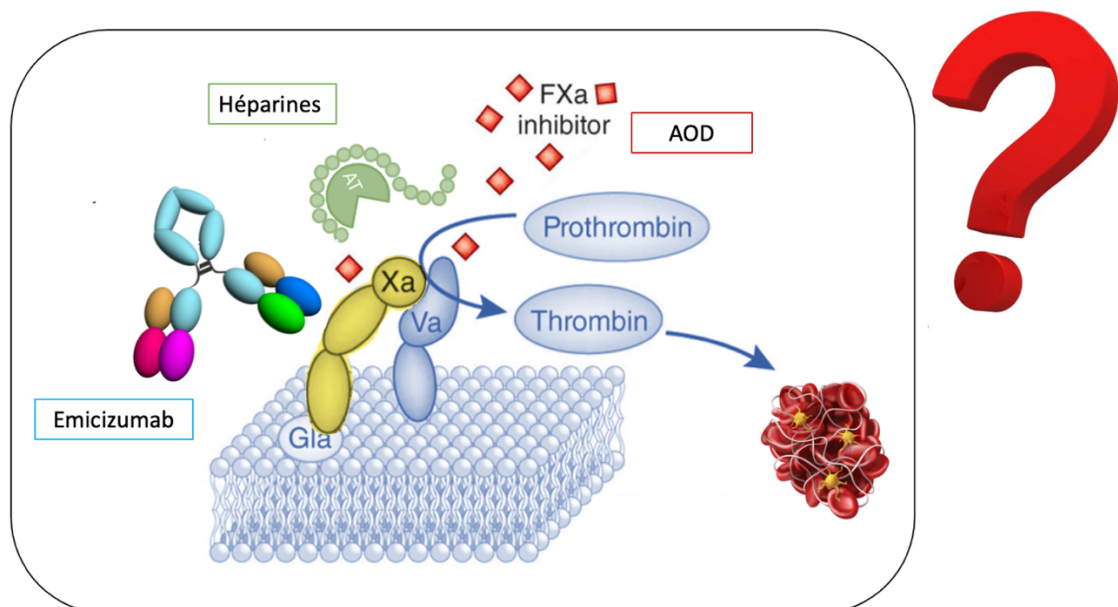
Le choix de l'anticoagulant est très important chez ces patients où il sera préféré une molécule à demi-vie courte avec, idéalement, un antidote disponible. Ainsi l'utilisation d'une Héparine Non Fractionnée (HNF) ou une Héparine de Bas Poids Moléculaire (HBPM) est favorisée. Si un traitement par voie orale est choisi, les antagonistes de vitamine K (AVK) ou le Dabigatran (PRADAXA®) sont privilégiés, en comparaison du Rivaroxaban ou Apixaban (XARELTO®, ELIQUIS®), du fait de la présence d'antidote.

L'intensité de l'anticoagulation est classée en trois catégories : élevée (bolus de charge dans la MTEV), modérée (anticoagulation curative), basse (prophylaxie anti-thrombotique). Le risque hémorragique correspond à l'intensité du traitement anticoagulant. Ainsi, chez le patient hémophile, l'utilisation d'une anticoagulation à forte intensité doit être la plus courte possible et sous couvert d'une thérapie anti-hémophilique. L'intensité de l'anticoagulation doit être réduite chez les patients avec un phénotype hémorragique sévère.

La durée de l'anticoagulation est le plus souvent réduite chez le patient hémophile car le risque de saignement, avec une durée standard d'anticoagulation, est supérieur au bénéfice du traitement anticoagulant.

Objectifs

L'arrivée des nouveaux traitements dont l'Emicizumab (HEMLIBRA®) est associée à une augmentation des complications thrombotiques chez certains patients hémophiles traités. Il a été observé, dans notre centre, un cas de thrombose du membre supérieur sur cathéter de type PICC-Line chez un patient hémophile mineur avec inhibiteur traité par Emicizumab seul durant la phase d'attaque. La nécessité d'initier un traitement anticoagulant complique énormément la prise en charge et le suivi de ces patients. En effet l'évaluation biologique de l'efficacité d'un traitement anticoagulant est plus difficile chez le patient hémophile traité par Emicizumab du fait des nombreuses interférences de cette molécule sur les dosages couramment utilisés au laboratoire. De plus des auteurs ont montrés que l'Emicizumab pouvait se lier au FXa, cible de la majorité des traitements anticoagulants.⁶³ Nous pouvons donc nous poser la question d'une éventuelle interférence de l'Emicizumab, du fait de son mécanisme d'action, sur l'effet anticoagulant des molécules classiques.



L'objectif principal de ce travail était d'évaluer, chez le patient hémophile sévère, l'impact d'un traitement par Emicizumab (HEMLIBRA®) sur l'effet anticoagulant des molécules utilisées dans le traitement de la MTEV grâce à l'utilisation des tests de génération de thrombine.

Matériel et Méthodes

I. Matériel

a. Pool de plasmas normaux

Afin de tester l'effet inhibiteur sur l'hémostase des différents traitements anticoagulants avant et après ajout d'Emicizumab, il était nécessaire de réaliser un pool par mélange de plusieurs plasmas normaux obtenus après centrifugation de sang total prélevé sur tube citraté (BD Vacutainer, 2,7 ml, 0.109M, citrate de sodium à 3,2%). Les échantillons étaient sélectionnés selon les critères suivants :

- Délai de prise en charge inférieur à 6 heures à compter de l'heure de prélèvement
- Taux de prothrombine (TP) compris entre 80 et 100%
- Ratio du Temps de céphaline activé (TCA) malade/témoin inférieur à 1,2
- Absence de traitement anticoagulant renseigné
- Plasma non hémolysé, non ictérique, non lactescent

Le pool de plasmas réalisé était conservé au congélateur à -80°C puis décongelé au bain-marie à 37°C le jour du test.

b. Plasma déficient en FVIII

Afin de déterminer le profil hémostatique de patients hémophiles sévères, modérés et mineurs par l'utilisation des tests de génération de thrombine, nous avons choisi d'utiliser du plasma humain lyophilisé déplété en FVIII et commercialisé par WERFEN (Factor VIII deficient plasma, lot N1143261) reconstitué avec 1 mL d'eau distillée puis stabilisé 30 minutes à température ambiante. Ce plasma était utilisé pour représenter le plasma d'un patient hémophile sévère. Afin de représenter le plasma de patients hémophiles modérés et mineurs, nous avons ajouté du FVIII recombinant à ce plasma déficient en FVIII comme décrit ci-dessous.

c. FVIII recombinant

Pour représenter le plasma de patients hémophiles modérés et mineurs, nous avons ajouté du FVIII recombinant (Turoctocog alpha-NOVOEIGHT® 1000UI, Novo nordisk®, lot GS63T51) préalablement reconstitué avec le solvant fourni au plasma déficient en FVIII afin d'obtenir des échantillons contenant 1-10-20 et 40% de FVIII.

d. Emicizumab (HEMLIBRA®)

Un flacon d'Emicizumab 150 mg/ml solution injectable (HEMLIBRA®, ROCHE, lot 1156720) a été utilisé dans la préparation des échantillons afin de déterminer le profil hémostatique de patients hémophiles sévères traités par Emicizumab seul à différentes concentrations (10, 20, 50 et 100 µg/mL) ou traités par Emicizumab à la concentration fixe de 50 µg/mL et anticoagulants.

e. Anticoagulants

Différents anticoagulants ont été utilisés dans l'évaluation de l'hémostase de patients sains et patients hémophiles traités par Emicizumab. L'objectif était d'obtenir une gamme de concentrations se rapprochant des concentrations mesurées chez les patients traités avec ajout de concentrations élevées représentant un surdosage en anticoagulant.

i. Héparines (HNF et HBPM)

Les héparines utilisées pour ce travail étaient :

- Enoxaparine sodique 2000 UI AXa/0,2 ml solution injectable (LOVENOX®, SANOFI-AVENTIS).
- Tinzaparine sodique 10000 UI AXa/0,5 ml solution injectable (INNOHEP®, LEO PHARMA).

- Héparine calcique 12500 UI/0,5 ml solution injectable (CALCIPARINE®, SANOFI-AVENTIS).
- Héparine sodique 25000 UI/5 ml solution injectable (HEPARINE CHOAY®, SANOFI-AVENTIS).

Les concentrations mesurées sur l'ensemble des échantillons sont présentées dans le tableau ci-dessous, où chaque condition a été testée deux fois. (Tableau. 1)

	Activités anti-Xa (UI/mL)				Activités anti-Xa (UI/mL)		
	Pool normal	Pool normal + Emicizumab	Plasma déficient FVIII + Emi		Pool normal	Pool normal + Emicizumab	Plasma déficient FVIII + Emi
Calciparine	<0,1	<0,1	<0,1	Lovenox	<0,1	<0,1	<0,1
	<0,1		<0,1		<0,1	<0,1	<0,1
	0,67	0,7	0,56		0,73	0,49	0,72
	0,6		0,55		0,6	0,54	0,75
	1,28	1,37	1,07		1,1	0,98	1,38
	1,21		0,95		1,05	1,05	1,31
	>1,5	>1,5	>1,5		>1,5	>1,5	>1,5
	>1,5		>1,5		>1,5	>1,5	>1,5
H. sodique	<0,1	<0,1	<0,1	Innohep	<0,1	<0,1	<0,1
	<0,1		<0,1		<0,1	<0,1	<0,1
	0,3	0,28	0,4		0,49	0,44	0,57
	0,41		0,39		0,47	0,47	0,59
	0,65	0,63	0,71		0,9	0,82	1,04
	0,8		0,73		0,92	0,86	1,09
	>1,5	1,25	1,41		>1,5	>1,5	>1,5
	>1,5		1,33		>1,5	>1,5	>1,5

Tableau 1. Concentrations en héparines (HNF et HBPM) mesurées

ii. Fondaparinux (ARIXTRA®)

Nous avons utilisé du Fondaparinux sodique 2,5 mg/0,5 ml solution injectable (ARIXTRA®, ASPEN France).

Les concentrations mesurées sur l'ensemble des échantillons sont présentées dans le tableau ci-dessous, où chaque condition a été testée deux fois. (Tableau. 2)

	Activités anti-Xa ($\mu\text{g/mL}$)		
	Pool normal	Pool normal + Emicizumab	Plasma déficient FVIII + Emi
Arixtra	0,14	0,02	0,06
		0	0,07
	0,61	0,47	0,61
		0,47	0,59
	> 1,47	1,37	> 1,47
		1,4	> 1,47
	> 1,47	> 1,47	> 1,47
		> 1,47	> 1,47

Tableau 2. Concentrations en Fondaparinux mesurées

iii. Anticoagulants Oraux Directs (AOD)

Les AOD utilisés pour ce travail étaient :

- Rivaroxaban 1mg poudre (XARELTO®, ALSACHIM), reconstitué dans du DMSO à la concentration de 1mg/mL.
- Apixaban 1mg poudre (ELIQUIS®, ALSACHIM), reconstitué dans du DMSO à la concentration de 1mg/mL.
- Dabigatran 1mg poudre (PRADAXA®, ALSACHIM), reconstitué dans du DMSO à la concentration de 1mg/mL.

Les concentrations mesurées sur l'ensemble des échantillons sont représentées dans le tableau ci-dessous, où chaque condition a été testée deux fois. (Tableau. 3)

	Activités anti-Xa (ng/mL)				Activités anti-IIa (ng/mL)		
	Pool normal	Pool normal + Emicizumab	Plasma déficient FVIII + Emi		Pool normal	Pool normal + Emicizumab	Plasma déficient FVIII + Emi
Eliquis	0	3,8	17,5	Pradaxa	<20	<20	<20
	14,8	20,2	14,6		<20	<20	<20
	38,6	38	44,1		32	29,8	23,4
	28,2	49,1	38,7		30	22,1	30
	186,8	198,3	192,7		172,3	155,1	142
	127,7	202,7	179		150	146	166,1
	543,1	569,4	554,6		>498,2	471,9	414,5
	328,7	583,2	526,7		>498,2	458,4	455,7
Xarelto	0	2,3	15				
	25,7	12,7	16,5				
	46,5	31,7	45				
	44,6	47	39,5				
	237,9	166,3	225				
	133,6	229,9	205,1				
	540	255,9	550				
	395,4	422,9	540				

Tableau 3. Concentrations en AOD mesurées

II. Techniques utilisées

a. Tests de génération de thrombine (TGT)

Les tests de génération de thrombine ont été réalisés sur l'automate ST-Génésia®, commercialisé par STAGO.

Le principe général de la technique est représenté sur la figure ci-dessous. (Fig. 16)

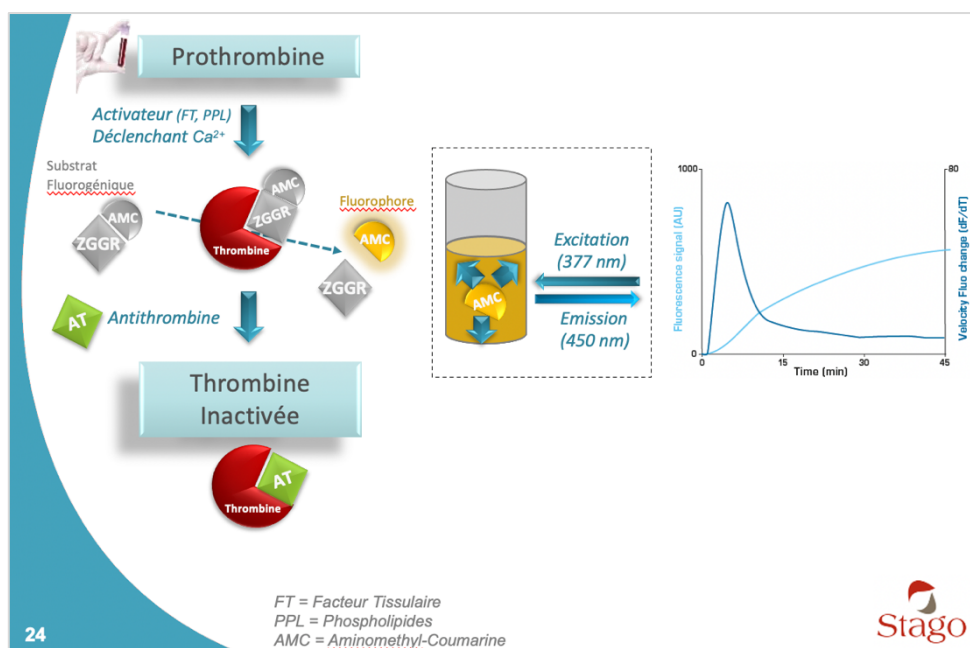


Figure 16. Principe général des tests de génération de thrombine⁴⁷

Les tests de génération de thrombine explorent le potentiel d'un plasma (pauvre ou riche en plaquettes) à générer de la thrombine après activation de la coagulation par du facteur tissulaire ou un autre déclencheur *in vitro*. Ils évaluent indirectement la formation du caillot en utilisant la génération de thrombine comme substitut. L'objectif est de suivre quantitativement la cinétique complète de génération de thrombine pour établir le phénotype, c'est-à-dire la réactivité et le potentiel du système de coagulation du sujet.⁶⁴

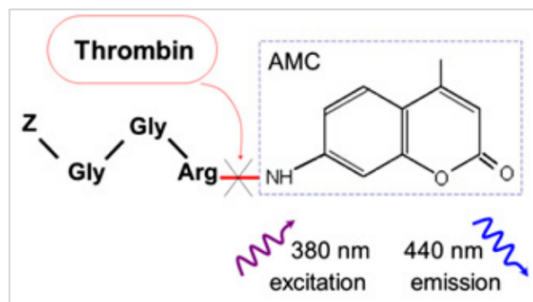


Figure 17. Détail du substrat fluorogénique générateur de fluorescence après clivage de la thrombine⁶⁵

