

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة أبو بكر بلقايد - تلمسان

Université Aboubakr Belkaïd – Tlemcen –

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Science de la Terre et de
l'Univers Département de Biologie**

**Laboratoire de valorisation des actions de l'homme pour la protection de
l'environnement et application en santé publique**



MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du **diplôme de MASTER**

En : Sciences biologiques

Spécialité : Génétique des populations

Par : ABDESSLAM Ali

Sujet

**Évaluation de dosage par méthode chromogénique du Facteur VIII chez la population
hémophile A de Tlemcen.**

Soutenu le 08 / 07/ 2021 , devant le jury composé de :

M/ MOUSSOUNI Abdellatif	Maître de recherche	C.N.R.P.A.H.Tlemcen	Directeur
Mme/ AOUAR-METRI Amaria	Professeur	Univ.Tlemcen	Co-Directrice
Mme/ TAOULI Katia	Professeur	Univ.Tlemcen	Examineur
Mme/ BOUAZZA Hayet	M.C.B	Univ.Tlemcen	Examineur

Année universitaire : 2020/2021.

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

REMERCIEMENTS

En préambule de ce mémoire je tiens d'abord de remercier ALLAH le tout Puissant et Miséricordieux, qui m'a donné la force, la volonté et la patience d'accomplir ce modeste travail et d'aller jusqu'au bout de mes études.

Mes remerciements les plus chaleureux s'adressent bien entendu à mon directeur de travail monsieur MOUSSOUNI ABDELLATIF maître de recherche, qui m'a orienté avec ses conseils judicieux, pour son aide précieuse, et le temps qu'il m'a consacré.

L'expression de ma haute reconnaissance s'adresse à ma co-directrice de thèse madame le professeur AOUAR-METRI AMARIA. Que ce travail soit le témoignage de ma sincère gratitude et de mon estime pour la confiance, les encouragements et le soutien inconditionnel que vous avez manifesté à mon égard depuis mon Master et tout au long temps de préparation de ce mémoire.

Mes remerciements les plus respectueux vont à madame le professeur TAOULI KATIA, qui m'a fait l'honneur d'examiner ce travail. Veuillez accepter Madame le témoignage de ma gratitude et de mon respectueux hommage.

Je tiens également à remercier mes très chers parents, ma famille et mes amis, qui grâce à leurs prières et leurs encouragements, j'ai pu surmonter les obstacles, je remercie aussi toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à l'exécution de ce mémoire.

DEDICACES

Avec l'aide de Dieux le Tout Puissant qui m'a éclairé les chemins du savoir, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie :

Mes très chers parents avec tout mon amour, ma tendresse et mon estime, je n'arriverai jamais à leurs rendre ce qui l'ont fait pour moi. Que dieu vous protège.

À mon frère ***Youcef*** et mes sœurs ***Hayet*** et ***Imane***, qui m'ont soutenu et qui ont cru en moi.

À tous les membres de ma famille, en particulier mes antes ***Aicha et son mari A hmed et Nacira*** et ***ses enfants Omrane, Nihel et Feras***, et mon oncle ***Mnaouer***.

Aux âmes des personnes qui nous quittées et entre les mains desquelles j'aurais souhaité voir ma thèse : Mes grandes mères ***Rahma et Ammara***, mes grands-parents ***Abdelkader et Mohammed***, Mes oncles Mohammed et ***Abdelkrim***, mon ante ***Fatna et Khalti El Hadja Fatima***. Que Dieux vous accorde sa miséricorde.

À tous mes amis, je ne citerai pas de noms de peur d'en oublier, mais sachez que ma fidélité envers vous ne souffre ou ne souffrira d'aucune équivoque. Vous êtes, pour moi, une source d'estime à jamais.

ملخص

الهيموفيليا "أ" هو مرض نزيف وراثي مرتبط بالصبغي اكس، ناجم عن نقص في العامل الثامن، الناتج عن طفرات وراثية تصيب الجين المسؤول عن العامل الثامن (الجين 8). هذا الأخير يلعب دوراً مهماً في عملية تخثر الدم. هذه الدراسة تستند إلى عمل مقارنة بين الأبحاث التي أجريت في مختلف مناطق العالم بخصوص الطريقة الكروموجينية. تم الحصول على المعلومات المتعلقة بمرضى الهيموفيليا "أ" من قسم أمراض الدم في مستشفى جامعة تلمسان هناك 87 مصاباً بالهيموفيليا أ مع هيمنة ر مطلقة للجنس الذكري، معظمهم يعانون من الهيموفيليا الشديدة بنسبة 75.36% من إجمالي المصابين بالهيموفيليا. تبلغ نسبة المصابين بالهيموفيليا المعتدلة 16.09% و 8.55% للمصابين بالهيموفيليا الصغرى. على المستوى العالمي، نلاحظ انتشار العمل بالطريقة الكروموجينية في البلدان المتقدمة على عكس البلدان النامية منهجية هذه التقنية بسيطة للحصول على النتائج المرجوة.

كلمات مفتاحية: الهيموفيليا أ، العامل الثامن، التخثر، الطريقة الكروموجينية، تلمسان.

Résumé

Hémophilie A est une maladie hémorragique héréditaire liée au chromosome X, provoquée par un déficit de facteur VIII, causée par des mutations hétérogènes du gène responsable de FVIII (gène F8). Ce dernier joue un rôle très important dans la cascade de coagulation. Ce travail est basé d'une étude comparative sous forme de méta analyse des différents articles et mémoires menés par différents scientifiques du monde. On a obtenu les informations liées aux atteints d'hémophilie A de la part de service d'hémobiologie de CHU Tlemcen. Il y a 87 hémophiles A avec une dominance totale des sujets mâles, dont la plupart sont atteints d'hémophilie sévère avec une proportion de 75.36 % de la population hémophilique totale. Pour les hémophiles modérés la proportion est de 16.09% et 8.55% sont atteints d'hémophilie mineure. Au niveau mondial, on observe la prolifération de travailler avec la méthode chromogénique dans les pays développés au contraire de pays en voie de développement. La méthodologie de cette technique est simple pour générer les résultats.

Mots-clés : Hémophilie A, Facteur VIII, Coagulation, Méthode chromogénique, Tlemcen.

Abstract

Hemophilia A is an inherited bleeding disease linked to the X chromosome, provoked by a deficiency of factor VIII, caused by heterogeneous mutations in the gene responsible for FVIII (gene F8). This latter plays a very important role in the coagulation cascade. This work is based on a comparative study in the form of a meta-analysis of the various articles and papers carried out by various scientists from around the world. Information related to the hemophilia A patient was obtained from the hemobiology department of CHU Tlemcen. There are 87 hemophiliacs A with a total dominance of males, most of whom have severe hemophilia with a proportion of 75.36% of the total hemophilia population. For moderate hemophiliacs the proportion is 16.09% and 8.55% have minor hemophilia. Globally, we observe the proliferation of working with the chromogenic method in developed countries as opposed to underdeveloped countries. The methodology of this technique is simple to generate the results.

Keywords: Hemophilia A, Factor VIII, Coagulation, Chromogenic method, Tlemcen.

LISTE DES ABREVIATIONS

3'UTR: Région 3' non traduite

3D: 3 Dimensions

AA: Acides aminés

ADN: Acide Désoxyribonucléique

APC: Protéine C activé

APTT : Activated partial thromboplastin time

ARNm : Acide Ribonucléique Messenger

AT: Antithrombine

ATH : Association Tunisienne d'Hémophilie

C° : Celsius

Ca²⁺: Ion calcium

CANAL: Concerted Action on Neutralizing Antibodies in severe hemophilia A

CHU: Centres Hospitalo-Universitaires

CPA: Cellules Présentatrices d'Antigènes

CpWH : Caregivers People with Hemophilia

CSA : méthode chromogénique

CTLA4: Cytotoxic T Lymphocyte associated protein 4

C.V. : Coefficient de variation

dl : Décilitre

EPCR: Récepteur Endothélial de la Protéine C

ERGIC: Compartiment Intermédiaire entre RE-Golgi

F3P : Facteur 3 plaquettaire

FAH : Facteur anti-hémophilique.

F8: Facteur 8

FEIBA: Factor Eight Inhibitor Bypassing Activity

FIIa: Facteur II activé.

FIX: Facteur IX

FT: Facteur tissulaire

FV : Facteur V

FVa: Facteur V activé

FVII: Facteur VII

FVIII: Facteur VIII

FVIII:C-1 : Facteur VIII par méthode chromométrique

FVIII:C-*chr* : Facteur VIII par méthode chromogénique

FvW ou FW : Facteur von Willebrand

FX: Facteur X

FXI: Facteur XI

FXII: Facteur XII

FXIII: Facteur XIII

GFHT : Groupe française d'études sur l'hémostase et la thrombose

Gla: *Gamma-carboxyglutamic acid*-rich du FIXa

GPIIb/IIIa: Glycoprotéine IIb/IIIa

H: Haplotypes

HA: Hémophilie A

HAP40: Protéine Associée à l'Huntingtine

HIGS : Hemophilia Inhibitor Genetics Study

HLA: Human Leucocyte Antigène

IgG: Immunoglobulines G

IL2: Interleukine 2

IL4: Interleukine 4

IL10: Interleukine 10

INESSS : Institut Nationale d'Excellence en Santé et en Services Sociaux

kb: Kilobases

kDa: Kilo Dalton

MIBS: Malmö Internationale Brother Study.

ml: Millilitre

OMS : Organisation mondiale de santé

OR: Odds Ratio

ORL : Oto Rhino Laryngologie.

OSA : Méthode chronométrique.

pb: Paires de base

PCa : Protéine C activé

PDF: Produits de Dégradation de Fibrine

pFVIII: FVIII d'origine plasmatique

PNDS : Protocole Nationale de Diagnostic et de Soins

PS : Protéine S.

PwH : People with Hemophilia

r² : Coefficient de corrélation

RAFLS : ReFacto AF Laboratory Standard

rFVIII : facteur VIII d'origine recombinant

SCH : Société canadienne d'hémophilie

SNP: Single Nucléotide Polymorphisme

TAFI: Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor

TCA: Temps de Céphaline Activée

TFPI: Inhibiteur de la voie du FT

TM: Thrombomoduline

TNFA : Tumor Necrosis Factor Alpha

tPA : Sécrétion d'activateur tissulaire

UI: Unité Internationale

WFH: World Federation of Hemophilia.

LISTE DES FIGURES

- Figure 1.** Évolution de l'espérance de vie des hémophiles sévères selon différents registres, sur la population la population suédoise, néerlandaise et française (**Rkain, 2008**).
- Figure 2.** Représentation schématique des différentes étapes d'hémostase primaire (**Boneu et Cazenava, 1997**).
- Figure 3.** Représentation schématique de la cascade de coagulation classique (**Sherwood et al., 2006**).
- Figure 4.** Représentation schématique de concept actuel de cascade de coagulation (**Guérois, 2009**).
- Figure 5.** Représentation schématique de la phase d'initiation de la coagulation *in vivo* (**Turpie et Esmon, 2011**).
- Figure 6.** Représentation de schéma pour la phase d'amplification de la coagulation *in vivo* (**Turpie et Esmon, 2011**).
- Figure 7.** Représentation schématique de la phase de propagation de la coagulation *in vivo* (**Turpie et Esmon, 2011**).
- Figure 8.** La transformation de fibrinogène en monomère de fibrine (**Turpie et Esmon, 2011**).
- Figure 9.** Les systèmes majeurs de régulation physiologique de la coagulation (**Boneu et Cazenave, 1997**).
- Figure 10.** Système inhibiteur APC. A. Activation de la protéine C en APC. B. Inactivation du FVa par l'APC. C. Inactivation du FVIIIa par l'APC (**Abdi, 2014**).
- Figure 11.** Le déroulement de fibrinolyse (**Rkain, 2008**).
- Figure 12.** Représentation schématique expliquant les étapes de synthèse et sécrétion du FVIII (**Abdi, 2014**).
- Figure 13.** Représentation schématique de la structure primaire du FVIII. (**Abdi, 2014**).
- Figure 14.** Représentation schématique de la structure de Facteur VIII (FVIII) et FVIII activé(FVIIIa) (**Allali et al., 2019**).
- Figure 15.** Structure 3D de facteur VIII (**Ngo et al., 2008; Shen et al., 2008**).
- Figure 16.** Structure et régions impliquées dans les principales interactions moléculaires (**Allali et al., 2019**).
- Figure 17.** Structure de FVIIIa et sites d'activation (**Abdi, 2014**).
- Figure 18.** Les deux mécanismes d'inactivation de FVIII (**Abdi, 2014**).
- Figure 19.** Principe de la méthode chromométrique pour le dosage de FVIII (**Llasera, 2017**).
- Figure 20.** Méthode chromogénique et son principe pour le dosage de FVIII (**Poret et Mourey, 2014**).
- Figure 21.** Courbe de calibration de méthode chromogénique.
- Figure 22.** Structure de gène de F8 et localisation chromosomique (**Abdi, 2014**).

Figure 23. Mode de transmission de l'hémophilie pour un père hémophile (**Guérois, 2009**)

Figure 24. Mode de transmission de l'hémophilie pour une mère conductrice (**Guérois, 2009**).

Figure 25. Le mécanisme responsable de micro inversion de l'intron 22 (**Graw et al. 2005**).

Figure 26. Le mécanisme responsable de la micro-inversion de l'intron 1, adaptée à partir de (**Graw et al., 2005**).

Figure 27. Distribution des mutations ponctuelles sur les différents domaines du FVIII (**Payne et al., 2013**).

Figure 28. Représentation schématique des larges délétions responsables De HA (**Payne et al., 2013**).

Figure 29. Hémarthrose aigue (**Guérois, 2009**).

Figure 30. Hématome (**Guérois, 2009**).

Figure 31. Représentation schématique des six haplotypes F8 (**Viel et al., 2009**).

Figure 32. Représentation schématique des SNP identifiés au niveau du gène F8 (**Viel et al., 2009**).

Figure 33 . L'impact de la COVID-19 sur les répondants vivants avec l'hémophilie (**Banchev et al., 2021**).

Figure 34. Type d'aide/d'information le plus fréquemment demandé par les répondants pendant la pandémie de COVID-19 (**Banchev et al., 2021**).

Figure 35. La carte géographique de la situation de la wilaya de Tlemcen (**Aouar et al., 2012**).

Figure 36. Les proportions des hémophiles au sein de la population de Tlemcen selon le type d'hémophilie.

Figure 37. Comparaison de la fréquence d'hémophilie au sein de la population de Tlemcenpar rapport à celles : de l'Algérie, de la Tunisie, de la France et du monde entier.

Figure 38. Répartition de l'hémophilie A et B selon la sévérité au niveau de la population de Tlemcen.

Figure 39. Répartition d'hémophilie A et B selon le type de groupage sanguin.

Figure 40. Corrélation FVIII : OSA / FVIII : CSA (**Llasera, 2017**).

Figure 41. Comparaison des deux techniques de dosage du facteur VIII (méthode chromogénique et chronométrique en un temps), n=46 (**Poret et Mourey, 2014**).

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Les inhibiteurs qui interviennent pendant la coagulation *in vivo*, (**Madouni et Madani, 2014**).

Tableau 2. Classification de HA (**Poret et Mourey, 2014**).

Tableau 3. Manifestations cliniques en fonction de type d'HA (**Poret et Mourey, 2014**).

Tableau 4. La prévalence de l'hémophilie au sein de la population de Tlemcen.

Tableau 5. Proportions des résultats épidémiologiques d'hémophilie de la population de Tlemcen avec celle de l'Algérie et différents pays du monde.

Tableau 6. La répartition d'hémophilie selon le degré de sévérité.

Tableau 7. Répétabilité et reproductibilité du dosage du Facteur VIII par méthode chromogénique (**Poret et Mourey, 2014**).

Tableau 8. Résultats des moyennes et des (C.V.) des dosages de FVIII par méthode chromogénique (**Llasera, 2017**).

Tableau 9. Reproductibilité et répétabilité du dosage du facteur VIII par les méthodes chromogène et chronométrique en un temps avec différents standards (**Pouplard et al., 2011**).

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS

DEDICACES

RÉSUMÉS

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION GENERALE.....02

Chapitre 1 : synthèse bibliographique

1. Hémophilie de type A (HA).....	05
1.1. Épistémologie de l'hémophilie (rappel historique).....	05
1.1.1. La découverte de l'hémophilie.....	05
1.1.2. L'hémophilie au XXe siècle.....	05
1.1.3. L'hémophilie la maladie des rois.....	07
1.2. Définition.....	08
1.3. Épidémiologie.....	08
1.3.1. Dans le monde.....	08
1.3.2. Dans l'Afrique et en Algérie.....	08
1.4. Rappels sur l'hémostase.....	09
1.4.1. Définition et rôle de l'hémostase.....	09
1.4.2. Hémostase primaire.....	09
1.4.3. La coagulation ou hémostase secondaire.....	11
1.4.3.1. Cascade de coagulation ancienne ou classique.....	11
1.4.3.1.1. Voie intrinsèque (endogène).....	11
1.4.3.1.2. Voie extrinsèque (exogène).....	11
1.4.3.1.3. Voie commune.....	12
1.4.3.2. Cascade nouvelle de la coagulation.....	12
1.4.3.3. Déroulement de processus de la coagulation.....	13
1.4.3.3.1. Phase d'initiation.....	14
1.4.3.3.2. Phase d'amplification.....	15
1.4.3.3.3. Phase de propagation.....	15
1.4.3.4. La régulation de la coagulation.....	17
1.4.3.4.1. Régulation positive.....	17
1.4.3.4.2. Régulation négative.....	18

1.4.4. Fibrinolyse.....	21
2. Facteur VIII.....	21
2.1. Définition.....	21
2.2. Biosynthèse et structure finale de FVIII.....	21
2.3. Activation et inactivation du FVIII.....	25
2.4. Rôle de la protéine FVIII dans la coagulation.....	27
2.5. Méthodes de mesures.....	27
2.5.1. Méthode chronométrique.....	28
2.5.1.1. Avantages.....	28
2.5.1.2. Inconvénients.....	29
2.5.2. Méthode chromogénique.....	29
2.5.2.1. Avantages.....	30
2.5.2.2. Inconvénients.....	30
3. Génétique.....	30
3.1. Description de gène F8	30
3.2. Mode de transmission.....	32
3.3. Anomalie génétiques responsable d'HA.....	34
3.3.1. Mutations ponctuelles.....	36
3.3.2. Les mutations de type de décalage de cadre de lecture.....	36
3.3.3. Les délétions et les insertions.....	37
3.3.4. Les duplications.....	38
4. Aspect clinique.....	38
4.1. Classification.....	38
4.2. Manifestations cliniques.....	38
4.3. Diagnostic.....	40
4.4. Traitement.....	42
5. Facteurs de risques.....	43
5.1 Facteurs de risques génétiques pour les inhibiteurs dans l'hémophilie A	43
5.1.1. Origine ethnique.....	43
5.1.2. Type de mutation F8 causale.....	44
5.1.3. Allèles de HLA (Human Leucocyte Antigen) de classe II.....	45
5.1.4. Molécules de régulation immunitaire.....	45
5.2. Facteurs de risque dépendant au traitement.....	47

5.3. Impact de la COVID-19 sur la vie avec hémophilie.....	48
--	----

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

1. Présentation de la wilaya de Tlemcen.....	51
2. Cadre de l'étude.....	51
3. Source des données et type de l'étude	52
4. Instrument d'étude.....	52
6. Méthode et analyse statistique.....	52

Chapitre 3 : Résultats et Discussion

1. La prévalence de l'hémophilie A et B au niveau de la population de Tlemcen.....	54
2. Proportion de l'hémophile A et B dans la population de Tlemcen comparée avec celle de l'Algérie et celle du monde.....	55
3. Répartition de l'hémophilie A et B selon la sévérité.....	56
4. Répartition de l'hémophilie A et B selon les groupes sanguins et Rhésus.....	57
5. Comparaison de résultats obtenus de la mesure de l'activité de FVIII par méthode chromogénique dans différentes études de monde.....	58
5.1. Répétabilité et reproductibilité du dosage de FVIII par méthode chromogénique.....	58
5.2. Comparaison entre les résultats des deux méthodes de dosage, la méthode chromogénique et la méthode chromométrique.....	61

CONCLUSION GENARALE.....	66
---------------------------------	-----------

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	69
---	-----------

ANNEXES

RÉSUMÉS

INTRODUCTION GENERALE

La survenue d'une plaie vasculaire entraîne un mécanisme de défense qui lutte contre l'issue du sang hors du système vasculaire appelé hémostasie. L'hémostasie est le processus physiologique

Regroupant les différents mécanismes qui assurent la prévention des saignements spontanés par la formation d'un thrombus plaquettaire qui sera par la suite consolidé par un réseau de fibrines. Ce processus comprend trois phases très intriquées : l'hémostasie primaire, l'hémostasie secondaire et la fibrinolyse. L'hémostasie implique plusieurs facteurs (cellules et protéines) qui seront activés au site de la brèche vasculaire et régulés spatialement et temporellement par différents systèmes d'inhibiteurs physiologiques. Un déficit d'un des mécanismes d'hémostasie de type facteurs ou inhibiteurs conduit à l'apparition de plusieurs maladies caractérisées, selon le système impliqué, par des complications thrombolytiques ou hémorragiques, comme cela a été longtemps documenté pour l'hémophilie A (HA) (**Abdi, 2014**).

L'hémophilie A est une maladie hémorragique constitutionnelle transmise selon le mode récessive liée au chromosome X, due à une anomalie moléculaire au sein de gène F8 de la coagulation sanguine en rapport d'un déficit ou une absence de facteur VIII (FVIII), causée par un défaut qualitatif ou quantitatif. Cette pathologie touche principalement les sujets mâles. Les femmes conductrices de la maladie sont généralement asymptomatiques.

Le diagnostic repose sur la mesure de l'activité coagulante, principalement par deux méthodes, méthode chromogénique en deux temps, et méthode chromométrique en un temps. Le diagnostic génotypique est réservé aux formes sévères. Seule la suspicion de formes sévères d'hémophilie peut justifier un diagnostic anténatal. Les manifestations cliniques au cours de l'hémophilie (hémarthroses, hématomes, hémorragies) sont fonction de l'intensité du déficit en facteur (sévere, modéré ou mineur) (**Bendi-Hadji et Bellahcene, 2017**).

L'objectif de ce travail a été de caractériser la population des atteints d'hémophilie au niveau de la wilaya de Tlemcen et de comparer le dosage du FVIII par méthode chromogénique de différentes régions du monde.

Ce mémoire est subdivisé en trois parties ; une synthèse bibliographique qui consiste à la description de l'hémophilie de type A, du facteur VIII, de son profil génétique, de son aspect clinique et de ses facteurs de risques.

La deuxième partie a été consacrée aux matériels et méthodes utilisées dans cette étude.

Les résultats obtenus dans ce travail sont présentés dans la troisième partie résultats et discussion

Les résultats obtenus dans cette étude sont présentés dans chapitre III : résultats et discussion.
Et enfin, nous concluons ce travail par conclusion générale et perspectives

**SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE**

1. Hémophilie de type A (HA) :

1.1. Épigénologie de l'hémophilie :

1.1.1. La découverte de l'hémophilie :

La découverte de l'hémophilie, qui n'avait pas encore de nom à l'époque, remonte à l'antiquité (**Ingram et Norris, 1976**). Le Talmud, un recueil d'écrits juifs du II^{ème} siècle avant JC, stipule que les nourrissons de sexe masculin n'avaient pas besoin d'être circoncis si leurs deux frères avaient déjà subi l'intervention (**Rosner, 1996**).

En XII^{ème} siècle, un médecin arabe qui s'appelle Abu Al-Qasim AL-Zahrawi, a décrit une famille dans laquelle des hommes sont morts des suites d'hémorragies consécutives à des blessures mineurs (**Rosner, 1996**). Puis, en 1983, John Otto qui est un médecin Américain de Philadelphie a fait état « d'une prédisposition aux hémorragies dans certaines familles ». Il s'est rendu compte que la maladie est héréditaire et affectait les sujets de sexe masculin. Il retracé la maladie à travers trois générations dans une famille à une femme qui s'est installée près de Plymouth, New Hampshire, en 1972 (**Otto, 1996**). L'auteur évoquait déjà la transmission génétique, qui fut précisé par Nasse en 1820 (**Pemberton, 2011**).

Le terme « *hémophilie* », dérivé du mot grec *haemo-philía* signifiant « attirer le sang », est en fait un raccourci de mot *haemorrhaphilia*. L'origine de mot est débattue. Certains croient qu'on parlait d'hémophilie dès XVI^{ème} siècle. D'autres attribuent la paternité du mot Schonlein, un médecin allemand, ou à Hopff, son élève à Zurich dans les années 1820-1840 (**Hopff, 1828**).

1.1.2. L'hémophilie au XX^{ème} siècle :

Au cours de XX^{ème} siècle, les médecins essayaient de comprendre ce qui causait l'hémophilie. Jusqu'alors, ils croyaient que les vaisseaux sanguins des personnes atteintes d'hémophilie étaient tout simplement trop fragiles. En 1937, deux chercheurs ont découvert qu'ils pouvaient surmonter le problème de coagulation en ajoutant une substance dérivée du plasma sanguin. Cette substance est appelée *globuline antihémophilique*. En 1944, des analyses de laboratoire ont montré d'une personne hémophile avait surmonté le problème de coagulation d'une deuxième personne hémophile et vice versa. Chaque personne a une déficience différente, l'une due à une carence en facteur VIII et l'autre à une carence en facteur IX. Cela pourrait confirmer, en 1952, que l'hémophilie A et l'hémophilie B étaient en effet deux maladies distinctes (**SCH, 2021**).

Durant les années 1960, il y a que les facteurs de coagulation ont été identifiés et nommés. Dans un article publié en 1964 dans la célèbre revue *Nature* on décrivait le processus de

coagulation en détail. L'interaction de divers facteurs nécessaires à la coagulation sanguine est alors nommée *réactions en cascade de la coagulation* (SCH, 2021).

Au cours des années cinquante et au début des années soixante, les personnes atteintes d'hémophilie étaient traitées au moyen de sang entier ou du plasma *frais congelé*, un composant important du sang. Malheureusement, ces produits sanguins ne contiennent pas suffisamment de protéines de FVIII et FIX pour arrêter les hémorragies internes graves. L'appareil circulatoire de l'organisme était surchargé avant qu'une quantité suffisante de concentré de facteur de la coagulation ne puisse être administrée. Par conséquent, de nombreuses personnes atteintes d'hémophilie sévère et d'autres atteintes d'une déficience légère ou modérée meurent également de l'enfance au début de l'âge adulte. La cause la plus fréquente de ces décès était des saignements touchant les organes vitaux, principalement le cerveau, et des saignements survenaient après une intervention chirurgicale mineure ou un traumatisme (SCH, 2021).

Les handicapés étaient généralement handicapés par l'impact à long terme des épisodes hémorragiques récurrents dans leurs articulations. Les complications des saignements musculaires prolongés et répétés font de l'hémophilie l'une des maladies douloureuses connues dans la médecine (SCH, 2021).

Ensuite, dans les années 1960, on a découvert *le cryoprécipité*. La substance gélatineuse qui flotte au-dessous du plasma frais décongelé est riche de FVIII. Pour la première fois, on arrivait suffisamment de perfusion de FVIII pour contrôler les hémorragies majeures. Même la chirurgie est devenue possible (SCH, 2021).

Par la suite, entre la fin des années soixante et le début des années 1970, les centres de traitement de l'hémophilie ont été créés pour fournir des soins complets. Par conséquent, les personnes hémophiles commencent à être en meilleure santé et elles manquent moins les études et le travail (SCH, 2021).

En 1968, les premiers concentrés de FVIII et de IX à partir du plasma humain ont été libérés pour la première fois. Ces concentrés lyophilisés se présentent sous forme de poudre qui peut être laissée à domicile et utilisés au besoin. Ils ont révolutionné le traitement de l'hémophilie. Depuis lors, les personnes atteintes d'hémophilie ne dépendent plus autant des hôpitaux. Ils peuvent désormais de voyager, conserver un emploi stable et envisager de vivre normale. Leur espérance de vie commence à se rapprocher de celle de la population. Tragiquement, ce sont ces mêmes produits sanguins qui se sont finalement avérés contaminés par des virus transmissibles par le sang, le VIH et l'hépatite C. de nombreuses de personnes atteintes d'hémophilie ont développés des infections pour lesquelles les mesures de sécurités, telles que

l'inactivation de virus, ne peuvent pas intégrer, au milieu et aux dernières années quatre-vingt de la production de produits sanguins pour rendre les facteurs concentrés plus sûre (SCH, 2021).

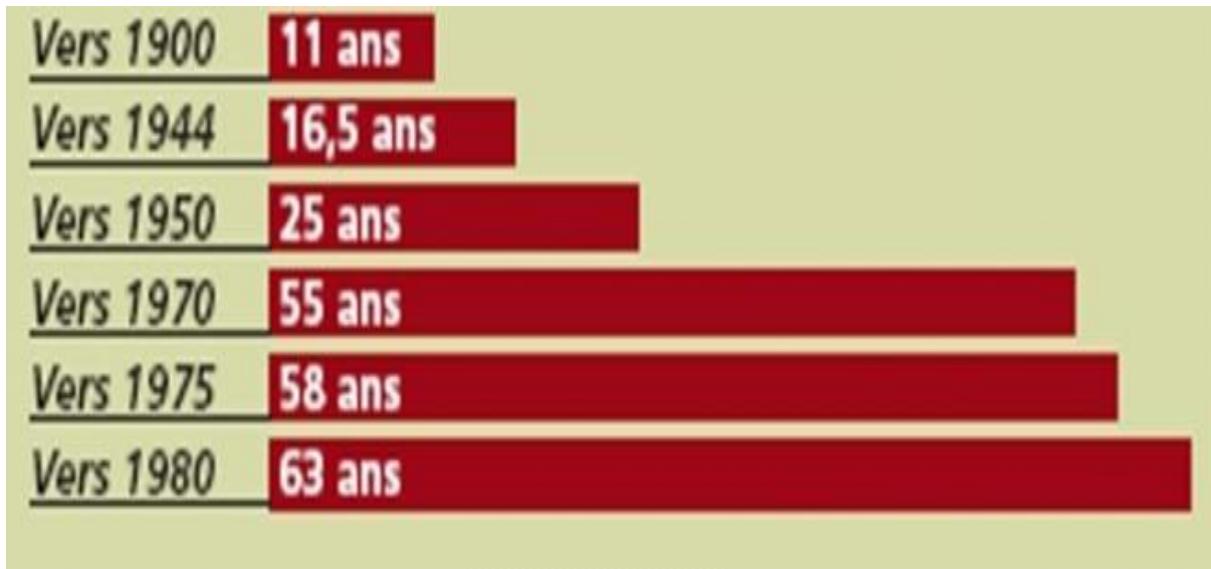


Figure 1 : Évolution de l'espérance de vie des hémophiles sévères selon différents registres, sur la population suédoise, néerlandaise et française (Rkain, 2008).

