

2023-2024

**Thèse**  
pour le  
**Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie**  
**Qualification en Biologie Médicale**

**Comparaison d'une méthode  
chronométrique et d'une méthode  
chromogénique pour la mesure de l'activité  
du FVIII recombinant NUWIQ® (simoctocog  
alpha) dans une étude de vie réelle.**

**Legeay Geoffrey**

Né le 20 mars 1997 à Saint Nazaire (44)

Sous la direction de Mme le Dr Marie TUFFIGO

**Membres du jury**

Monsieur le Pr Matthieu EVEILLARD		Président
Madame le Dr Marie TUFFIGO		Directrice
Monsieur le Dr Alban GODON		Co-Directeur
Monsieur le Pr Damien LUQUE PAZ		Membre
Monsieur le Dr Philippe BEURRIER		Membre
Monsieur le Dr Julien DENIS LE SEVE		Membre

Soutenue publiquement le :  
11 octobre 2024

# ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné LEGEAY Geoffrey  
déclare être pleinement conscient que le plagiat de documents ou d'une  
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,  
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.  
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées  
pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiant le 29/09/2024

## Déclaration d'engagement de l'auteur

"La Faculté de Santé déclare que les opinions émises dans les thèses qui lui  
sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et  
qu'elle entend ne leur donner ni approbation, ni improbation."

# LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTÉ DE SANTÉ D'ANGERS

---

Doyen de la Faculté : Pr Nicolas Lerolle

Vice-Doyen de la Faculté et directeur du département de pharmacie : Pr Sébastien Faure

Directeur du département de médecine : Pr Cédric Annweiler

## PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

ABRAHAM Pierre	PHYSIOLOGIE	Médecine
ANGOULVANT Cécile	MEDECINE GENERALE	Médecine
ANNWEILER Cédric	GERIATRIE ET BIOLOGIE DU VIEILLISSEMENT	Médecine
ASFAR Pierre	REANIMATION	Médecine
AUBE Christophe	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE	Médecine
AUGUSTO Jean-François	NEPHROLOGIE	Médecine
BAUFRETON Christophe	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIOVASCULAIRE	Médecine
BELLANGER William	MEDECINE GENERALE	Médecine
BIERE Loïc	CARDIOLOGIE	Médecine
BIGOT Pierre	UROLOGIE	Médecine
BONNEAU Dominique	GENETIQUE	Médecine
BOUCHARA Jean-Philippe	PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE	Médecine
BOUET Pierre-Emmanuel	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE	Médecine
BOUVARD Béatrice	RHUMATOLOGIE	Médecine
BOURSIER Jérôme	GASTROENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE	Médecine
BRIET Marie	PHARMACOLOGIE	Médecine
CALES Paul	GASTROENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE	Médecine
CAMPONE Mario	CANCEROLOGIE ; RADIOTHERAPIE	Médecine
CAROLI-BOSC François-Xavier	GASTROENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE	Médecine
CASSEREAU Julien	NEUROLOGIE	Médecine
CLERE Nicolas	PHARMACOLOGIE / PHYSIOLOGIE	Pharmacie
CONNAN Laurent	MEDECINE GENERALE	Médecine
COPIN Marie-Christine	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES	Médecine
COUTANT Régis	PEDIATRIE	Médecine
CUSTAUD Marc-Antoine	PHYSIOLOGIE	Médecine
CRAUSTE-MANCIET Sylvie	PHARMACOTECHNIE HOSPITALIERE	Pharmacie
DE CASABIANCA Catherine	MEDECINE GENERALE	Médecine
DESCAMPS Philippe	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE	Médecine
D'ESCATHA Alexis	MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL	Médecine
DINOMAIS Mickaël	MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION	Médecine
DUBEE Vincent	MALADIES INFECTIEUSES ET TROPICALES	Médecine
DUCANCELLE Alexandra	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE ; HYGIENE HOSPITALIERE	Médecine
DUVAL Olivier	CHIMIE THERAPEUTIQUE	Pharmacie
DUVERGER Philippe	PEDOPSYCHIATRIE	Médecine
EVEILLARD Matthieu	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE	Pharmacie
FAURE Sébastien	PHARMACOLOGIE PHYSIOLOGIE	Pharmacie
FOURNIER Henri-Dominique	ANATOMIE	Médecine
FOUQUET Olivier	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIOVASCULAIRE	Médecine
FURBER Alain	CARDIOLOGIE	Médecine
GAGNADOUX Frédéric	PNEUMOLOGIE	Médecine
GOHIER Bénédicte	PSYCHIATRIE D'ADULTES	Médecine
GUARDIOLA Philippe	HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION	Médecine
GUILET David	CHIMIE ANALYTIQUE	Pharmacie
HAMY Antoine	CHIRURGIE GENERALE	Médecine
HENNI Samir	MEDECINE VASCULAIRE	Médecine
HUNAULT-BERGER Mathilde	HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION	Médecine