Le plasma à tester est mis dans une cuvette dans laquelle on va y ajouter les différents réactifs déclencheurs à la concentration voulue ainsi que le substrat fluorogénique (Z-Gly-Gly-Arg-7-amino-4-methylcoumarin, ou AMC). Les réactifs déclencheurs utilisés sont le facteur tissulaire avec des phospholipides et du chlorure de calcium. La thrombine formée clive le substrat et libère le fluorophore (AMC) qui émet de la fluorescence.⁶⁵

Les modifications d'intensité du signal fluorescent sont suivies en temps réel et enregistrées par le logiciel informatique qui calculera l'activité de la thrombine par rapport à un étalon interne de thrombine.⁴⁹ (Fig. 16 ; Fig. 17)

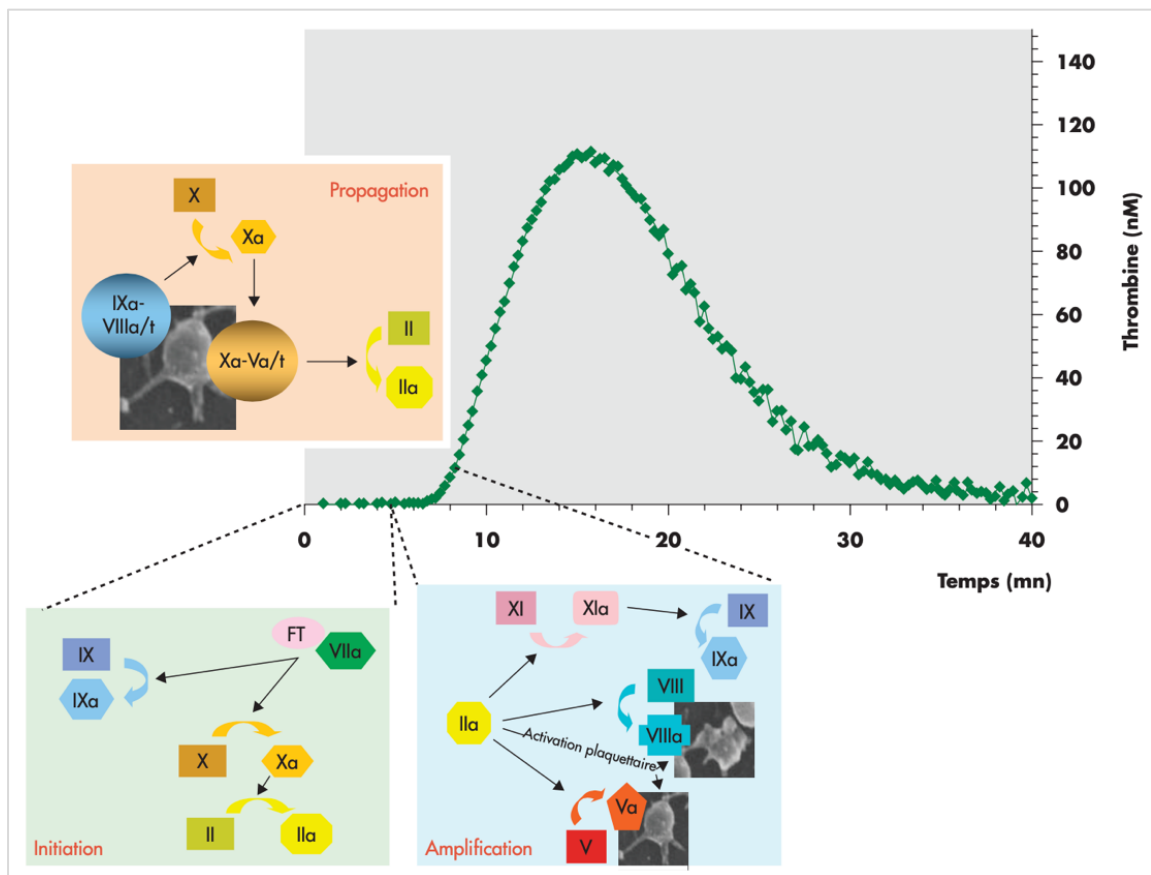


Figure 18. Thrombogramme et phases de la coagulation *in vitro*⁴⁴

In vitro, le système de coagulation du sujet évolue schématiquement en trois phases décrites précédemment. Le schéma ci-dessus (Fig. 18) montre la cinétique enregistrée de l'activité de la thrombine correspondant aux différentes phases de la coagulation⁴⁴ :

- Initiation : déclenchement puis amplification ; cette phase correspond à la transition du fibrinogène soluble en fibrine (mesurée par les tests de coagulation classiques)
- Propagation : génération explosive de thrombine, qui est l'aboutissement visible de l'amplification et qui prédomine alors nettement sur son inhibition
- Terminaison : l'inhibition de la thrombine générée par formation d'un complexe avec l'antithrombine ou la thrombomoduline permet l'inactivation de l'activité de la thrombine.

La courbe de génération de thrombine, appelée thrombogramme, a une forme d'onde à partir de laquelle une série de paramètres spécifiques peuvent être calculés⁴⁹ : (Fig. 19)

- Le temps de latence (Lag Time) : temps en minutes débutant à l'ajout de facteur tissulaire jusqu'à l'initiation de thrombine.
- La concentration maximale de thrombine générée (Peak height) : ou pic de thrombine en nmol/L.
- Le temps pour atteindre le pic de thrombine (Time to Peak) : en minutes.
- L'aire sous la courbe : représente le potentiel de thrombine endogène (ETP), exprimée en nmol/L de thrombine par minute et représente la totalité de thrombine générée sous l'action des facteurs pro- et anticoagulants.
- La vitesse de génération de thrombine (Velocity Index) permet de mesurer la cinétique initiale de formation de thrombine. Cet index est obtenu après calcul du rapport $\text{peak} / (\text{Time to peak} - \text{Lag Time})$.

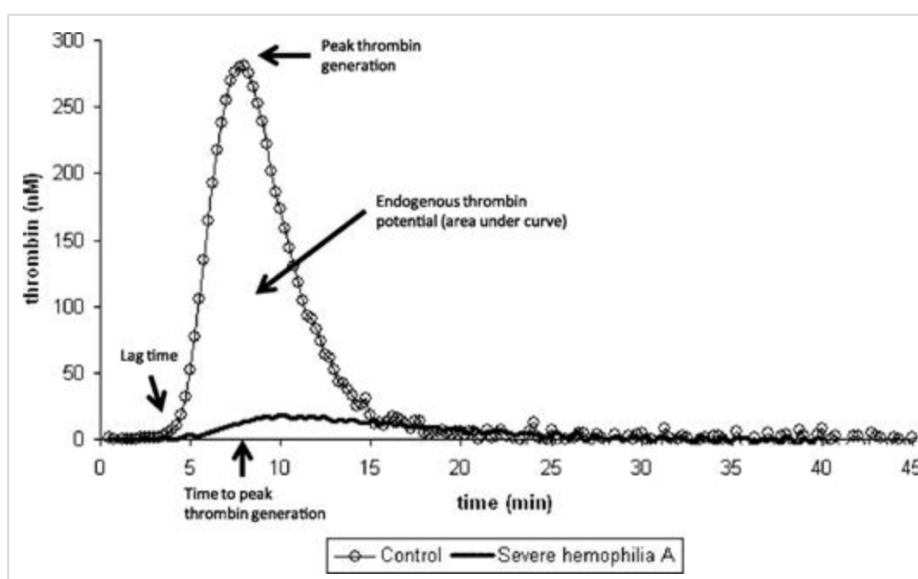


Figure 19. Courbes de génération de thrombine : courbe normale et courbe d'un patient hémophile A sévère⁶⁴

L'ensemble des tests réalisés pour ce travail ont été effectués en double et avec deux concentrations de FT : le coffret « Bleedscreen » (BS) contenant un activateur de la coagulation avec une faible concentration de FT et le coffret « Drugscreen » (DS) contenant un activateur de la coagulation avec une concentration plus importante de FT.

b. Tests d'hémostase

Les dosages des concentrations en anticoagulants ont été réalisés en parallèle des tests de génération de thrombine sur les automates Atellica coag 360® commercialisés par SIEMENS.

i. Mesure de l'activité anti-Xa

Le dosage de l'activité anti-Xa, dont le principe est résumé ci-dessous (Fig. 20), a été réalisé par une méthode chromogénique automatisée avec ajout de FXa en excès dans l'échantillon, l'Innovance Heparin reagent (Siemens, lot 50492). L'anticoagulant forme un complexe inactif avec le FXa seul ou avec le FXa et l'antithrombine de l'échantillon selon le mécanisme d'action de chaque anticoagulant. Le FXa résiduel clive un substrat chromogène spécifique apporté par l'Innovance Heparin Substrate (Siemens, lot 50492). L'absorbance mesurée à 405 nm est inversement proportionnelle à l'activité anti-Xa de l'échantillon et reportée sur une droite de calibration réalisée à partir d'un plasma avec une activité anti-Xa définie dilué en cascade permettant l'obtention de l'activité anti-Xa de l'échantillon (Innovance Heparin Calibrator, Siemens, lot 50370).

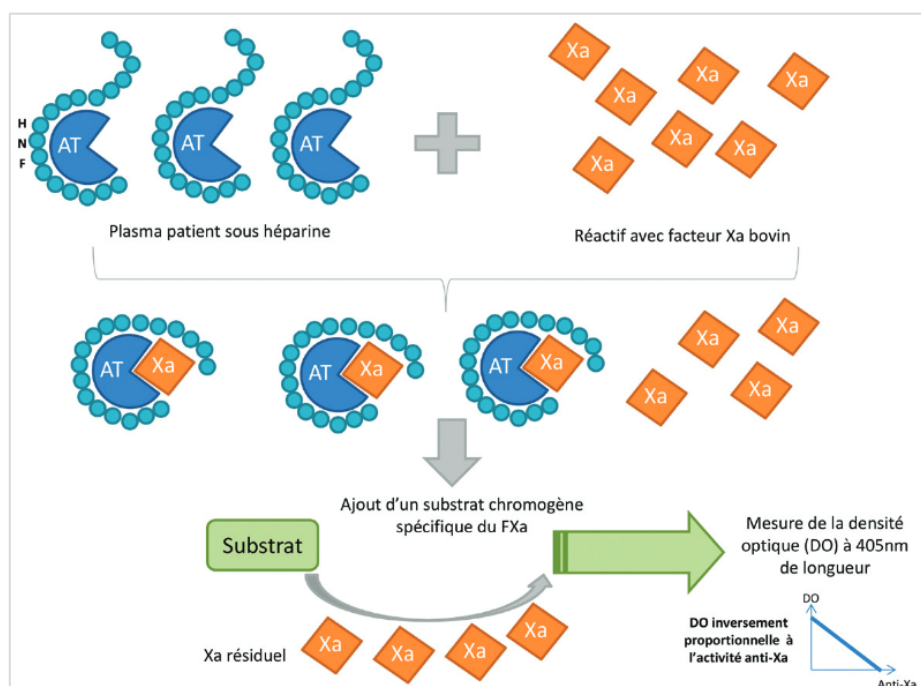


Figure 20. Dosage chromogénique de l'héparinémie par l'activité anti-Xa⁶⁶

Les Contrôles Internes de Qualité (CIQ) passés avant les échantillons comprenaient les contrôles Innovance Heparin UF 1 & 2 (Siemens, lot 563633A) ou Innovance Heparin LMW 1 & 2 (Siemens, lot 553328A) ou Arixtra control Plasma 1 & 2 (Biophen, lot F2001253) ou Rivaroxaban Control Plasma 1 & 2 (Biophen, lot F1900968) ou Apixaban control (Biophen, lot F2000154).

ii. Mesure de l'activité anti-IIa

Le dosage de l'activité anti-IIa a été effectué par une méthode chromométrique automatisée, l'Hemoclot®, où l'échantillon est incubé avec du plasma normal et un excès de thrombine (Innovance DTI Assay, Siemens, lot 50519). Le Dabigatran contenu dans l'échantillon inactive une partie de la thrombine et la thrombine restante va permettre la formation du caillot de fibrine. Le temps de coagulation obtenu est fonction de la concentration en Dabigatran contenue dans l'échantillon. Ce temps de coagulation est reporté sur une droite de calibration réalisée à partir d'un plasma avec une concentration connue en Dabigatran (Dabigatran standards, Siemens, lot 50443), permettant d'en déduire la concentration en Dabigatran de l'échantillon.

Les CIQ passés avant les échantillons comprenaient les contrôles Dabigatran Control L & H (Siemens, lot 558612).

Résultats

L'objectif principal de ce travail était d'évaluer, chez le patient hémophile sévère, l'impact d'un traitement par Emicizumab sur l'effet anticoagulant des molécules utilisées dans le traitement de la MTEV grâce à l'utilisation des tests de génération de thrombine.

Afin d'y répondre, plusieurs étapes ont été nécessaires. Nous avons tout d'abord caractérisé le profil de génération de thrombine de plasmas contenant des taux croissants de FVIII puis mesuré le niveau de restauration du potentiel de coagulation apporté par des concentrations croissantes d'Emicizumab sur un plasma déficient en FVIII. Nous avons ensuite caractérisé le pouvoir anticoagulant de différentes molécules sur des échantillons de plasmas normaux en l'absence puis en présence d'Emicizumab afin de comparer ces résultats avec ceux obtenus sur des échantillons de plasmas déficients en FVIII avec Emicizumab.

I. Profil hémostatique de patients hémophiles A

a. Patients hémophiles A sévères, modérés et mineurs non traités

La première partie de notre travail a consisté en l'étude *in vitro* de l'hémostase de patients hémophiles sévères, modérés et mineurs non traités grâce aux tests de génération de thrombine.

La génération de thrombine a été évaluée sur un plasma déficient en FVIII en absence et en présence de différentes concentrations de FVIII (<1%, 1%, 10%, 20%, 40%).