Enfin, au début des années 1990, des facteurs génétiquement modifiés, appelés concentrés de facteurs recombinants sont arrivés au marché. Ces derniers ne sont pas fabriqués à partir de plasma et ils contiennent un minimum de quantité de protéines humaines (SCH, 2021).

1.1.3. L'hémophilie la maladie des rois :

L'hémophilie est considérée souvent comme la maladie des rois. C'est parce que la reine Victoria, qui a régné sur l'Angleterre de 1837 à 1901, portait le gène de la maladie. Son huitième enfant, Léopold, souffrait d'hémophilie et de saignements fréquents, comme le rapporté British Medical en 1868 (SCH, 2021).

Il y a encore d'importance historique : transmettre l'hémophilie à d'autres familles royales en Europe. Les deux filles de la reine Victoria, Alice et Béatrice, sont également porteuses de la maladie. Elles ont transmis la maladie sanguine par leurs mariages aux membres de la famille royale d'Espagne et d'Allemagne. Alexandra, la fille d'Alice et la nièce de la reine Victoria était également porteuse de l'hémophilie. Elle a épousé Nicolas, tsar de Russie, au début des années 1900. Cependant, la tsarine Alexandra a transmis à son fils tsarévitch Alexie. Nicolas et Alexandra étaient préoccupés par la santé des enfants à une époque très difficile de l'histoire de Russie. Le moine Raspoutine avait beaucoup d'influence sur les partisans russes car il était le seul à aider le jeune tsarévitch. Il a utilisé l'hypnose pour soulager sa douleur. L'utilisation de l'hypnose soulage non seulement la douleur, elle peut même aider à ralentir ou même

arrêter le saignement du garçon. L'hémophilie de l'héritier du trône russe, les tensions quelle affligeait de la famille royale et l'éblouissement du diable Raspoutine ont tous contribué à conduire la Russie vers la révolution de 1917 (SCH, 2021).

1.2. Définition :

L'hémophilie est une maladie hémorragique constitutionnelle, rare et chronique (Guérois, 2009), aussi est une *maladie génétique*. Cela signifie qu'elle est causée par un gène qui ne fonctionne pas correctement (SCH, 2021).

Le HA est un trouble hémorragique lié au chromosome X causé par des mutations hétérogènes du gène responsable de FVIII (gène F8). La protéine FVIII est nécessaire pour la propagation de la voie intrinsèque de la coagulation. Le HA ou déficit congénital en FVIII, est le plus fréquent des troubles héréditaires de la coagulation (Tantawy, 2010), il est provoqué par une carence (90% des cas) ou l'inactivité (10% des cas) du FVIII (Berntorp, 2001).

1.3. Épidémiologie :

1.3.1. Dans le monde :

À l'échelle mondiale, selon l'enquête de la Fédération Mondiale de l'Hémophilie (**World Federation of Hemophilia 2019, WFH**), plus de 195 263 sont atteints d'hémophilie en 155 pays, dont 157 517 sont des hémophiles A.

La prévalence de l'HA est de l'ordre 1 pour 10000 personnes pour les sujets mâles (Skinner, 2012).

En France, le nombre d'hémophilie répertoriés dans le registre national « FranceCoag » des déficits rares en protéines de la coagulation était 8553 dont 6910 sont atteints d'hémophilie A (www.francecoag.org, 2021).

1.3.2. Dans l'Afrique et en Algérie :

En Afrique, l'incidence de l'hémophilie est peu connue pour certains nombre de raison, les coûts de traitements et prise en charge sont élevés, il n'y a pas assez d'hématologues et manque des laboratoires adaptés pour le diagnostic biologique de cette maladie (Rkain, 2008).

En Tunisie, le nombre des hémophiles recensés en 2013 est de 380 dont 81% sont des hémophiles A (ATH, 2013).

Au Maroc, un enfant sur 10 000 est hémophile, d'après les statistiques de l'OMS, et 3000 cas d'hémophilies estimées en l'absence d'un registre national (Benajiba *et al.*, 2014).

En Algérie, environ 1435 cas atteints d'hémophilie en 2012 et 2300 cas en 2016, sont recensés par le registre national de ministère de la santé (Bendi-hadji et Bellahcene, 2017).

Cependant, ces données statistiques sont encore sous-estimées dans les pays en voie de développement.

1.4. Rappels sur l'hémostase :

1.4.1. Définition et rôle de l'hémostase :

L'hémostase est un ensemble de phénomènes physiologiques qui permettent de maintenir l'intégrité d'un vaisseau sanguin tout en arrêtant le saignement dû à une rupture vasculaire évitant ainsi la thrombose (**Turpie et Esmon , 2011**). Il nécessite la coopération des parois des vaisseaux cassés, des cellules sanguines en particulier des plaquettes, des protéines plasmatiques (**Abdi ,2014**).

Par conséquent, le rôle de l'hémostase est de prévenir et d'arrêter les saignements pour maintenir le sang fluide. Hémorragies et thromboses constituent deux urgences biologiques immédiates potentiellement mortelles pour l'organisme (**Madouni et Madani, 2014**).

Plusieurs mécanismes physiologiques permettent de maintenir le sang à l'état fluide dans les vaisseaux ce qui autorise une perfusion tissulaire adéquate. D'autres sont responsables de la formation localisée d'un thrombus pour limiter la perte des fluides à partir de la plaie ainsi que les contaminations provenant de l'extérieur (**Madouni et Madani, 2014**).

Les mécanismes de l'hémostase se divisent en trois étapes :

1.4.2. Hémostase primaire :

L'hémostase primaire représente l'ensemble complexe d'interactions entre la paroi vasculaire, les plaquettes et les protéines adhésives qui conduisent à l'obturation de la brèche vasculaire par un thrombus plaquettaire (**Abdi, 2014**).

Les acteurs qui interviennent au cours de cette étape sont : les cellules endothéliales, paroi vasculaires, les plaquettes, les deux protéines plasmatiques : le facteur Willebrand et fibrinogène, ces deux protéines sont également présentes à l'intérieur des plaquettes (**Rkain, 2008**).

En cas de lésion ou d'une rupture d'un vaisseau sanguin, une vasoconstriction se produit presque immédiatement dans la zone endommagée (figure 2.A). Il s'agit de la première réponse physiologique de l'hémostase qui a pour effet de réduire voire d'arrêter le flux sanguin. Les cellules endommagées libèrent des prostaglandines telles que la thromboxane qui favorisent la vasoconstriction (**Madouni et Madani, 2014**). La vasoconstriction est un facteur de défense important mais très bref, particulièrement efficace contre les vaisseaux de petite veine (**Rkain, 2008**).

L'adhésion plaquettaire au sous-endothélium est un mécanisme complexe qui régule les propriétés de la membrane plaquettaire pour faciliter sa fixation à la matrice sous-endothéliale

exposée en raison d'une lésion vasculaire (**Madouni et Madani, 2014**). Cette adhésion s'effectue et accomplit par le facteur de Von Willebrand (FvW), secrété par les cellules endothéliales et mégacaryocytes, d'une part interagit avec une glycoprotéine de la membrane plaquettaire et d'autre part avec le collagène sous-endothélial. L'adhésion des plaquettes au sous-endothélium conduit à les activer (figure2.B). Une fois activées, ces plaquettes s'expriment vers leurs surfaces le récepteur spécifique du fibrinogène (secrété par la fois) : la glycoprotéine Iib/IIIa (GPIIb/IIIa). L'interaction du fibrinogène avec GPIIb/IIIa active l'agrégation des plaquettes (**Abdi, 2014**).

Les plaquettes s'agrègent entre elles via des molécules de fibrinogène qui se lient au un récepteur plaquettaire GPIIb/IIIa (**Rkain, 2008**), par la présence de Calcium (**Madouni et Madani, 2014**).

Ainsi, l'agrégation des plaquettes est également réalisée grâce au fibrinogène qui établit des ponts entre les plaquettes, créant un premier thrombus fragile (agrégation réversible) (**Madouni et Madani, 2014**). Cette étape devient rapidement irréversible sous l'influence de thrombus blanc ou clou plaquettaire de la coagulation plasmatique induite, activant spontanément la lésion de vaisseau très rapidement (figure2.C) (**Rkain, 2008**). Généralement, les plaquettes sont liées entre elles d'une manière irréversible, mais le thrombus peut être expulsé avec le flux en réparant l'écoulement de la brèche qui est très fragile (**Madouni et Madani, 2014**). Les plaquettes agrégées meurent très rapidement, leurs membranes fusionnent et les cellules sont lysées, libérant les éléments du cytoplasme (**Rkain, 2008**).

La figure suivante montre les différentes étapes de l'hémostase primaire.

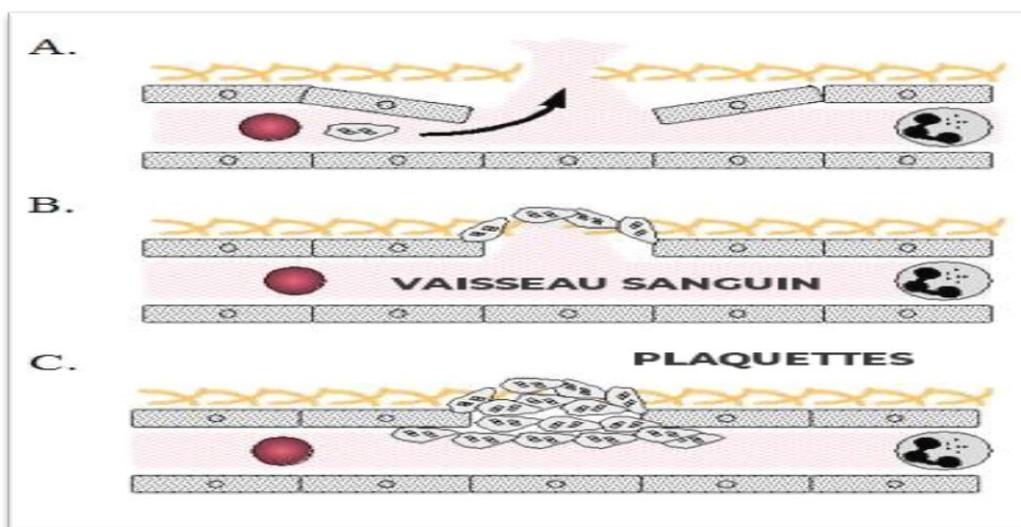


Figure 2 : Représentation schématique des différentes étapes d'hémostase primaire (**Boneu et Cazenava, 1997**).

1.4.3. La coagulation ou hémostase secondaire :

Le clou plaquettaire ou le thrombus blanc formé lors de l'hémostase primaire est fragile et doit être fusionné par un réseau de fibrine, qui se formera ensuite par l'hémostase secondaire. Ces séries des réactions enzymatiques sont appelées « cascade de coagulation » (**Abdi, 2014**).

1.4.3.1. Cascade de coagulation ancienne ou classique :

Le concept de cascade de coagulation, comme une chaîne des étapes enzymatiques, a été décrit pour la première fois par Davie et Macfarlane, en 1964 (**Davie et Ratnoff, 1964 ; Macfarlane, 1964**). Ce concept a démontré l'activation de précurseurs inactifs, ou zymogène, étapes nécessaires pour la formation finale de fibrine. Ainsi, la cascade ancienne de coagulation a suivi deux voies distinctes, endogène (intrinsèque) et exogène (extrinsèque), convergeant une voie commune, la dernière étape de la transformation du fibrinogène en fibrine insoluble (**Mosesson, 1992**). Ces deux voies, intrinsèque et extrinsèque, ont été décrites comme étant soit dépendantes du contact entre le plasma et une surface chargée négativement (voie endogène), soit associées à l'introduction d'éléments, dont l'origine est externe de sang, dans le plasma (voie exogène) (**Adams et Bird, 2009**).

1.4.3.1.1. Voie intrinsèque (endogène) :

Tous les éléments nécessaires à la coagulation sont présents dans le plasma, sans apport extérieur (**Madouni et Madani, 2014**).

Cette voie est initiée par le contact entre la circulation sanguine et des surfaces exposées lors d'une lésion de la paroi vasculaire. Quatre acteurs de la coagulation vont intervenir : Facteur XII (FXII), Facteur XI (FXI), Facteur IX (FIX), et FVIII. La surface électronégative active le FXII qui active à son tour le FXI. Sous l'action du FXIa, le FIX devient actif. Le FIXa, fixé aux phospholipides (PLs) en présence d'ions calcium (Ca^{2+}) et de son cofacteur activé (FVIIIa), va former un complexe activateur du Facteur X (FX) également appelé complexe tenase intrinsèque (**Abdi, 2014**).

1.4.3.1.2. Voie extrinsèque (exogène) :

C'est la voie la plus importante, fait intervenir de nombreux facteurs : les facteurs contacts (facteurs XI, XII, kallikréine, kininogène de haut poids moléculaire (KHMP)). Les autres facteurs sont les suivants : facteurs antihémophiliques IX et VIII, phospholipides de la membrane plaquettaire, facteur 3 plaquettaire (F3P), calcium (Ca^{++}) (**Rkain, 2008**). Cependant, la cascade extrinsèque est ainsi initiée lors d'une lésion tissulaire qui mène à l'exposition du FT, une glycoprotéine située à la surface des cellules sous endothéliales (Figure 4). Cette voie implique le FT et le Facteur VII (FVII) (**Broze, 1995**). Ensemble, ils forment le complexe tenase extrinsèque (**Butenas et Mann, 2002**), qui une fois activé exerce

son activité catalytique vis-à-vis du FX, le menant à une forme active (FXa) (Marlar *et al.*, 1982).

1.4.3.1.3. Voie commune :

Les deux voies convergent ainsi vers l'activation du FX. Le FXa, à travers le complexe prothrombinase (FXa/Facteur Va (FVa)/PLs/Ca²⁺), hydrolyse et active la prothrombine en thrombine (Figure 4). Enfin, la thrombine convertit le fibrinogène en fibrine et active le Facteur XIII (FXIII) en FXIIIa (aussi appelé transglutaminase). Le FXIIIa se liera de manière covalente des rangées de polymères de fibrine qui coagulent le caillot sanguin et forment ainsi un réseau de fibrine stable (Naski *et al.*, 1991).

Cependant, ce modèle de voies intrinsèque et extrinsèque constitue un concept ancien issu d'expériences *in vitro*. Le déroulement de la coagulation *in vivo* ne respecte pas cette différence. Toutefois, cette conception duelle est toujours très utile pour l'exploration de la coagulation, puisque la voie intrinsèque est explorée par le temps de céphaline activée (TCA), et la voie exogène extrinsèque par le temps de Quick. Le diagnostic des déficits de la coagulation se fait donc sur ce schéma (Abdi, 2014).

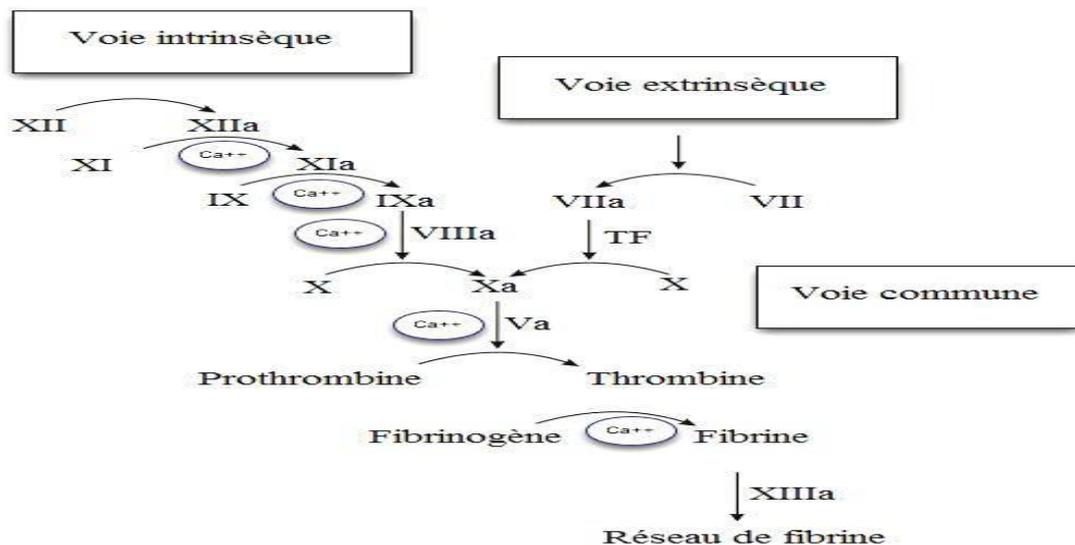


Figure 3 : Représentation schématique de la cascade de coagulation classique (Sherwood *et al.*, 2006).

1.4.3.2. Cascade nouvelle de la coagulation :

En 2001, deux scientifiques, Hoffman et Monroe, ont introduit une nouvelle vision de cascade de coagulation appelés « modèle cellulaire ». Ce concept actuel est basé sur la formation de fibrine comme le résultat de deux processus complémentaires: la coagulation (représentée par la thrombine) et l'activation plaquettaire. Le modèle cellulaire décrit la coagulation en trois principales étapes qui se chevauchent ; initiation, amplification et propagation (Hoffman et

Monroe, 2007; Monroe et Hoffman, 2006). Ce modèle réfutait la notion précédente d'activation indépendante et axée sur le rôle synergique et parallèle entre chaque branche de la coagulation tout en tenant en compte un système vasculaire dynamique. En outre, ce modèle a mieux expliqué la localisation de la formation du caillot en incorporant le rôle de la cellule et en soulignant l'importance du FT (**Abdi, 2014**).

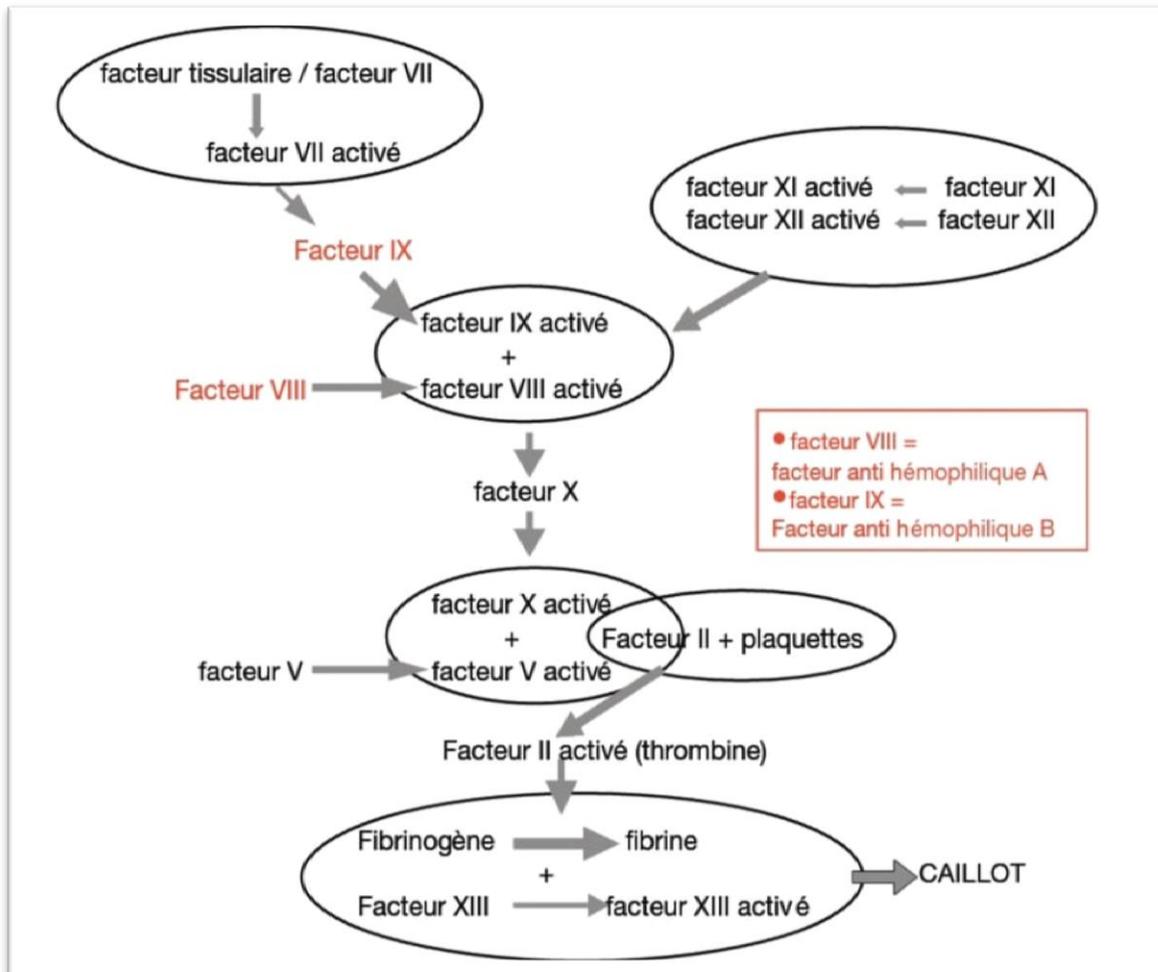


Figure 4 : Représentation schématique de concept actuel de cascade de coagulation (**Guérois, 2009**).

1.4.3.3. Déroulement de processus de la coagulation :

Dans un état physiologique normal, les monocytes et les cellules endothéliales n'expriment pas de FT, ou bien l'expriment dans un état qui ne lui permet pas de se combiner avec le FVII de la coagulation. Pendant une brèche vasculaire, l'activation de ces mêmes cellules entraîne l'expression à leur surface de FT. Des complexes se forment alors entre le FT membranaire et le FVII circulant, permettant ainsi l'initiation de la cascade de coagulation (**Furie et Furie, 2008; Osterud et Bjorklid, 2006**).

Comme s'est mentionné précédemment, le processus de la coagulation est divisé en trois étapes :

1.4.3.3.1. Phase d'initiation :

La phase d'initiation commence alors par l'apparition du FT à la surface des cellules endothéliales suivis à une lésion de la paroi vaisseau (**Furie et Furie, 2008; Monroe et Hoffman, 2006**). Le FT se lie avec FVII pour former un complexe FT-FVII. Ainsi, La formation de ce complexe permet ainsi l'activation du FVII en FVIIa par une modification appropriée. Le complexe FT/FVIIa active le FX, directement ou indirectement via l'intermédiaire du FIX (**Abdi, 2014**). Ensuite, FXa se rend en présence de FVa pour convertir une petite quantité prothrombine en thrombine, ce qui n'est pas suffisant pour achever la formation de fibrine (**Monroe et Hoffman, 2006; Turpie et Esmon, 2011**). Il a été récemment montré que le complexe FT/FVIIa active également le FVIII, induit de petite quantité de FVIIIa au début de cette phase d'initiation (**Soeda *et al.*, 2010**). Ces réactions ont lieu très rapidement et forment un véritable « starter » de processus de la coagulation (**Abdi, 2014**).

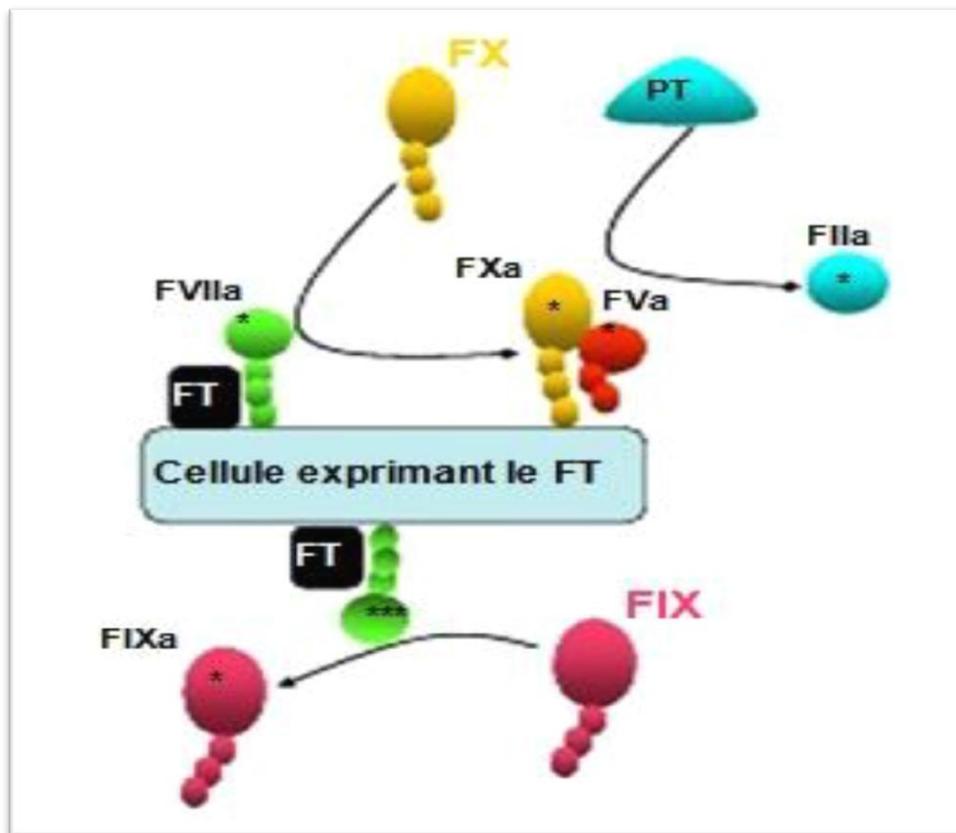


Figure 5 : Représentation schématique de la phase d'initiation de la coagulation *in vivo* (**Turpie et Esmon, 2011**).

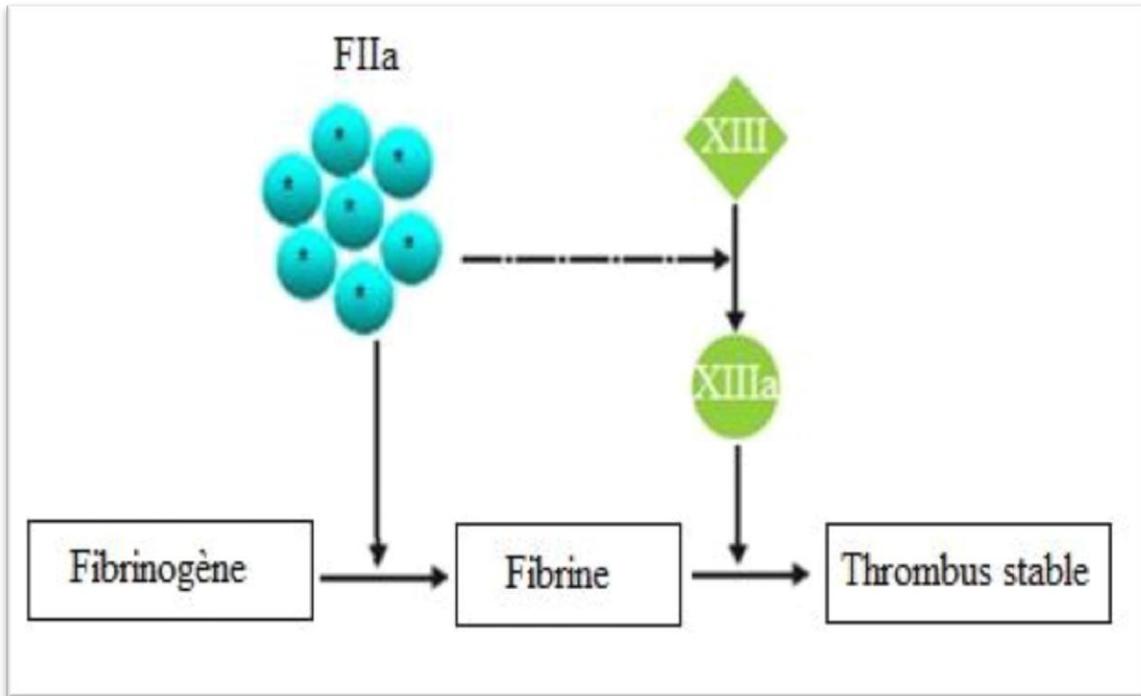


Figure 8 : La transformation de fibrinogène en monomère de fibrine (**Turpie et Esmon, 2011**).

1.4.3.4. La régulation de la coagulation :

La rapidité de la réponse aux lésions vasculaires est fournie par des phénomènes d'activation rétroactive qui permettent à la cascade de la coagulation de s'auto-amplifier. Le fait que ces réactions aient lieu au sein de la surface des membranes cellulaires (plaquettes activées, cellules endothéliales stimulées), permet de limiter la localisation de la coagulation au niveau de la brèche vasculaire, limitant ainsi le risque d'occlusion vasculaire. Toutefois, la coagulation sanguine est également soumise à une régulation permettant de maintenir de la fluidité du sang. Il est très important pour l'organisme que les enzymes impliquées dans l'activation de la coagulation ne circulent pas dans le plasma car ils peuvent provoquer une activation diffuse de la coagulation qui entraîne des processus pathologiques graves (**Abdi, 2014**).

1.4.3.4.1. Régulation positive :

L'exemple le plus important de régulation par rétroaction positive est celui de la thrombine qui, dans sa génération par le complexe tenase extrinsèque, ne sera pas le convertir seulement le fibrinogène en fibrine mais amplifiera également sa propre génération en activant le FXI (**Gailani et Broze, 1991**) et les cofacteurs de la coagulation FV, FVIII (**Butenas et al., 1997**). En parallèle, la thrombine joue un rôle protecteur du caillot formé par l'activation de

l'inhibiteur Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI) (**Bajzar et al., 1995**).