IFRAH Norbert	HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION	Médecine
JEANNIN Pascale	IMMUNOLOGIE	Médecine
KEMPF Marie	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE ; HYGIENE HOSPITALIERE	Médecine
KUN-DARBOIS Daniel	CHIRURGIE MAXILLO-FACIALE ET STOMATOLOGIE	Médecine
LACOEUILLE FRANCK	RADIOPHARMACIE	Pharmacie
LACCOURREYE Laurent	OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE	Médecine
LAGARCE Frédéric	BIPHARMACIE	Pharmacie
LANDREAU Anne	BOTANIQUE/ MYCOLOGIE	Pharmacie
LASOCKI Sigismond	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION	Médecine
LEBDAI Souhil	UROLOGIE	Médecine
LEGENDRE Guillaume	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE	Médecine
LEGRAND Erick	RHUMATOLOGIE	Médecine
LERMITE Emilie	CHIRURGIE GENERALE	Médecine
LEROLLE Nicolas	REANIMATION	Médecine
LIBOUBAN Hélène	HISTOLOGIE	Médecine
LUNEL-FABIANI Françoise	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE ; HYGIENE HOSPITALIERE	Médecine
MARCHAIS Véronique	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE	Pharmacie
MARTIN Ludovic	DERMATO-VENEREOLOGIE	Médecine
MAY-PANLOUP Pascale	BIOLOGIE ET MEDECINE DU DEVELOPPEMENT ET DE LA REPRODUCTION	Médecine
MENEI Philippe	NEUROCHIRURGIE	Médecine
MERCAT Alain	REANIMATION	Médecine
PAPON Nicolas	PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE	Pharmacie
PASSIRANI Catherine	CHIMIE GENERALE	Pharmacie
PELLIER Isabelle	PEDIATRIE	Médecine
PETIT Audrey	MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL	Médecine
PICQUET Jean	CHIRURGIE VASCULAIRE ; MEDECINE VASCULAIRE	Médecine
PODEVIN Guillaume	CHIRURGIE INFANTILE	Médecine
PROCACCIO Vincent	GENETIQUE	Médecine
PRUNIER Delphine	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE	Médecine
PRUNIER Fabrice	CARDIOLOGIE	Médecine
RAMOND-ROQUIN Aline	MEDECINE GENERALE	Médecine
REYNIER Pascal	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE	Médecine
RICHARD Isabelle	MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION	Médecine
RICHOMME Pascal	PHARMACOGNOSIE	Pharmacie
RODIEN Patrice	ENDOCRINOLOGIE, DIABETE ET MALADIES METABOLIQUES	Médecine
ROQUELAURE Yves	MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL	Médecine
ROUGE-MAILLART Clotilde	MEDECINE LEGALE ET DROIT DE LA SANTE	Médecine
ROUSSEAU Audrey	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES	Médecine
ROUSSEAU Pascal	CHIRURGIE PLASTIQUE, RECONSTRUCTRICE ET ESTHETIQUE	Médecine
ROUSSELET Marie-Christine	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES	Médecine
ROY Pierre-Marie	MEDECINE D'URGENCE	Médecine
SAULNIER Patrick	BIOPHYSIQUE ET BIOSTATISTIQUES	Pharmacie
SERAPHIN Denis	CHIMIE ORGANIQUE	Pharmacie
SCHMIDT Aline	HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION	Médecine
TESSIER-CAZENEUVE Christine	MEDECINE GENERALE	Médecine
TRZEPIZUR Wojciech	PNEUMOLOGIE	Médecine
UGO Valérie	HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION	Médecine
URBAN Thierry	PNEUMOLOGIE	Médecine
VAN BOGAERT Patrick	PEDIATRIE	Médecine
VENARA Aurélien	CHIRURGIE VISCERALE ET DIGESTIVE	Médecine
VENIER-JULIENNE Marie-Claire	PHARMACOTECHNIE	Pharmacie
VERNY Christophe	NEUROLOGIE	Médecine
WILLOTEAUX Serge	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE	Médecine