Les courbes de génération de thrombine obtenues pour les différents taux de FVIII sont représentées ci-dessous. Nous avons souhaité mesurer l'impact de la concentration en facteur tissulaire (FT) sur la génération de thrombine en utilisant les deux coffrets disponibles : le coffret « Bleedscreen » (BS) contenant un activateur de la coagulation avec une faible concentration de FT et le coffret « Drugscreen » (DS) contenant un activateur de la coagulation avec une concentration plus importante de FT. (Fig. 21)

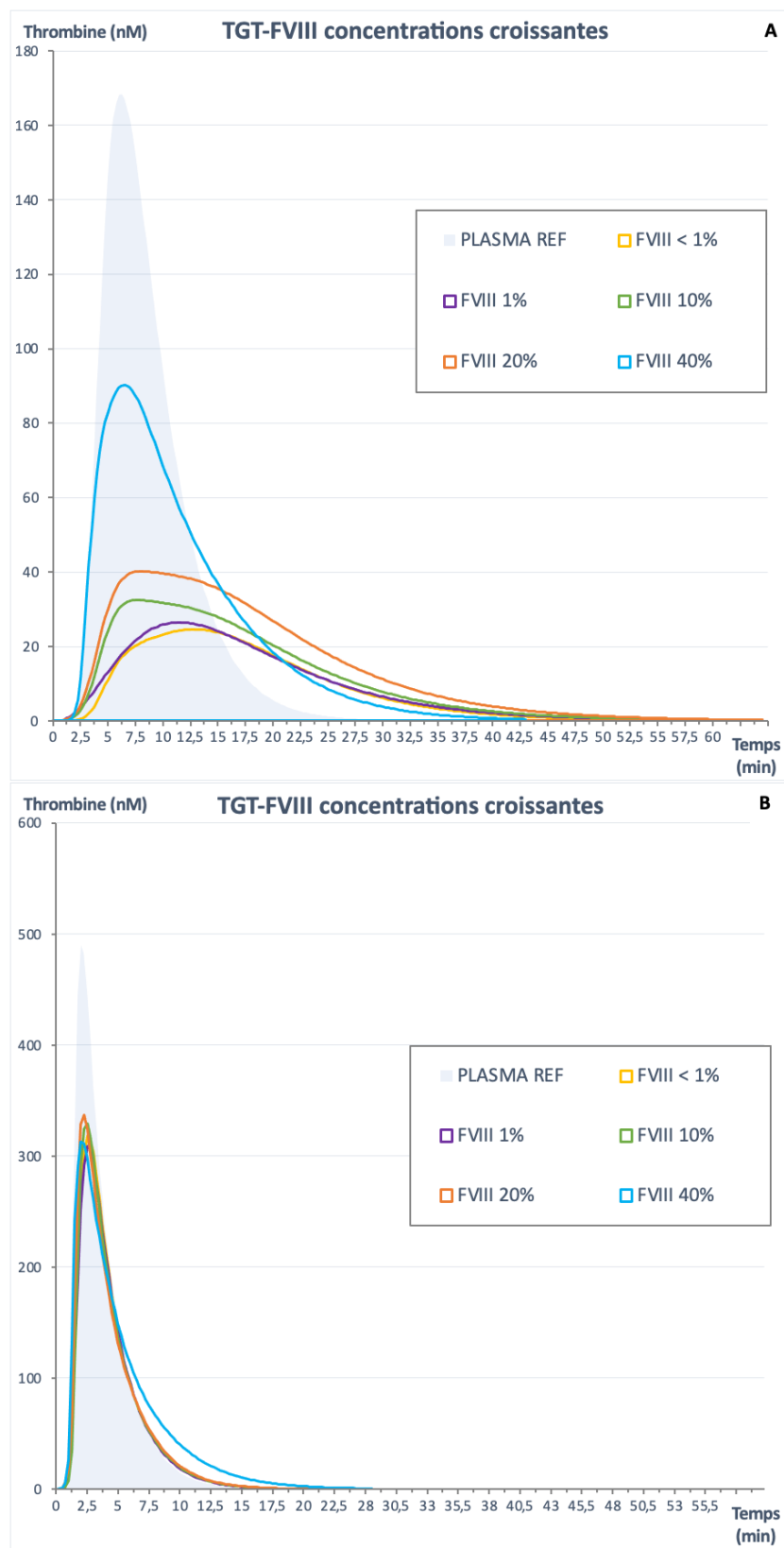


Figure 21. Courbes de génération de thrombine : concentrations croissantes de FVIII

(A) Faible concentration de FT (BS) ; (B) Forte concentration de FT (DS)
L'aire bleutée représente la génération de thrombine d'un plasma de référence.

En présence d'une faible concentration de FT, nous observons une augmentation de génération de thrombine de plus en plus importante à mesure que les taux de FVIII augmentent. Les courbes de génération de thrombine obtenues à partir d'un plasma contenant moins de 1% et 1% de FVIII sont proches. En présence d'une forte concentration de FT, la comparaison avec la courbe de génération de thrombine du plasma de référence montre une discrète diminution de génération de thrombine, équivalente quel que soit le taux de FVIII. (Fig. 21)

Nous pouvons en déduire que le taux de FVIII a très peu d'influence sur la génération de thrombine lorsqu'on utilise une forte concentration de facteur tissulaire pour activer la coagulation. Ceci peut être expliqué par une activation préférentielle de la voie extrinsèque de la coagulation au dépend de la voie intrinsèque.

Ainsi, pour la suite de notre travail, seules les données obtenues avec une faible concentration en FT (coffret BS) ont été présentées car cette condition est plus représentative de la réalité *in vivo*.

Pour l'ensemble de notre travail nous avons choisi d'interpréter trois paramètres de GT : l'ETP, le pic de thrombine et le Lag time. Les moyennes obtenues pour chaque paramètre de GT en fonction du taux de FVIII sont présentées dans le tableau ci-dessous (Tableau 4)

Taux de FVIII (%)	ETP (nM/min)	Pic de thrombine (nM)	Lag time (min)
<1	468,8	27,1	2,7
1	543,3	26,7	2,8
10	691	36,7	2,8
20	910,3	51,7	2,9
40	1122,5	106,6	2,5
Plasma réf	1200,8	159,2	2,9

Tableau 4. Paramètres de GT avec des concentrations croissantes de FVIII et en comparaison d'un plasma normal

Dans ces conditions expérimentales, nos résultats montrent que l'augmentation du taux de FVIII est associée à une augmentation de génération de thrombine avec augmentation de l'ETP et du pic de thrombine de façon concentration-dépendante sans effet sur le Lag time. Nous remarquons également que le potentiel de coagulation représenté par l'ETP d'un plasma contenant 40% de FVIII est proche de celui d'un plasma normal, justifiant l'utilisation de ce taux de FVIII pour la définition biologique de l'hémophilie A au-dessus duquel le sur-risque hémorragique est considéré comme minime.

b. Patients hémophiles A sévères traités par Emicizumab

Nous avons ensuite étudié l'hémostase de patients hémophiles sévères traités par Emicizumab à différentes concentrations par l'évaluation de la GT d'un plasma déficient en FVIII en présence de différentes concentrations d'Emicizumab (0, 10, 20, 50, 100 µg/mL) *in vitro*.

Les moyennes obtenues pour chaque paramètre de GT en fonction de la concentration en Emicizumab et avec une faible concentration de FT sont présentées dans le tableau ci-dessous (Tableau 5). Nous avons en effet obtenu des résultats similaires à ceux observés pour différents taux de FVIII en présence d'une forte concentration de FT. (*Données non présentées*)

Concentration d'Emicizumab (µg/mL)	ETP (nM/min)	Pic de thrombine (nM)	Lag time (min)
0	468,8	27,1	2,7
10	587,5	26,9	3,4
20	796,5	42,1	2,9
50	826,6	39,4	3,9
100	962,4	55,3	4,4
Plasma réf	1200,8	159,2	2,9

Tableau 5. Paramètres de GT avec des concentrations croissantes d'Emicizumab et en comparaison d'un plasma normal

Dans ces conditions expérimentales, nos résultats montrent que l'ajout d'Emicizumab à un plasma déficient en FVIII a un effet procoagulant par l'augmentation de la génération de thrombine avec augmentation de l'ETP et du pic de thrombine de façon concentration-dépendante. Cet effet procoagulant reste néanmoins modéré. En effet l'augmentation de génération de thrombine observée avec des concentrations moyennes à fortes d'Emicizumab est équivalente à la génération de thrombine observée à partir d'un plasma contenant 10 à 20% de FVIII et donc inférieure à la génération de thrombine obtenue à partir d'un plasma normal.

II. Profil hémostatique de patients sains traités par anticoagulants

La suite de notre travail a consisté en l'étude *in vitro* de l'hémostase de patients sains traités par anticoagulants par la caractérisation du profil de génération de thrombine d'échantillons de plasmas normaux après ajout de concentrations croissantes d'anticoagulants.

Nous avons choisi de présenter les paramètres de génération de thrombine obtenus en présence de Fondaparinux (ARIXTRA®) comme exemple illustrant l'ensemble de nos résultats.

Les paramètres de GT obtenus en présence d'ARIXTRA® ont été comparés avec les mêmes paramètres obtenus à partir d'un plasma normal dépourvu d'anticoagulant, permettant de calculer des pourcentages d'inhibition de l'ETP et du pic de thrombine ainsi que les pourcentages d'augmentation du Lag time. (Fig. 22)

Chaque condition ayant été testée deux fois, les pourcentages de variation des paramètres de GT ont été calculés à partir de la moyenne des deux passages.

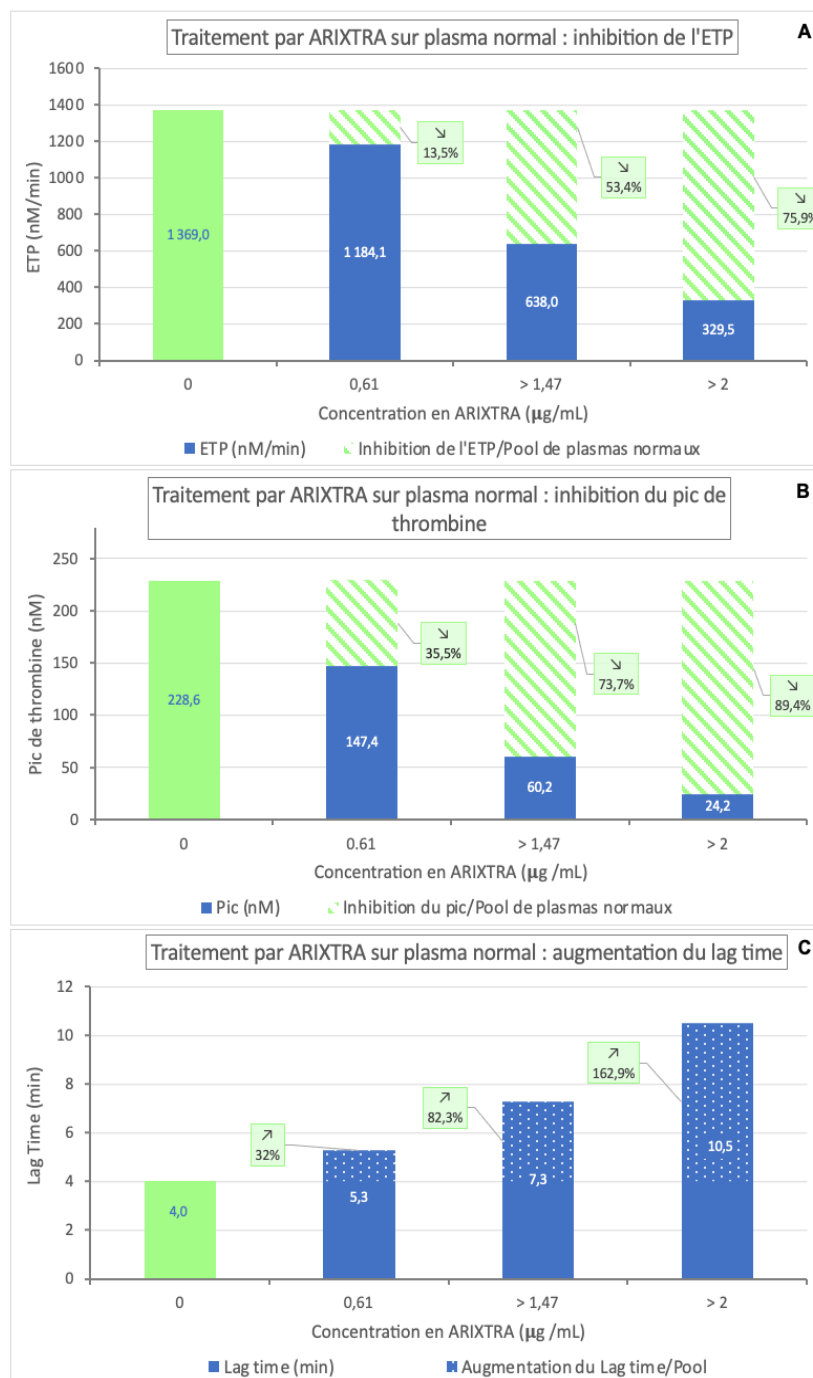


Figure 22. Variation des paramètres de génération de thrombine en fonction de la concentration en ARIXTRA®

(A) Pourcentages d'inhibition de l'ETP ; (B) Pourcentages d'inhibition du pic de thrombine ; (C) Pourcentages d'augmentation du Lag time

Nous pouvons conclure que dans nos conditions expérimentales, une anticoagulation par ARIXTRA®, aux concentrations habituellement rencontrées chez les patients anticoagulés, se traduit par une inhibition de l'ETP d'environ 13% à 53% avec une augmentation du Lag time d'environ 32% à 82%. (Fig. 22)

De la même façon, dans ces conditions expérimentales *in vitro*, nous montrons que le pouvoir anticoagulant des autres anticoagulants testés aux concentrations habituellement observées chez les patients anticoagulés se traduit par :

- Une abolition de génération de thrombine en présence d'HNF
- Une inhibition de l'ETP d'environ 65% à 85% avec augmentation du Lag time d'environ 60% à 87% en présence de LOVENOX®
- Une inhibition de l'ETP de 85 à 100% avec augmentation du Lag time d'au moins 77% en présence d'INNOHEP®
- Une inhibition de l'ETP d'environ 8% à 33% avec une augmentation du Lag time d'environ 20% à 60% en présence d'ELIQUIS®
- Une inhibition de l'ETP d'environ 7% à 42% avec une augmentation du Lag time d'environ 35% à 117% en présence de XARELTO®
- Une augmentation paradoxale de l'ETP de 6% aux faibles concentrations et une inhibition d'environ 57% aux concentrations plus élevées avec une augmentation importante du Lag time d'environ 77% à 144% en présence de PRADAXA®

L'ensemble des résultats obtenus permettent de conclure que chaque anticoagulant a un profil de génération de thrombine différent et pourtant une efficacité clinique similaire. La variable commune, et qui traduit le pouvoir anticoagulant de toutes ces molécules, reste l'inhibition de la génération de thrombine avec augmentation du Lag time de façon concentration-dépendante.

Nous avons également montré que l'ajout d'Emicizumab à la concentration de 50 µg/mL sur ces mêmes échantillons de plasmas normaux traités par anticoagulants n'a pas modifié l'effet anticoagulant de ces molécules *in vitro*. (*Données non présentées*) Le traitement d'un plasma normal par Emicizumab n'entraîne pas de modification de la génération de thrombine et ne modifie pas l'effet anticoagulant des molécules testées.

III. Profil hémostatique de patients hémophiles sévères traités par Emicizumab et anticoagulants

Afin d'étudier l'impact d'un traitement par Emicizumab sur l'effet anticoagulant des molécules utilisées dans le traitement de la MTEV chez le patient hémophile A sévère, nous avons étudié l'effet d'un ajout d'Emicizumab à la concentration de 50 µg/mL sur un plasma déficient en FVIII en présence de différents anticoagulants *in vitro*.

Les paramètres de GT obtenus en présence d'anticoagulants ont été comparés avec les mêmes paramètres obtenus à partir de plasmas déficients en FVIII avec Emicizumab dépourvus d'anticoagulants, permettant de calculer des pourcentages d'inhibition de l'ETP et du pic de thrombine ainsi que les pourcentages d'augmentation du Lag time.