1.4.3.4.2. Régulation négative :

Une fois le caillot de fibrine formé dans la lésion, le processus de coagulation doit être limité pour éviter l'occlusion thrombotique dans les zones vasculaires adjacentes normales. Si les mécanismes de coagulation ne sont pas contrôlés, la coagulation pourrait se propager dans toute l'arborescence vasculaire causant de graves maladies. C'est pour cela que le très fort potentiel d'amplification de la cascade de la coagulation est finement régulé par des inhibiteurs physiologiques, permettant de garder la fluidité du sang, soit par inhibition enzymatique ou par modulation de fonctionnement des cofacteurs. Le mécanisme de régulation de la coagulation est relativement complexe et de nombreuses molécules anticoagulantes sont présentes. Les principaux systèmes de régulation sont : l'antithrombine (AT), l'inhibiteur de la voie du FT (TFPI) et le système protéine C (**Abdi, 2014**).

L'inhibiteur de la coagulation le plus important est l'antithrombine (AT) qui exerce son effet sur toutes les sérines protéases impliquées lors de la coagulation, en particulier les FIIa, FXa, FIXa, FXIa, et secondairement les FXIIa et FVIIa (**Olson et al., 1993; Rau et al., 2007**). En effet, l'AT est le principal inhibiteur de la thrombine. Cependant, l'AT peut également inhiber le FXa et dans une moindre mesure les FIXa, FXIa et FXIIa. L'AT forme des complexes équimoléculaires irréversibles avec ces facteurs bloquant des sites catalytiques de leurs enzymes cibles (**Abdi, 2014**).

L'inhibiteur de la voie du FT (TFPI) régule l'initiation de la coagulation et inhibe FXa et le complexe FT-FVIIa (**Monroe et Key, 2007**). En effet, le TFPI est un inhibiteur de type « Kunitz » principalement synthétisé par les cellules endothéliales (**Maroney et al., 2010**). Le domaine Kunitz est un domaine protéique capable d'inhiber les sites actifs de plusieurs protéases en imitant leurs substrats naturels. L'inhibition de l'initiation de la coagulation par le TFPI se produit en deux phases. Premièrement, le TFPI via son domaine « Kunitz II » inhibe le FXa en formant un complexe binaire TFPI-FXa. Deuxièmement, ce complexe se lie au complexe FT-FVIIa par l'association entre le premier domaine « Kunitz I » du TFPI et le FVIIa. Ainsi, un complexe quaternaire FVIIa-FT-TFPI-FXa est formé, dans lequel les FXa, le FVIIa, et le FT perdent leurs activités (**Monroe et Key, 2007**).

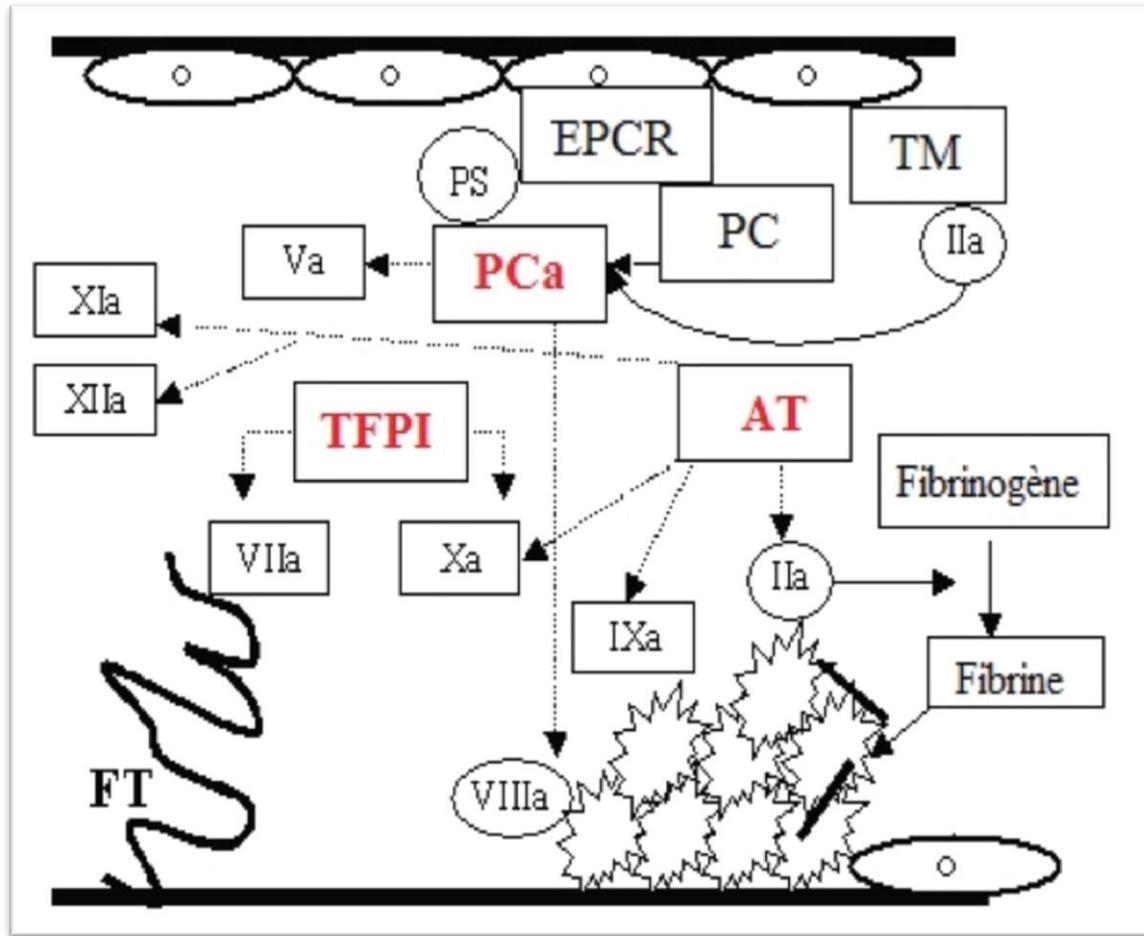


Figure 9 : Les systèmes majeurs de régulation physiologique de la coagulation (Boneu et Cazenave, 1997).

Le système protéine C est un mécanisme important pour confiner l'action de la pro-coagulation sur le site de la lésion. Ce mécanisme est composé de protéines plasmatiques (la protéine C et la protéine S), des récepteurs membranaires tels que la thrombomoduline (TM) et le Récepteur Endothélial de la Protéine C (EPCR), et a pour cibles les FVa et FVIIIa. Lorsque la thrombine atteint une cellule endothéliale intacte, elle se lie à la TM pour former un complexe thrombine/TM (Figure 10.A). En présence de l'EPCR, le complexe thrombine/TM active alors la protéine C en protéine C activé (APC), qui se lie à son cofacteur, la protéine S, et inactive les FVa (Figure 10.B) et FVIIIa (Figure 10.C) (Hoffman, 2003).

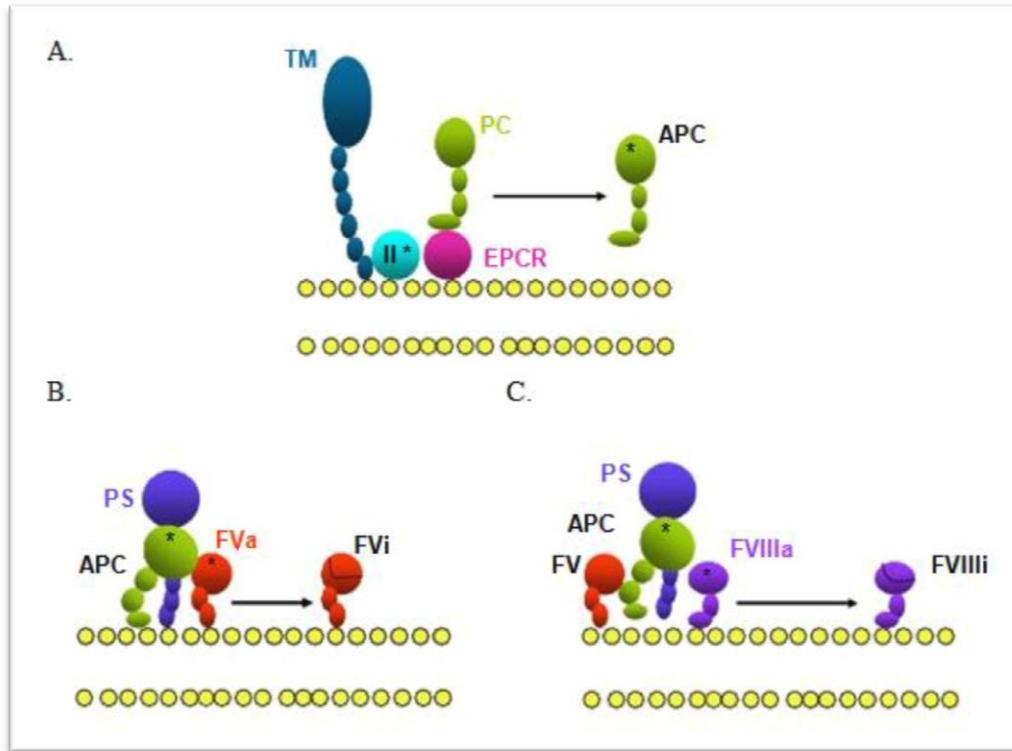


Figure 10 : Système inhibiteur APC. A. Activation de la protéine C en APC. B. Inactivation du FVa par l’APC. C. Inactivation du FVIIIa par l’APC (Abdi, 2014).

Tableau 1 montre tous les inhibiteurs qui interviennent au cours de déroulement de la cascade de coagulation.

Tableau 1. Les inhibiteurs qui interviennent pendant la coagulation *in vivo*, (Madouni et Madani, 2014).

Inhibiteurs	Enzymes cibles	Demi-vie <i>in vivo</i>
Antithrombine (AT)	Thrombine (IIa) FXa FIXa FXIa et FXIIa	50 à 70 heures
Protéine C activé (PCa)		6 à 8 heures
Protéine S (PS)	FVa FVIIIa	60 heures
Cofacteur II de l’héparine	Thrombine	60 heures
Tissu Factor Pathway inhibitor (TFPI)	FVIIa	Non déterminée

1.4.4. Fibrinolyse :

La fibrinolyse tend à inhiber l'arrangement mais surtout l'allongement du caillot en détruisant les polymères de fibrine en transformant plasminogène en plasmine qui est l'enzyme principale. Comme la coagulation, la fibrinolyse utilise à des facteurs ou protéines plasmatiques qui amorcent et activent le processus et des protéines qui le régulent afin d'empêcher sa généralisation (**Mann, 2002**).

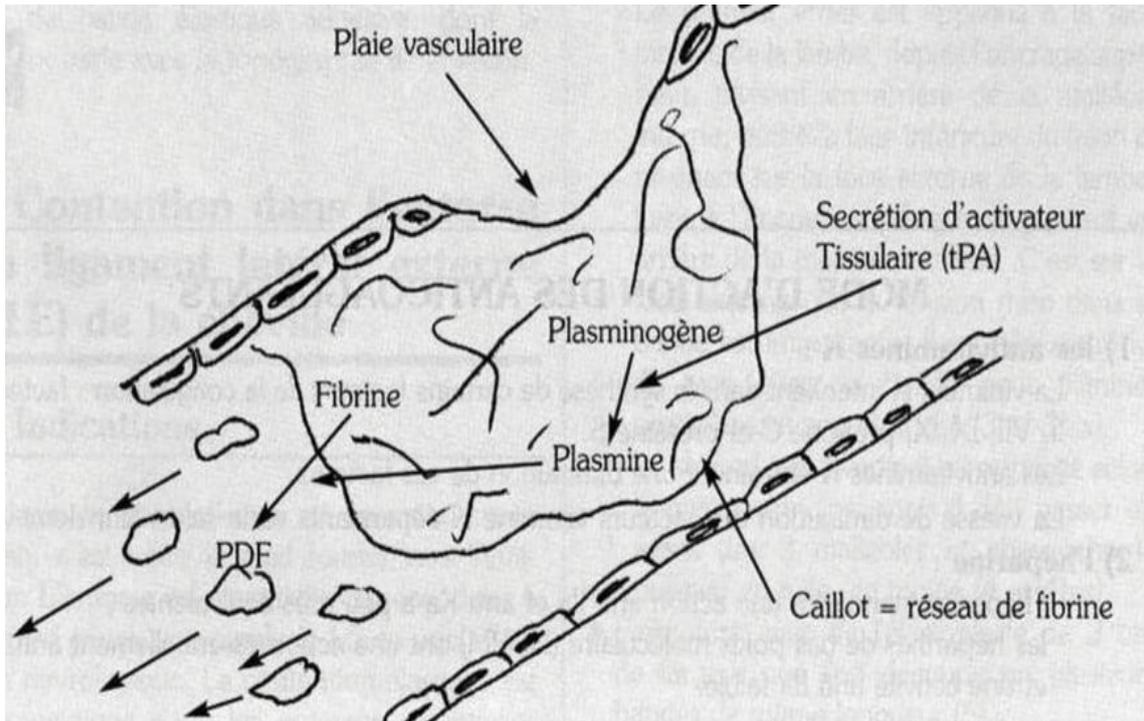


Figure 11 : Le déroulement de fibrinolyse (Rkain, 2008).

2. Facteur VIII :

2.1. Définition :

Le facteur VIII est une glycoprotéine synthétisée en quasi-totalité par le foie (synthèse rénale très limitée), présente en plusieurs tissus (foie, poumons, rate, reine...). Cependant, Il ne semble pas être présent dans l'endothélium vasculaire. Le facteur VIII circule dans le plasma sous une forme liée au facteur de Willebrand qui le protège d'une dégradation protéique rapide. Ainsi, sa demi-vie varie de 10 à 16 heures. Contrairement pour la forme libre de facteur VIII, qui est présentée à une très faible quantité et une demi-vie très courte pour la forme non liée à celle de facteur Willebrand. Le taux minimal pour assurer une hémostase normale est de 30 % (**Biomnis, 2012**).

2.2. Biosynthèse et structure finale de FVIII :

Le type de la cellule responsable de la production du FVIII reste controversé (**Yadav et al., 2012**). Diverses observations ont démontré la présence de l'ARNm du FVIII dans de

nombreux tissus comme le foie, la rate et les cellules endothéliales (**Jacquemin *et al.*, 2006; Wion *et al.*, 1985**), cependant une de ces transcriptions est peut-être illégitime et ne produit pas des quantités suffisantes de FVIII. Bien que ces sites de synthèse du FVIII ne soient pas entièrement identifiés, la plupart des données indiquent que le plus grand site de synthèse se situe dans le système réticulum-endothélial séquence polypeptidique de 2351 AA. La sécrétion de cette protéine suit une voie cellulaire avant d'être libérée dans le plasma par le réticulum endoplasmique (RE) puis le compartiment intermédiaire entre RE-Golgi (ERGIC), et enfin par l'appareil de Golgi (**Abdi, 2014**).

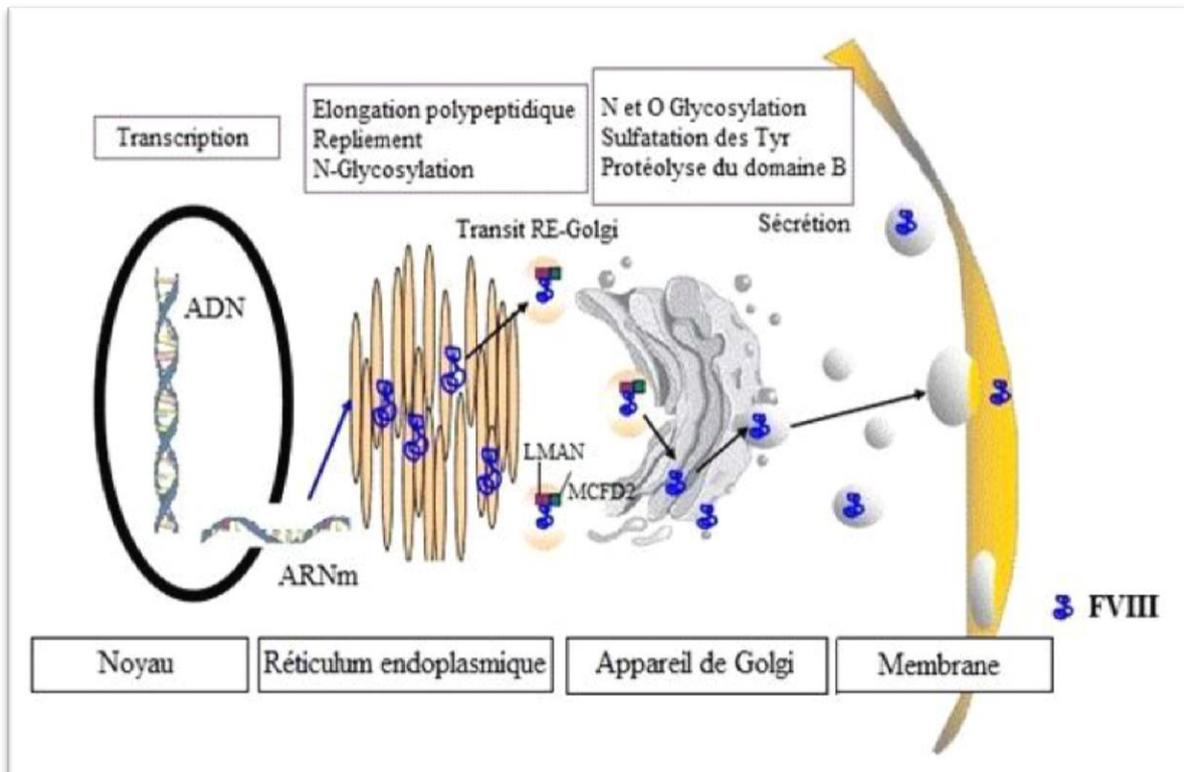


Figure 12: Représentation schématique expliquant les étapes de synthèse et sécrétion du FVIII (**Abdi, 2014**).

Pendant la traduction, le FVIII est transloqué vers le RE où il subit un clivage peptidique qui va réduire sa séquence à 2332 AA. La pré-protéine FVIII apparait dans un arrangement linéaire présenté par la séquence suivante : NH₂-A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2-COOH (**Lenting *et al.* 1998; Vehar *et al.* 1984**).

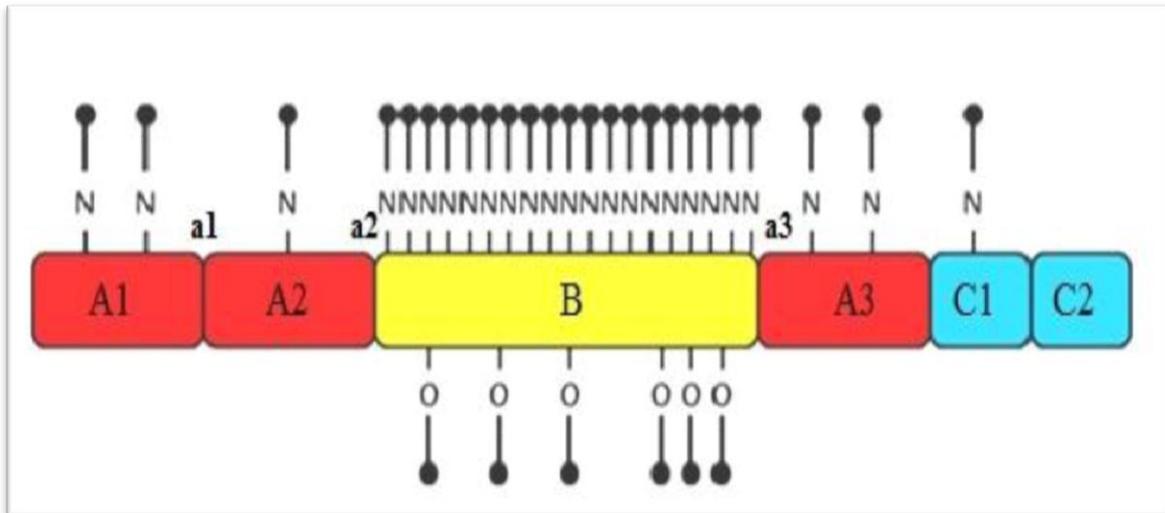


Figure 13 : Représentation schématique de la structure primaire du FVIII. (Abdi, 2014).

Cette protéine va subir ensuite une mise en conformation par les protéines du RE. Cette structure comprend la formation de ponts disulfures. Deux ponts disulfures sont formés à l'intérieur de chacun des domaines A1 et A2 tandis qu'un seul pont est formé dans les domaines A3, C1 et C2 (Selvaraj *et al.*, 2012).

D'un autre côté, en absence de données de cristallographie aux rayons X dans les années 90, une étude microscopique a permis de décrire le FVIII humain comme une protéine possédant une tête globulaire d'environ 14 nm de diamètre, avec des appendices satellites d'environ 50 nm de longueur (Fowler *et al.*, 1990).

Le FVIII est une protéine plasmatique de la coagulation constituée de trois domaines homologues A, un domaine B et deux domaines C organisés selon la séquence suivante A1-A2-B-A3-C1-C2. Entre ces domaines sont définies des régions acides ; a1 entre A1 et A2, a2 entre A2 et B, et a3 entre B et A3. Les trois domaines A, essentiels à l'activité cofacteur, présentent une homologie avec celle du facteur V de la coagulation et de la céruloplasmine (Allali *et al.*, 2019). Des études basées sur la modélisation homologue ont été réalisées pour mieux comprendre la structure du FVIII. Ces études ont permis de déterminer la structure du domaine A (Pan *et al.*, 1995; Pemberton *et al.*, 1997) ainsi que la structure du domaine C (Pellequer *et al.*, 1998). Cependant, la cristallisation du domaine C2 du FVIII a pu révéler à haute résolution atomique la structure de ce domaine (Pratt *et al.*, 1999). Ce n'est qu'en 2008, que la structure cristallographique du FVIII dépourvu du domaine B a été rapportée par deux équipes de recherche (Abdi, 2014 ; Ngo *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2008).

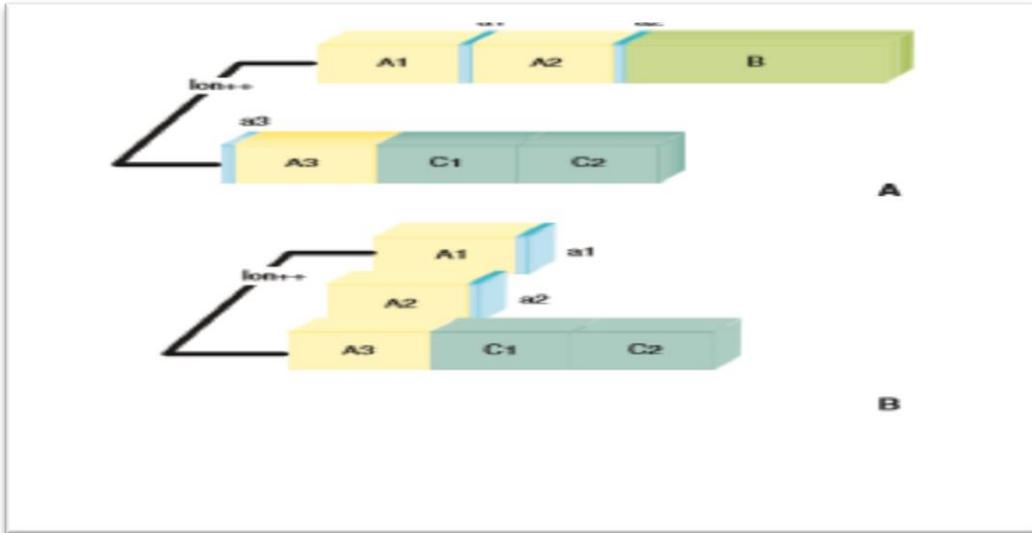


Figure 14 : Représentation schématique de la structure de Facteur VIII (FVIII) et FVIII activé(FVIIIa) (Allali *et al.*, 2019).

Ces deux études ont aidé à déterminer avec une résolution structurale élevée 3D ainsi que l’organisation en domaines de la protéine FVIII. Ces deux structures sont presque identiques avec une différence seulement sur un site de liaison à un ion divalent identifié par Shen *et al.*, (Abdi, 2014;Shen *et al.*, 2008).

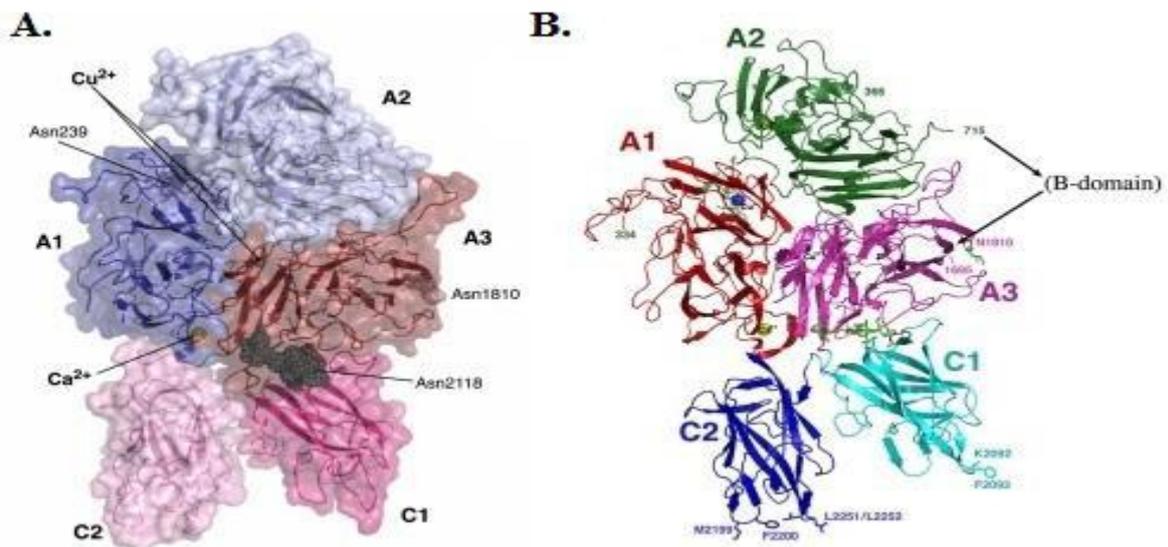


Figure 15 : Structure 3D de facteur VIII (Ngo *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2008).

La figure 16 détermine les différentes régions impliquées dans les interactions moléculaires par le FVIII.

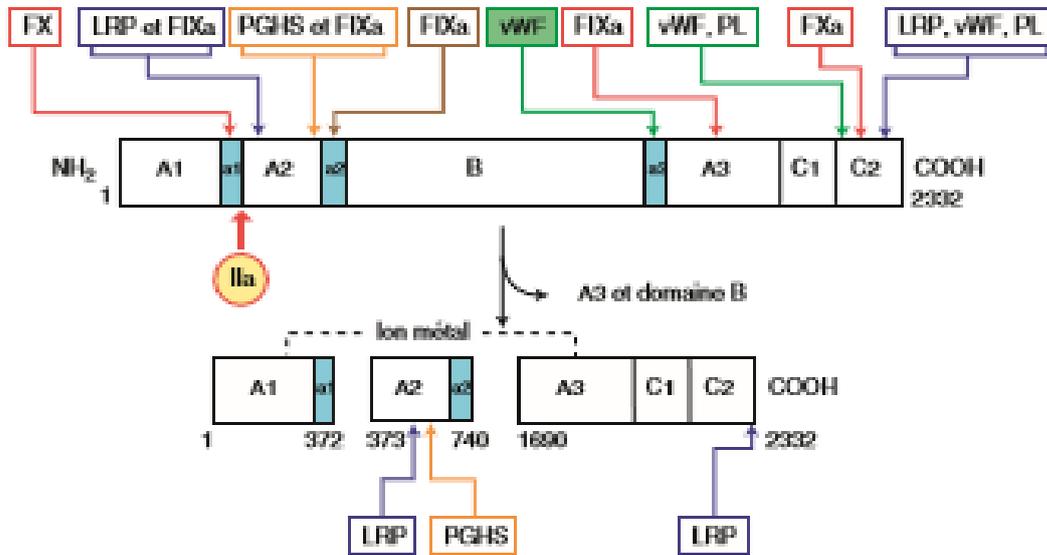


Figure 16 : Structure et régions impliquées dans les principales interactions moléculaires (Allali *et al.*, 2019).

2.3. Activation et inactivation du FVIII :

Pour participer à la coagulation, le FVIII hétéro-dimérique est un précurseur inactif qui doit être converti en son dérivé actif (Fulcher *et al.*, 1983; Lollar *et al.*, 1984; Toole *et al.*, 1984; Wood *et al.*, 1984). La forme active du FVIII, ou FVIIIa, est formée au site où se déroule le processus de coagulation par l'action sur le FVIII de deux enzymes : la thrombine (facteur II activé : FIIa) et le FXa (Allali *et al.*, 2019). Ces deux sérines protéases clivent la molécule FVIII à la base Arg372 et Arg740 dans la chaîne lourde et Arg1689 dans la chaîne légère (Eaton *et al.*, 1986; Vehar *et al.*, 1984). Il y a perte du domaine B et a3 (le WF se détache du complexe). Ceci forme le FVIIIa, hétérotrimère A1, A2, A3-C1-C2 (Allali *et al.*, 2019). Récemment, un autre activateur, le complexe FT/FVIIa, a aussi montré sa capacité à cliver le FVIII au niveau des Arginine en position 372 et 740. Cependant, cette activation est beaucoup plus faible que celle produite par la thrombine (Soeda *et al.*, 2010).