## MAÎTRES DE CONFÉRENCES

BAGLIN Isabelle	CHIMIE THERAPEUTIQUE	Pharmacie
BASTIAT Guillaume	BIOPHYSIQUE ET BIOSTATISTIQUES	Pharmacie
BEAUVILLAIN Céline	IMMUNOLOGIE	Médecine
BEGUE Cyril	MEDECINE GENERALE	Médecine
BELIZNA Cristina	MEDECINE INTERNE	Médecine
BELONCLE François	REANIMATION	Médecine
BENOIT Jacqueline	PHARMACOLOGIE	Pharmacie
BESSAGUET Flavien	PHYSIOLOGIE PHARMACOLOGIE	Pharmacie
BLANCHET Odile	HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION	Médecine
BOISARD Séverine	CHIMIE ANALYTIQUE	Pharmacie
BRIET Claire	ENDOCRINOLOGIE, DIABETE ET MALADIES METABOLIQUES	Médecine
BRIS Céline	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE	Pharmacie
CAPITAIN Olivier	CANCEROLOGIE ; RADIOTHERAPIE	Médecine
CHAO DE LA BARCA Juan-Manuel	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE	Médecine
CHEVALIER Sylvie	BIOLOGIE CELLULAIRE	Médecine
COLIN Estelle	GENETIQUE	Médecine
DERBRE Séverine	PHARMACOGNOSIE	Pharmacie
DESHAYES Caroline	BACTERIOLOGIE VIROLOGIE	Pharmacie
DOUILLET Delphine	MEDECINE D'URGENCE	Médecine
FERRE Marc	BIOLOGIE MOLECULAIRE	Médecine
FORTRAT Jacques-Olivier	PHYSIOLOGIE	Médecine
GUELFF Jessica	MEDECINE GENERALE	Médecine
HAMEL Jean-François	BIOSTATISTIQUES, INFORMATIQUE MEDICALE	Médicale
HELESBEUX Jean-Jacques	CHIMIE ORGANIQUE	Pharmacie
HERIVAUX Anaïs	BIOTECHNOLOGIE	Pharmacie
HINDRE François	BIOPHYSIQUE	Médecine
JOUSSET-THULLIER Nathalie	MEDECINE LEGALE ET DROIT DE LA SANTE	Médecine
JUDALET-ILLAND Ghislaine	MEDECINE GENERALE	Médecine
KHIATI Salim	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE	Médecine
LEGEAY Samuel	PHARMACOCINETIQUE	Pharmacie
LEMEE Jean-Michel	NEUROCHIRURGIE	Médecine
LE RAY-RICHOMME Anne-Marie	PHARMACOGNOSIE	Pharmacie
LEPELTIER Elise	CHIMIE GENERALE	Pharmacie
LETOURNEL Franck	BIOLOGIE CELLULAIRE	Médecine
LUQUE PAZ Damien	HEMATOLOGIE BIOLOGIQUE	Médecine
MABILLEAU Guillaume	HISTOLOGIE, EMBRYOLOGIE ET CYTOGENETIQUE	Médecine
MALLET Sabine	CHIMIE ANALYTIQUE	Pharmacie
MAROT Agnès	PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE	Pharmacie
MESLIER Nicole	PHYSIOLOGIE	Médecine
MIOT Charline	IMMUNOLOGIE	Médecine
MOUILLIE Jean-Marc	PHILOSOPHIE	Médecine
NAIL BILLAUD Sandrine	IMMUNOLOGIE	Pharmacie
PAILHORIES Hélène	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE	Médecine
PAPON Xavier	ANATOMIE	Médecine
PASCO-PAPON Anne	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE	Médecine
PECH Brigitte	PHARMACOTECHNIE	Pharmacie
PENCHAUD Anne-Laurence	SOCIOLOGIE	Médecine
PIHET Marc	PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE	Médecine
POIROUX Laurent	SCIENCES INFIRMIERES	Médecine
PY Thibaut	MEDECINE GENERALE	Médecine
RINEAU Emmanuel	ANESTHESIOLOGIE REANIMATION	Médecine
RIOU Jérémie	BIOSTATISTIQUE	Pharmacie
RIQUIN Elise	PEDOPSYCHIATRIE ; ADDICTOLOGIE	Médecine