Chaque condition ayant été testée deux fois, les pourcentages de variation des paramètres de GT ont été calculés à partir de la moyenne des deux passages.

a. Plasmas déficients en FVIII traités par Héparines

La comparaison des pourcentages d'inhibition de l'ETP, du pic de thrombine et des pourcentages d'augmentation du Lag time obtenus avec des concentrations croissantes d'héparines sur des échantillons de plasmas normaux et plasmas déficients en FVIII avec Emicizumab est représentée ci-dessous. (Fig. 23 ; Fig. 24 ; Fig. 25)

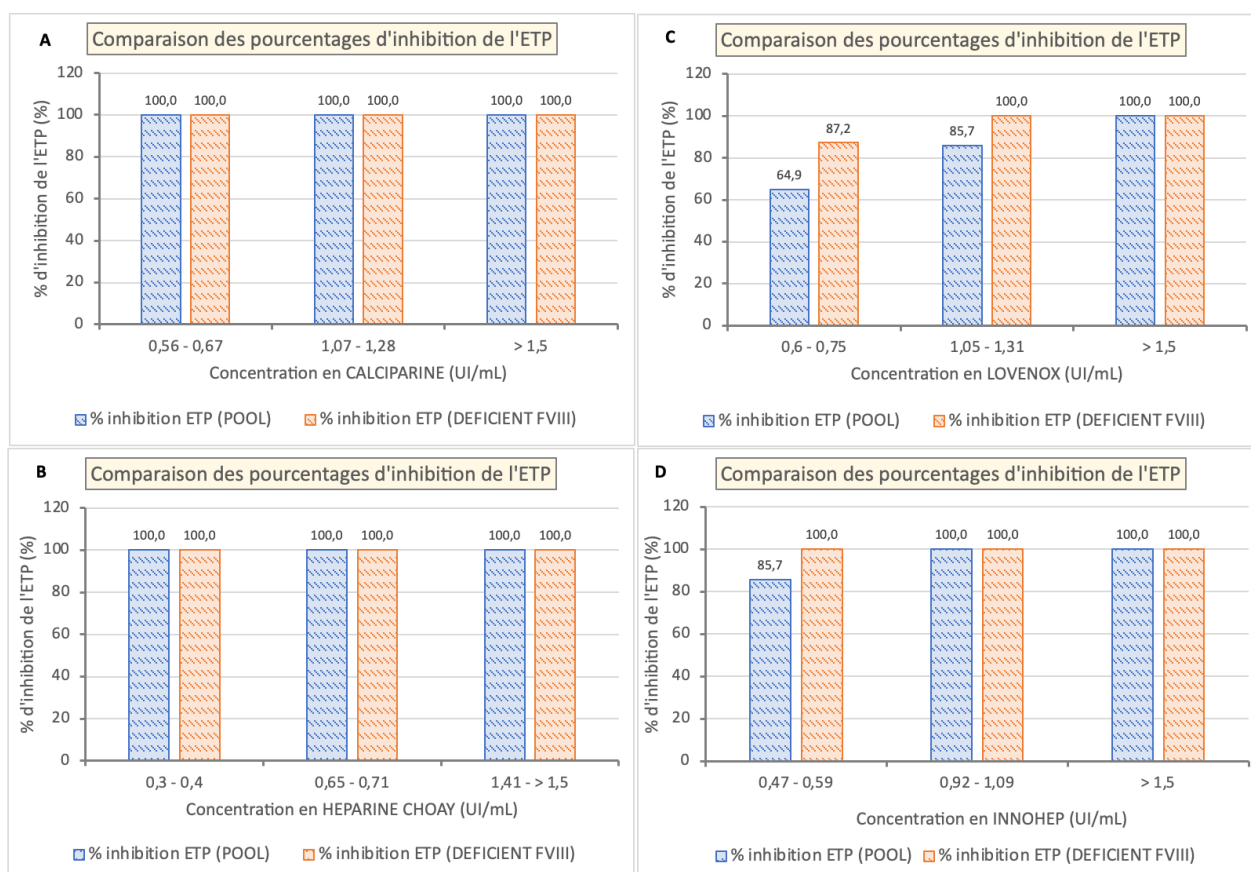


Figure 23. Comparaison des pourcentages d'inhibition de l'ETP en présence d'héparines

Pourcentages d'inhibition de l'ETP sur pool de plasmas normaux (bleu) et sur plasma déficient en FVIII avec Emicizumab (orange) en présence de (A) CALCIPARINE® ; (B) HEPARINE CHOAY® ; (C) LOVENOX® ; (D) INNOHEP®.

L'ajout d'HNF à un plasma déficient en FVIII avec Emicizumab ou à un pool de plasmas normaux entraîne une abolition de génération de thrombine quelle que soit la concentration d'HNF mesurée, correspondant à une inhibition de l'ETP de 100% en comparaison de plasmas normaux ou déficients en FVIII dépourvus d'anticoagulants. (Fig. 23)

En présence de faibles concentrations de LOVENOX® ou d'INNOHEP®, les pourcentages d'inhibition de l'ETP observés sur les échantillons de plasmas normaux ou plasmas déficients en FVIII avec Emicizumab sont proches sans être exactement identiques. Aucune génération de thrombine n'est observée à partir d'un plasma déficient en FVIII avec Emicizumab après ajout de concentrations de LOVENOX® proches de 1,0

UI/mL alors que nous avons une faible quantité de thrombine générée sur un pool de plasmas normaux.

L'ajout de concentrations plus élevées, telles qu'observées lors de surdosages en HBPM, se traduit par une abolition de la génération de thrombine. (Fig. 23)

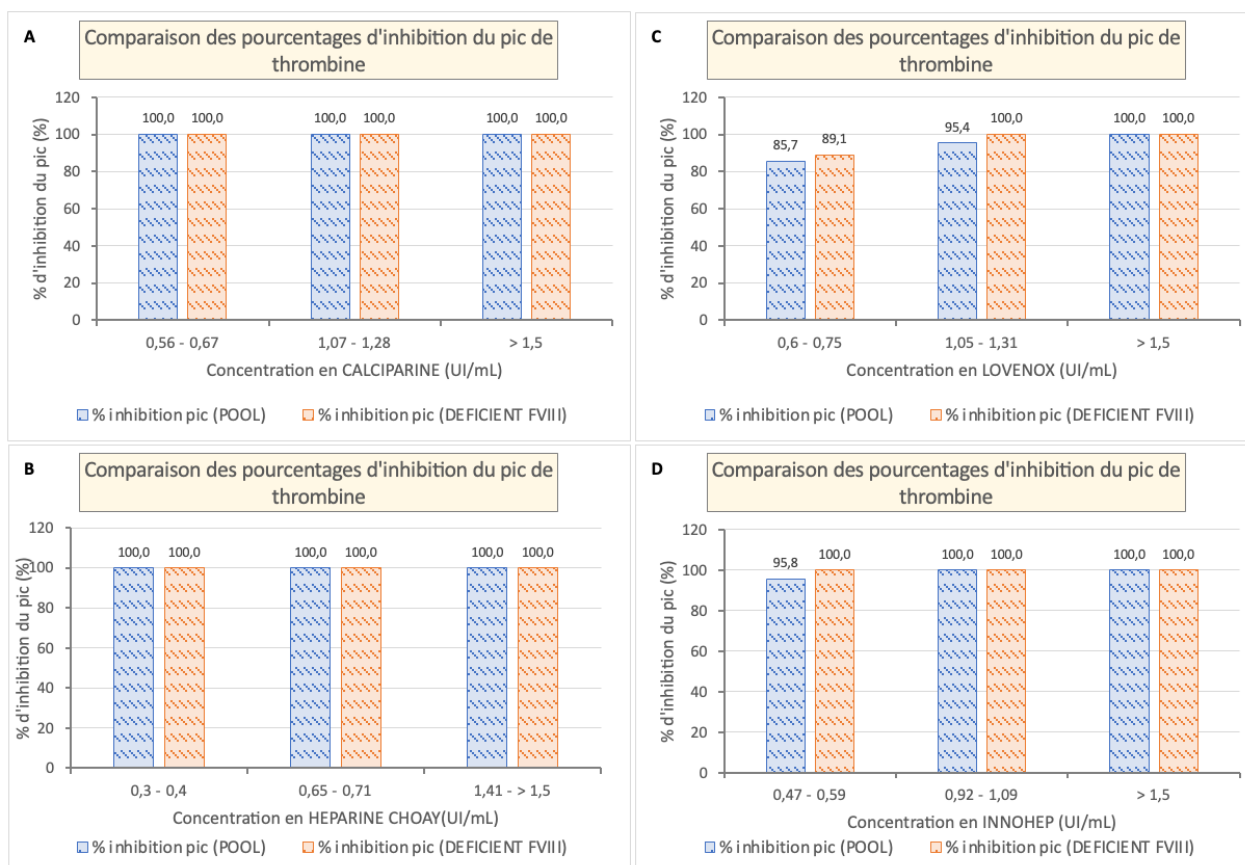


Figure 24. Comparaison des pourcentages d'inhibition du pic de thrombine en présence d'héparines

Pourcentages d'inhibition du pic de thrombine sur pool de plasmas normaux (bleu) et sur plasma déficient en FVIII avec Emicizumab (orange) en présence de (A) CALCIPARINE® ; (B) HEPARINE CHOAY® ; (C) LOVENOX® ; (D) INNOHEP®.

Les pourcentages d'inhibition du pic de thrombine obtenus en présence d'héparines sur un plasma déficient en FVIII avec Emicizumab sont comparables à ceux obtenus sur les échantillons de plasmas normaux. (Fig. 24)

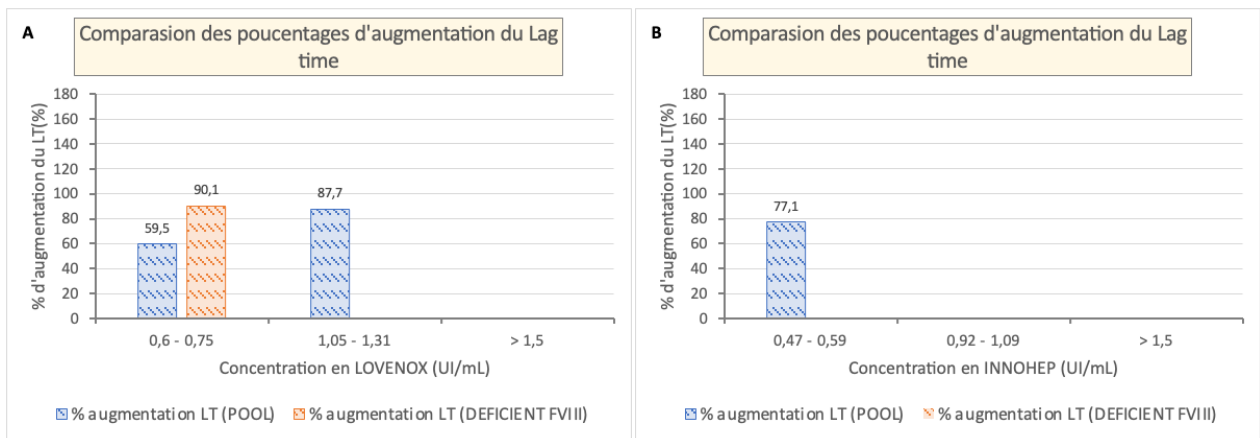


Figure 25. Comparaison des pourcentages d'augmentation du Lag time en présence d'HBPM

Pourcentages d'augmentation du Lag time sur pool de plasmas normaux (bleu) et sur plasma déficient en FVIII avec Emicizumab (orange) en présence de (A) LOVENOX® ; (B) INNOHEP®.

Aucune thrombine n'est générée en présence d'HNF sur les plasmas déficients en FVIII avec Emicizumab et échantillons de plasmas normaux. La comparaison des pourcentages d'augmentation du Lag time n'a donc pas été représentée.

En présence de faibles concentrations de LOVENOX®, le pourcentage d'augmentation du Lag time observé sur les échantillons de plasmas déficients en FVIII avec Emicizumab est plus élevé que celui obtenu sur les échantillons de plasmas normaux. La comparaison n'a pas pu être effectuée en présence d'INNOHEP® ou de concentrations plus élevées de LOVENOX® du fait d'une abolition de GT. (Fig. 25)

Au total, nous montrons que le pouvoir anticoagulant des HNF sur un plasma dépourvu de FVIII en présence d'Emicizumab, avec abolition complète de génération de thrombine aux concentrations habituellement observées chez les patients anticoagulés, est similaire à celui observé sur les échantillons de plasmas normaux.

D'après nos résultats précédents, une anticoagulation par HBPM sur des échantillons de plasmas normaux se traduit par une inhibition de l'ETP de 65% à 85% avec augmentation du Lag time de 60% à 87% en présence de LOVENOX® et une inhibition

de l'ETP de 85 à 100% avec augmentation du Lag time d'au moins 77% en présence d'INNOHEP®.

L'effet anticoagulant des HBPM ajoutées à un plasma déficient en FVIII avec Emicizumab se traduit par une inhibition de l'ETP de 87% à 100% avec augmentation du Lag time d'au moins 90% en présence de LOVENOX® et une inhibition de l'ETP de 100% en présence d'INNOHEP®.

Les variations observées peuvent être expliquées par les concentrations en anticoagulants mesurées qui étaient comparables sans être exactement identiques et par la variabilité connue des profils de génération de thrombine pour une concentration donnée d'anticoagulant. Le petit nombre d'échantillons testés explique également ces variations.

Nous concluons que le traitement d'un plasma déficient en FVIII par Emicizumab à la concentration habituellement rencontrée chez le patient hémophile sévère ne modifie pas l'effet anticoagulant des HNF et des HBPM *in vitro*.

b. Plasmas déficients en FVIII traités par Fondaparinux (ARIXTRA®)

La comparaison des pourcentages d'inhibition de l'ETP, du pic de thrombine et les pourcentages d'augmentation du Lag time obtenus pour chaque concentration d'ARIXTRA® sur pool de plasmas normaux et plasma déficient en FVIII après ajout d'Emicizumab est représentée ci-dessous. (Fig. 26)

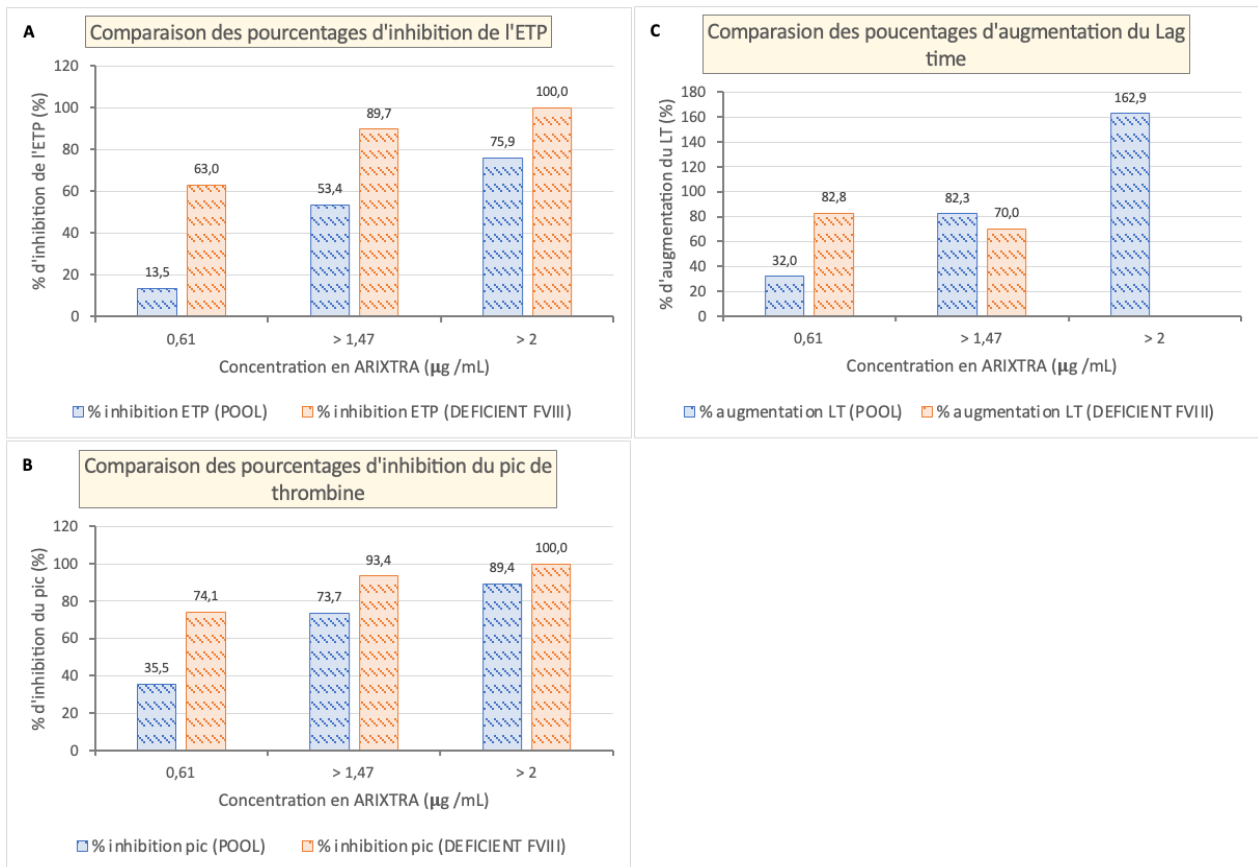


Figure 26. Comparaison des pourcentages de variation des paramètres de génération de thrombine (ETP, pic de thrombine, Lag time) en présence d'ARIXTRA®

(A) Pourcentages d'inhibition de l'ETP ; (B) Pourcentages d'inhibition du pic de thrombine ; (C) Pourcentages d'augmentation du Lag time après ajout d'ARIXTRA® sur pool de plasmas normaux (bleu) et sur plasma déficient en FVIII avec Emicizumab (orange).