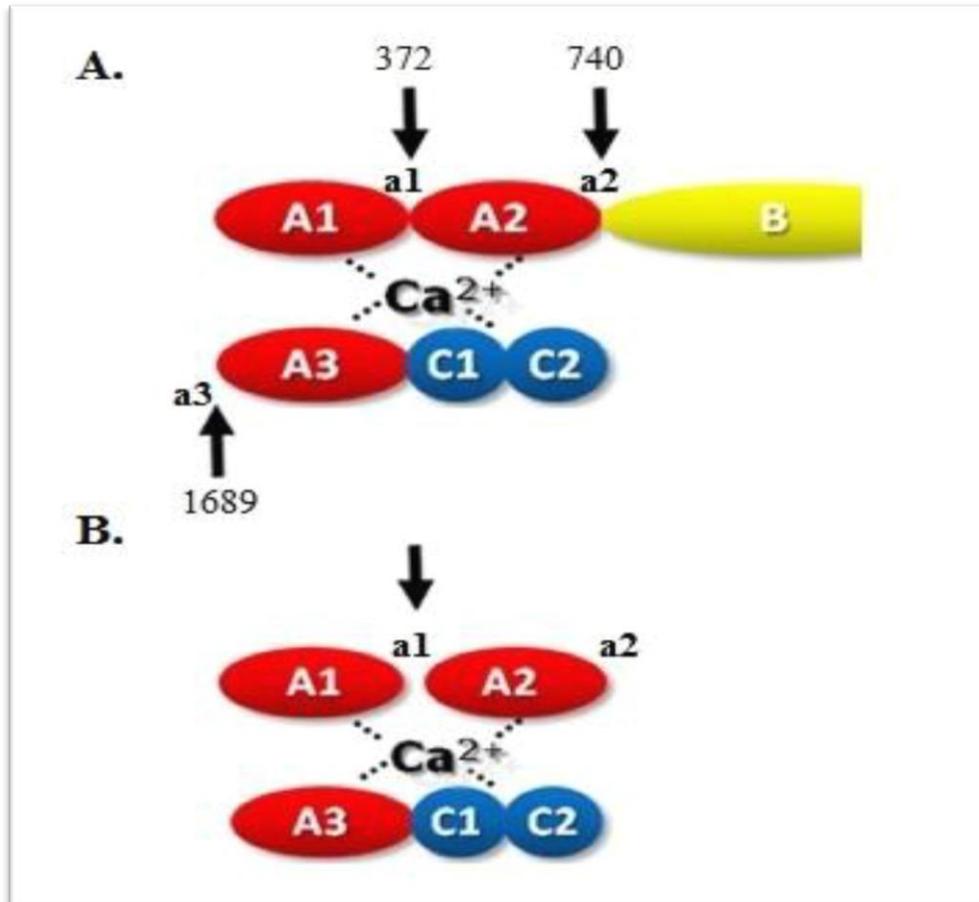


Figure 17 : Structure de FVIIIa et sites d'activation (Abdi, 2014).

Le facteur VIII peut être inactivé par dégradation protéolytique : clivage du FVIIIa par la protéine C activée (PCa) ou par le FXa. En fait, cette voie n'est pas majoritaire, il se produit aussi une inactivation par dissociation spontanée du domaine A2-a2 du dimère (Allali *et al.*, 2019).

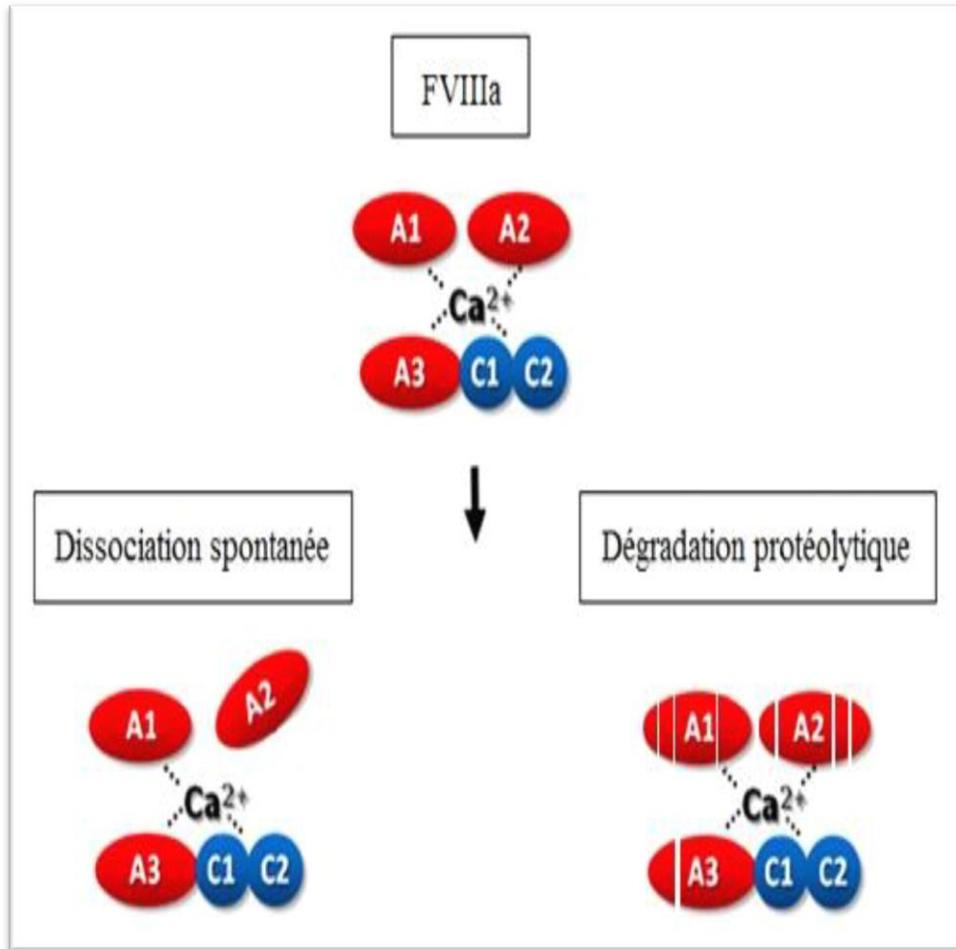


Figure 18 : Les deux mécanismes d'inactivation de FVIII (Abdi, 2014).

2.4. Rôle de la protéine FVIII dans la coagulation :

Le facteur VIII est un cofacteur enzymatique qui joue un rôle très important dans la coagulation sanguine. Il est activé par le facteur Xa ou la thrombine, en facteur VIIIa qui se complexera avec le facteur IXa avec la présence de phospholipides pour activer le facteur X en Xa (Biomnis, 2012). L'activation massive du facteur Xa est responsable de la production de thrombine avec un taux élevés, qui est nécessaire pour former et protéger le caillot contre la fibrinolyse (Von dem Borne *et al.*, 1997). En cas de déficit de FVIII, qualitativement ou quantitativement, une pathologie hémorragique survient : il s'agit de HA (Abdi, 2014).

2.5. Méthodes de mesures :

La méthode de mesure du facteur VIII telle pratiquée en routine dans les laboratoires d'hémostase et basée sur la mesure de l'activité du FVIII, généralement abrégé sous la forme FVIII:C. Les valeurs normales du facteur VIII:C sont usuellement comprises entre 50 et 150 %. Cette mesure peut être réalisée par plusieurs techniques (Poret et Mourey, 2014).

2.5.1. Méthode chronométrique :

La méthode chronométrique en une seule étape (FVIII:C-1) est la technique la plus largement utilisée. Elle est basée sur un test dérivé du TCA, qui évalue la capacité de l'échantillon à tester, à corriger ou à raccourcir le temps de coagulation d'un plasma complètement déficient en facteur VIII. Le temps de coagulation mesuré est une fonction directe de l'activité du facteur VIII dans l'échantillon. Sur la base de la droite d'étalonnage établie pour le lot de réactifs en cours, le résultat est exprimé en pourcentage d'activité par rapport au plasma de référence commercial (calibrateur) (Poret et Mourey, 2014).

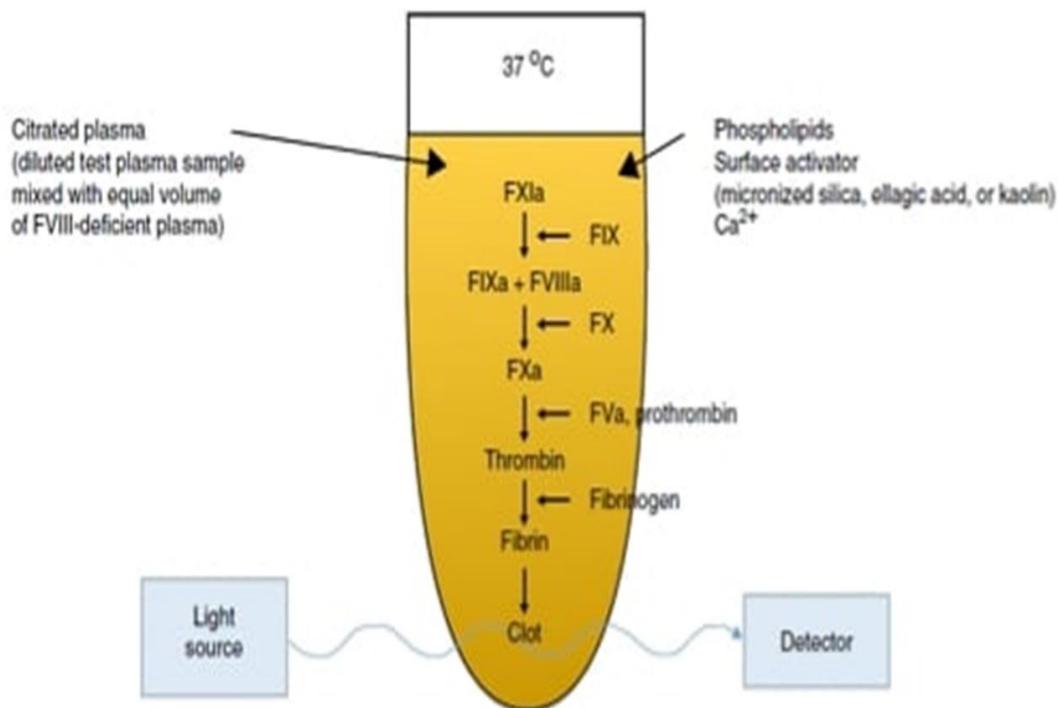


Figure 19 : Principe de la méthode chronométrique pour le dosage de FVIII (Llasera, 2017).

2.5.1.1. Avantages :

- Familier aux laboratoires.
- Protocoles d'instruments facilement disponibles.
- Facile à automatiser.
- Perçu comme moins coûteux.

- Peut être adapté pour détecter des taux de FVIII <1% de la normale (**Adcock *et al.*, 2018**).

2.5.1.2. Inconvénients :

- Imprécision potentielle en présence de certains produits de remplacement comme rFVIII modifié.
- Plus d'imprécision en présence d'interférence non-spécifique.
- Trois dilutions de plasma à tester dans un plasma déficient en facteur sont nécessaires.
- Des algorithmes relativement complexes doivent être appliqués pour générer des résultats.
- Exigence pour le plasma déficient en facteur.
- Variabilité selon les réactifs APTT, les méthodologies ou les instruments utilisés (**Adcock *et al.*, 2018**).

2.5.2. Méthode chromogénique :

La méthode chromogénique (FVIII:C-Chr) est une méthode de deux étapes pour mesurer l'activité du facteur VIII. Cette technique est basée sur la capacité du FVIII à agir comme un cofacteur pour activer le facteur X par le facteur IXa en présence de phospholipides et de calcium (**Poret et Mourey, 2014**).

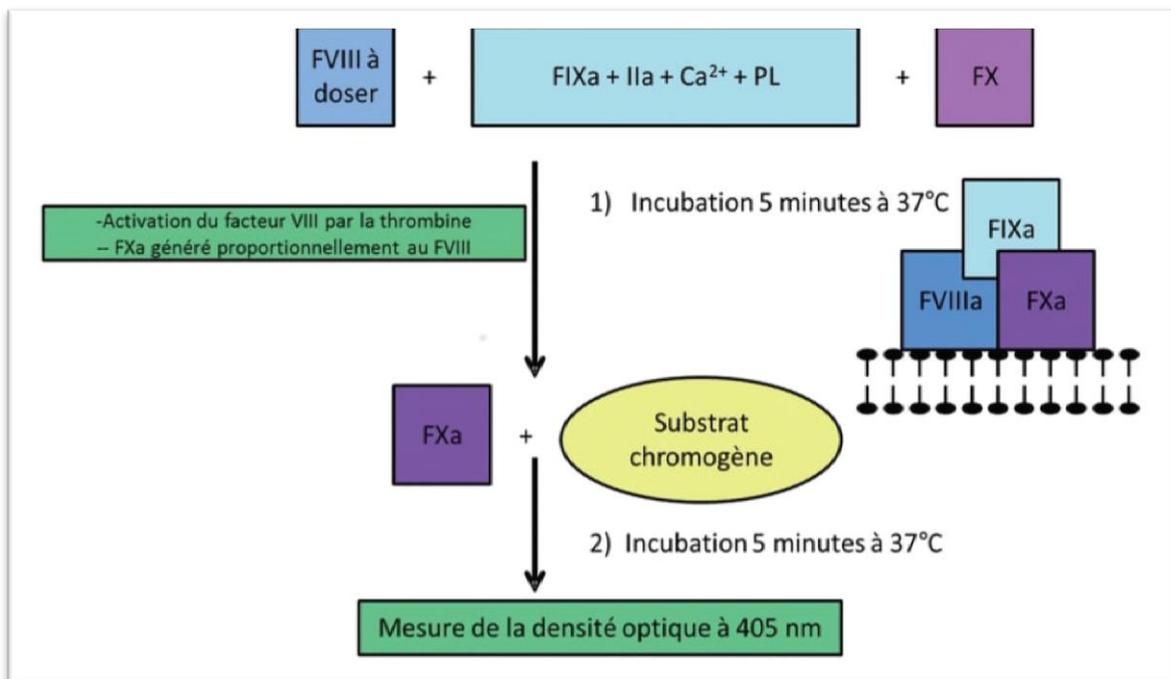


Figure 20 : Méthode chromogénique et son principe pour le dosage de FVIII (**Poret et Mourey, 2014**).

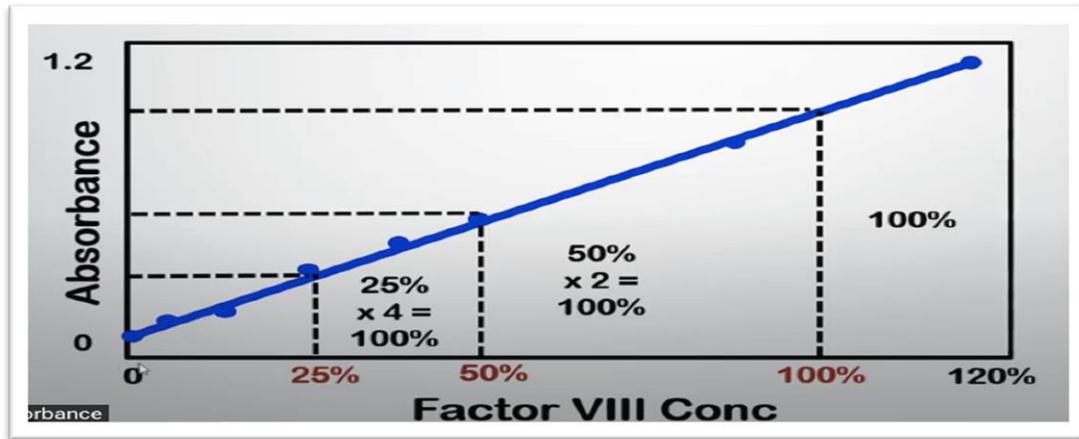


Figure 21 : Courbe de calibration de méthode chromogénique.

2.5.2.1. Avantages :

- Plus précis en présence de la plupart des produits de remplacement comme rFVIII modifié.
- Moins d'interférence par des inhibiteurs non spécifiques.
- Aucune exigence de trois dilutions d'échantillon à tester.
- Aucune exigence de plasma à déficit en facteur.
- Méthodologie simple pour générer les résultats (Adcock *et al.*, 2018).

2.5.2.2. Inconvénients :

- Peu de protocoles spécifiques à l'instrument disponible.
- Perçu comme trop complexe à automatiser en raison du manque de familiarité du Staff de laboratoire.
- Plus coûteux que la méthode chromométrique si les réactifs ne peuvent pas être stockés (Adcock *et al.* 2018).

3. Génétique :

3.1. Description de gène F8 :

Le gène codant le FVIII est appelé gène F8 et a été cloné en 1984 (Gitschier *et al.*, 1984). Il est situé à l'extrémité distale du bras long du chromosome X (q) en Xq28, couvrant 186 kilobases (kb), représentant près de 0,1% de l'ensemble du chromosome (Poustka *et al.*, 1991). Ce gène se compose de 26 exons et 25 introns, et la séquence codante est de 7053 nucléotides (Oldenburg et Pavlova, 2006).

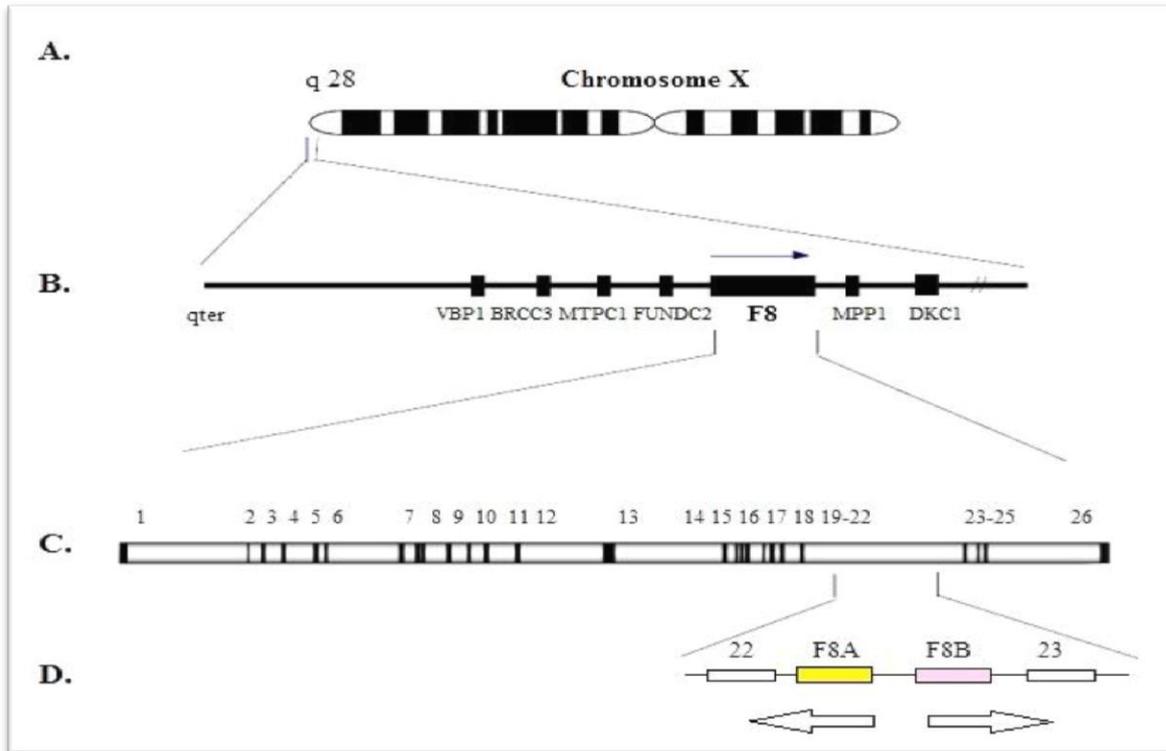


Figure 22 : Structure de gène de F8 et localisation chromosomique (Abdi, 2014).

(A) Représentation du chromosome X (B). La Localisation chromosomique du gène F8 (C). Distribution des 26 exons du gène F8 (D). Représentation des deux gènes supplémentaires au F8 : F8A et F8B. (Abdi, 2014).

En effet, L'orientation de lecture de transcription 5'-3' du gène F8, se fait dans la direction télomère vers centromère. Ce gène comprend un promoteur estimé à 1,2 kb de longueur, une région codante de 183 kb constituée de 26 exons, 25 introns et une région 3'UTR de 1,8 kb (Gitschier *et al.*, 1984). La transcription de ce gène commence au niveau du 170^{ème} nucléotide du gène qui se trouve en amont du codon d'initiation de la traduction (ATG) (Gitschier *et al.*, 1984). Le codon ATG est précédé en 30 nucléotides en amont d'une séquence GATAAA similaire à la boîte TATAAA, nécessaire à l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II. Cette séquence est suivie d'un cadre de lecture ouvert continue donnant à un polypeptide de 2351 AA (Truett *et al.*, 1985). La région codante est suivie d'une autre région non traduite, qui contient 1805 nucléotides riches en signaux de polyadénylation, tels que répétitions AATAAA et CATTG et d'une queue poly A d'environ 1 kb de longueur (White et Shoemaker, 1989).

Le gène F8 est inhabituel dans le sens où il existe au sein de l'intron 22 un îlot CpG associé à deux gènes supplémentaires F8A et F8B (Figure 21.D). Le gène F8A s'étend sur 2 kb et il est transcrit dans le sens inverse du gène F8 (Levinson *et al.*, 1990). Deux copies homologues de

ce gène F8A ont été retrouvées à une distance d'approximativement 400 et 600kb de la région télomérique du F8 (**Naylor et al., 1995**). Le F8A code pour une protéine de 40 Kilo Dalton (kDa) appelée protéine associée à l'huntingtine (HAP40) (**Peters et Ross, 2001**). L'HAP40 est impliquée dans le transport et l'endocytose de l'Huntington, une protéine qui, lorsqu'elle est mutée, provoque la maladie d'Huntington (**Abdi, 2014**). Le gène F8B de 2,7 kb est transcrit dans le même sens que le gène F8 (**Levinson et al., 1992**). Le gène F8B utilise les quatre derniers exons du gène F8 pour sa traduction. Ce gène code donc pour une protéine contenant le domaine C2 de la protéine FVIII. Cependant, la fonction biologique de cette protéine reste incertaine. En effet, les patients présentant une délétion de l'exon 23 à 26 ne souffrent d'aucune autre maladie que le HA (**Casana et al., 2008**).

3.2. Mode de transmission :

L'hémophilie A est une maladie héréditaire, récessive liée à des gènes situés sur le chromosome X (**Guérois, 2009**) qui correspond à 70 % des cas dans les formes familiales (**Jayandharan et Srivastava, 2011**). Dans les 30% restant, le HA apparaît sporadiquement soit à cause d'une mutation dite *de novo* dans un gamète grand-parental, soit par transmission d'une mutation sur plusieurs générations de femmes porteuses asymptomatiques (**Leuer et al., 2001**). Après cette première mutation, la maladie se transmet à l'identique aux formes familiales (**Abdi, 2014**). De rares cas d'HA ont été décrits chez les femmes, provoqués soit par une inactivation aléatoire du chromosome X, soit par la présence de deux copies du gène F8 portant la mutation, soit chez les filles atteintes du syndrome de Turner (**Bicocchi et al., 2005; Pavlova et al., 2009**).

Le chromosome X est un gonosome (chromosome sexuel) qui présente la particularité de n'être présent sous forme de paires comme les autosomes uniquement chez la femme. L'homme est donc hémizygoté ; il a un chromosome X et un chromosome Y. Alors que les femmes ont deux chromosomes X. Dans les maladies récessives liées à l'X, l'activité normale du gène sur le chromosome X masquera le déficit de coagulation causé par une mutation du même gène sur l'autre chromosome X chez la femme, ce qui en fait une conductrice de la pathologie mais non hémophile (**Peyvandi et al., 2006**). En revanche, l'absence d'un deuxième chromosome X chez l'homme empêchera une éventuelle atténuation des effets de la mutation et le soumettra aux différentes manifestations cliniques du HA, faisant d'eux un hémophile d'une vision génétique et clinique.

Comme pour toutes les maladies récessive liée à l'X, un hémophile donne naissance à des garçons indemnes et à des filles qui sont obligatoirement des conductrices (**Jayandharan et Srivastava, 2012; Peake et al., 1993**).

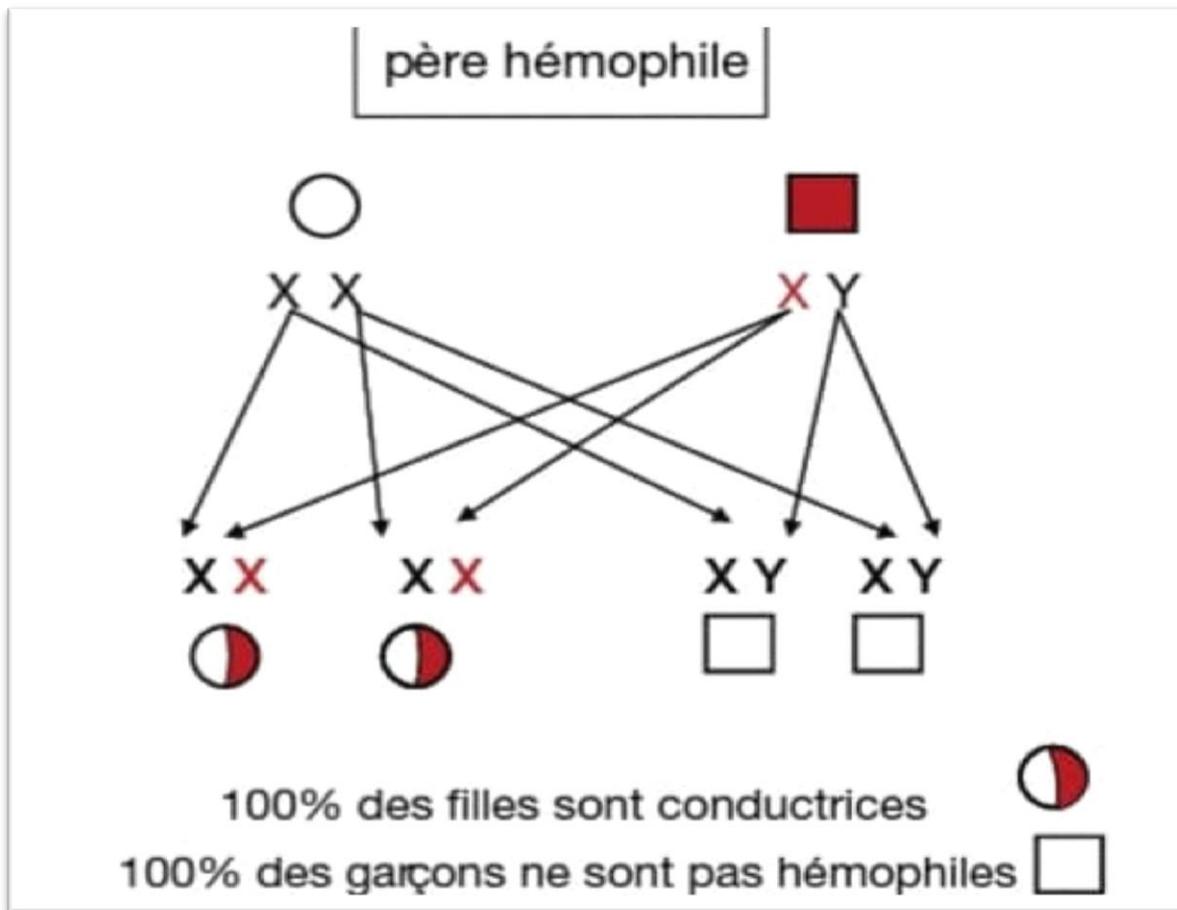


Figure 23 : Mode de transmission de l'hémophilie pour un père hémophile (Guérois, 2009).

Dans 50 % des cas, une conductrice peut donner naissance à un garçon ou à une fille normale dont la descendance sera indemne. Dans 25 % des cas, une conductrice donnera naissance à un garçon hémophile et à une fille conductrice (Jayandharan et Srivastava, 2012).

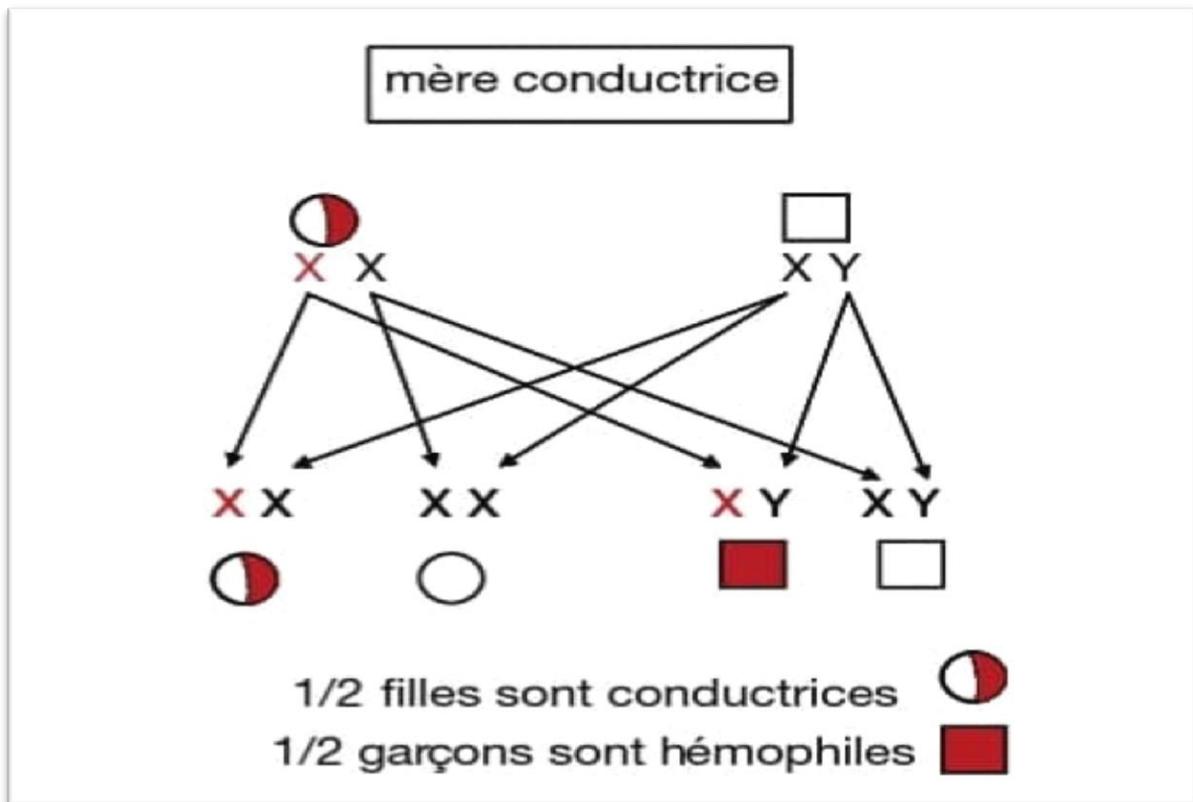


Figure 24 : Mode de transmission de l'hémophilie pour une mère conductrice (Guérois, 2009).