RONY Louis	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE	Médecine
ROGER Emilie	PHARMACOTECHNIE	Pharmacie
SAVARY Camille	PHARMACOLOGIE-TOXICOLOGIE	Pharmacie
SCHMITT Françoise	CHIRURGIE INFANTILE	Médecine
SCHINKOWITZ Andréas	PHARMACOGNOSIE	Pharmacie
SPIESSER-ROBELET Laurence	PHARMACIE CLINIQUE ET EDUCATION THERAPEUTIQUE	Pharmacie
TEXIER-LEGENDRE Gaëlle	MEDECINE GENERALE	Médecine
VIAULT Guillaume	CHIMIE ORGANIQUE	Pharmacie

### AUTRES ENSEIGNANTS

#### **ATER**

ELHAJ MAHMOUD Dorra	IMMUNOLOGIE	Pharmacie
LEMAN Géraldine	BIOCHIMIE	Pharmacie

#### **ECER**

PIRAUX Arthur	OFFICINE	Pharmacie
HASAN Mahmoud	PHARMACIE GALENIQUE ET PHYSICO-CHIMIE	Pharmacie
BARAKAT Fatima	CHIMIE ANALYTIQUE	Pharmacie

#### **PRCE**

AUTRET Erwan	ANGLAIS	Santé
BARBEROUSSE Michel	INFORMATIQUE	Santé
COYNE Ashley	ANGLAIS	Santé
O'SULLIVAN Kayleigh	ANGLAIS	Santé
RIVEAU Hélène	ANGLAIS	Santé

#### **PAST**

BEAUV AIS Vincent	OFFICINE	Pharmacie
BRAUD Cathie	OFFICINE	Pharmacie
CAVAILLON Pascal	PHARMACIE INDUSTRIELLE	Pharmacie
DILÉ Nathalie	OFFICINE	Pharmacie
GUILLET Anne-Françoise	PHARMACIE DEUST PREPARATEUR	Pharmacie
MOAL Frédéric	PHARMACIE CLINIQUE	Pharmacie
KAASSIS Mehdi	GASTRO-ENTEROLOGIE	Médecine
GUITTON Christophe	MEDECINE INTENSIVE-REANIMATION	Médecine
SAVARY Dominique	MEDECINE D'URGENCE	Médecine
POMMIER Pascal	CANCEROLOGIE-RADIOTHERAPIE	Médecine
PICCOLI Giorgia	NEPHROLOGIE	Médecine

#### **PLP**

CHIKH Yamina	ECONOMIE-GESTION	Médecine
--------------	------------------	----------

#### **AHU**

CORVAISIER Mathieu	PHARMACIE CLINIQUE	Pharmacie
CHABRUN Floris	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE	Pharmacie
ROBIN Julien	DISPOSITIF MEDICAUX	Pharmacie

# REMERCIEMENTS

## **À mon jury,**

### **À Madame le Docteur Marie TUFFIGO,**

Chère Marie, un grand merci de m'avoir accompagné et supporté pendant ce travail de thèse, mais aussi en routine au laboratoire, tu m'as énormément apporté que ce soit en hémostase ou en hématologie et toujours avec bienveillance, dans une bonne humeur, parfois même débordante ! Merci beaucoup de ta passion pour ton travail, tu transmets tout cela, jusqu'à même tes inquiétudes (un peu exagérées parfois). J'aurais beaucoup appris et ri en ta compagnie et n'aurais pas pu rêver mieux en tant que directrice de thèse.

### **À Monsieur le Professeur Damien LUQUE PAZ,**

Merci à toi, Damien. Souvent très occupé, mais restant aussi disponible que possible et toujours à l'écoute, avec en plus une passion contagieuse pour l'hématologie et la recherche. C'est un honneur de te compter parmi les membres de mon jury.