En présence d'ARIXTRA®, les pourcentages d'inhibition de l'ETP et du pic de thrombine ainsi que les pourcentages d'augmentation du Lag time observés sur les plasmas déficients en FVIII avec Emicizumab sont plus élevés que sur les échantillons de plasmas normaux. Ces différences sont plus marquées avec de faibles concentrations en ARIXTRA® et s'estompent en présence de concentrations plus élevées. (Fig. 26)

Aucune génération de thrombine n'est observée à partir d'un plasma déficient en FVIII avec Emicizumab après ajout de concentrations élevées (>2 µg/mL) alors que nous avons une faible quantité de thrombine générée avec cette même concentration sur un pool de plasmas normaux. (Fig. 26)

D'après nos résultats précédents, une anticoagulation par ARIXTRA® sur un plasma normal se traduit par une inhibition de l'ETP de 13% à 53% avec augmentation du Lag time de 32% à 82%. Nous observons ici que l'effet anticoagulant de l'ARIXTRA® sur un plasma déficient en FVIII traité par Emicizumab se traduit par une inhibition de l'ETP de 63% à 90% avec augmentation du Lag time de 70% à 83%.

L'effet inhibiteur sur la génération de thrombine d'un ajout d'ARIXTRA® à un plasma déficient en FVIII avec Emicizumab est légèrement supérieur à celui observé sur un plasma normal.

Le peu d'échantillons testés et l'existence d'une variabilité des profils de GT en présence d'anticoagulants peuvent expliquer les différences observées.

Nous pouvons conclure que le traitement d'un plasma déficient en FVIII par Emicizumab à la concentration habituellement rencontrée chez le patient hémophile sévère n'empêche pas l'effet anticoagulant du Fondaparinux (ARIXTRA®) *in vitro*.

c. Plasmas déficients en FVIII traités par Anticoagulants Oraux Directs (AOD)

La comparaison des pourcentages d'inhibition de l'ETP, du pic de thrombine et les pourcentages d'augmentation du Lag time obtenus pour chaque concentration d'AOD sur pool de plasmas normaux et plasmas déficients en FVIII après ajout d'Emicizumab est représentée ci-dessous. (Fig. 27 ; Fig. 28 ; Fig. 29)

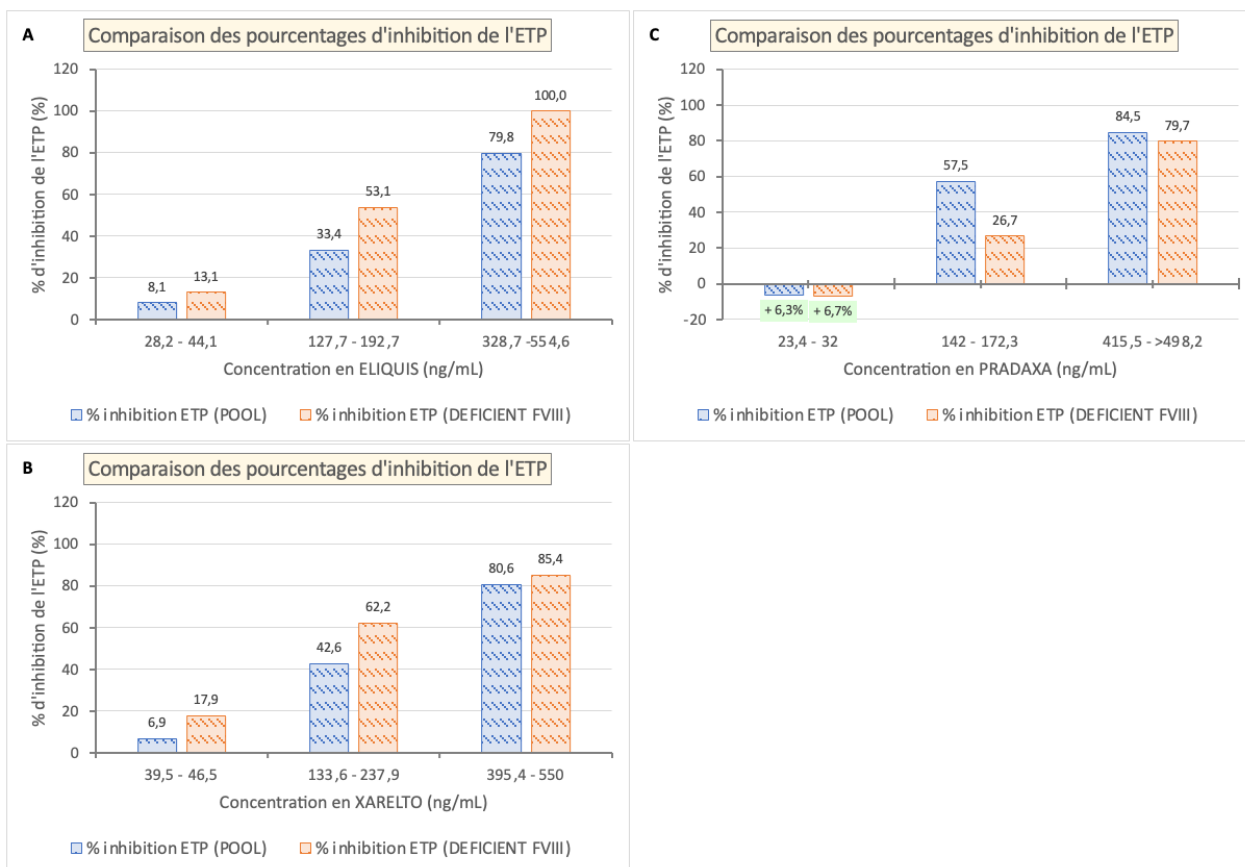


Figure 27. Comparaison des pourcentages d'inhibition de l'ETP après ajout d'AOD
 Pourcentages d'inhibition de l'ETP sur pool de plasmas normaux (bleu) et sur plasma déficient en FVIII avec Emicizumab (orange) en présence de (A) ELIQUIS® ; (B) XARELTO® ; (C) PRADAXA®

Les pourcentages d'inhibition de l'ETP observés après ajout d'ELIQUIS® ou de XARELTO® sur les plasmas déficients en FVIII avec Emicizumab sont comparables à ceux observés sur les échantillons de plasmas normaux sans être parfaitement identiques. L'effet inhibiteur de ces molécules sur la GT est en effet plus élevé sur les plasmas déficients en FVIII avec Emicizumab que sur les plasmas normaux.

Il est intéressant de remarquer que l'ajout de faibles concentrations de PRADAXA® entraîne une augmentation paradoxale de l'ETP d'environ 6%. En présence de concentrations plus élevées, le pourcentage d'inhibition de l'ETP est plus faible sur les échantillons de plasmas déficients en FVIII avec Emicizumab. Ces différences s'estompent avec de fortes concentrations de PRADAXA® (> 400 ng/mL). (Fig. 27)

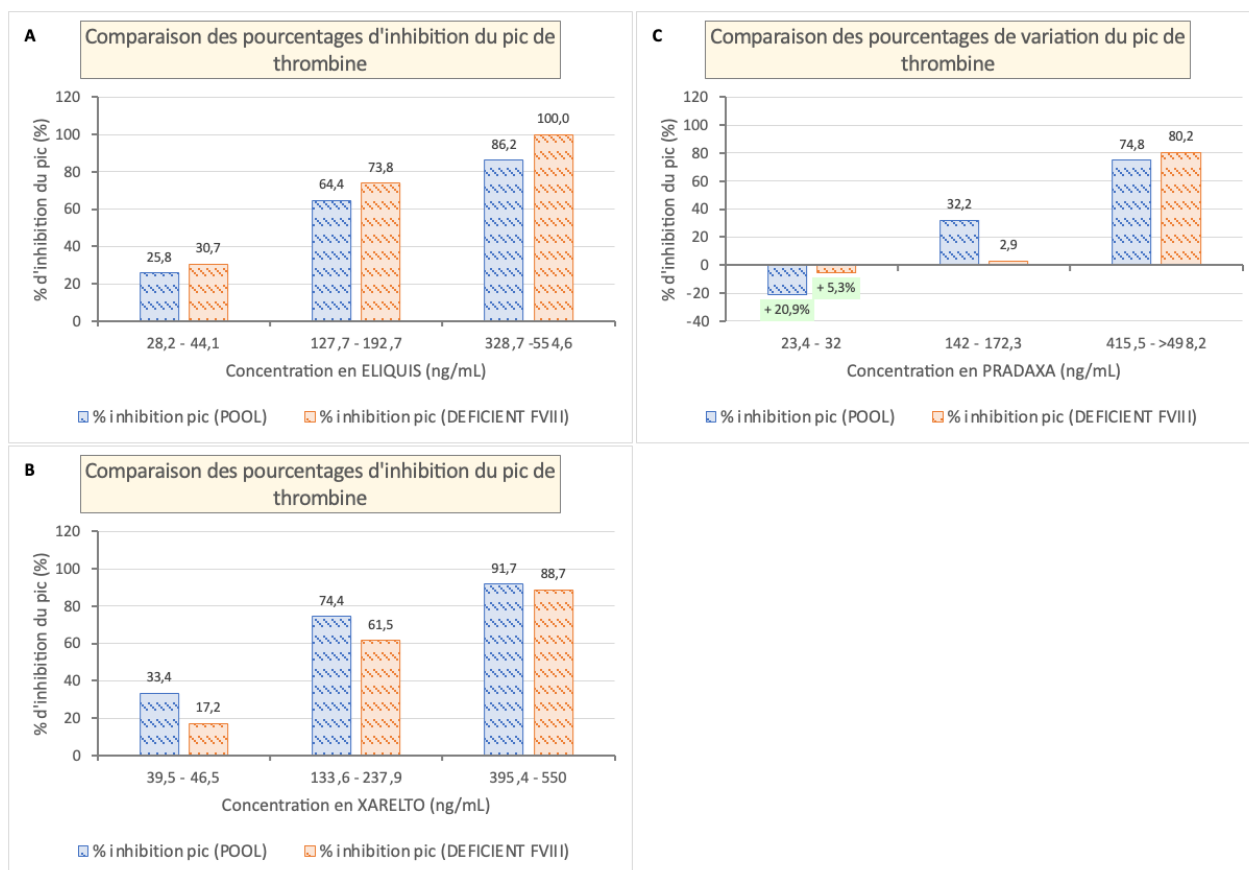


Figure 28. Comparaison des pourcentages d'inhibition du pic de thrombine après ajout d'AOD

Pourcentages d'inhibition du pic de thrombine sur pool de plasmas normaux (bleu) et sur plasma déficient en FVIII avec Emicizumab (orange) en présence de (A) ELIQUIS® ; (B) XARELTO® ; (C) PRADAXA®

Les pourcentages d'inhibition du pic de thrombine observés après ajout d'ELIQUIS® sur les plasmas déficients en FVIII avec Emicizumab sont comparables à ceux observés sur les plasmas normaux. En présence de XARELTO®, ces pourcentages d'inhibition sont étonnamment plus bas sur les plasmas déficients en FVIII avec Emicizumab en comparaison de ceux observés sur les plasmas normaux. (Fig. 28)

Comme cela a été observé précédemment, l'ajout de faibles concentrations de PRADAXA® entraîne une augmentation paradoxale de la génération de thrombine avec une augmentation du pic de thrombine qui est plus prononcée sur les échantillons de plasmas normaux. En présence de concentrations plus élevées, les pourcentages d'inhibition du pic de thrombine sont plus faibles sur les échantillons de plasmas déficients

en FVIII avec Emicizumab. Ces différences s'estompent avec de fortes concentrations de PRADAXA® (>400 ng/mL). (Fig. 28)

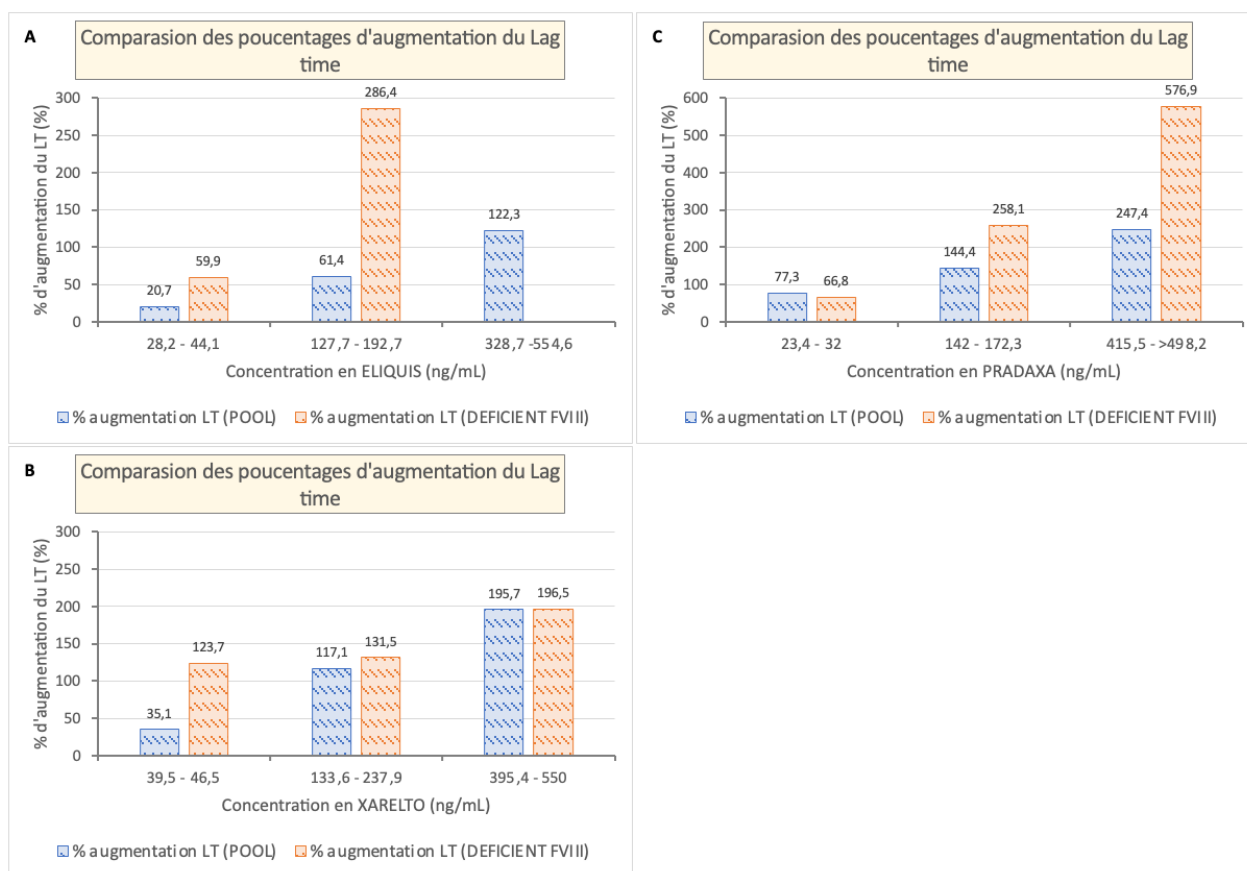


Figure 29. Comparaison des pourcentages d'augmentation du Lag time après ajout d'AOD