3.3. Anomalie génétique responsable d'HA :

La plupart des mutations responsables de la HA sont rares ou spécifiques à une famille, à l'exception des micro-inversions du gène F8 qui sont relativement communes et courantes (Bagnall *et al.*, 2002; Lakich *et al.*, 1993). Deux types de micro-inversions intrachromosomiques du gène F8 ont été décrits. Il s'agit de la micro-inversion de l'intron 22 et de l'intron 1 dont le mécanisme pathogène est une recombinaison entre les séquences intragéniques Int22h-1 et Int1h-1 avec leurs séquences homologues extra-géniques télomériques respectivement Int22h-2 et Int22h-3, et Int1h-2. Ces deux micro-inversions sont responsables d'un phénotype sévère de la maladie (Abdi, 2014). Ces micro-inversions se produisent principalement pendant la méiose masculine, où la partie intermédiaire du chromosome X est libre (Rossiter *et al.*, 1994).

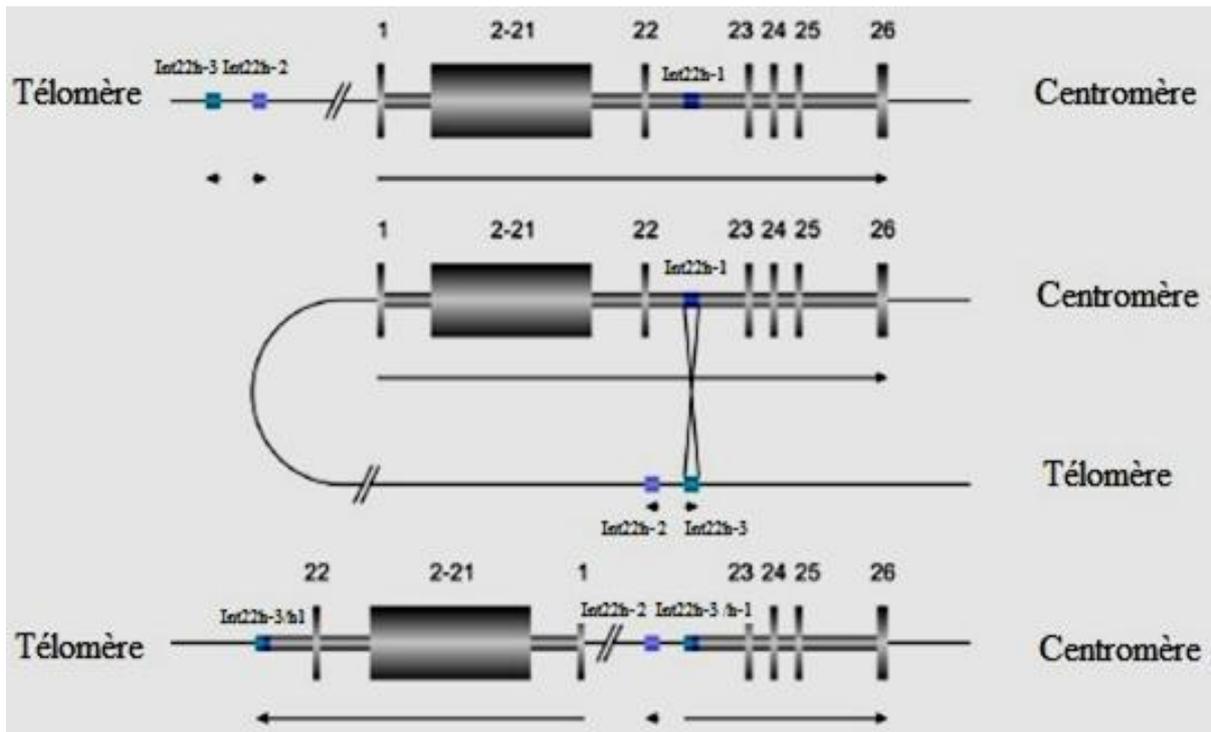


Figure 25: Le mécanisme responsable de micro inversion de l'intron 22 (Graw *et al.*, 2005).

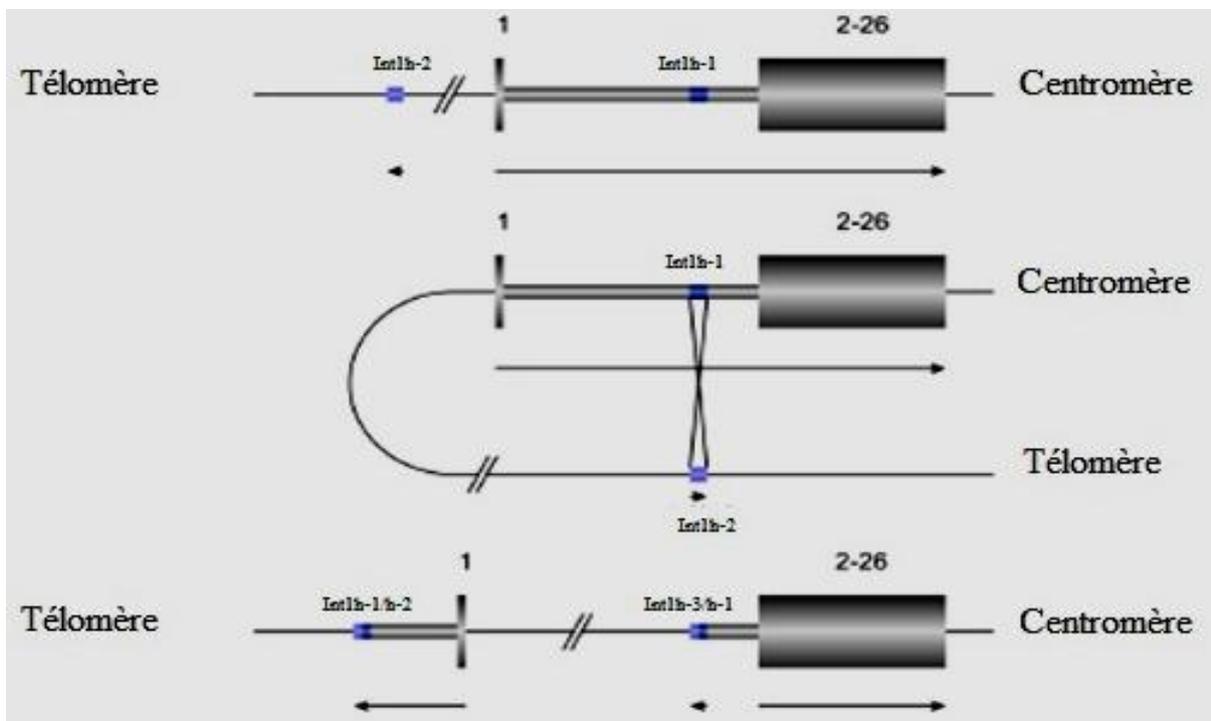


Figure 26: Le mécanisme responsable de la micro-inversion de l'intron 1, adaptée à partir de (Graw *et al.*, 2005).

En plus des micro-inversions, le HA est causée par d'autres types de mutations qui se répartissent en quatre grandes catégories : les mutations ponctuelles, les mutations de type décalage de cadre de lecture, les délétions/insertions et les duplications (**Payne et al., 2013**).

3.3.1. Mutations ponctuelles :

La majorité des cas d'HA (environ 67%) proviennent d'une mutation ponctuelle dans le gène F8. Ces mutations ponctuelles comprennent les mutations faux-sens, les mutations non-sens et les mutations au niveau des sites d'épissage. La majorité des mutations ponctuelles sont des mutations faux-sens (48,7%), puis les mutations non-sens (11,3%) et enfin les mutations au niveau des sites d'épissage (7,7%) (**Abdi, 2014**).

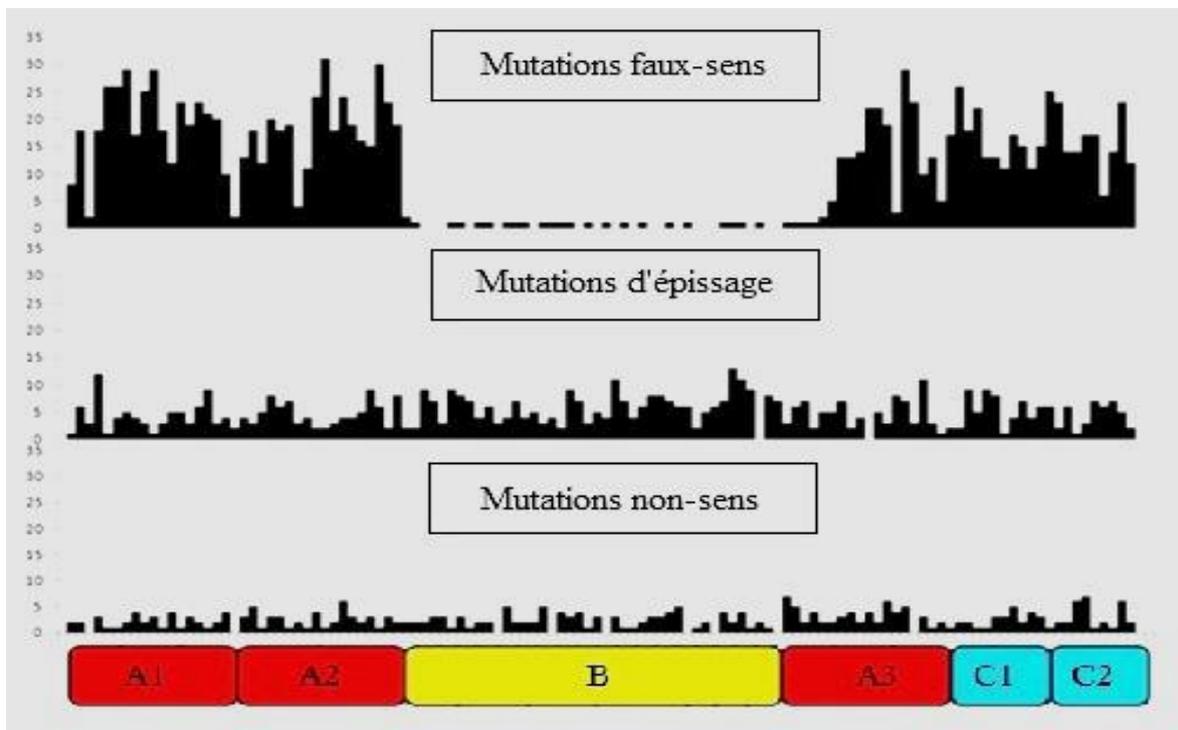


Figure 27: Distribution des mutations ponctuelles sur les différents domaines du FVIII (**Payne et al., 2013**).

Les mutations non-senses et aux sites d'épissage sont réparties dans tous les domaines FVIII. Cependant, les mutations faux-sens sont dispersées tout au long des domaines à l'exception du domaine B où elles sont relativement rares (**Payne et al., 2013**).

3.3.2. Les mutations de type de décalage de cadre de lecture :

Les mutations de type décalage de cadre de lecture sont responsable de 23,3% de HA. Ces mutations sont dues à des petites délétions, des insertions ou des duplications différentes d'un multiple de trois situées dans des régions codantes du gène du F8. Ces mutations sont responsables d'un décalage du cadre de lecture lors de la traduction de l'ARNm en protéine,

ce qui entraîne le plus souvent l'apparition d'un codon stop prématuré. Ce type de mutation est donc associé à la forme sévère d'HA (**Payne *et al.*, 2013**).

3.3.3. Les délétions et les insertions :

Les délétions et insertions sont retrouvées chez 6,05% de la population HA. Ces mutations sont le plus souvent responsables d'un décalage du cadre de lecture de l'ADN, ce qui modifie significativement la protéine et conduit généralement à une forme sévère de la pathologie. Il y a des délétions et insertions causées par des erreurs de glissement de l'ADN polymérase en série de nucléotides d'adénine (A) au niveau du gène F8 ont été rapportées (**Abdi, 2014**).

Les délétions du gène F8 sont responsables de 6% de HA. Elles peuvent être de deux types : les grandes délétions (4,7%) ou les micro-délétions (1,3%). Au niveau protéique, les grandes délétions peuvent entraîner une perte de la fonction du FVIII, l'élimination d'une partie importante de la protéine ou introduire une modification du cadre de lecture. Ainsi, ce type de modification est généralement associé à une forme sévère de HA. Les micro-délétions peuvent avoir comme conséquence soit un décalage du cadre de lecture ou l'apparition d'un codon stop à la séquence protéique (**Abdi, 2014**).



Figure 28: Représentation schématique des larges délétions responsables De HA (**Payne *et al.*, 2013**).

Les insertions correspondent à l'ajout d'une séquence nucléotidique à la séquence du gène. Au niveau du gène F8, deux types d'insertions ont été rapportés : les grandes insertions (0,02%) et les petites insertions (0,03%). Seulement deux type de grandes insertions de *nov* sur le gène du F8 (fragments de 2,64 et de 3,8 kb) ont été mis en évidence au niveau de l'exon

14 et sont associés à la forme sévère de la maladie. Les autres types signalés représentent des insertions à base unique. Celles-ci sont à l'origine de l'apparition d'un décalage de lecture responsable de la forme sévère de la maladie (**Abdi, 2014**).

3.3.4. Les duplications :

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

4. Aspect clinique :

4.1. Classification :

Cliniquement, le HA est classée, selon l'activité résiduelle du FVIII mesurée dans le plasma des patients par rapport à celle réalisée sur un plasma sain, en sévère, modérée et mineure (**White et al. 2001**).

Tableau 2. Classification de HA (**Poret et Mourey, 2014**).

Classification (type)	Taux de FVIII
Sévère	<1%
Modérée	1 à 5%
Mineure	5 à 40%

4.2. Manifestations cliniques :

Les manifestations cliniques de HA sont principalement de nature hémorragique et peuvent avoir des conséquences différentes en raison de leurs répétitions ou localisations. Ces hémorragies sont souvent provoquées et affectent préférentiellement l'appareil locomoteur (**Abdi, 2014**).

Chez les patients d'hémophilie sévère, les premiers symptômes cliniques apparaissent systématiquement lors de l'acquisition de la marche. Ces manifestations sont le plus souvent spontanées ou secondaires à des traumatismes minimes et sont essentiellement de type hémarthroses et hématomes (**Jayandharan et Srivastava, 2011**).

Les hémarthroses ou bien les hémorragies articulaires sont plus fréquentes dans l'hémophilie sévère, elles sont récidivantes et douloureuses, leur nombre varie entre 20 à 25 saignements par an. Elles apparaissent vers l'âge de 2-3 ans. Toutes les articulations peuvent être touchées, mais les plus souvent atteintes sont le genou, la cheville et le coude. L'hémarthrose aigue

(figure 28) doit être traitée le plus précocement possible. La répétition des hémarthroses sur une même articulation entraîne très tôt des lésions irréversibles de la synoviale et du cartilage qui aboutissent à la destruction de l'articulation, avec rétractions tendineuses, amyotrophie des muscles adjacentes (arthropathie hémophilique), source de handicap majeur dans l'hémophilie (**Guérois, 2009**).



Figure 29 : Hémarthrose aiguë (Guérois, 2009).

Les hématomes sont rarement spontanés mais généralement post traumatiques (**Giridhara Rao et Alok, 2012**). Ces complications sont également redoutées. Leur gravité est liée soit à leurs volumes (risque de spoliation sanguine). Soit à leur localisation. Certains hématomes mettent en jeu le pronostic vital : hématome intracérébral ou rétro-péritonéal, localisation dans la sphère ORL. D'autres localisations compromettent le pronostic fonctionnel comme les hématomes compressifs des membres avec compression vasculaire (risque ischémique) ou nerveuse (risque de paralysie), hématome péri-rachidien, rétro-orbitaire, etc. (**Guérois, 2009**). un hématome mal résorbé ou insuffisamment traité peut également évoluer vers une pseudotumeur hémophilique avec formation d'une coque fibreuse, adhérente aux plans adjacents qui peut ultérieurement évoluer pour son propre compte (**Guérois, 2009**).



Figure 30 : Hématome (Guérois, 2009).

À côté de cette forme sévère, les formes modérées et mineures d’HA sont principalement dues aux accidents hémorragiques provoqués à l’occasion d’une intervention chirurgicale ou avulsion dentaire (Jayandharan et Srivastava, 2011). En conséquence, ces formes peuvent être silencieuses pendant longtemps et n’apparaissent qu’à un âge avancé (Abdi, 2014).

Tableau 3. Manifestations cliniques en fonction de type d’HA (Poret et Mourey, 2014).

Classification	Manifestations
Sévère	Hémorragies fréquentes, parfois spontanée, à localisation articulaire et musculaire.
Modérée	Hémorragies occasionnelles, notamment lors de traumatismes, ou interventions chirurgicales
Mineure	Hémorragies lors de traumatismes ou interventions chirurgicales.

4.3. Diagnostic :

Le diagnostic de HA est essentiellement biologique (Kitchen *et al.*, 2013). Les dosages biologiques permettent de distinguer le type d’hémophilie, d’établir le taux exact de facteur

déficient ainsi que l'existence ou non d'inhibiteur (**Guérois, 2009**). La réalisation d'un bilan sanguin lors d'un épisode hémorragique ou d'une enquête familiale ou parfois d'une manière fortuite permet d'effectuer le diagnostic. Ce diagnostic repose sur un allongement isolé du TCA. Les dosages spécifiques et répétées des facteurs de coagulation de la voie intrinsèque par méthode chromométriques et chromogéniques permettront de mettre en évidence et de confirmer le déficit en FVIII (**Kitchen et al., 2013**).

Le diagnostic néonatal du HA sévère est relativement courant. Il survient lors de manifestations hémorragiques généralement causée par un traumatisme identifiable lié aux conditions obstétricales (ventouses, forceps) ou par une intervention chirurgicale ou invasive (test de Guthrie, ponction veineuse, circoncision). De plus, il est rare de trouver un HA sévère après deux ans, car l'apprentissage de la marche occasionne une symptomatologie marquée caractéristique en termes de diagnostic (**Abdi, 2014**).

Ainsi, les tests génétiques sont recommandés chez tous les patients atteints hémophiles A quel que soit le degré de sévérité et doivent être effectués dès que possible. Cette analyse nécessite une information et un recueil de consentement avant tout prélèvement. Le génotypage confirme le diagnostic, et peut, entre autres facteurs de risques, avoir un intérêt pronostique sur le risque d'apparition d'inhibiteurs, l'efficacité d'induction de tolérance immunitaire et sur la réponse au traitement par la desmopressine. Mais surtout, le génotypage est indispensable pour la détection des conductrices d'hémophilie, le diagnostic prénatal, le diagnostic préimplantatoire et dans un futur proche le diagnostic prénatal non invasif sur sang maternel (**PNDS, 2019**).

La stratégie diagnostique est établie dans le cadre du réseau des laboratoires de génétique. Elle dépend du type et de la sévérité de l'hémophilie et est régulièrement mise à jour en fonction de l'évolution technologique et de l'avancée des connaissances. En cas de négativité de l'analyse génétique standard, des analyses complémentaires (recherche de grands réarrangements, analyses fonctionnelles,...) pourront être réalisées par un laboratoire dit « spécialisé ». Malgré les progrès, dans certains cas aucune anomalie génétique n'est identifiée : chez moins de 20 % des hémophiles A mineurs, 10 à 15 % des hémophiles A modérées et moins de 2 % des hémophiles A sévères, tous degrés de sévérité confondus. Une étude indirecte par l'étude de marqueurs polymorphes liés aux gènes d'intérêt peut parfois apporter une réponse à la détermination du statut de conductrice mais impose d'étudier plusieurs membres de la famille expliquant des délais de réponse assez longs dont doivent être informés les patients et leur famille (**PNDS, 2019**).⁷

4.4. Traitement :

Les thérapeutiques destinées aux patients atteints d'hémophilie A ont beaucoup évolués. Le traitement actuel est essentiellement préventif et consiste en des perfusions de concentrés thérapeutiques de FVIII (**Abdi, 2014 ; Llasera, 2017**). Ce traitement substitutif a pour but de corriger le déficit en FVIII afin de permettre une hémostasie normale (**Abdi, 2014**).

Trois types de produits thérapeutiques existent actuellement : le FVIII d'origine plasmatique (pFVIII) et le FVIII recombinant (rFVIII), et plus récemment, les facteurs à demi-vie prolongée dits « long acting » (**Abdi, 2014 ; Llasera, 2017**). Le pFVIII est purifié à partir d'un mélange de plasma de milliers de donneurs sains et subit divers traitements d'inactivation virale. Les rFVIII sont, quant à eux, produits par génie génétique à partir des séquences d'Acide Désoxyribonucléique (ADN) de deux donneurs caucasiens (**Viel et al., 2009**). Les FVIII thérapeutiques ont une demi-vie moyenne de 12 à 14 heures après administration (**Bjorkman et al., 2009**). Les « long acting » sont des concentrés d'origine recombinante à durée d'action prolongée (**Llasera, 2017**).

Le traitement substitutif peut être pratiqué ponctuellement à chaque épisode hémorragique ou intervention chirurgicale. C'est le traitement à la demande. Pour être efficace, il doit être débuté le plus précocement possible après le début de saignement et être poursuivi selon l'importance de l'hémorragie, de son évolution et du risque de récurrence. Les études rétrospectives et prospectives ont montré les limites de ce type de traitement sur la prévention l'arthropathie hémophilique. Il a donc été proposé un traitement préventif par injection régulière de FAH durant la petite enfance et au moins jusqu'à l'adolescence. Il s'agit du traitement prophylactique (**Guérois, 2009**).

D'autres traitements sont également utilisés pour traiter les hémorragies chez patients atteints d'HA, notamment le FVIIa recombinant et un complexe pro-thrombotique, le Factor Eight Inhibitor Bypassing Activity (FEIBA) contenant plusieurs facteurs de la coagulation (**Mehta et al., 2006**). Ces deux préparations sont utilisées chez des patients hémophiles en échec de traitement avec le FVIII thérapeutique (**Abdi, 2014**).

D'un autre côté, et comme perspective de traitement de hémophilie A. La thérapie génique se propose de réapprendre l'organisme du patient à fabriquer le facteur déficient, en lui injectant le gène de facteur manquant, associé à un virus rendu inoffensif qui permet au gène d'entrer dans les cellules du foie et de s'insérer dans l'ADN de ces cellules qui dès lors produisent le facteur déficient. Annoncé depuis une quinzaine d'années, la thérapie génique est enfin accessible, plusieurs essais cliniques sont en cours avec des résultats prometteurs puisque avec un recul de 1 à 6 ans. Des hémophiles sévères ont vu les signes de la maladie s'atténuer

considérablement voire disparaître, tandis que dans le sang. Les dosages montraient l'apparition du facteur jusque-là absent. Dans certaines études, le taux atteint était proche de la normale. Certes, avant de parler de guérison, il reste à savoir combien de temps de maintiendra la production de facteur par l'organisme, et à s'assurer de l'innocuité de ces traitements, mais l'espoir généré par ces résultats est important (Schved, 2019).

5. Facteurs de risques :

5.1 Facteurs de risques génétiques pour les inhibiteurs dans l'hémophilie A :

5.1.1. Origine ethnique :

Une fréquence deux fois plus élevée d'inhibiteurs a été décrite chez les Afro-Américains par rapport aux Caucasiens, mais la raison n'a pas été complètement élucidée. Il existe six haplotypes F8 distincts identifiés désignés H1 à H6. Deux d'entre eux (H1 et H2) se retrouve dans tous les groupes raciaux, mais trois (H3, H4 et H5) se trouvent uniquement dans la population noire et H6 se trouve uniquement chez les Chinois. Étant donné que les concentrés de FVIII à la fois de type dérivé du plasma et de type recombinant comprennent principalement H1 et H2, une inadéquation entre l'haplotype F8 des patients et la molécule FVIII perfusée a été suggérée pour contribuer au risque d'inhibiteur. Dans l'étude HIGS (Hemophilia Inhibitor Genetics Study), l'association n'est cependant pas restée significative après ajustement pour le type de mutation F8 et les allèles HLA de classe II. Par conséquent, pour l'instant, il n'est pas possible de conclure qu'un mésappariement entre les haplotypes du FVIII en soi sera associé à un risque d'inhibiteurs, mais des marqueurs supplémentaires, par exemple HLA et les molécules de régulation immunitaires, peuvent être plus déterminants (Bardi et Astermark, 2015)

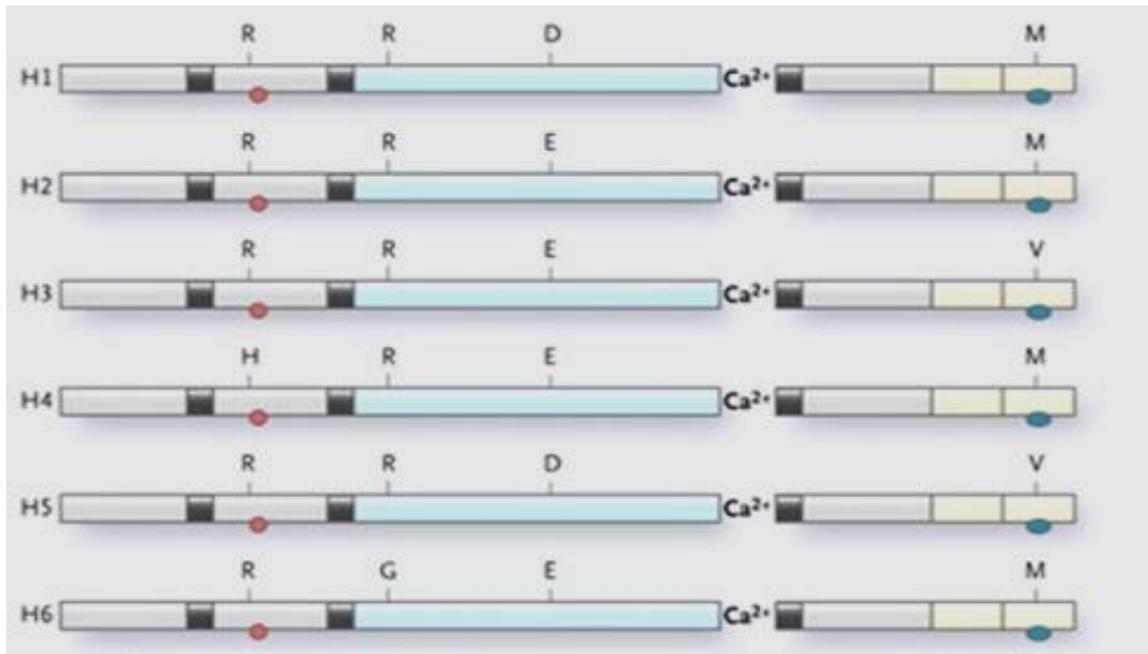


Figure 31 : Représentation schématique des six haplotypes F8 (Viel *et al.*, 2009).

5.1.2. Type de mutation F8 causale :

Le facteur de risque le plus évalué pour les inhibiteurs est la mutation causale au niveau de gène F8. L'inversion de l'intron 22 est la mutation la plus courante dans la population de patients atteints d'HA sévère et, au fil des ans, a été considérée comme une mutation à haut risque. Cependant, dans la plus des cohortes, une fréquence d'inhibiteurs de seulement 20% a été reportée, c'est-à-dire que 80% des patients ne développeront aucun inhibiteur. Une raison potentielle à cela a été récemment décrite par Paschke *et al.*, qui ont rapporté que les patients présentant l'inversion de l'intron 22 peuvent être tolérés malgré l'absence d'antigène circulant (réaction croisée négative) en raison de l'ARNm et des peptides FVIII intracellulaires. On ne sait pas si cela peut également être valable aussi pour d'autres mutations. En 2012, Gouw *et al.*, ont réalisé une revue systématique pour fournir des estimations plus précises du développement d'inhibiteurs pour les différents types de mutations chez les patients du HA sévère. Les données de 5383 patients dans 30 études ont été incluses, dont 1029 étaient des patients inhibiteurs. Le risque associé aux délétions importantes et aux mutations non-sens avéré que pour les inversions de l'intron 22, alors que le risque chez les patients avec des inversions de l'intron 1 et des mutations au site d'épissage était égal à une inversion de l'intron 22 et le risque de petits délétions/insertions et de mutations faux-sens était plus faible. L'opinion actuelle sur les mutations F8 à haut risque est qu'une classification en sous-groupe des types des mutations moins grave est nécessaire, telles que les mutations faux-sens, ainsi

que des mutations au site d'épissage impliquant des nucléotides conservés aux positions 1 et 2, et de petites délétions sans séquence A, qui confèrent toutes un risque relativement élevé de développement d'inhibiteurs (**Bardi et Astermark, 2015 ; Howard *et al.*, 2011 ; Gouw *et al.*, 2012**).

5.1.3. Allèles de HLA (Human Leucocyte Antigen) de classe II :

Le système HLA de classe II montre un degré élevé de variabilité entre les patients et les groupes raciaux. (**Bardi et Astermark, 2015 ; Pandey *et al.*, 2013**) Comme des allèles définissent quels peptides de la molécule infusée sont présentés aux cellules T auxiliaires naïves, il est évident qu'ils joueront un rôle central dans la réponse immunitaire qui aura lieu par la suite. Il a cependant été difficile d'identifier systématiquement les allèles à risque, dont la raison n'est pas claire, mais est probablement due à la promiscuité du système et à la liaison non spécifique des peptides. Les allèles à risque les plus cohérents décrits sont les HLA DRB1*1501 et HLA DQB*0602 (**Bardi et Astermark, 2015 ; Hay *et al.*, 1997**). Un OR pour l'haplotype DRB1*15/DQB1*0602 de 1.9 (P<0.05) chez les patients inhibiteurs a été décrit (**Bardi et Astermark, 2015 ; Pavlova *et al.*, 2009**). Cependant, d'autres allèles ont également été proposés. **Pergantou *et al.***, par exemple, a conçu une étude pour étudier les corrélations entre le gène F8, l'inversion de l'intron 22, les allèles et haplotypes HLA et certains polymorphisme de cytokines, et les inhibiteurs du FVIII chez 52 enfants grecs atteints d'HA sévère exclusivement traités avec des concentrés recombinants et décrit une association avec HLA DRB1*01, DRB1*01:01 et DQB1*05:01 (**Bardi et Astermark, 2015 ; Pergantou *et al.*, 2013**).