Pourcentages d'augmentation du Lag Time sur pool de plasmas normaux (bleu) et sur plasma déficient en FVIII avec Emicizumab (orange) en présence de (A) ELIQUIS® ; (B) XARELTO® ; (C) PRADAXA®

Les pourcentages d'augmentation du Lag time après ajout de XARELTO® sur les échantillons de plasmas déficients en FVIII avec Emicizumab sont comparables à ceux observés sur les échantillons de plasmas normaux, excepté avec de faibles concentrations d'anticoagulant. Nous observons de plus grandes variations en présence d'ELIQUIS® et de PRADAXA® où les pourcentages d'augmentation du Lag time sont parfois beaucoup plus importants sur les échantillons de plasmas déficients en FVIII avec Emicizumab. (Fig. 29)

D'après nos résultats précédents, une anticoagulation par ELIQUIS® sur un plasma normal se traduit par une inhibition de l'ETP de 8% à 33% avec augmentation du Lag time de 20% à 60% et une anticoagulation par XARELTO® se traduit par une inhibition de l'ETP de 7% à 42% avec augmentation du Lag time de 35% à 117%. Nous observons ici qu'une anticoagulation par ces mêmes molécules sur un plasma déficient en FVIII traité par Emicizumab se traduit par une inhibition de l'ETP d'environ 13% à 53% avec augmentation du Lag time de 60% à plus de 200% en présence d'ELIQUIS® et par une inhibition de l'ETP d'environ 18% à 62% avec augmentation du Lag time d'environ 120% à 130% en présence de XARELTO®

Nous avons montré qu'une anticoagulation par PRADAXA® sur un plasma normal se traduit par une augmentation de l'ETP de 6% aux faibles concentrations puis une inhibition de l'ETP de 57% aux concentrations plus élevées avec augmentation du Lag time de 77% à 144%. Nous observons ici que l'effet anticoagulant de cette molécule sur un plasma déficient en FVIII traité par Emicizumab se traduit également par une augmentation de l'ETP d'environ 6% aux faibles concentrations et une inhibition de l'ETP d'environ 26% aux concentrations plus élevées avec augmentation du Lag time de 67% à plus de 200%.

Le peu d'échantillons testés et l'existence d'une variabilité des profils de GT en présence d'anticoagulants peuvent expliquer les différences observées.

Nous pouvons conclure que le traitement d'un plasma déficient en FVIII par Emicizumab à la concentration habituellement rencontrée chez le patient hémophile sévère n'empêche pas l'effet anticoagulant des AOD *in vitro*.

Au total, l'ensemble de ces résultats permet de mieux appréhender le pouvoir procoagulant de l'Emicizumab lorsqu'il est utilisé seul ou en présence de traitements anticoagulants.

En effet l'utilisation de tests de génération de thrombine a permis de montrer l'effet procoagulant de l'Emicizumab lorsqu'il est ajouté à un plasma déficient en FVIII par la restauration d'un potentiel de coagulation équivalent à celui d'un plasma contenant 10 à 20% de FVIII *in vitro*. Nous remarquons que la restauration de la coagulation en présence d'Emicizumab reste partielle et inférieure à la coagulation obtenue à partir d'un plasma normal.

Nous montrons que l'ajout d'Emicizumab à un plasma déficient en FVIII, préalable à l'ajout de divers traitements anticoagulants, n'empêche pas ces molécules d'exercer leur pouvoir anticoagulant *in vitro*.

Discussion

L'Emicizumab (HEMLIBRA®) est un anticorps monoclonal humanisé de type immunoglobuline G4 (IgG4) présentant une structure d'anticorps bispécifique. Il se lie au facteur IXa et au facteur X pour restaurer la fonction du facteur VIIIa nécessaire pour une hémostase efficace. L'arrivée sur le marché de cette nouvelle molécule a considérablement amélioré la prise en charge et la qualité de vie du patient hémophile sévère ou avec inhibiteur du fait d'une diminution de l'ABR, de son mode d'administration (SC) et d'une demi-vie longue permettant d'espacer les injections. Cependant des événements thrombotiques à type de microangiopathies thrombotiques et événements thromboemboliques ont été observés lors des études pré-cliniques lorsqu'un traitement par FEIBA® était administré conjointement à l'injection d'Emicizumab ou, comme cela a été le cas dans notre centre, en présence d'un cathéter central au moment de l'initiation de la prophylaxie par Emicizumab avec des doses de charge. Ces données laissent penser que l'Emicizumab puisse entraîner une hypercoagulabilité chez le patient hémophile, dépassant le potentiel de coagulation d'un patient sain, dans certaines conditions comme la présence de matériel étranger ou l'administration d'un autre traitement à effet procoagulant comme les agents by-passants. Dans ce contexte, l'initiation d'un traitement anticoagulant complique la prise en charge car peu de données relatives à l'anticoagulation d'un patient hémophile, et à fortiori traité par Emicizumab, sont disponibles dans la littérature. De plus le mécanisme d'action de cette nouvelle molécule peut faire penser qu'elle puisse interférer voire empêcher l'effet anticoagulant des molécules classiques utilisées dans le traitement de la MTEV.

L'objectif principal de ce travail était donc d'évaluer, chez le patient hémophile A sévère, l'impact d'un traitement par Emicizumab sur l'effet anticoagulant des molécules utilisées dans le traitement de la MTEV *in vitro*.

Nous avons choisi les tests de génération de thrombine pour caractériser l'hémostase de ces patients pour deux raisons. La première est qu'il s'agit de tests globaux permettent de mesurer la totalité de thrombine générée après activation de la coagulation par du FT et donc plus représentatif de la réalité *in vivo*. La courbe de génération de thrombine obtenue reflète la fonction de l'ensemble des facteurs plasmatiques pro- et anticoagulants et plusieurs études ont montré que les paramètres de génération de thrombine étaient corrélés avec les taux de facteurs de coagulation, l'apparition et la gravité des symptômes hémorragiques dans de nombreuses maladies hémorragiques dont l'hémophilie A.^{43,51,52} La deuxième est que l'Emicizumab n'interfère pas sur les tests de génération de thrombine contrairement aux tests classiques d'hémostase utilisés en laboratoire.

La première partie de notre travail a consisté en l'étude des profils de génération de thrombine de patients hémophiles mineurs, modérés et sévères non traités en utilisant un plasma déficient en FVIII auquel nous avons ajouté des concentrations croissantes de FVIII. Nous montrons, en présence d'une faible quantité de FT, que l'augmentation du taux de FVIII est associée à une augmentation de génération de thrombine avec une augmentation de l'ETP et du pic de thrombine. Nous n'avons pas mis en évidence de corrélation entre le Lag time et le taux de FVIII.

Ces résultats sont en accord avec une étude publiée en 2005 où les auteurs montrent qu'en présence d'une faible quantité de FT (1 pM) il existe une corrélation positive entre les taux circulants de FVIII et l'ETP ainsi qu'avec le pic de thrombine mais qu'aucune corrélation n'est observée entre les taux circulants de FVIII et le Lag time. De plus, dans cette étude, l'ETP et le pic de thrombine obtenus avec différents taux de FVIII sont comparables aux résultats que nous avons obtenu.⁵¹

Une autre étude ayant pour but de caractériser les profils de génération de thrombine de patients hémophiles a montré qu'en présence d'une faible concentration en FT il existe une corrélation positive entre l'ETP et le taux de FVIII ainsi qu'une corrélation négative

entre le Lag time et le taux de FVIII mais aucune corrélation entre le pic de thrombine et le taux de FVIII. L'ETP obtenu avec différents taux de FVIII dans notre travail est comparable à celui observé dans l'étude. A l'inverse le pic de thrombine et le Lag time observés dans notre travail sont plus faibles.⁶⁷

Ces données montrent qu'il existe une grande variabilité des profils de génération de thrombine dans l'hémophile bien que l'on observe une tendance générale identique avec une augmentation de génération de thrombine lorsque le taux de FVIII augmente. Cette diversité peut être expliquée par des variables pré-analytiques où le choix de la quantité de FT utilisée, l'utilisation d'un plasma pauvre ou riche en plaquettes ou encore la température peut avoir une influence importante sur les résultats. Nous l'avons d'ailleurs observé en modifiant la quantité de FT utilisée qui a entraîné une modification importante des paramètres de génération de thrombine de l'ensemble des échantillons.

Nous avons ensuite souhaité étudier l'effet hémostatique d'un traitement par Emicizumab lorsqu'il est administré à un patient hémophile sévère en ajoutant de l'Emicizumab à différentes concentrations à un plasma déficient en FVIII. Nous montrons, en présence d'une faible quantité de FT, que l'ajout d'Emicizumab à un plasma déficient en FVIII a un effet procoagulant par l'augmentation de la génération de thrombine avec augmentation de l'ETP et du pic de thrombine de façon concentration-dépendante. L'effet procoagulant de l'Emicizumab reste néanmoins modéré avec une augmentation de la génération de thrombine engendrée qui semble équivalente à la génération de thrombine obtenue à partir d'un plasma contenant 10 à 20% de FVIII et donc inférieure à celle d'un plasma normal. Les données relatives à l'étude des profils de génération de thrombine d'un patient hémophile traité par Emicizumab sont peu nombreuses. La majorité des études ont utilisé ces tests dans l'évaluation pharmacocinétique d'un traitement par agents by-passants en complément d'une prophylaxie par Emicizumab chez le patient hémophile. Néanmoins l'ETP que nous avons obtenu à partir d'un plasma déficient en FVIII traité par Emicizumab est proche de celui observé dans une étude publiée en 2018 où les auteurs

ont utilisé une faible concentration en FT (1 pM) pour caractériser le profil de GT d'un patient hémophile traité par Emicizumab *ex vivo*.⁴²

Une autre étude publiée plus récemment en 2020 a montré l'effet procoagulant de l'Emicizumab par l'augmentation de l'ETP et du pic de thrombine en comparaison d'un plasma déficient en FVIII *in vitro*. Cependant les auteurs considèrent que l'interprétation de ces données, dans l'objectif de prédire la réponse hémostatique d'un patient, est à considérer avec prudence. La grande variabilité des résultats obtenus en fonction du type d'activateur utilisé et de leur concentration ainsi que la concentration en FIXa qui est le facteur limitant de la réaction, montre que ces tests globaux ne donnent pas d'informations sur la véritable équivalence en taux de FVIII d'une prophylaxie par Emicizumab.⁶⁸ Nos résultats illustrent bien cette observation où l'augmentation de la concentration en FT est associée à des profils identiques de GT quelle que soit la concentration en Emicizumab ou en FVIII, et donc des profils très différents de ceux obtenus avec une faible concentration de FT. C'est l'utilisation de modèles animaux qui a permis d'établir cette équivalence où l'effet procoagulant d'une prophylaxie par Emicizumab, aux doses thérapeutiques, est équivalent à celui d'un plasma contenant 10 à 20% de FVIII.⁶⁸

Pour la suite de notre travail, nous avons jugé nécessaire de tester les différentes molécules utilisées dans le traitement de la MTEV sur des plasmas normaux dans le but de caractériser l'effet anticoagulant de ces molécules en termes de modification de la génération de thrombine chez le patient non hémophile. Nos premières observations montrent que chaque anticoagulant inhibe la génération de thrombine de façon concentration-dépendante avec des profils différents en fonction de la molécule testée.

L'ajout de concentrations croissantes d'héparine non fractionnée (CALCIPARINE® et HEPARINE CHOAY®) à des plasmas normaux *in vitro*, telles qu'observées chez un patient traité par ces mêmes molécules, a entraîné une abolition de génération de thrombine à chaque concentration testée (de 0,3 UI/mL à plus de 1,5 UI/mL). Les résultats

obtenus sont en accord avec les données de la littérature. En effet Yiming XU *et al.* ont montré que l'ajout d'HNF à un plasma normal pauvre en plaquettes entraîne une abolition de génération de thrombine avec de faibles concentrations (dès 0,2 UI/mL) lorsque les tests de génération de thrombine sont réalisés avec de faibles concentrations de FT.⁶⁹ Kenichi A. Tanaka *et al.* observent, dans les mêmes conditions de réalisation des tests de génération de thrombine, des résultats similaires avec une inhibition importante de la génération de thrombine avec une concentration minimale en HNF (0,1 UI/mL) et une abolition de génération de thrombine avec des concentrations modérées (0,5 UI/mL). Les auteurs sont allés plus loin dans l'interprétation de ces résultats en concluant que les HNF, du fait de leur mécanisme d'action, retardent le début de la génération de thrombine en inhibant l'auto-activation initiale de la thrombine et donc la phase de propagation.⁵⁴

Nous avons ensuite testé l'ajout de concentrations croissantes d'héparines de bas poids moléculaire (LOVENOX® et INNOHEP®), telles qu'observées chez le patient traité, à des échantillons de plasmas normaux *in vitro*. Nous montrons que l'ajout de concentrations croissantes d'HBPM entraîne une diminution de génération de thrombine de façon concentration-dépendante avec, pour une même concentration, une inhibition plus importante de la génération de thrombine en présence d'INNOHEP® que de LOVENOX®. Dans nos conditions expérimentales, le pouvoir anticoagulant des HBPM se traduit par une inhibition de l'ETP d'environ 65% à 85% avec augmentation du Lag time d'environ 60% à 87% en présence de LOVENOX® et une inhibition de l'ETP de 85% à 100% avec augmentation du Lag time d'au moins 77% en présence d'INNOHEP®. Des résultats similaires ont été observés par une équipe suédoise en utilisant des plasmas de volontaires sains et une concentration en FT de 2 pM. Ils observaient une corrélation négative entre la concentration en HBPM et l'ETP et une inhibition plus importante de la génération de thrombine en présence d'INNOHEP® que de LOVENOX®. Cette équipe observait néanmoins des ETP plus élevés en présence de concentrations modérées en HBPM (1,0 UI/mL). Nous supposons que ceci peut être dû aux différentes concentrations

de FT utilisées.⁷⁰ D'après Al Dieri *et al.* l'inhibition de l'ETP dépend majoritairement de l'activité anti-IIa de chaque anticoagulant plutôt que de leur activité anti-Xa, ce qui explique nos résultats. Ils précisent également que l'ETP n'est pas (encore) validé pour le suivi d'un traitement anticoagulant mais qu'une estimation de la fenêtre thérapeutique est possible où un traitement par HBPM est considéré comme non inadéquat tant que l'ETP est compris entre 25% et 75% de la normale.⁵⁵

L'ajout de concentrations croissantes de Fondaparinux à des échantillons de plasmas normaux *in vitro* est associé à une diminution de la génération de thrombine de façon concentration-dépendante. Nous concluons, dans nos conditions expérimentales, que le pouvoir anticoagulant du Fondaparinux se traduit par une diminution de l'ETP d'environ 13% à 53% avec une augmentation du Lag time d'environ 32% à 82%. Ces résultats sont en accord avec l'étude publiée par G. T. Gerotziapas *et al.* où l'on observe une diminution de l'ETP et une augmentation du Lag time avec l'augmentation des concentrations en Fondaparinux. Il est néanmoins impossible de comparer nos résultats en termes de pourcentages de l'inhibition de l'ETP/augmentation du Lag time correspondant à une concentration donnée de Fondaparinux du fait de conditions expérimentales différentes, et particulièrement une concentration de FT plus élevée.⁷¹

Nous avons ensuite souhaité caractériser les profils de génération de thrombine de plasmas normaux après ajout d'AOD (ELIQUIS®, XARELTO®, PRADAXA®). Nos résultats montrent que l'ajout d'un anticoagulant à activité anti-Xa, ELIQUIS® ou XARELTO®, à des plasmas normaux se traduit par des profils de génération de thrombine proches avec une diminution de génération de thrombine et une augmentation du Lag time concentration-dépendante. Le pouvoir anticoagulant de ces molécules se traduit par une inhibition de l'ETP d'environ 7% à 42% et une augmentation du Lag time d'environ 20% à 117%. Le profil de génération de thrombine obtenu avec des concentrations croissantes de PRADAXA®, qui a une activité anti-IIa, est singulier avec une augmentation paradoxale

de la génération de thrombine avec de faibles concentrations puis une diminution de la génération de thrombine avec des concentrations plus élevées. L'augmentation du Lag time est franche et concentration-dépendante. Les résultats que nous obtenons en présence de PRADAXA® sont similaires à ceux publiés par Yiming XU *et al.* qui montrent qu'il existe une augmentation de la génération de thrombine d'un plasma normal pauvre en plaquettes après ajout de faibles concentrations en anticoagulant puis une diminution de génération de thrombine en présence de concentrations plus élevées en présence d'une faible concentration en FT. Ils observent également une augmentation du Lag time avec l'augmentation de la concentration en anticoagulant. Les auteurs expliquent l'augmentation paradoxale de génération de thrombine avec de faibles concentrations en PRADAXA® *in vitro* par l'existence de mécanismes impliqués dans la suppression de l'inactivation de la thrombine par la Protéine C activée et par la présence de l'alpha2-macroglobuline.⁶⁹

La majorité des études ayant étudié l'impact d'un traitement par ELIQUIS® ou XARELTO® sur l'hémostase par l'utilisation des tests de génération de thrombine ont été réalisées en présence d'une forte concentration en FT (supérieure à 4 pM). Dans ces conditions les auteurs montrent qu'il existe une corrélation entre la concentration en XARELTO® ou ELIQUIS® et les paramètres de génération de thrombine à l'exception de l'ETP.⁷² Ces résultats diffèrent en partie avec nos observations, particulièrement concernant la diminution de l'ETP qui, dans notre travail, était corrélée à la concentration en anticoagulant. Nous faisons l'hypothèse que cette discordance puisse être expliquée par les conditions expérimentales. En effet, dans cette étude, les auteurs ont étudié l'effet des AOD *ex vivo* à partir de plasmas de patients traités. Ils ont réussi à tester plus de 300 plasmas de patients traités avec différentes concentrations en anticoagulant lorsque nous n'avions que 8 échantillons testés par molécule, 2 échantillons de plasmas traités par concentration en anticoagulant. L'automate utilisé était également le ST-Génésia® de STAGO mais le coffret utilisé était différent. Nous avons choisi de n'interpréter que les

données obtenues avec de faibles concentrations en FT (coffret « Bleedscreen ») lorsque les auteurs eux ont choisi d'utiliser de fortes concentrations en FT (coffret « Drugscreen »).

Avant d'étudier l'impact d'un traitement par Emicizumab sur l'effet anticoagulant des molécules utilisées dans le traitement de la MTEV chez le patient hémophile A sévère, nous avons tout d'abord étudié l'effet de l'Emicizumab sur des plasmas normaux en présence ou non d'anticoagulant *in vitro*. Nos résultats montrent que le traitement d'un plasma normal par Emicizumab n'entraîne pas de modification de la génération de thrombine et ne modifie pas l'effet anticoagulant des différentes molécules testées. L'Emicizumab n'a donc pas d'effet procoagulant lorsqu'il est ajouté à un plasma normal, en présence ou non d'anticoagulant.

Nos résultats sont en accord avec ceux publiés par Armando Tripodi *et al.* où les auteurs montrent que certains paramètres de génération de thrombine (pic de thrombine et ETP) de plasmas normaux contenant de l'Apixaban à la concentration de 500 ng/mL sont très peu affectés par la présence d'Emicizumab avec une augmentation de moins de 10% de ces paramètres en comparaison d'un plasma normal avec Apixaban à la même concentration mais dépourvu d'Emicizumab. Cependant, dans cette étude, le Lag time est plus court de 15% à 30% en présence d'Emicizumab en comparaison d'un même plasma normal contenant de l'Apixaban à la concentration de 500 ng/mL mais dépourvu d'Emicizumab. D'après les auteurs, les raisons expliquant que l'Emicizumab n'affecte que certains paramètres de génération de thrombine restent inconnues.⁷³

Nous expliquons nos résultats par la présence d'une quantité importante de FVIII endogène dans les échantillons testés. En effet les différents échantillons de plasmas normaux utilisés contenaient des taux supposés normaux de FVIII, permettant la formation du complexe Ténase et donc la génération de thrombine. Il a été montré qu'en présence de taux importants de FVIII, l'ajout d'Emicizumab, ayant le même rôle que le FVIII au sein de la coagulation, ne se traduit pas par une augmentation de la génération de thrombine du fait d'une compétition entre le FVIII endogène et l'Emicizumab pour se lier au substrat

qui est alors insuffisant. Dans ce cas, le FVIII se lie plus efficacement au FX et FIXa que l'Emicizumab. L'Emicizumab est ainsi « déplacé », ne pouvant pas exercer son action procoagulante.⁷⁴

Pour finir, nous avons étudié l'effet de l'Emicizumab sur un plasma dépourvu de FVIII en présence d'anticoagulants *in vitro*. Nous concluons que, dans nos conditions expérimentales, l'ajout d'Emicizumab à un plasma déficient en FVIII préalable à l'ajout de divers traitements anticoagulants n'empêche pas ces molécules d'exercer leur pouvoir anticoagulant. Nous sommes tentés de croire que ces résultats pourraient également être observés *in vivo* mais des études complémentaires sont nécessaires pour le démontrer.

A notre connaissance, les effets d'une anticoagulation systémique administrée lors d'une prophylaxie par Emicizumab chez le patient hémophile A sévère en utilisant les tests de génération de thrombine n'a jamais été décrite. Seuls deux cas cliniques ont été publiés récemment où chaque centre avait pour but de décrire une situation ayant nécessité l'initiation d'un traitement anticoagulant chez un patient hémophile A sévère, sous couvert d'une prophylaxie par Emicizumab. Le premier cas clinique, publié en 2019, décrivait l'histoire d'un jeune patient de 6 ans hémophile A sévère avec inhibiteur ayant développé un thrombus intra-cardiaque. Une prophylaxie par Emicizumab a été débutée pour permettre une anticoagulation curative par HBPM aux posologies usuelles avec deux injections par jour. Le dosage de l'activité anti-Xa a été choisi pour le suivi avec une cible déterminée en fonction de la clinique, à savoir une régression du thrombus à l'échographie cardiaque avec une absence de manifestation hémorragique. Ces objectifs ont été atteints avec une activité anti-Xa comprise entre 0,5 et 0,7 UI/mL, donc similaire à l'activité anti-Xa cible lors d'une anticoagulation curative chez le patient non hémophile. Le deuxième cas, publié en 2020, relatait l'histoire d'un patient de 49 ans atteint d'hémophile A sévère sous prophylaxie par Emicizumab avec un diagnostic de COVID-19. Une anticoagulation préventive a été initiée par Enoxaparine 4000UI une fois par jour. Aucune complication

thrombotique ni hémorragique n'est survenue et le traitement a pu être arrêté 21 jours plus tard.^{75,76}

L'ensemble de ces données illustrent et sont en accord avec une partie de nos résultats, bien que notre travail ait été réalisé à partir de plasmas déficients en FVIII lyophilisés *in vitro* et non *in vivo*. En effet la conclusion que l'on peut avancer, à partir de ces deux cas cliniques, est qu'une anticoagulation préventive ou curative par HBPM, aux doses usuelles, est possible et efficace chez le patient hémophile A sévère traité par Emicizumab. D'après nos résultats, nous suggérons que l'on puisse obtenir des résultats similaires avec d'autres molécules comme les HNF, les AOD ou encore le Fondaparinux.

Notre travail comporte plusieurs limites. En effet nous avons testé de nombreuses molécules mais sur un petit nombre d'échantillons où chaque condition n'était testée que deux fois. Or il a été montré qu'il existe une grande variabilité inter-individuelle des profils de génération de thrombine au sein de patients hémophiles ayant le même taux de FVIII ou chez les patients sains traités par anticoagulant. Nous aurions peut-être obtenu des résultats différents si nous avions pu tester un nombre plus important d'échantillons.

Le choix d'utiliser les tests de génération de thrombine offrait de nombreux avantages mais ces tests s'avèrent très sensibles aux variables pré-analytiques. Certaines différences observées sont peut-être dues à l'incertitude de mesure de la technique en elle-même et non aux différentes conditions testées. De plus le choix des conditions expérimentales influence de façon importante les résultats obtenus et rend la comparaison aux travaux déjà effectués par d'autres équipes difficile.

Enfin, une autre limite de notre travail est que nous avons utilisé un plasma déficient en FVIII lyophilisé reconstitué auquel nous avons ajouté une concentration donnée d'Emicizumab puis différents traitements anticoagulants afin de représenter un patient hémophilie A sévère traité par ces mêmes molécules. Nos résultats obtenus ne sont donc pas transposables à la condition *in vivo*. Il paraît nécessaire de réaliser ces mêmes

expériences à partir de plasmas de patients hémophiles en cours de prophylaxie par Emicizumab en plus grand nombre et de réaliser des études complémentaires *in vivo*. L'utilisation d'un modèle murin tel que celui développé par P.J. Lenting et son équipe pourrait convenir à cette fin.⁷⁷

Conclusion

L'anticoagulation du patient hémophile est un défi du fait de la difficulté à obtenir une efficacité thérapeutique sans voir apparaître des complications hémorragiques graves chez des patients qui sont déjà à risque hémorragique. Ces événements sont rares, expliquant l'absence de lignes directrices. Néanmoins l'arrivée de nouveaux traitements comme l'Emicizumab visant à restaurer une hémostase efficace chez ces patients est associée, dans certains contextes, à une augmentation des complications thrombotiques.

Nous avons utilisé les tests de génération de thrombine pour mesurer l'impact d'un traitement par Emicizumab sur l'effet anticoagulant des molécules utilisées dans le traitement de la MTEV lorsqu'ils sont administrés chez le patient hémophile A sévère, représenté *in vitro* par un plasma dépourvu de FVIII.

Nos résultats montrent que, dans nos conditions expérimentales, l'ajout d'Emicizumab à un plasma déficient en FVIII a un effet procoagulant modéré avec une restauration de l'hémostase partielle, correspondant à un plasma contenant 10% à 20% de FVIII. L'ajout de divers traitements anticoagulants, en présence d'Emicizumab, n'empêche pas ces molécules d'exercer leur pouvoir anticoagulant *in vitro*. A notre connaissance, cela n'a jamais été mis en évidence auparavant.

Nous émettons l'hypothèse que de tels traitements peuvent être utilisés chez le patient hémophile A sévère traité par Emicizumab et aux mêmes posologies que chez le patient non hémophile. En effet l'Emicizumab, par son effet procoagulant, permet l'initiation d'une anticoagulation chez le patient hémophile A sévère lorsque cela est nécessaire. Cependant, les mêmes précautions dont une évaluation fine du rapport bénéfice/risque de l'utilisation de ces molécules reste primordial. Des études complémentaires sont nécessaires afin de savoir si des résultats similaires peuvent être observés *in vivo*.

Bibliographie

1. LK Leung, L. Overview of hemostasis - UpToDate. 2020
<https://www.uptodate.com/contents/overview-of-hemostasis>
2. Gouault-Heilmann, M. *Aide-mémoire d'hémostase*. (Médecine Sciences Publications, 2006).
3. Physiologie de l'hémostase. *MHEMO* <https://mhemofr/les-pathologies/physiologie-de-lhemostase/>.
4. Eledjam, J. J., Schved, J. F. & Bonnafox, J. Physiologie de l'hémostase. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* 4, 8 (1985).
5. Hoffman, M. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. *Blood Reviews* 17, S1–S5 (2003).
6. Krishnaswamy, S. FVIII-VWF dos-à-dos. *Blood* 126, 923–924 (2015).
7. Samuelson Bannow, B. *et al.* Factor VIII: Long-established role in haemophilia A and emerging evidence beyond haemostasis. *Blood Rev.* 35, 43–50 (2019).
8. Fibrinolysis: Introduction. https://practical-haemostasis.com/Fibrinolysis/fibrinolysis_introduction.html.
9. Bouma, B. N. & Meijers, J. C. M. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI, plasma procarboxypeptidase B, procarboxypeptidase R, procarboxypeptidase U). *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 1, 1566–1574 (2003).
10. Blanchette, V. S. *et al.* Definitions in hemophilia: communication from the SSC of the ISTH. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 12, 1935–1939 (2014).
11. Iorio, A. *et al.* Establishing the Prevalence and Prevalence at Birth of Hemophilia in Males. *Ann Intern Med.* 171(8):540-546. (2019)
12. Clinical manifestations and diagnosis of hemophilia - UpToDate. 2020.
<https://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-and-diagnosis-of-hemophilia>
13. Srivastava, A. *et al.* Guidelines for the management of hemophilia. *Haemophilia* 19, e1–e47 (2013).
14. Protocole National de Diagnostic et de Soins_Hémophilie_Haute Autorité de Santé_2019.pdf.
15. Lakich, D., Kazazian, H. H., Antonarakis, S. E. & Gitschier, J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nat Genet* 5, 236–241 (1993).
16. Valentino, L. A. Blood-induced joint disease: the pathophysiology of hemophilic arthropathy. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 8, 1895–1902 (2010).