5.1.4. Molécules de régulation immunitaire :

L'influence des molécules polymorphes de régulation immunitaire sur le risque d'inhibiteur a été suggérée dans diverses études et cohortes, à commencer par les résultats initiaux des gènes IL-10, TNFA et CLTA4 dans l'étude Malmo International Brothers (MIBS) (**Bardi et Astermark, 2015 ; Astermark *et al.*, 2006a ; Astermark *et al.*, 2007**). Dans cette étude, 164 patients (124 sévères, 40 modérés) dans 78 familles non apparentées atteintes d'HA ont été inclus et l'importance potentielle de divers facteurs génétique a été évaluée. Une fréquence significativement plus élevée d'inhibiteurs a été trouvée chez les patients avec un microsatellite IL10G de 134 pb dans la région de promoteur du gène IL-10 et chez ceux avec un polymorphisme G>A à la position -308 dans la région de promoteur du gène TNFA. Dans les **Astermark *et al.*, 2006a ; Astermark *et al.*, 2006b**) cas de CTLA4, l'allèle a C>T en position -318 était associée à une incidence plus faible d'inhibiteurs indiquant un effet protecteur (**Bardi et Astermark, 2015 ; Astermark *et al.*, 2007**)

Les résultats initiaux de l'étude MIBS ont depuis été reproduits dans plusieurs autres cohortes d'étude. **Pavlova *et al.***, ont réalisé une étude cas-témoins auprès de 260 patients allemands gravement atteints, appariés au type de mutation, atteints d'HA, dont la moitié avaient des antécédents d'inhibiteurs (**Bardi et Astermark, 2015 ; Pavlova *et al.*, 2009**). Une association entre l'allèle A du polymorphisme -308G>A dans le TNFA et le risque d'inhibiteur a été décrite (OR de 4,7 pour le génotype A/A homozygote). De plus, l'allèle -1082G dans la région promotrice de l'IL10 a été rencontré plus fréquemment chez les patients avec inhibiteurs que chez les patients non inhibiteurs (P = 0,008). La même région de l'IL10 était également associée à des inhibiteurs dans une étude de **Pergantou *et al.***, (**Bardi et Astermark, 2015 ; Pergantou *et al.*, 2013**). **Lozier *et al.***, a réalisé une étude cas-témoins de 302 patients avec des inhibiteurs et 633 témoins traités entre 1982 et 2005 aux États-Unis et a trouvé des associations significatives avec le risque d'inhibiteur avec, non seulement IL-10, mais aussi IL11, IL-2 et IL-12 (**Bardi et Astermark, 2015 ; Lozier *et al.*, 2011**). L'effet des haplotypes IL-10 et IL-2 était également plus prononcé chez les sujets séropositifs. Il a été montré que le FVIII associé à des nanoparticules contenant du phosphatidylinositol réduisait le développement d'anticorps neutralisants chez les souris hémophiles A (**Bardi et Astermark, 2015 ; Peng *et al.*, 2010**). Le(s) mécanisme(s) sous-jacent(s) n'est pas clair, mais **Gaitonde *et al.***, ont suggéré qu'il y avait une modification de la molécule Co-stimulatrice CD40 (**Bardi et Astermark, 2015 ; Gaitonde *et al.*, 2012**). De plus, le phosphatidylinositol *in vitro* a augmenté la sécrétion des cytokines régulatrices TGF- β 1 et IL-10, mais a réduit la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-17. Les auteurs ont conclu à partir de leurs données que le phosphatidylinositol réduit l'immunogénicité du FVIII en modulant la maturation des cellules dendritiques et en induisant la sécrétion de cytokines régulatrices. De plus, **Chavas *et al.***, décrit dans une étude de 60 patients brésiliens atteints d'hémophilie A que les haplotypes d'IL-10 définissant des synthèses élevées et faibles étaient associés à un risque d'inhibiteur (**Bardi et Astermark, 2015 ; Chavas *et al.*, 2010**). Ils ont conclu que l'IL-10 est un marqueur génétique du développement d'inhibiteurs, mais que de simples associations ne considérant que la présence ou l'absence d'un seul haplotype ne seront pas suffisantes pour définir pleinement le risque d'inhibiteur. La complexité de la réponse immunitaire au facteur déficient a également été récemment soulignée par les résultats de l'étude de cohorte combinée HIGS (**Astermark *et al.*, 2013**). Dans cette étude, des milliers de SNP de 1081 gènes, principalement des gènes de réponse immunitaire et de modificateur immunitaire, ont été étudiés. Après ajustement pour les facteurs de confusion potentiels, 53 SNP se sont avérés être des prédicteurs significatifs du développement d'inhibiteurs. Huit des

Santagostino *et al.*, ont montré qu'il existe une relation inverse entre l'âge à la première exposition du FVIII et le risque de production un inhibiteur (**Santagostino *et al.*, 2005**). **Goudemand *et al.***, ont constaté que par rapport aux patients plus jeunes, les patients âgés sont plus à risque au premier contact (**Goudemand *et al.*, 2006**). La Concerted Action on Neutralizing Antibodies in severe hemophilia A Study (CANAL study) a également montré une association hautement significative entre l'âge au début de la première exposition et le risque accru de développer des inhibiteurs (**Gouw *et al.*, 2007b**).

En revanche, Il semble que le premier traitement intensif (≥ 5 jours) (**Gouw *et al.*, 2013**) et/ou la chirurgie prédisposent à un risque accru de développer des inhibiteurs (**Gouw *et al.*, 2007b**). En effet, les lésions chirurgicales induisent à l'activation des cellules endothéliales sécrétant des cytokines pro-inflammatoires dans la circulation (**Astermark, 2006a**). Cet environnement pro-inflammatoire est impliqué dans le recrutement et à l'activation des effecteurs du système immunitaire (**Abdi, 2014**).

Concernant le mode d'administration du FVIII, plusieurs équipes ont montré que la prophylaxie régulière débutée à un âge précoce permet d'éviter la formation des inhibiteurs (**Gouw *et al.*, 2013; Santagostino *et al.*, 2005**).

Un autre facteur de risque dépendant du traitement est la nature du produit FVIII thérapeutique injecté. Selon **Goudemand *et al.***, les patients recevant un traitement par le rFVIII ont un risque plus élevé de développer des inhibiteurs que les patients recevant un traitement par le pFVIII (**Goudemand *et al.*, 2006**). Cependant, ce facteur de risque n'a pas été confirmé par d'autres études (**Gouw *et al.*, 2007a; Scharrer *et al.*, 1999**). À ce jour, L'association entre le développement des inhibiteurs et la nature des produits thérapeutiques est encore controversée (**Abdi, 2014**).

5.3. Impact de la COVID-19 sur la vie avec hémophilie :

Récemment, un groupe des scientifiques a mené une étude dans certains pays d'Europe Centrale. Cette étude était un questionnaire composé de 22 questions, 364 personnes ont participé et ont répondu aux questions posées, dont 232 étaient PwH (63.7%) et 132 étaient CPwH (Caregivers of People with Hemophilia) (36.3%). Les résultats ont été analysés à l'aide de statistiques descriptives. L'étude a révélé qu'environ la moitié des PwH (People with Hemophilia) et leurs aidants ou soignants (CPwH) (52,5 %) n'ont signalé aucun changement majeur dans leur vie avec l'hémophilie au cours de la première vague de la pandémie de COVID-19 (mars/avril 2020) (figure 33). Une faible proportion de répondants (12,9 %) ont déclaré avoir éprouvé de l'anxiété et de la pression mentale en vivant avec l'hémophilie pendant la pandémie de COVID-19. La figure 34 révèle que l'aide la plus fréquemment

demandée par les répondants pendant la pandémie de COVID-19 est cohérente entre PwH et CPwH. Dans l'ensemble, l'impact pour les répondants de COVID-19, c'est-à-dire pas de grand changement contre grand changement, ne dépendait pas de l'activité des médias numériques (55,0% contre 45,0%, respectivement) (Banchev *et al.*, 2021).

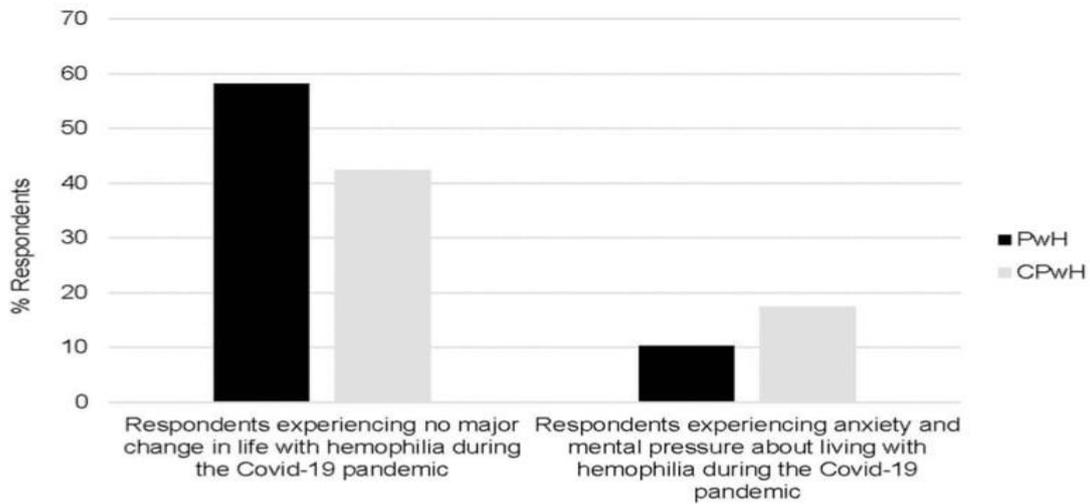


Figure 33 : L'impact de la COVID-19 sur les répondants vivants avec l'hémophilie (Banchev *et al.*, 2021).

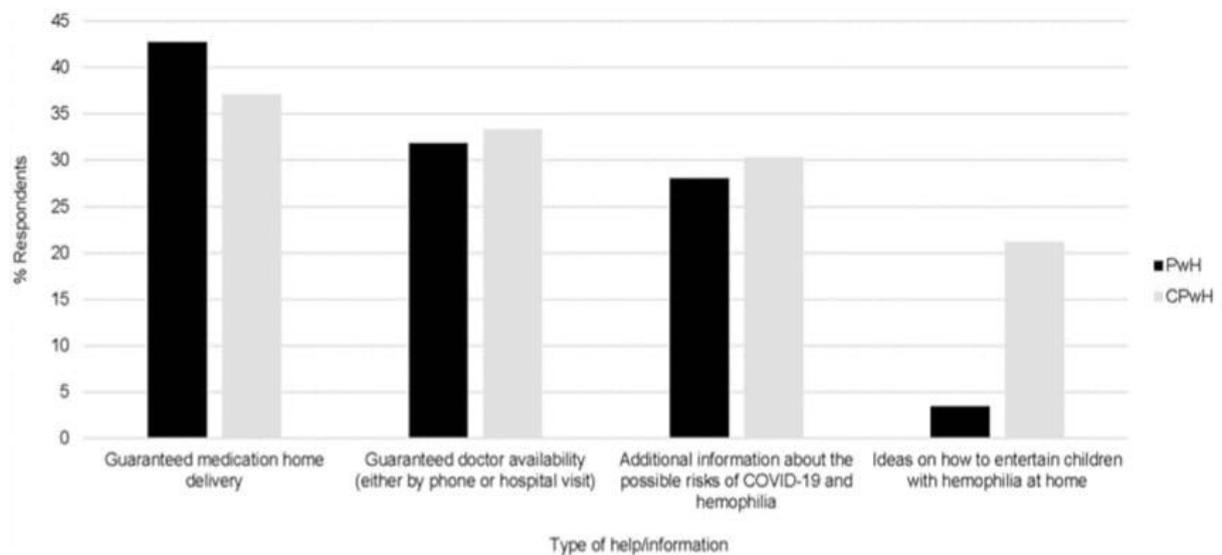


Figure 34 : Type d'aide/d'information le plus fréquemment demandé par les répondants pendant la pandémie de COVID-19 (Banchev *et al.*, 2021).

MATERIELS ET METHODES

1. Présentation de la wilaya de Tlemcen :

La wilaya de Tlemcen se situe à l'extrême ouest de l'Algérie. Elle est limitée au Nord, par la mer méditerranée, à l'Est par la wilaya de Sidi Bel Abbès, au Sud par la wilaya de Naâma, au Nord-Est par la wilaya d'Ain Témouchent et à l'Ouest par le Maroc. Elle occupe une superficie de 9061 km² (Bensaoula *et al.*, 2012).

La population de la wilaya est estimée à 1 029 700 habitants pour une densité de 113 habitants au Km², concentrés essentiellement au Nord (Abid, 2019).



Figure 35 : La carte géographique de la situation de la wilaya de Tlemcen (Aouar *et al.*, 2012).

2. Cadre de l'étude :

Notre étude a eu lieu dans le laboratoire de valorisation des actions de l'homme pour la protection de l'environnement et application en santé publique, en collaboration avec le service d'hémobiologie (laboratoire central) au niveau de Centre Hospitalo-Universitaire CHU de Tlemcen.

3. Source des données et type de l'étude :

Le recueil des données a été extrait à partir de la base des données du registre du service d'hémodiagnostic de CHU Tlemcen. Ce registre comprenait l'ensemble des différentes informations concernant les patients atteints de l'hémophilie au niveau de la wilaya de Tlemcen (nom, prénom, âge, type, sévérité, groupes sanguins, enquête familiale...etc.).

La deuxième partie des données, on était censé l'avoir en effectuant le dosage du FVIII par méthode chromogénique chez la population hémophile A de Tlemcen. Malheureusement, faute de ne pas avoir le réactif à temps, nous nous avons réorienté notre recherche vers une comparative sous forme de méta analyse dans différentes régions du monde.

4. Instrument d'étude :

Dans notre étude on se basait sur des travaux antérieurs de dosage de Facteur VIII par méthode chromogénique réalisés dans différentes régions du monde.

5. Méthode et analyse statistique :

Notre étude a été effectuée sur 87 hémophiles de sexe masculin de différents âges, qui traitent au niveau de service d'hémodiagnostic de CHU Tlemcen.

Les différents types d'hémophilie ont été répartis selon de degré de sévérité (sévère, modérée, mineure),

Les différentes répartitions et comparaisons ont été représentées par les cercles polaires et les histogrammes réalisés par le programme informatique Excel 2010.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. La répartition de l'hémophilie A et B au niveau de la population de Tlemcen :

Tableau 4. La prévalence de l'hémophilie au sein de la population de Tlemcen.

	Nombre de cas	Pourcentage
Hémophilie A	69	79.31%
Hémophilie B	18	20.69%
Total	87	100%

Selon la base des données du registre de service d'hémobiologie de CHU Tlemcen, on constate qu'il y a 87 personnes atteintes d'hémophilie, soit 0.00008 de la population totale de la wilaya de Tlemcen, dont 59 sont des hémophiles A (79.31% de cas) et 18 (20.69%) sont atteintes d'hémophilie B, avec une dominance intégrale des sujets masculins.

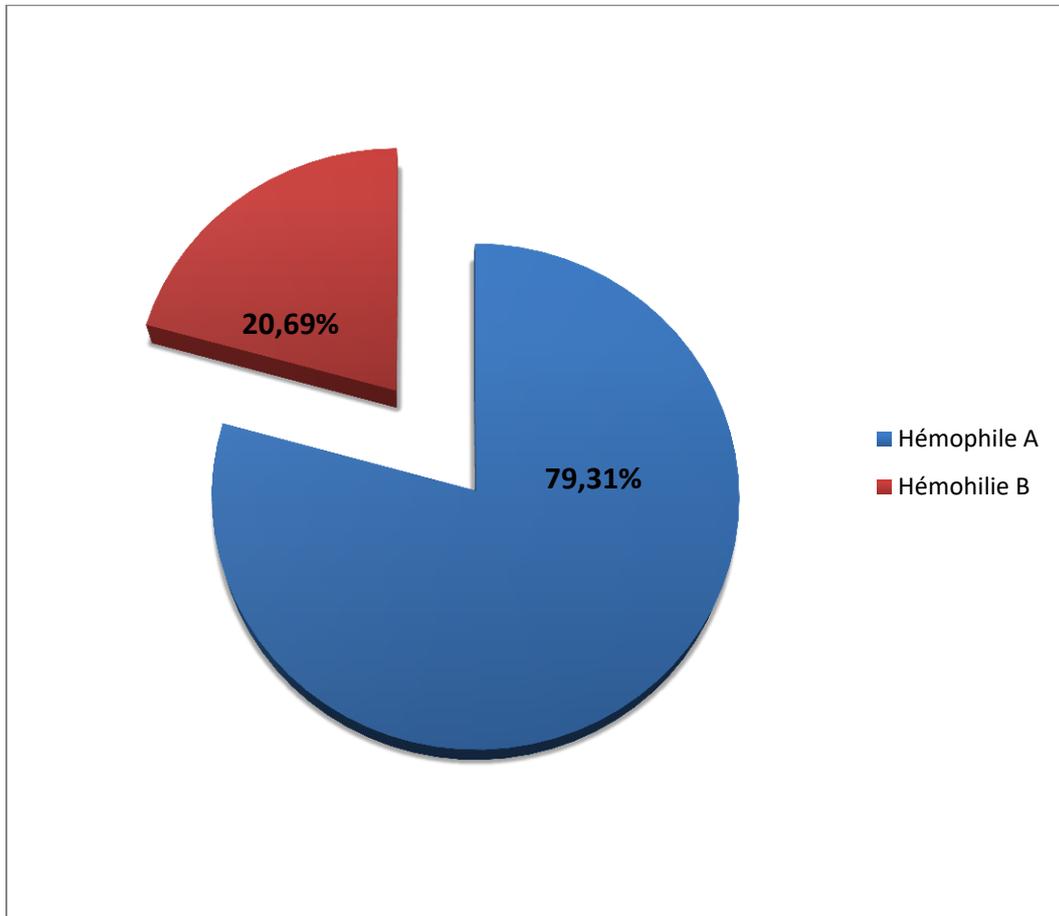


Figure 36 : Les proportions des hémophiles au sein de la population de Tlemcen selon le type d'hémophilie.

2. Proportion de l'hémophile A et B dans la population de Tlemcen comparée avec celle de l'Algérie et celle du monde :

Tableau 5. Proportion des résultats épidémiologiques d'hémophilie de la population de Tlemcen avec celle de l'Algérie et différents pays du monde.

	Tlemcen	Algérie	Tunisie	France	Le monde entier
Hémophilie A	69	1840	308	6910	157517
Hémophilie B	18	460	72	1643	37746
Total	87	2300	380	8553	195236

Le tableau 5 et la figure 37 montrent que la proportion de l'hémophilie au niveau de la population de la wilaya de Tlemcen représente 3.87% de la population hémophile totale en Algérie et 0.046% des hémophiles du monde entier.

En Algérie, le pourcentage des patients de cette maladie hémorragique est de 0.005% de la population totale et de 1.17% des hémophiles selon l'échelle mondiale.

Le pourcentage de la population hémophile de Tlemcen estimé (0.008%) reste similaire à celui de la population atteinte d'hémophilie de l'Algérie (0.005%), supérieur à celui de la Tunisie (0.003%) (ATH, 2013). Cependant, il reste inférieur par rapport à celui de France (0.012%) (www.francecoag.org, 2021).

Au niveau mondial, les personnes atteintes d'hémophilie présentent 0.003% de la population mondiale totale.

De plus, on a constaté que l'hémophilie de type A causée par le déficit ou l'absence totale du FVIII, est plus répandue que l'hémophilie de type B dans le monde avec un pourcentage environ 80%.

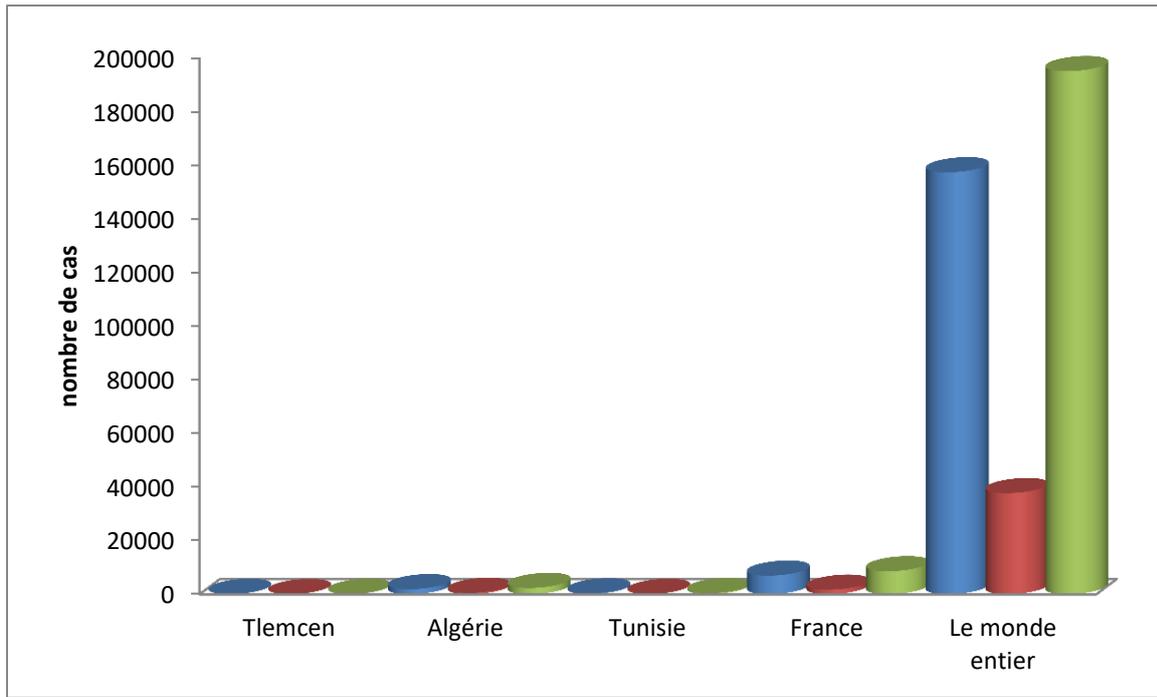


Figure 37 : Comparaison de la fréquence d’hémophilie au sein de la population de Tlemcen par rapport à celles : de l’Algérie, de la Tunisie, de la France et du monde entier.

3. Répartition de l’hémophilie A et B selon la sévérité :

Le tableau 6 et la figure 38 désignent la répartition de hémophilie A et B selon le type de classification clinique. On a trouvé que l’hémophilie sévère est la plus fréquente de la population des hémophiles au niveau de la wilaya de Tlemcen (52 cas d’hémophilie A et 8 cas d’hémophilie B), avec une proportion de 69%. L’hémophilie modérée est moins répandue que l’hémophilie sévère avec un pourcentage de 26.44% de cas (23 patients). Enfin, le type mineur est le moins fréquent des autres types avec seulement 4 cas et présente 4.56% de la population hémophilique totale.

Concernant l’hémophilie A, la proportion des hémophiles sévères est de 75.36 %, 16.09% pour l’hémophilie modérée et 8.55% sont atteints d’hémophilie mineure. Pour l’hémophilie B, les patients atteints d’hémophilie sévères et modérées représentent respectivement 44.44 % et 50%. En revanche, les cas mineurs forment seulement 5.56% des hémophiles B.

Tableau 6. La répartition d’hémophilie selon le degré de sévérité.

	Sévère	Modérée	Mineure
Hémophilie A	52	8	3
Hémophilie B	8	9	1
Total	60	23	4

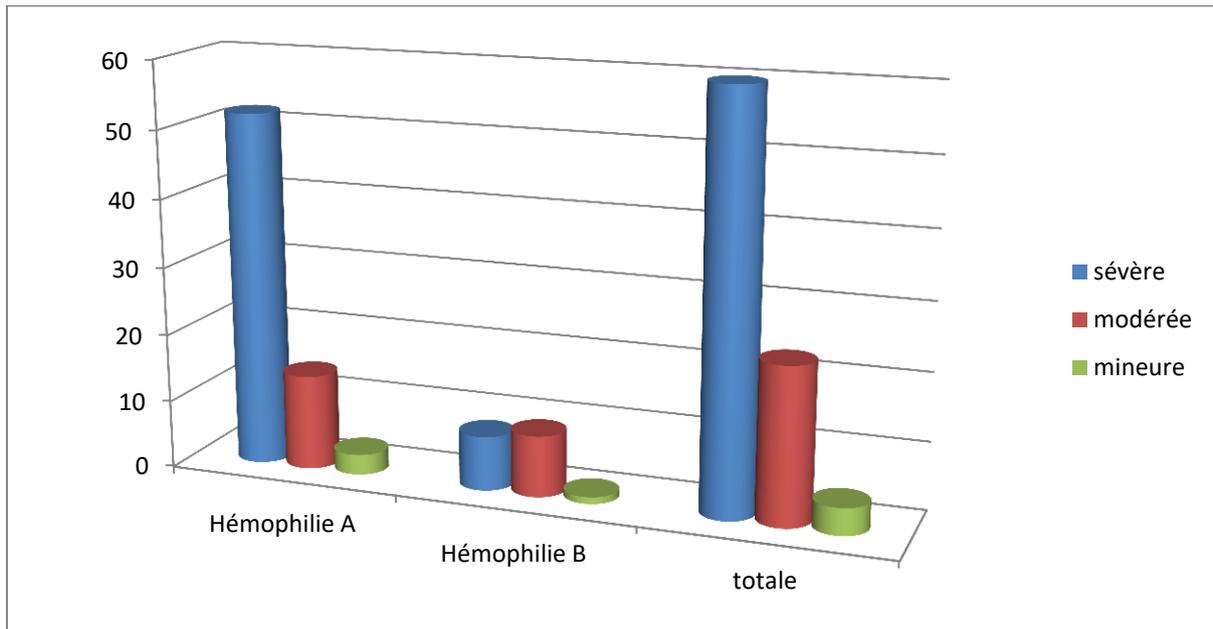


Figure 38 : La répartition de l'hémophilie A et B selon la sévérité au niveau de la population de Tlemcen.

4. Répartition de l'hémophilie A et B selon les groupes sanguins ABO et Rhésus :

Selon les données de registre de service d'hémodiagnostic de CHU Tlemcen, seulement 51 atteints d'hémophilie avaient la variable groupes sanguins.

La répartition de l'hémophilie selon les groupes sanguins mentionnée dans la figure 38 montre que le groupe sanguin O+ est le plus dominant avec un pourcentage de 45%, suivi de groupe sanguin A+ (23%), puis le groupe sanguin B+ avec 18%. Et enfin, le groupe sanguin AB+ avec un taux de 8%.

À l'opposé, les groupes sanguins O-, A- et B- représentent 2% chacun de la population hémophile.

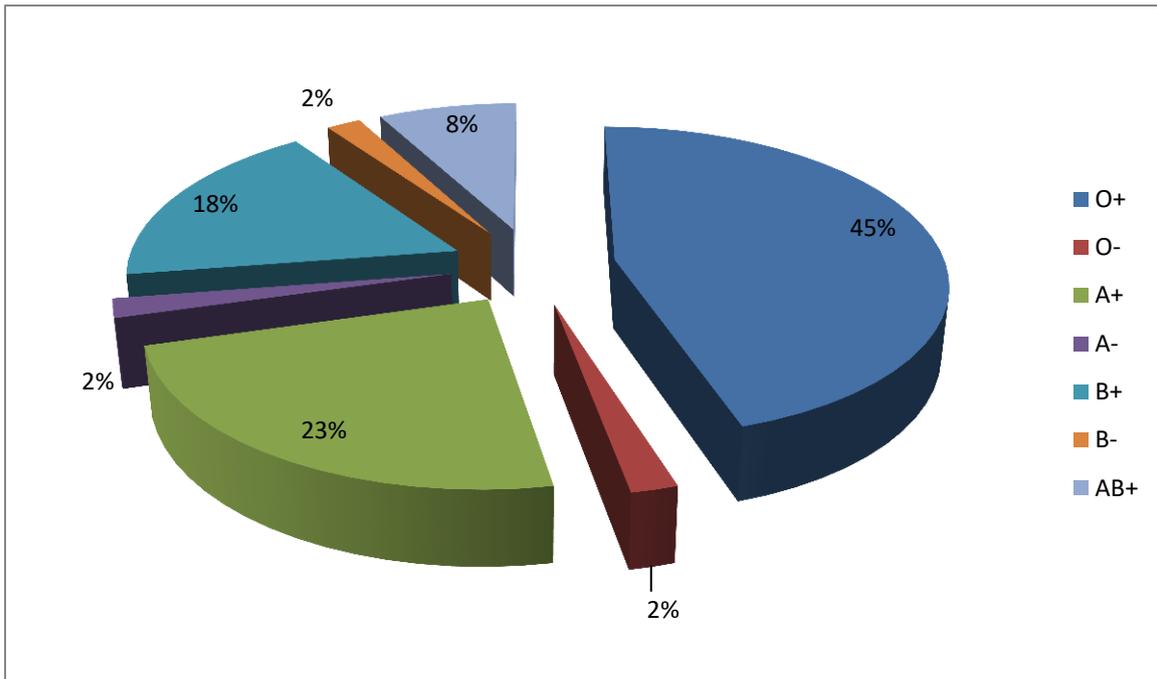


Figure 39 : Répartition d’hémophilie A et B selon le type de groupe sanguins.

5. Comparaison de résultats obtenus de la mesure de l’activité de FVIII par méthode chromogénique dans différentes études de monde :

En raison au retard de l’arrivée de coffret de réactifs, nous n’avons pas pu effectuer le dosage du FVIII par la méthode chromogénique chez la population hémophile A de Tlemcen au service d’hémobiologie de CHU Tlemcen, ainsi que le manque de données sur le dosage par cette méthode à l’échelle nationale, nous nous sommes focaliser sur la comparaison des résultats de certains études menées dans diverses régions dans le monde.

5.1. Répétabilité et reproductibilité du dosage de FVIII par méthode chromogénique :

Dans une étude effectuée au laboratoire d’hémostase de l’Établissement Français de Sang de Besançon. L’objectif principal de ce travail été de mettre en place la technique de dosage de FVIII par méthode chromogène au sein de ce laboratoire afin que cette méthode de mesure soit disponible et utilisée dans les cas où elle apporte un bénéfice par rapport à la méthode chromométrique en une seule étape utilisée en routine (Poret et Mourey, 2014).

La répétabilité a été évalué à l’aide d’un pool de plasma thérapeutique pur et dilué dans du diluant (HermosIL* Factor Diluent, Instrumentation Laboratory). Chaque dilution a été analysée vingt fois par le même opérateur, dans le laps de temps le plus courte possible et dans les mêmes conditions. La reproductibilité a été estimée à l’aide de contrôles ont été utilisés, deux évaluant la gamme haute et un évaluant la gamme basse. Les contrôles ont été

passés sur huit jours distincts avec 1 à 3 mesures par jour réalisée à différents moment (**Poret et Mourey, 2014**).

Tableau 7. Répétabilité et reproductibilité du dosage du Facteur VIII par méthode chromogénique (**Poret et Mourey, 2014**).

			Moyenne (%)	Écart type	C.V. (%)
Répétabilité	Gamme Haute	Pool plasmatique pur	137.75	2.90	2.11
		Pool plasmatique 1/2	66.55	2.28	3.42
		Pool plasmatique 1/4	33.28	1.53	4.60
		Pool plasmatique 1/5	27.12	0.58	2.12
	Gamme Basse	Pool plasmatique 1/10	10.48	0.23	2.20
		Pool plasmatique 1/20	4.28	0.19	4.33
reproductibilité	Gamme Haute	HermosIL* Normal Control Assayed	95.76	10.67	11.14
		HermosIL* Low Abnormal Control Assayed	30.38	3.37	11.10
	Gamme Basse	HermosIL* Special Test Control Level 2	20.64	1.04	5.04

Le tableau 7 montre que les coefficients de variation (C.V.) obtenus lors de l'étude de la répétabilité sont tous inférieurs à 5 %, ceci quel que soit le niveau de mesure et aussi bien pour la gamme haute que la gamme basse. Concernant la reproductibilité, les 15 valeurs obtenues pour les deux niveaux évaluant la gamme haute donnent une moyenne de 95,76 % et 30,38 % avec un coefficient de variation inférieur à 12 % dans les deux cas. Les 15 valeurs

obtenues pour le niveau évaluant la gamme basse donnent une moyenne de FVIII:C-chr (méthode chromogénique) a 20,64 % avec un coefficient de variation de 5,04 % (**Poret et Mourey, 2014**).

Dans le même contexte, une autre étude a été menée au France en 2017. Pour la répétabilité, les deux niveaux de contrôles (normal et bas) ainsi que le contrôle bas dilué au tiers été analysés 20 fois consécutives, dans des conditions identiques par le même opérateur au sein de la même série. Tandis que pour la reproductibilité, les résultats des contrôles internes de chaque série réalisés sur plusieurs jours et sur trois niveaux (un pour les valeurs hautes, deux pour les valeurs basses) ont été utilisés (nombre d'échantillon (n)=15). Et ils trouvées les résultats suivantes (**Llasera, 2017**) :

Tableau 8. Résultats des moyennes et des (C.V.) des dosages de FVIII par méthode chromogénique (**Llasera, 2017**).

		Biophen FVIII :C (Hyphen)		
		Contrôle normal	Contrôle moyen	Contrôle bas
La répétabilité	Moyenne (%)	92.4	38.8	10.0
	Écart type	1.9	1.2	0.2
	C.V. (%)	3.1	3.2	2.0
La reproductibilité	Moyenne (%)	84.8	36.8	3.9
	Écart type	2.8	2.1	0.1
	(C.V.) (%)	3.4	5.6	2.4

D'après (**Llasera, 2017**), les résultats obtenus de cette étude sont satisfaisantes avec des (C.V.) conformes aux limites acceptables fixées au préalable selon les normes d'acceptabilité en hémostase de GFHT 2014. Les (C.V.) de la répétabilité étaient inférieures à 0.75 fois les C.V. maximums recommandés et les (C.V.) de reproductibilité inférieurs au (C.V.) maximums recommandés.

Cependant, le traitement utilisé dans ces deux études n'était pas le même. Mais, lorsque l'on compare les résultats obtenus dans ces deux études, on constate qu'il y a une similarité concernant le pourcentage de (C.V), les coefficients de variation obtenus lors de la répétabilité des deux études sont inférieurs à 5%.

En revanche, les résultats obtenus lors de reproductibilité des deux études sont dissimilaires. Pour **Poret et Mourey. (2014)**, les coefficients de variation sont supérieurs à 5% et inférieurs à 12%. Tandis que, sont tous inférieurs à 5% pour le travail de **Llasera. (2017)**.

5.2. Comparaison entre les résultats des deux méthodes de dosage, la méthode chromogénique et la méthode chromométrique :

D'après l'étude de **Llasera. (2017)**. Chaque échantillon a été analysé sur l'Automate ACL TOP successivement selon les deux méthodes, méthode chromogénique et méthode chromométrique, le même jour, sur le même aliquote et dans la même séries. Deux dilutions ont été réalisées pour confirmer nos résultats et s'affranchir d'un éventuel anticoagulant le type lupique, la valeur retenue correspond à la moyenne des résultats des deux dilutions.

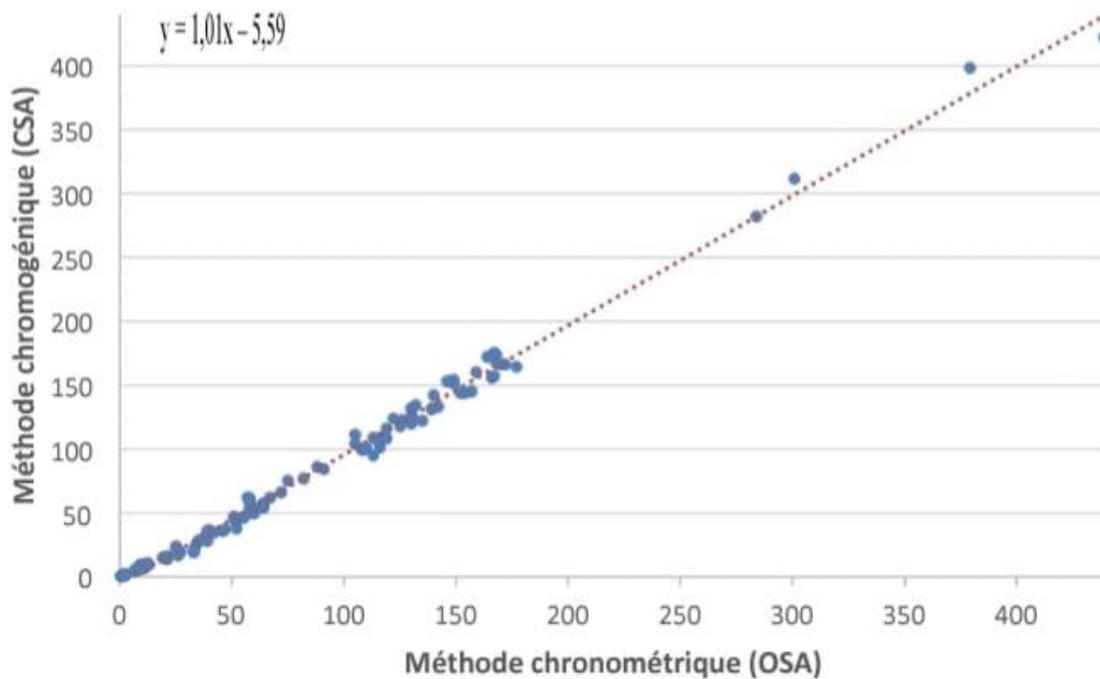


Figure 40 : Corrélation FVIII : OSA / FVIII : CSA (Llasera, 2017).

Ainsi donc la figure 40 met en évidence que les deux méthodes sont bien corrélées avec un coefficient de corrélation r^2 à 0.997 ($p < 0.0001$ selon le test de Spearman) (**Llasera, 2017**).

Selon l'Institut national d'excellence en santé et en services sociaux (**INESSS, 2017**) au Québec Canada, En 2011, **Pouplard et al. (2011)** ont mené une étude multicentrique visant l'analyse d'échantillons de plasmas enrichis de quatre concentrations connues de Xyntha^{MC}. La trousse chromogène Biophen FVIII:C^{MC} a été utilisée par tous les laboratoires. Des

variations inter-laboratoires allant de 2,5 % à 10,6 % ont été observées entre les deux méthodes. Selon les auteurs, la méthode chromogène est toutefois plus reproductible avec 5,1 % à 7,2 % de coefficient de variation. Des variations inter-laboratoires ont également été observées avec un coefficient de variation de l'ordre de 0,5 % à 17,1 %. Les auteurs concluent que le dosage chromogène est plus précis, comme le témoigne un coefficient de variation allant de 1,2 % à 9,5 %.

Tableau 9. Reproductibilité et répétabilité du dosage du facteur VIII par les méthodes chromogène et chromométrique en un temps avec différents standards (Pouplard *et al.*, 2011).

Reproductibilité et répétabilité des méthodes	Méthode chromométrique/plasma (n=6)				Méthode chromométrique/RALF S (n=6)				Méthode chromogène/plasma (n=6)			
Concentration connue (UI/dl)	92	64	36	16	92	64	36	16	92	64	36	16
Dosage* (UI/dl)	73 ± 4,7	51 ± 3,0	27 ± 2,3	14 ± 1,4	91 ± 3,3	64 ± 1,6	33 ± 1,7	18 ± 1,9	101 ± 5,5	71 ± 3,6	38 ± 2,1	20 ± 1,4
(C.V.) %	6.5	5.8	8.5	9.2	3.7	2.5	5.0	10.6	5.4	5.1	5.6	7.2
Concentration connue (UI/dl)	92	64	36	16	92	64	36	16	92	64	36	16
Dosage* (UI/dl)	2,1-9,4	3,4-12,3	4,1-17,1	3,2-11,2	2,1-9,8	0,5-15,0	2,4-13,3	3,2-13,9	1,2-7,9	2,6-7,7	2,7-9,5	2,7-8,5
(C.V.) %	1,4-8,7	1,7-6,3	1,1-4,7	0,5-1,7	1,8-8,8	0,2-9,8	0,8-4,2	0,6-2,6	2,1-7,8	2,6-7,7	1,0-3,4	0,6-1,7

En outre, l'étude réalisée par **Poret et Mourey. (2014)**, en comparant les résultats obtenues par les deux méthodes, ils ont conclues que :

La comparaison des deux techniques de mesure du facteur VIII:C a été réalisée sur 46 échantillons pour lesquels le facteur VIII:C a été mesuré à la fois par méthode FVIII:C-1 et FVIII:C-chr. L'équation de la droite de corrélation des deux techniques pour l'ensemble de ces 46 échantillons est: $y = 1,26x - 8,28$ avec un r^2 à 0,93. Les plasmas de 19 patients atteints d'hémophilie A modérée ou mineure ont été analysés à la fois par méthode FVIII:C-1 et FVIII:C-chr. Le ratio FVIII:C-chr/FVIII:C-1 a ensuite été calculé pour chaque patient afin de mettre en évidence une éventuelle discordance entre les deux méthodes de dosage. Le seuil de discordance entre les deux techniques a été défini par une différence supérieure ou égale à deux entre le taux mesuré par la technique chromométrique en un temps et par la technique chromogénique, soit un ratio FVIII:C-chr/FVIII:C-1 $\leq 0,5$ ou ≥ 2 . Les ratios obtenus pour 4 de ces 19 patients sont en faveur d'une discordance allant toujours dans le sens d'une surestimation du FVIII:C par la technique chromométrique en 1 temps. Un patient présente une vraie discordance avec un ratio à 0,24 (FVIII:C-chr = 5,4 % et FVIII:C-1 = 22,2 %). Trois autres patients présentent des ratios très proches du seuil de discordance, à 0,52 pour l'un et 0,57 pour les deux autres.

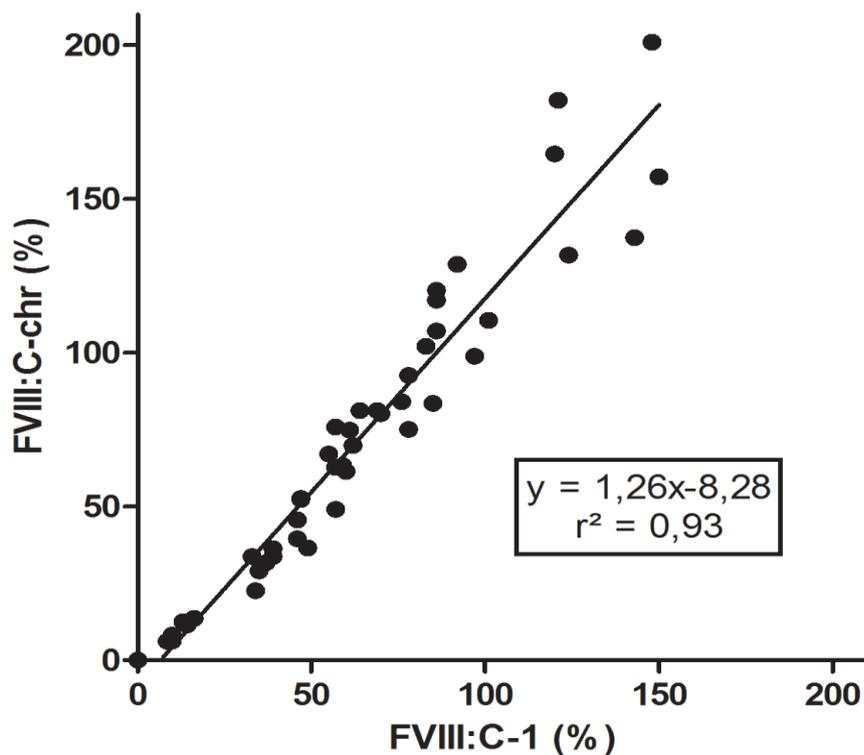


Figure 41 : Comparaison des deux techniques de dosage du facteur VIII (méthode chromogénique et chromométrique en un temps), n=46 (Poret et Mourey, 2014).

FVIII:C-chr = facteur VIII par méthode chromogénique ; FVIII:C-1 = facteur VIII par méthode chromométrique en un temps.

D'après **Poret et Mourey. (2014)**, les performances de répétabilité et de reproductibilité retrouvée aux laboratoires pour le dosage FVIII par méthode chromogénique sont excellentes. En ce qui concerne la comparaison avec la méthode chromométrique en cours au laboratoire, la corrélation est elle aussi bonne en considérant l'ensemble des mesures effectuées. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature. Aussi, pour les résultats de **Llasera. (2017)**, sont en accord avec les données de la littérature ce qui concerne les FVIII recombinants dits conventionnels qui peuvent en effet être dosés à la fois par la méthode chromogénique ou chromométrique.

CONCLUSION GENERALE

Le HA ou déficit congénital en FVIII, est un trouble hémorragique lié au chromosome X, provoqué par une carence ou l'inactivité du FVIII, causé par des mutations hétérogènes du gène responsable de FVIII (gène F8).

Les mécanismes de l'hémostase se divisent en trois étapes : hémostase primaire, hémostase secondaire (coagulation) et fibrinolyse.

La cascade de coagulation est une chaîne de réactions enzymatique, basée sur la formation de fibrine comme le résultat de deux processus complémentaires: la coagulation (représentée par la thrombine) et l'activation plaquettaire. Le modèle cellulaire décrit la coagulation en trois principales étapes qui se chevauchent ; initiation, amplification et propagation.

Le facteur VIII est un cofacteur enzymatique synthétisé généralement par le foie, qui joue un rôle très important dans la coagulation sanguine. En cas de déficit de FVIII, qualitativement ou quantitativement, une pathologie hémorragique survient : il s'agit de HA. Comme prospective de traitement d'hémophilie A. La thérapie génique se propose de réapprendre l'organisme du patient à fabriquer le facteur déficient et l'espoir généré par ces résultats est important.

L'objectif de notre travail englobe la caractérisation de la population hémophiles A de Tlemcen et la comparaison de dosage par méthode chromogénique du FVIII dans différentes régions de monde.

D'une part, cette étude a porté sur l'examen des informations obtenues par la base des données de registre du service d'hémobiologie au sein de la population hémophilie A de Tlemcen, tels que ; le type d'hémophilie, la classification par rapport au degré de sévérité et le groupes sanguins...etc. Nous avons recensées 87 personnes de sexe masculin atteintes d'hémophilie au niveau de la wilaya de Tlemcen, 69 sont des hémophiles A et 18 sont des hémophiles B. dont 60 sont sévères, 23 sont modérées et 4 sont des hémophiles mineurs.

L'étude statistique à concerner la répartition des proportions de l'hémophilie A et B chez la population hémophile de Tlemcen, la comparaison de nos résultats avec ceux de l'Algérie et du monde, la classification selon le degré de sévérité et enfin la répartition selon les groupes sanguins.

D'autre part, nous avons comparés les résultats des études portant le dosage du FVIII dans diverses régions du monde. Ces recherches scientifiques ont permis de mesurer l'activité de FVIII et faire une étude comparative avec les résultats de méthode chromométrique.

Dans la lumière de cette étude, et en termes de perspectives :

- Refaire cette étude et évaluer le dosage de FVIII par méthode chromogénique chez la population hémophilie A de Tlemcen. Tenant compte du fait que le service d'hématologie de CHU Tlemcen va effectuer cette méthode bientôt.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abdi M. (2014). Contribution à l'étude moléculaire de l'hémophilie A dans la population Algérienne. Thèse de doctorat LMD, Université des Sciences et de la Technologie d'Oran «MOHAMED BOUDIAF». 218 pages.

Abid L. (2019). Santemaghreb la guide de la médecine et de la santé Maghreb.

Adams RL, Bird RJ. (2009). Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. *Nephrology (Carlton)* **14**: 462-470.

Adcock M, Strandberg K, Shima M, Marlar RA. (2018). Advantages, disadvantages and optimization of one-stage and chromogenic factor activity assays in haemophilia A and B. *International journal of Laboratory Hematology*. Page 624.

Allali T, Attouche R, Abdelaziz F. (2019). Mémoire de fin étude, Département de pharmacie, Université de Mouloud Mammeri Tizi Ouzou. 115 pages.

Aouar Metri A, Sidi-Yakhlef A, Biémont C, Saïdi M, Chaïf O, Ouraghi SA. (2012). A genetic study of nine populations from the region of Tlemcen in Western Algeria: a comparative analysis on the Mediterranean scale. *Anthropological Science* ; 120, 209-216. <http://doi.org/10.1537/ase.120618>.

Association Tunisienne de l'Hémophilie. (2013). L'association tunisienne des hémophilies célèbre la journée mondiale de l'hémophilie. David H.

Astermark J (2006a) Basic aspects of inhibitors to factors VIII and IX and the influence of non-genetic risk factors. *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia* **12 Suppl 6**: 8-13; discussion 13-14.

Astermark J, Donfield SM, Gomperts ED, et al., (2013). Hemophilia Inhibitor Genetics Study (HIGS) Combined Cohort. The polygenic nature of inhibitors in hemophilia A: results from the Hemophilia Inhibitor Genetics Study (HIGS) Combined Cohort. *Blood*; 121:1446–54.

Astermark J, Oldenburg J, Carlson J, et al., (2006). Polymorphisms in the TNFA gene and the risk of inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood*;108:3739–45.

Astermark J, Oldenburg J, Pavlova A, Berntorp E, Lefvert AK; MIBS Study Group. (2006). Polymorphisms in the IL10 but not in the IL1beta and IL4 genes are associated with inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood*;107: 3167–72.

Astermark J, Wang X, Oldenburg J, Berntorp E, Lefvert AK; MIBS Study Group. (2007). Polymorphisms in the CTLA-4 gene and inhibitor development in patients with severe hemophilia A. *J Thromb Haemost*;5:263–5.

B

Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Giannelli F. (2002). Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood* **99**: 168-174.

Bajzar L, Manuel R, Nesheim ME. (1995). Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *The Journal of biological chemistry* **270**: 14477-14484.

Banchev A, Batorova A, Faganel Kotnik B, Csongor Kiss Puras G, Zapotocka E Zupancic-Salek S. (2021). A Cross-National Survey of People Living with Hemophilia: Impact on Daily Living and Patient Education in Central Europe. *Patient Preference and Adherence* 2021:15.

Bardi E, Astermark J. (2015). Genetic risk factors for inhibitors in haemophilia A. *European Journal of Haematology* 94 Suppl. 77 (7–10).

Benajiba N, EL Boussaadni Y, Aljabri M, Bentata Y, Amrani R, Rkain M. (2014). Hémophilie: état des lieux dans un service de pédiatrie dans la région de l'oriental du Maroc. *Pan African Medical Journal – ISSN: 1937- 8688* (www.panafrican-med-journal.com). Published in partnership with the African Field Epidemiology Network (AFENET). (www.afenet.net).

Bendi-hadji M, Bellahcene A. (2017). Étude des facteurs de risque d'apparition des Allo-Anticorps Anti Facteur VIII au cours de l'hémophilie A : à propos d'une série de cas suivis au CHU Tlemcen. Thèse de doctorat, DEPARTEMENT DE PHARMACIE Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen Faculté de Médecine Département de Pharmacie. 110 pages.

Bensaoula F, Derni I, Adjim M. (2012). TRENTE ANNEES DE PROSPECTION ET DE MOBILISATION DES RESSOURCES EN EAU SOUTERRAINE, PAR FORAGES DANS LA WILAYA DE TLEMCEN. *Larhyss Journal*, ISSN 1112-3680, n° 10, pp. 91-99. https://www.researchgate.net/publication/313553056_trente_annees_de_prospection_et_de_mobilisation_des_ressources_en_eau_souterraines_par_forages_dans_la_wilaya_de_tlemcen?enrichId=rgreq-f9a9a1a280f41254b6ad67a57cae55b3-XXX&enrichSource=Y292ZXJQYWdlOzMzMzU1MzA1NjtBUzo0NjAyNDA3Mjc2MTM0NDJAMTQ4Njc0MTM0ODYzMg%3D%3D&el=1_x_2&_esc=publicationCoverPdf.

Berntorp E. 2001. Immune Tolerance Induction: Recombinant vs. Human-Derived Product. *Haemophilia* 7 (1):109-13.

Biocchi MP, Migeon BR, Pasino M, Lanza T, Bottini F, Boeri E, Molinari AC, Corsolini F, Morerio C, Aquila M. (2005). Familial nonrandom inactivation linked to the

X inactivation centre in heterozygotes manifesting haemophilia A. *Eur J Hum Genet* **13**: 635-640.

Biomnis. (2012). Factuer VIII. *Précis de biopathologie analyses médicales spécialisé*. Page 1

Bjorkman S, Folkesson A, Jonsson S. (2009). Pharmacokinetics and dose requirements of factor VIII over the age range 3-74 years: a population analysis based on 50 patients with long-term prophylactic treatment for haemophilia A. *European journal of clinical pharmacology* **65**: 989-998.

Boneu B, Cazenave JP. (1997). *Introduction à l'étude de l'hémostase et de la thrombose*: Boehringer Ingelheim.

Broze GJ, Jr. (1995). Tissue factor pathway inhibitor. *Thrombosis and haemostasis* **74**: 90-93.

Butenas S, Mann KG. (2002). Blood coagulation. *Biochemistry Biokhimiia* **67**: 3-12.

Butenas S, van 't Veer C, Mann KG. (1997). Evaluation of the initiation phase of blood coagulation using ultrasensitive assays for serine proteases. *The Journal of biological chemistry* **272**: 21527-21533.

C

Casana P, Cabrera N, Cid AR, Haya S, Beneyto M, Espinos C, Cortina V, Dasi MA, Aznar JA. (2008). Severe and moderate hemophilia A: identification of 38 new genetic alterations. *Haematologica* **93**: 1091-1094.

Chaves D, Belis_ario A, Castro G, Santoro M, Rodrigues C. (2010). Analysis of cytokine genes polymorphism as markers for inhibitor development in haemophilia A. *Int J Immunogenet*; 37:79-82.

D

Davie EW, Ratnoff OD. (1964). Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting. *Science* **145**: 1310-1312.

Eaton D, Rodriguez H, Vehar GA. (1986). Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity. *Biochemistry* **25**: 505-512.

Fowler WE, Fay PJ, Arvan DS, Marder VJ. (1990). Electron microscopy of human factor V and factor VIII: correlation of morphology with domain structure and localization of factor V activation fragments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 7648-7652.

Fulcher CA, Roberts JR, Zimmerman TS. (1983). Thrombin proteolysis of purified factor viii procoagulant protein: correlation of activation with generation of a specific polypeptide. *Blood* **61**: 807-811.

Furie B, Furie BC. (2008). Mechanisms of thrombus formation. *The New England journal of medicine* **359**: 938-949.

Furie B, Furie BC. (2008). Mechanisms of thrombus formation. *The New England journal of medicine* **359**: 938-949.

G

Gailani D, Broze GJ, Jr. (1991). Factor XI activation in a revised model of blood coagulation. *Science* **253**: 909-912.

Gaitonde P, Peng A, Straubinger RM, Bankert RB, Balu-Iyer SV. (2012). Downregulation of CD40 signal and induction of TGF- β by phosphatidylinositol mediates reduction in immunogenicity against recombinant human factor VIII. *J Pharm Sci*; 101:48–55.

Giridhara Rao J, Alok S. (2012). Hemophilia: Disease, Diagnosis and Treatment. *Journal of Genetic Syndromes & Gene Therapy* **01**.

Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, Vehar GA, Capon DJ, Lawn RM. (1984). Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* **312**: 326-330.

Goudemand J, Rothschild C, Demiguel V, Vinciguerrat C, Lambert T, Chambost H, Borel-Derlon A, Claeysens S, Laurian Y, Calvez T. (2006). Influence of the type of factor VIII concentrate on the incidence of factor VIII inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A. *Blood* **107**: 46-51.

Gouw SC, Fijnvandraat K. (2013). Identifying nongenetic risk factors for inhibitor development in severe hemophilia a. *Seminars in thrombosis and hemostasis* **39**: 740-751.

Gouw SC, van den Berg HM, Fischer K, Auerswald G, Carcao M, Chalmers E, Chambost H, Kurnik K, Liesner R, Petrini P, Platokouki H, Altisent C, Oldenburg J, Nolan B, Garrido RP, Mancuso ME, Rafowicz A, Williams M, Clausen N, Middelburg RA, Ljung R, van der Bom JG. (2013). Intensity of factor VIII treatment and inhibitor development in children with severe hemophilia A: the RODIN study. *Blood* **121**: 4046-4055.

Gouw SC, van den Berg HM, Oldenburg J, et al., (2012). F8 gene mutation type and inhibitor development in patients with severe hemophilia A: systematic review and meta-analysis. *Blood* 2012;119:2922–34.

Gouw SC, van der Bom JG, Auerswald G, Ettinghausen CE, Tedgard U, van den Berg HM. (2007a). Recombinant versus plasma-derived factor VIII products and the development of inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A: the CANAL cohort study. *Blood* **109**: 4693-4697.

Gouw SC, van der Bom JG, Marijke van den Berg H. (2007b). Treatment-related risk factors of inhibitor development in previously untreated patients with hemophilia A: the CANAL cohort study. *Blood* **109**: 4648-4654.

Graw J, Brackmann HH, Oldenburg J, Schneppenheim R, Spannagl M, Schwaab R. (2005). Haemophilia A: from mutation analysis to new therapies. *Nature reviews Genetics* **6**: 488-501.

Guerois C. (2009). L'hémophilie aujourd'hui: hemophilia today. *Kinesither Rev* **88** :32-6.

H

Hay CR, Ollier W, Pepper L, Cumming A, Keeney S, Goodeve AC, Colvin BT, Hill FG, Preston FE, Peake IR. (1997). HLA class II profile: a weak determinant of factor VIII inhibitor development in severe haemophilia A. UKHCDO Inhibitor Working Party. *Thromb Haemost*; **77**:234-7.

Hoffman M, Monroe DM. (2007). Coagulation 2006: a modern view of hemostasis. *Hematology/oncology clinics of North America* **21**: 1-11.

Hoffman M. (2003). Remodeling the blood coagulation cascade. *Journal of thrombosis and thrombolysis* **16**: 17-20.

Hopff F. (1828). *Ueber die Haemophilie, oder die erbliche Anlage zu tödtlichen Blutungen: Inaugural-Abhandlung*: Becker.

Howard TE, Yanover C, Mahlangu J, Krause A, Viel KR, Kasper CK, Pratt KP. (2011). Haemophilia management: time to get personal? *Haemophilia*; **17**:721-8.

I

Ingram GI, Norris KM. (1976). The history of haemophilia. *J Clin Pathol* **29**: 469-479.

Institut Nationale d'Excellence en Santé et en Services Sociaux (INESSS). (2017). Détermination de la concentration du Facteur VIII par méthode chromogène. 35 pages.

J

Jacquemin M, Neyrinck A, Hermanns MI, Lavend'homme R, Rega F, Saint-Remy JM, Peerlinck K, Van Raemdonck D, Kirkpatrick CJ. (2006). FVIII production by human lung microvascular endothelial cells. *Blood* **108**: 515-517.

Jayandharan GR, Srivastava A. (2011). Hemophilia: Disease, Diagnosis and Treatment. *J Genet Syndr Gene Ther* **S1:005**.

Jayandharan GR, Srivastava A. (2012). Role of molecular genetics in hemophilia: from diagnosis to therapy. *Seminars in thrombosis and hemostasis* **38**: 64-78.

Jayandharan GR, Srivastava A. (2012). Role of molecular genetics in hemophilia: from diagnosis to therapy. *Seminars in thrombosis and hemostasis* **38**: 64-78.

K

Kitchen S, Olson JD, Preston FE. (2013). *Quality in laboratory hemostasis and thrombosis*, 2nd edn. Chichester, West Sussex: Wiley-Blackwell.

L

- Lakich D, Kazazian HH, Jr., Antonarakis SE, Gitschier J. (1993).** Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nature genetics* **5**: 236-241.
- Lenting PJ, van Mourik JA, Mertens K. (1998).** The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. *Blood* **92**: 3983-3996.
- Leuer M, Oldenburg J, Lavergne JM, Ludwig M, Fregin A, Eigel A, Ljung R, Goodeve A, Peake I, Olek K. (2001).** Somatic mosaicism in hemophilia A: a fairly common event. *American journal of human genetics* **69**: 75-87.
- Levinson B, Kenwrick S, Gamel P, Fisher K, Gitschier J. (1992).** Evidence for a third transcript from the human factor VIII gene. *Genomics* **14**: 585-589.
- Levinson B, Kenwrick S, Lakich D, Hammonds G, Jr., Gitschier J. (1990).** A transcribed gene in an intron of the human factor VIII gene. *Genomics* **7**: 1-11.
- Llasera E. (2017).** HEMOPHILIE : L'ARRIVEE DES « LONG ACTING » VA-T-ELLE MODIFIER NOS PRATIQUES BIOLOGIQUES ? Diplôme d'état de docteur en médecine, faculté de médecine, Université de Nantes. 78 pages.
- Lollar P, Knutson GJ, Fass DN. (1984).** Stabilization of thrombin-activated porcine factor VIII:C by factor IXa phospholipid. *Blood* **63**: 1303-1308.
- Lozier JN, Rosenberg PS, Goedert JJ, Menashe I. (2011).** A casecontrol study reveals immunoregulatory gene haplotypes that influence inhibitor risk in severe haemophilia A. *Haemophilia*;17:641-9.