17. Acharya, S. S. Exploration of the pathogenesis of haemophilic joint arthropathy: understanding implications for optimal clinical management: Review. *British Journal of Haematology* 156, 13–23 (2012).
18. Chronic complications and age-related comorbidities in people with hemophilia - UpToDate. 2020 <https://www.uptodate.com/contents/chronic-complications-and-age-related-comorbidities-in-people-with-hemophilia>
19. Mauser-Bunschoten, E. P., Posthouwer, D., Fischer, K. & Van Den Berg, H. M. Safety and efficacy of a plasma-derived monoclonal purified factor VIII concentrate during 10 years of follow-up. *Haemophilia* 13, 697–700 (2007).
20. Duncan, E, Collecutt, M & Street, A. Nijmegen-Bethesda Assay to Measure Factor VIII Inhibitors. *Haemostasis Methods and protocol*. pp 321-333. 2013.
21. Martin, K. & Key, N. S. How I treat patients with inherited bleeding disorders who need anticoagulant therapy. *Blood* 128, 178–184 (2016).
22. Mannucci, P. M. *et al.* Desmopressin (DDAVP) In the Treatment Of Bleeding Disorders. WFH. Nov. 2012. No.11.
23. Hvas, A.-M. *et al.* Tranexamic acid combined with recombinant factor VIII increases clot resistance to accelerated fibrinolysis in severe hemophilia A. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 5, 2408–2414 (2007).
24. Tiede, A. Half-life extended factor VIII for the treatment of hemophilia A. *J Thromb Haemost* 13, S176–S179 (2015).
25. Mancuso, M. E., Mahlangu, J. N. & Pipe, S. W. The changing treatment landscape in haemophilia: from standard half-life clotting factor concentrates to gene editing. *The Lancet*. doi :10.1016/S0140-6736(20)32722-7. (2021).
26. Hermans, P. C. Innovations thérapeutiques pour l'hémophilie. *REVUE MÉDICALE SUISSE* 6 (2019).
27. K.J.Pasi *et al.* Targeting of Antithrombin in Hemophilia A or B with RNAi therapy. *N Engl J Med*. 377, 819-28 (2017).
28. Overview of Concizumab - Creative Biolabs. <https://www.creativebiolabs.net/concizumab-overview.htm>.
29. Sidonio, R. F. & Zimowski, K. L. TFPI blockade: removing coagulation's brakes. *Blood* 134, 1885–1887 (2019).
30. Chhabra, E. S. *et al.* BIVV001, a new class of factor VIII replacement for hemophilia A that is independent of von Willebrand factor in primates and mice. *Blood*. 135 (17):1484-1496 (2020).
31. Konkle, B. A. *et al.* BIVV001 Fusion Protein as Factor VIII Replacement Therapy for Hemophilia A. *N Engl J Med* 383, 1018–1027 (2020).

32. Yee, A. *et al.* A von Willebrand factor fragment containing the D'D3 domains is sufficient to stabilize coagulation factor VIII in mice. *Blood* 124, 445–452 (2014).
33. Nathwani, A. C. Gene therapy for hemophilia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. Dec 6; 2019(1): 1-8 (2019).
34. HEMLIBRA® (Emicizumab)_Guide biologique. pdf. 2018.
35. Pipe, S. W. *et al.* Efficacy, safety, and pharmacokinetics of Emicizumab prophylaxis given every 4 weeks in people with haemophilia A (HAVEN 4): a multicentre, open-label, non-randomised phase 3 study. *The Lancet Haematology* 6, e295–e305 (2019).
36. Oldenburg, J. *et al.* Emicizumab Prophylaxis in Hemophilia A with Inhibitors. *N Engl J Med* 377, 809–818 (2017).
37. Mahlangu, J. *et al.* Emicizumab Prophylaxis in Patients Who Have Hemophilia A without Inhibitors. *N Engl J Med* 379, 811–822 (2018).
38. Young, G. *et al.* A multicenter, open-label phase 3 study of Emicizumab prophylaxis in children with hemophilia A with inhibitors. *Blood* 134, 2127–2138 (2019).
39. HEMLIBRA® (Emicizumab)_Guide du patient/soignant. RMA 03/2019
40. Hemlibra-solution-injectable-RCP-commun_2020.pdf.
41. Commission de la transparence_HEMLIBRA®_HAS_2018.pdf.
42. Dargaud, Y. *et al.* Use of thrombin generation assay to personalize treatment of breakthrough bleeds in a patient with hemophilia and inhibitors receiving prophylaxis with emicizumab. *Haematologica* 103, e181–e183 (2018).
43. Al Dieri, R., de Laat, B. & Hemker, H. C. Thrombin generation: What have we learned? *Blood Reviews* 26, 197–203 (2012).
44. Thomas Lecompte, Denis Wahl, Veronique Regnault. Thrombinographie. *Hématologie revue*. 12 (2) : 115-27 (2006).
45. Biggs, R. & Douglas, A. S. The Thromboplastin Generation Test. *Journal of Clinical Pathology* 6, 23–29 (1953).
46. Hemker, H. C., Wielders, S., Kessels, H. & Béguin, S. Continuous Registration of Thrombin Generation in Plasma, Its Use for the Determination of the Thrombin Potential. *Thromb Haemost* 70, 617–624 (1993).
47. ST_Genesia®_Formation Utilisateurs.pptx. STAGO. 2020
48. van Veen, J. J., Gatt, A. & Makris, M. Thrombin generation testing in routine clinical practice: are we there yet? *British Journal of Haematology* 15 (2008).
49. Tripodi, A. Thrombin Generation Assay and Its Application in the Clinical Laboratory. *Clinical Chemistry* 62, 699–707 (2016).

50. Filippin, L. *et al.* Test de génération de thrombine : importance d'établir les valeurs de référence en fonction de l'âge et des concentrations en facteur tissulaire avant l'implémentation au laboratoire. *Rev Med Brux* 5 (2011).
51. Dargaud, Y. *et al.* Evaluation of thrombin generating capacity in plasma from patients with haemophilia A and B. *Thromb Haemost* 93, 475–480 (2005).
52. Al Dieri, R. *et al.* The Thrombogram in Rare Inherited Coagulation Disorders: Its Relation to Clinical Bleeding. *Thromb Haemost* 88, 576–582 (2002).
53. Ninivaggi, M. *et al.* Thrombin generation assay using factor IXa as a trigger to quantify accurately factor VIII levels in haemophilia A: CAT-based factor VIII assay and bleeding tendency. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 9, 1549–1555 (2011).
54. Tanaka, K. A., Szlam, F., Sun, H. Y., Taketomi, T. & Levy, J. H. Thrombin Generation Assay and Viscoelastic Coagulation Monitors Demonstrate Differences in the Mode of Thrombin Inhibition Between Unfractionated Heparin and Bivalirudin: *Anesthesia & Analgesia* 105, 933–939 (2007).
55. Dieri, R. A., Alban, S., Béguin, S. & Hemker, H. C. Fixed dosage of low-molecular-weight heparins causes large individual variation in coagulability, only partly correlated to body weight. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 4, 83–89 (2006).
56. Sanchez, O. *et al.* Recommandations de bonne pratique pour la prise en charge de la maladie veineuse thromboembolique chez l'adulte. Version courte. *Revue des Maladies Respiratoires* 36, 249–283 (2019).
57. Dargaud, Y., Meunier, S. & Negrier, C. Haemophilia and thrombophilia: an unexpected association! *Haemophilia* 10, 319–326 (2004).
58. Ahmed, A., Kozek-Langenecker, S., Mullier, F., Pavord, S. & Hermans, C. European guidelines on perioperative venous thromboembolism prophylaxis: Patients with preexisting coagulation disorders and after severe perioperative bleeding. *European Journal of Anaesthesiology* 35, 96–107 (2018).
59. Verstraete, G., Lambert, C., Hammer, F. & Hermans, C. Low rate of subclinical venous thrombosis in patients with haemophilia undergoing major orthopaedic surgery in the absence of pharmacological thromboprophylaxis. *Haemophilia* 26, 1064–1071 (2020).
60. Raza, S. *et al.* Thromboprophylaxis and Incidence of Venous Thromboembolism in Patients With Hemophilia A or B Who Underwent High-Risk Orthopedic Surgeries. *Clin Appl Thromb Hemost* 22, 161–165 (2016).
61. Holderness, B. M., Goto, Y., McKernan, L., Bernini, P. & Ornstein, D. L. Thromboprophylaxis and Outcomes for Total Joint Arthroplasty in Congenital Bleeding Disorders: A Single-Center Experience. *Clin Appl Thromb Hemost* 22, 563–568 (2016).

62. Peng, H. *et al.* Incidence of Symptomatic Venous Thromboembolism in Patients with Hemophilia Undergoing Hip and Knee Joint Replacement without Chemoprophylaxis: A Retrospective Study. *Orthop Surg* 11, 236–240 (2019).
63. Noguchi-Sasaki, M. *et al.* Emicizumab, A Bispecific Antibody to Factors IX/IXa and X/Xa, Does Not Interfere with Antithrombin or TFPI Activity In Vitro. *TH Open* 02, e96–e103 (2018).
64. Young, G. *et al.* Thrombin generation and whole blood viscoelastic assays in the management of hemophilia: current state of art and future perspectives. *Blood* 121, 1944–1950 (2013).
65. Dashkevich, N. M. *et al.* Thrombin Activity Propagates in Space During Blood Coagulation as an Excitation Wave. *Biophysical Journal* 103, 2233–2240 (2012).
66. Row, C., Callegarin, A., de Maistre, E. & Maynadié, M. Surdosage en héparine : fake news. *Revue francophone des laboratoires*. N° 515. Sept-Oct 2019.
67. Haghpanah, S. *et al.* Evaluation of Thrombin Generation Assay in Patients With Hemophilia. *Clin Appl Thromb Hemost* 22, 322–326 (2016).
68. Lenting, P. J. Laboratory monitoring of hemophilia A treatments: new challenges. *Blood Adv* 4, 2111–2118 (2020).
69. Xu, Y. *et al.* Differential profiles of thrombin inhibitors (heparin, hirudin, bivalirudin, and dabigatran) in the thrombin generation assay and thromboelastography in vitro: *Blood Coagulation & Fibrinolysis* 24, 332–338 (2013).
70. Thomas, O., Lybeck, E., Strandberg, K., Tynngård, N. & Schött, U. Monitoring Low Molecular Weight Heparins at Therapeutic Levels: Dose-Responses of, and Correlations and Differences between aPTT, Anti-Factor Xa and Thrombin Generation Assays. *PLoS ONE* 10, e0116835 (2015).
71. G. T. Gerotziapas, A. D. Petropoulou, E. Verdy, M. M. Samama and I. Elalamy. Effect of the anti-factor Xa and anti-factor IIa activities of low-molecular-weight heparins upon the phases of thrombin generation. 8 (2007).
72. Pfrepper, C. *et al.* Direct oral anticoagulant plasma levels and thrombin generation on ST Genesia system. *Res Pract Thromb Haemost* 4, 619–627 (2020).
73. Tripodi, A. *et al.* Effect of emicizumab on global coagulation assays for plasma supplemented with apixaban or argatroban. *J Thromb Thrombolysis* doi:10.1007/s11239-019-01993-9. (2019).
74. Bravo, M. I., Raventós, A., Pérez, A., Costa, M. & Willis, T. Non-additive effect on thrombin generation when a plasma-derived factor VIII/von Willebrand factor (FVIII/VWF) is combined with emicizumab in vitro. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 18, 1934–1939 (2020).

75. Weyand, A. C., Dorfman, A. L., Shavit, J. A. & Pipe, S. W. Emicizumab prophylaxis to facilitate anticoagulant therapy for management of intra-atrial thrombosis in severe haemophilia with an inhibitor. *Haemophilia* 25, (2019).
76. Rivas-Pollmar, M. I. *et al.* Thromboprophylaxis in a patient with COVID-19 and severe hemophilia A on emicizumab prophylaxis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 18, 2202–2204 (2020).
77. Ferrière, S. *et al.* A hemophilia A mouse model for the in vivo assessment of emicizumab function. *Blood* 136, 740–748 (2020).

« Par délibération de son Conseil en date du 10 Novembre 1972, l'Université n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ou mémoires. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs ».

VU, le Président de Thèse

VU, le Doyen de la Faculté

VU et permis d'imprimer
en référence à la délibération
du Conseil d'Université
en date du 14 Décembre 1973

Pour le Président
de l'Université de CAEN et P.O

Le Doyen

ANNEE DE SOUTENANCE : 2020/2021

NOM ET PRENOM DE L'AUTEUR : LEROY Bettina

TITRE DE LA THESE : Patients hémophiles A sévères traités par Emicizumab (HEMLIBRA®) : quid de l'anticoagulation

RESUME DE LA THESE EN FRANÇAIS :

L'anticoagulation du patient hémophile est un défi du fait de la difficulté à obtenir une efficacité thérapeutique sans voir apparaître des complications hémorragiques chez des patients déjà à haut risque hémorragique. L'arrivée de nouveaux traitements comme l'Emicizumab visant à restaurer une hémostase efficace chez ces patients est associée, dans certains contextes, à une augmentation des complications thrombotiques. La nécessité d'initier un traitement anticoagulant complique énormément la prise en charge de ces patients et le suivi biologique est plus difficile du fait des nombreuses interférences de l'Emicizumab sur les dosages couramment utilisés au laboratoire. Nous pouvons également nous poser la question d'une éventuelle interférence de l'Emicizumab sur l'effet anticoagulant des molécules classiques. L'objectif principal de ce travail était d'évaluer, chez le patient hémophile sévère, l'impact d'un traitement par Emicizumab (HEMLIBRA®) sur l'effet anticoagulant des molécules utilisées dans le traitement de la MTEV grâce à l'utilisation des tests de génération de thrombine. L'ensemble de nos résultats ont permis de montrer l'effet procoagulant de l'Emicizumab lorsqu'il est ajouté à un plasma déficient en FVIII par l'augmentation de la génération de thrombine de façon concentration-dépendante. Le potentiel de coagulation observé était équivalent à celui d'un plasma contenant 10% à 20% de FVIII. L'ajout d'Emicizumab à un plasma déficient en FVIII préalable à l'ajout de divers traitements anticoagulants n'a pas altéré leur pouvoir anticoagulant *in vitro*. C'est à notre connaissance la première fois que des tests de génération de thrombine ont été utilisés pour mesurer l'effet de l'ajout d'Emicizumab à un plasma dépourvu de FVIII sur l'effet anticoagulant de différentes molécules utilisées dans le traitement de la MTEV. Nous émettons l'hypothèse que de tels traitements peuvent être utilisés chez le patient hémophile A sévère traité par Emicizumab et aux mêmes posologies que chez le patient non hémophile. Cependant, les mêmes précautions dont une évaluation fine du rapport bénéfice/risque de l'utilisation de ces molécules reste primordial. Des études complémentaires sont nécessaires afin de savoir si des résultats similaires peuvent être observés *in vivo*.

MOTS CLES : Hémophilie, Emicizumab, Tests de génération de thrombine, Anticoagulants

TITRE DE LA THESE EN ANGLAIS : Patients with severe hemophilia A treated with Emicizumab (HEMLIBRA®) : what about anticoagulation.

RESUME DE LA THESE EN ANGLAIS :

Anticoagulation of patients with hemophilia is a challenge due to the difficulty in obtaining therapeutic efficacy without bleeding complications in patients at risk of bleeding. Some new treatment such as Emicizumab arrived but are associated, in few cases, with more thrombotic complications. Initiation of anticoagulant therapy complicates the management of these patients and laboratory monitoring is more difficult because of many interferences of Emicizumab on the tests commonly used in the laboratory. We also supposed that Emicizumab could interfere with the anticoagulant effect of classical molecules. The main objective was to assess, in patients with severe hemophilia A, the impact of a treatment with Emicizumab (HEMLIBRA®) on the anticoagulant effect of molecules commonly used in the treatment of VTE, with thrombin generation assays. Our results showed the procoagulant effect of Emicizumab when added to a FVIII-deficient plasma by an increasing of thrombin generation in a concentration-dependent manner. The restoration of a clotting potential is equivalent to a plasma containing 10% to 20% of FVIII. The addition of Emicizumab to a FVIII-deficient plasma, prior to the addition of different anticoagulants did not alter the anticoagulant effect of these molecules *in vitro*. To our knowledge, this is the first time that thrombin generation assays have been used to measure the effect of Emicizumab, when added to a FVIII-deficient plasma, on the anticoagulant effect of molecules used in the treatment of VTE. We hypothesize that these treatments could be used in patients with severe hemophilia A treated with Emicizumab with the same dosages as patients without hemophilia. However, the same precautions, including an assessment of the benefit/risk ratio for the use of these molecules, remain essential. Further studies are needed to see if similar results can be observed *in vivo*.

KEY WORDS : Hemophilia, Emicizumab, Thrombin generation assays, Anticoagulants