M

- Macfarlane RG. (1964).** An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and Its Function as a Biochemical Amplifier. *Nature* **202**: 498-499.
- Madouni S, Madani K. (2014).** La prise en charge en hémophilie. Mémoire de l'internat, faculté de médecine, Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen. 100 pages.
- Mann KG. (2002).** Biochemistry and physiology of blood coagulation. *ThrombHaemost* ;82:165-74.
- Marlar RA, Kleiss AJ, Griffin JH. (1982).** An alternative extrinsic pathway of human blood coagulation. *Blood* **60**: 1353-1358.
- Maroney SA, Ellery PE, Mast AE. (2010).** Alternatively spliced isoforms of tissue factor pathway inhibitor. *Thrombosis research* **125 Suppl 1**: S52-56.
- Mehta R, Parameswaran R, Shapiro AD. (2006).** An overview of the history, clinical practice concerns, comparative studies and strategies to optimize therapy of bypassing agents. *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia* **12 Suppl 6**: 54-61.

- Monroe DM, Hoffman M. (2006).** What does it take to make the perfect clot? *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **26**: 41-48.
- Monroe DM, Key NS. (2007).** The tissue factor-factor VIIa complex: procoagulant activity, regulation, and multitasking. *J Thromb Haemost* **5**: 1097-1105.
- Mosesson MW. (1992).** The roles of fibrinogen and fibrin in hemostasis and thrombosis. *Seminars in hematology* **29**: 177-188.

N

- Naski MC, Lorand L, Shafer JA. (1991).** Characterization of the kinetic pathway for fibrin promotion of alpha-thrombin-catalyzed activation of plasma factor XIII. *Biochemistry* **30**: 934-941.
- Naylor JA, Buck D, Green P, Williamson H, Bentley D, Giannelli F. (1995).** Investigation of the factor VIII intron 22 repeated region (int22h) and the associated inversion junctions. *Hum Mol Genet* **4**: 1217-1224.
- Ngo JC, Huang M, Roth DA, Furie BC, Furie B. (2008).** Crystal structure of human factor VIII: implications for the formation of the factor IXa-factor VIIIa complex. *Structure* **16**: 597-606.

O

- Oldenburg J, Pavlova A. (2006).** Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX. *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia* **12 Suppl 6**: 15-22.
- Olson ST, Bjork I, Shore JD. (1993).** Kinetic characterization of heparin-catalyzed and uncatalyzed inhibition of blood coagulation proteinases by antithrombin. *Methods in enzymology* **222**: 525-559.
- Osterud B, Bjorklid E. (2006).** Sources of tissue factor. *Seminars in thrombosis and hemostasis* **32**: 11-23.
- Otto JC. (1996).** An account of an hemorrhagic disposition existing in certain families. *Clin Orthop Relat Res*: 4-6.

P

- Pan Y, DeFay T, Gitschier J, Cohen FE. (1995).** Proposed structure of the A domains of factor VIII by homology modelling. *Nature structural biology* **2**: 740-744.
- Pandey GS, Yanover C, Miller-Jenkins LM, Sauna ZE, et al., (2013).** PATH (Personalized Alternative Therapies for Hemophilia) Study Investigators. Endogenous factor VIII synthesis from the intron 22-inverted F8 locus may modulate the immunogenicity of replacement therapy for hemophilia A. *Nat Med*;19:1318–24.
- Pavlova A, Brondke H, Musebeck J, Pollmann H, Srivastava A, Oldenburg J. (2009a).** Molecular mechanisms underlying hemophilia A phenotype in seven females. *J Thromb Haemost* **7**: 976-982.
- Pavlova A, Delev D, Lacroix-Desmazes S, Schwaab R, Mende M, Fimmers R, Astermark J, Oldenburg J. (2009).** Impact of polymorphisms of the major histocompatibility complex class II, interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 genes on inhibitor development in severe hemophilia A. *J Thromb Haemost*; 7:2006–15.

- Payne AB, Miller CH, Kelly FM, Michael Soucie J, Craig Hooper W. (2013).** The CDC Hemophilia A Mutation Project (CHAMP) mutation list: a new online resource. *Human mutation* **34**: E2382-2391.
- Peake IR, Lillicrap DP, Boulyjenkov V, Briet E, Chan V, Ginter EK, Kraus EM, Ljung R, Mannucci PM, Nicolaidis K, et al., (1993).** Haemophilia: strategies for carrier detection and prenatal diagnosis. *Bulletin of the World Health Organization* **71**: 429-458.
- Pellequer JL, Gale AJ, Griffin JH, Getzoff ED. (1998).** Homology models of the C domains of blood coagulation factors V and VIII: a proposed membrane binding mode for FV and FVIII C2 domains. *Blood cells, molecules & diseases* **24**: 448-461.
- Pemberton S, Lindley P, Zaitsev V, Card G, Tuddenham EG, Kemball-Cook G. (1997).** A molecular model for the triplicated A domains of human factor VIII based on the crystal structure of human ceruloplasmin. *Blood* **89**: 2413-2421.
- Pemberton S. (2011).** *The Bleeding Disease: Hemophilia and the Unintended Consequences of Medical Progress*: Johns Hopkins University Press.
- Peng A, Straubinger RM, Balu-Iyer SV. (2010).** Phosphatidylinositol containing lipidic particles reduces immunogenicity and catabolism of factor VIII in hemophilia a mice. *AAPS J*;12: 473–81.
- Perez-Gomez F, Bover R. (2007).** [The new coagulation cascade and its possible influence on the delicate balance between thrombosis and hemorrhage]. La nueva cascada de la coagulacion y su posible influencia en el dificil equilibrio entre trombosis y hemorragia. *Rev Esp Cardiol* **60**: 1217-1219.
- Pergantou H, Varela I, Moraloglou O, Economou M, Spanou K, Kapsimali Z, Constantinidou N, Platokouki H. (2013).** Impact of HLA alleles and cytokine polymorphisms on inhibitors development in children with severe haemophilia A. *Haemophilia*;19:706–10.
- Peters MF, Ross CA. (2001).** Isolation of a 40-kDa Huntingtin-associated protein. *The Journal of biological chemistry* **276**: 3188-3194.
- Peyvandi F, Jayandharan G, Chandy M, Srivastava A, Nakaya SM, Johnson MJ, Thompson AR, Goodeve A, Garagiola I, Lavoretano S, Menegatti M, Palla R, Spreafico M, Tagliabue L, Asselta R, Duga S, Mannucci PM. (2006).** Genetic diagnosis of haemophilia and other inherited bleeding disorders. *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia* **12 Suppl 3**: 82-89.
- Poret E et Mourey G. (2014).** Mise en place de la mesure de l'activité du facteur VIII par méthode chromogénique au laboratoire d'hémostase de l'Établissement Français du Sang de Besançon. Comparaison avec la méthode chronométrique en un temps. *Spectra Biologie* ;(208):63-71.

Pouplard C, Caron C, Aillaud MF, Ternisien C, Desconclois C, Dubanchet A, Sobas F. (2011). The use of the new ReFacto AF Laboratory Standard allows reliable measurement of FVIII:C levels in ReFacto AF mock plasma samples by a one-stage clotting assay. *Haemophilia*;17(5):e958-62.

Poustka A, Dietrich A, Langenstein G, Toniolo D, Warren ST, Lehrach H. (1991). Physical map of human Xq27-qter: localizing the region of the fragile X mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 8302-8306.

Pratt KP, Shen BW, Takeshima K, Davie EW, Fujikawa K, Stoddard BL. (1999). Structure of the C2 domain of human factor VIII at 1.5 Å resolution. *Nature* **402**: 439-442.

R

Rafati M, Ravanbod S, Hoseini A, Rassoulzadegan M, Jazebi M, Enayat MS, Ala FA, Ghaffari SR. (2011). Identification of ten large deletions and one duplication in the F8 gene of eleven unrelated Iranian severe haemophilia A families using the multiplex ligation-dependent probe amplification technique. *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia* **17**: 705-707.

Rau JC, Beaulieu LM, Huntington JA, Church FC. (2007). Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. *J Thromb Haemost* **5 Suppl 1**: 102-115.

Réseau FanceCoag. (2021). Statistique nationale : Données démographiques- Hémophilie A.

Disponible

sur :

https://www.francecoag.org/SiteWebPublic/public/StatGlobale.action?fbclid=IwAR2732Tc9HZagEwSSLTT5IITCiaBLqbWSHOtIs6v_tSJhR-_bA5eBkpOFoU (consulté le 18 mai 2021).

Rkain M. (2008). L'hémophilie au Maroc, état actuel et perspectives. Thèse pour l'obtention de doctorat de médecine, centre de traitement de l'hémophilie, service d'hémo-oncologie pédiatrique de chu rabat-sale. 123 pages.

Rosner F. (1969). Hemophilia in the Talmud and rabbinic writings. *Ann Intern Med* **70**: 833-837.

Rossiter JP, Young M, Kimberland ML, Hutter P, Ketterling RP, Gitschier J, Horst J, Morris MA, Schaid DJ, de Moerloose P, et al., (1994). Factor VIII gene inversions causing severe hemophilia A originate almost exclusively in male germ cells. *Hum Mol Genet* **3**: 1035-1039.

Rost S, Loffler S, Pavlova A, Muller CR, Oldenburg J. (2008). Detection of large duplications within the factor VIII gene by MLPA. *J Thromb Haemost* **6**: 1996-1999.

Toole JJ, Knopf JL, Wozney JM, Sultzman LA, Buecker JL, Pittman DD, Kaufman RJ, Brown E, Shoemaker C, Orr EC, et al., (1984). Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. *Nature* **312**: 342-347.

Truett MA, Blacher R, Burke RL, Caput D, Chu C, Dina D, Hartog K, Kuo CH, Masiarz FR, Merryweather JP, et al., (1985) Characterization of the polypeptide composition of human factor VIII:C and the nucleotide sequence and expression of the human kidney cDNA. *DNA* **4**: 333-349.

Turpie AG, Esmon C. (2011). Venous and arterial thrombosis--pathogenesis and the rationale for anticoagulation. *Thrombosis and haemostasis* **105**: 586-596.

V

Vehar GA, Keyt B, Eaton D, Rodriguez H, O'Brien DP, Rotblat F, Oppermann H, Keck R, Wood WI, Harkins RN, Tuddenham EG, Lawn RM, Capon DJ. (1984). Structure of human factor VIII. *Nature* **312**: 337-342.

Viel KR, Ameri A, Abshire TC, et al., (2009). Inhibitors of factor VIII in black patients with hemophilia. *N Engl J Med* 2009;360: 1618–27.

Viel KR, Ameri A, Abshire TC, Iyer RV, Watts RG, Lutcher C, Channell C, Cole SA, Fernstrom KM, Nakaya S, Kasper CK, Thompson AR, Almasy L, Howard TE. (2009). Inhibitors of factor VIII in black patients with hemophilia. *The New England journal of medicine* **360**: 1618-1627.

Von dem Borne PA, Bajzar L, Meijers JC, Nesheim ME, Bouma BN. (1997). Thrombin-mediated activation of factor XI results in a thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor-dependent inhibition of fibrinolysis. *The Journal of clinical investigation* **99**: 2323-2327.

W

White GC, 2nd, Shoemaker CB. (1989). Factor VIII gene and hemophilia A. *Blood* **73**: 1-12.

White GC, Rosendaal F, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild C, Ingerslev J, Subcommittee FVFI. (2001). Definitions in hemophilia - Recommendation of the Scientific Subcommittee on factor VIII and factor IX of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thrombosis and Haemostasis* **85**: 560-560.

Wion KL, Kelly D, Summerfield JA, Tuddenham EG, Lawn RM. (1985). Distribution of factor VIII mRNA and antigen in human liver and other tissues. *Nature* **317**: 726-729.

Wood WI, Capon DJ, Simonsen CC, Eaton DL, Gitschier J, Keyt B, Seeburg PH, Smith DH, Hollingshead P, Wion KL, Delwart E, Tuddenham EG, Vehar GA, Lawn RM.

(1984). Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones. *Nature* **312**: 330-337.

World Federation of Hemophilia (WFH). 2019. Rapport sur l'enquête mondiale annuelle de l'année 2019. Disponible sur : http://www.wfh-arabic.org/%d8%a7%d9%84%d8%aa%d9%82%d8%b1%d9%8a%d8%b1-%d8%ad%d9%88%d9%84-%d8%a7%d9%84%d9%85%d8%b3%d8%ad-%d8%a7%d9%84%d8%b9%d8%a7%d9%84%d9%85%d9%8a-%d8%a7%d9%84%d8%b3%d9%86%d9%88%d9%8a-%d9%84%d9%84%d8%b9%d8%a7/?fbclid=IwAR22w0MBkjh1IVPRPeYJ0rsYRArLqnV2UyJmMZX0s3yHxKIBehWXz_V_k_s (consulté le 16 mai 2021).

Y

Yadav N, Kanjirakkuzhiyil S, Ramakrishnan M, Das TK, Mukhopadhyay A. (2012). Factor VIII can be synthesized in hemophilia A mice liver by bone marrow progenitor cell-derived hepatocytes and sinusoidal endothelial cells. *Stem cells and development* **21**: 110-120.

Z

Zimmermann MA, Oldenburg J, Muller CR, Rost S. (2010). Characterization of duplication breakpoints in the factor VIII gene. *J Thromb Haemost* **8**: 2696-2704.

ANNEXES

Annexe 1 : Consentement éclairé de participation.

Annexe 2 : Prosepectus de la méthode chromogénique.

Annexe 1 : Consentement Eclairé de participation

موافقة صريحة حول المشاركة في مشروع بحث علمي حول تقييم المقايسة بالطريقة الكروموجينية للعامل الثامن في الهيموفيليا ا سكان تلمسان.

« **Personne adulte** / شخص راشد »

Confidentiel / سري

Je soussigné(e)..... إنني الممضي أسفله

Certifie :

أشهد :

Avoir reçu et compris l'information qui m'a été remise sur le projet de recherche et il m'a été précisé que ma participation est libre et volontaire ,	تسلمت وفهمت كل المعلومات المتعلقة بمشروع البحث وعلمت أن مشاركتي حرة وتطوعية.
J'autorise l'équipe de recherche à collecter des informations sur ma famille pour la recherche scientifique sur évaluation de dosage par méthode chromogénique du facteur VIII chez la population hémophilie A de Tlemcen. .	أوافق على تمكين فريق العمل من جمع كل المعلومات الشخصية والجنور العائلية المتعلقة بمشروع البحث المتعلق بتقييم المقايسة بالطريقة الكروموجينية للعامل الثامن في الهيموفيليا ا سكان تلمسان.
J'ai bien noté que les données seront collectées et analysées par des outils informatiques dans le respect le plus strict de la confidentialité .	علمت أن كل المعلومات المدونة سيتم جمعها وتحليلها ومعالجتها أليا في إطار السرية التامة

Accepte librement et volontairement de participer à la recherche scientifique sur évaluation de dosage par méthode chromogénique du facteur VIII chez la population hémophilie A de Tlemcen.

أوافق بصفة حرة وتطوعية للمساهمة في مشروع البحث المتعلق بتقييم المقايسة بالطريقة الكروموجينية للعامل الثامن في الهيموفيليا ا سكان تلمسان.

Signature de la personne donnant son consentement (Témoin / Malade)

إمضاء الشخص الذي أسدى بموافقتة (مريض / سليم)

Fait à

حرر ب

Date :

Signature

يوم

الإمضاء

Signature de la personne qui atteste avoir pleinement expliqué à la personne signataire le but, les modalités ainsi que les finalités de la recherche.

Nom

et

prénom :.....

Qualité :.....

Date :

Signature

Annexe2 : Prospectus de la méthode chromogénique



TriniCHROM™ Factor VIII:C

(KX) T2608

Four sachets lingues
Für andere Sprachen
Pate otras linguas

Paix sachets lingues
Für la altre lingus
Da innych jazykove



www.tcoag.com

INTENDED USE

TriniCHROM Factor VIII:C is designed for the quantitative determination of Factor VIII:C in human plasma and Factor VIII concentrate by chromogenic assay.

SUMMARY AND PRINCIPLE

Haemophilia A is a bleeding disorder caused by the deficiency of Factor VIII procoagulant activity (FVIII:C). The quantitative determination of Factor VIII:C is useful in the diagnosis of Haemophilia A and in the determination of the severity of the disorder. The severity of Haemophilia A is classified according to Factor VIII:C concentration as follows: mild 5-50% of normal, moderate 1-5% of normal and severe <1% of normal.

Factor VIII:C is a blood plasma protein which exists as a complex with von Willebrand factor. After activation by thrombin, Factor VIII:C acts as a cofactor in the conversion of Factor X to Factor Xa by Factor IXa when calcium and phospholipid are present. The quantity of Factor Xa generated is determined using a specific chromogenic substrate and is directly proportional to the amount of Factor VIII:C in the sample.

REAGENT

For in vitro diagnostic use only.

REAGENT DESCRIPTION

TriniCHROM Factor IXa Reagent, 3 x 1 ml, T2608A
Freeze-dried. Each vial contains Factor IXa, thrombin, calcium and phospholipid cofactors as well as 0.02% sodium azide as preservative.

TriniCHROM Factor X Reagent, 3 x 1 ml, T2608B
Freeze-dried. Each vial contains bovine Factor X with 0.02% sodium azide as preservative and a fibrin polymerization inhibitor.

TriniCHROM Factor Xa Substrate, 3 x 1 ml, T2608C
Freeze-dried. Each vial contains freeze-dried MeO-CO-O-CHG-Gly-Arg-pNA and a potent fibrinolytic inhibitor.

TriniCHROM Dilution Buffer (15X Concentrate, pH 8.6), 3 x 5 ml, T2608D
2.1% sodium azide is added as preservative. Each vial contains buffer concentrate which optimizes the hydrolysis of the chromogenic substrate by Factor Xa.

REAGENT PREPARATION

Factor IXa Reagent: Reconstitute with 1 ml purified water. Let stand at 2-8°C for 5 minutes to ensure complete dissolution. Mix the reagent by vortexing, then transfer to a plastic test tube.

Temperature	Storage
2-8°C	8 hours

Factor X Reagent: Reconstitute with 2 ml purified water. Let stand at 2-8°C for 5 minutes to ensure complete dissolution. Mix the reagent by vortexing, then transfer to a plastic test tube.

Temperature	Storage
2-8°C	7 days

Factor Xa Substrate: Reconstitute with 5 ml purified water.

Temperature	Storage
2-8°C	7 days

Dilution Buffer: Dilute one vial to 50 ml with purified water.

Temperature	Storage
2-8°C	30 days
20-25°C	7 days

ADDITIONAL MATERIALS REQUIRED

Purified water for dilutions.
50% glycolic acid.
Commercial reference plasma.
Spectrophotometer operable at 405 nm.
25 µl, 100 µl, 200 µl, 500 µl pipettes.
Test tubes (plastic).
37°C water bath or dry bath.
Laboratory timer.

INSTRUMENTS

Tcoag Instruments:

Applications/Method adaptations for individual analyzers are available upon request, please contact your local representative.

The number of tests obtained with specific instruments may vary.

STORAGE AND STABILITY

All unconstituted reagents are stable until the expiration date stated on the vial label when stored at 2-8°C.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

Nine volumes of blood are to be collected in one volume of 3.2% (0.109 M) sodium citrate. Immediately after blood collection, samples are centrifuged at 1500 x g for 15 minutes. Please refer to the most recent version of the CLSI document H21² for further instructions regarding specimen collection and storage.

PROCEDURE

WARNINGS AND PRECAUTIONS

Factor IXa Reagent, Factor X Reagent and the Dilution Buffer contain sodium azide which may react with lead or copper plumbing to form highly explosive metal azides. Metal pipes connected to a sink should be flushed with a large volume of water to prevent azide build-up. All wastes containing biological material should be properly labeled and stored separately from other wastes. Dispose of all waste materials according to prescribed international, national and local regulations.

The test should be used in conjunction with clinical observations and results of other laboratory tests.

TEST PROCEDURE

Assay Procedure

Allow Factor Xa Substrate to warm to room temperature (18-25°C) immediately before use. Keep all other reagents and plasma at 2-8°C. Prepare plasma standards as detailed in Assay Calibration.

To a glass or plastic tube:

- Add 100 µl standard plasma dilution or patient plasma dilution.
- Incubate at 37°C for 2 minutes.
- Add 100 µl Factor IXa Reagent. The forceful addition of reagent will cause adequate mixing.
- Incubate at 37°C for 2 minutes.
- Add 200 µl Factor X Reagent and mix.
- Incubate at 37°C for 4 minutes.
- Add 200 µl Factor Xa Substrate and mix.
- Incubate at 37°C for 4 minutes.
- Add 200 µl 50% Acetic Acid.
- (optional) Add 200 µl purified water (some spectrophotometers require a minimum of 1 ml volume in the cuvette).

The yellow color of the final reaction product is stable for at least 4 hours.

Read absorbance at 405 nm in a 1 cm semi-micro cuvette. Blank the spectrophotometer to purified water.

Assay Calibration

Pooled normal plasma (PNP) which has been collected in the same way as plasma to be tested may be used for preparation of the Factor VIII:C standards. Commercially prepared plasma standards in which the Factor VIII:C has been determined may also be used.

Prepare plasma standards just before testing as follows:

Percent Factor VIII:C	Plasma	Sample Dilution Buffer
200% Standard	25 µl PNP	2 ml
100% Standard	500 µl of 200% Standard	500 µl
0% Standard	-	1 ml

Patient Plasma: 25 µl plasma specimen + 4 ml sample dilution buffer. In cases of suspected Factor VIII:C deficiency, or if assay results show less than 50% Factor VIII:C, dilute 25 µl plasma in 2 ml buffer for assay and divide the final results by 2.

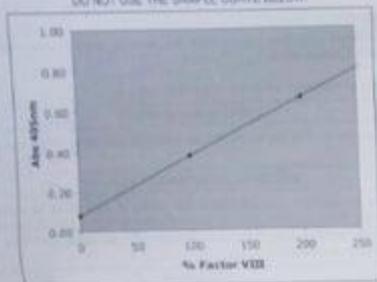
Cryoprecipitates or Factor VIII Concentrates: Dilute sample in dilution buffer so that the estimated Factor VIII:C concentration will be in the range of 0-200%. Note that 1 Unit Factor VIII:C = 100%. Make subsequent dilutions as described for patient plasma. Multiply the final result by the initial dilution factor only.

Calibration Curve

Plot the absorbance obtained with each Factor VIII:C (FVIII:C) calibration standard against % FVIII:C on linear graph paper. The FVIII:C in unknown plasma specimens can be determined by interpolation from the calibration curve. If a commercial FVIII:C control is used for the calibration curve, the FVIII:C in the unknown specimen should be adjusted for the FVIII:C in the control: % FVIII:C (adjusted) = % FVIII:C (unknown) x % FVIII:C (control) / 100.

The sample curve shown below has been constructed using pooled normal plasma and is an example only. Users must construct a new standard curve each time the assay is performed.

DO NOT USE THE SAMPLE CURVE BELOW



QUALITY CONTROL

Control samples should be run each time the assay is performed. TruCHROM Factor VIII may be used as a reverse abnormal control.

RESULTS

EXPECTED RESULTS

The normal range of Factor VIII C is 50-100% in plasma.¹

Factor VIII C is reduced in Haemophilia A which can be characterised according to Factor VIII concentration as severe (<1%), moderate (1-5%) and mild (5-50%).¹

LIMITATIONS

Factor VIII C determinations in plasma samples from patients with a high level of acquired Factor VIII C inhibitor (autoantibody) may result in erroneously low levels of Factor VIII C.¹

Lupus type anticoagulants may interfere with prothrombin-dependent activation of Factor X in the assay resulting in underestimation of Factor VIII C.

Elevations of Factor VIII C can be caused by oral anticoagulants, corticosteroids, and contraceptives, pregnancy and inflammatory disorders. In addition, physical exertion and stress prior to or during venipuncture should be avoided as this may cause elevations of Factor VIII C.¹

To assure accurate, reproducible results use accurate pipetting devices and observe recommended procedures with particular emphasis on incubation time and incubation temperature.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision

The following estimates of precision (coefficient of variation or CV) were observed:

Factor VIII C	Within Assay C.V.	Among Assay C.V.
100%	1.3%	3.0%
50%	3.3%	6.0%

Accuracy

Correlation between TruCHROM Factor VIII C (x) and a standard clotting assay for Factor VIII C (y) as described in the CLSI guideline.¹

Regression Line	Correlation Coefficient	Standard Error of Estimate
$y = 1.13x + 0.64$	0.98	42

Sensitivity

TruCHROM Factor VIII C is designed to give a linear standard curve for Factor VIII C levels between 0 and 200%.

Specificity

Specificity is ensured by the use of purified bovine Factor IXa which is known to catalyse the activation of purified Factor X in the presence of human Factor VIII C. In addition, specificity is ensured by the use of a chromogenic substrate which is known to be specific for Factor Xa.

REFERENCES

1. Singleton LR and Miller Anderson MA. A systematic evaluation of Factor VIII C potency. *Med Lab Sci* 20: 347-354, 1973.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostatic Assays*. Approved Guideline-7th Edition, CLSI Document H21-A5, Vol 29 No 5, 2004.
3. Lapinski M et al. *The Clinical Hemostasis Handbook*. Year Book Medical Publishers Inc, Chicago, 1989.
4. Coward J. *Inhibitors of blood coagulation, blood coagulation and hemostasis*. Ed. JM Thomson, Churchill Livingstone, London, 1982.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Determination of Factor Coagulant Activities*. Approved guideline, CLSI Document H43-A, 1997.

ORDERING INFORMATION

		TruCHROM Factor VIII C
KIT		T2008
Catalogue No.		Quantity
KIT Content	Item	Quantity
	TruCHROM Factor IXa Reagent	2 x 1 ml
	TruCHROM Factor X Reagent	2 x 2 ml
	TruCHROM Factor Xa Substrate	2 x 5 ml
	TruCHROM Dilution Buffer (10X)	2 x 5 ml
OPTIONAL REAGENTS		
ADDITIONAL PRODUCTS AVAILABLE		
Catalogue No.	Item	Quantity
T1068	TruCLOT Factor VIII	10 x 1 ml



TruCHROM Limited,
 OA Business Park,
 Southern Cross Road,
 Bray, Co. Wicklow,
 Ireland.
 Tel: +353 1 2743200
 Fax: +353 1 2740678
 www.truag.com
 info@truag.com



201240
 10/2016

ملخص

الهيموفيليا "أ" هو مرض نزيف وراثي مرتبط بالصبغي اكس، ناجم عن نقص في العامل الثامن، الناتج عن طفرات وراثية تصيب الجين المسؤول عن العامل الثامن (الجين 8). هذا الأخير يلعب دوراً مهماً في عملية تخثر الدم. هذه الدراسة تستند إلى عمل مقارنة بين الأبحاث التي أجريت في مختلف مناطق العالم بخصوص الطريقة الكروموجينية. تم الحصول على المعلومات المتعلقة بمرضى الهيموفيليا "أ" من قسم أمراض الدم في مستشفى جامعة تلمسان هناك 87 مصاباً بالهيموفيليا أ مع هيمنة مطلقة للجنس الذكري، معظمهم يعانون من الهيموفيليا الشديدة بنسبة 75.36% من إجمالي المصابين بالهيموفيليا. تبلغ نسبة المصابين بالهيموفيليا المعتدلة 16.09% و 8.55% للمصابين بالهيموفيليا الصغرى. على المستوى العالمي، نلاحظ انتشار العمل بالطريقة الكروموجينية في البلدان المتقدمة على عكس البلدان النامية منهجية هذه التقنية بسيطة للحصول على النتائج المرجوة.

كلمات مفتاحية: الهيموفيليا أ، العامل الثامن، التخثر، الطريقة الكروموجينية، تلمسان.

Résumé

Hémophilie A est une maladie hémorragique héréditaire liée au chromosome X, provoquée par un déficit de facteur VIII, causée par des mutations hétérogènes du gène responsable de FVIII (gène F8). Ce dernier joue un rôle très important dans la cascade de coagulation. Ce travail est basé d'une étude comparative sous forme de méta analyse des différents articles et mémoires menés par différents scientifiques du monde. On a obtenu les informations liées au atteints d'hémophilie A de la part de service d'hémobiologie de CHU Tlemcen. Il y a 87 hémophiles A avec une dominance totale des sujets mâles, dont la plupart sont atteints d'hémophilie sévère avec une proportion de 75.36 % de la population hémophilique totale. Pour les hémophiles modérés la proportion est de 16.09% et 8.55% sont atteints d'hémophilie mineure. Au niveau mondial, on observe la prolifération de travailler avec la méthode chromogénique dans les pays développés au contraire de pays en voie de développement. La méthodologie de cette technique est simple pour générer les résultats.

Mots-clés : Hémophilie A, Facteur VIII, Coagulation, Méthode chromogénique, Tlemcen.

Abstract

Hemophilia A is an inherited bleeding disease linked to the X chromosome, provoked by a deficiency of factor VIII, caused by heterogeneous mutations in the gene responsible for FVIII (gene F8). This latter plays a very important role in the coagulation cascade. This work is based on a comparative study in the form of a meta-analysis of the various articles and papers carried out by various scientists from around the world. Information related to the hemophilia A patient was obtained from the hemobiology department of CHU Tlemcen. There are 87 hemophiliacs A with a total dominance of males, most of whom have severe hemophilia with a proportion of 75.36% of the total hemophilia population. For moderate hemophiliacs the proportion is 16.09% and 8.55% have minor hemophilia. Globally, we observe the proliferation of working with the chromogenic method in developed countries as opposed to underdeveloped countries. The methodology of this technique is simple to generate the results.

Keywords: Hemophilia A, Factor VIII, Coagulation, Chromogenic method, Tlemcen.