### **À Monsieur le Professeur Matthieu Eveillard,**

Merci à vous, j'ai toujours apprécié échanger avec vous lors de mon stage en bactériologie et lors de la suite de mon internat. Vous avez accepté sans hésitation de présider mon jury de thèse, j'en suis honoré.

### **À Monsieur le Docteur Alban GODON,**

Alban, merci beaucoup pour tes remarques toujours pertinentes en hémostase (et en cytologie), j'ai apprécié apprendre à tes cotés. Et merci beaucoup de faire partie de mon jury.

### **À Monsieur le Docteur Philippe BEURRIER,**

Dr Beurrier, échanger avec vous durant l'évolution de mon manuscrit fut très instructif. C'est un honneur de vous compter parmi mes jurys. Merci.

### **À Monsieur le Docteur Julien DENIS LE SEVE,**

C'est un plaisir d'avoir comme membre du jury de thèse un ancien interne de mon externat de pharmacie à Nantes. Tu étais déjà passionné par ton travail et il est très agréable et constructif de discuter d'hémostase avec toi. Merci.

## ***Aux personnes ayant œuvré à ce travail de thèse,***

Merci à vous deux, Isabelle et Anne-France. Ce travail de thèse aurait pu prendre une toute autre tournure sans votre aide et vos réponses à mes interrogations. Je vous remercie pour le temps passé et pour votre bonne humeur malgré le sous-effectif que vous avez dû supporter.

## ***À toute l'équipe du laboratoire d'hématologie biologique et d'hémostase,***

Madame le Professeur Valérie UGO, merci pour nos échanges au sujet de ma maquette en hématologie et pour votre disponibilité malgré un agenda bien rempli. Veuillez trouver en ces quelques mots ma grande reconnaissance. A l'ensemble des biologistes ; Franck, merci à vous pour toutes ces remarques bienveillantes et votre regard expert et plein de passion pour la cytologie. J'aurais toujours envers vous un respect et une grande reconnaissance. Agathe, je te remercie pour ce que tu as pu m'apporter depuis mon premier stage en hématologie, j'ai adoré lire plein de moelle avec toi ! Tu m'as permis de découvrir l'hématologie d'une merveilleuse manière et toujours avec bienveillance. Amélie, merci pour ces moments précieux en ta compagnie, je suis ravie de pouvoir te retrouver à Cholet lors de mon dernier stage. Odile, Anne, Margaux, Laurane, merci à vous pour votre temps et nos échanges. Vous avez toujours répondu avec passion et précision à mes questions. Je vous remercie pour tout ce temps et votre bonne humeur générale. Et un grand merci à tous les techniciens, sans qui notre vie au laboratoire serait bien plus laborieuse, en oubliant bien sûr les quelques boucliers en trop...

Aux autres biologistes du laboratoire d'Angers, merci pour nos échanges. J'ai apprécié chacun de mes stages et c'était en grande partie grâce à vous.

Un mot spécial pour vous ; Xavier, Floris, Guillaume, Rachel, Caroline, Etienne et Julian, vous n'êtes pas dans la spécialité que j'ai choisie, mais vous m'avez évidemment beaucoup apporté et je ne pouvais pas passer à côté d'un grand merci !

A tous les biologistes et professionnels que j'ai pu rencontrer et avec qui j'ai pu échanger durant mes différents stages, merci.

Merci à tous les techniciens du plateau technique pour votre aide précieuse et les rires partagés.

# REMERCIEMENTS

Merci à toutes les secrétaires du laboratoire du CHU d'Angers et aux infirmières du CPCs, toujours de bonne humeur et à l'écoute des interrogations. Merci spécialement à toi Aline, la super secrétaire du laboratoire d'hématologie, toujours un plaisir de discuter avec toi, merci beaucoup pour ta gentillesse et ton aide précieuse au fil de mon cursus.

## ***À mes cointernes...***

Julien, le fadelito, toi-même tu sais la route que l'on a parcourue ensemble en bonne et en moins bonne compagnie... Je suis plus que ravi que ça ait été avec toi pour ces quelques semestres de phase socle, c'est bien vrai avec toi, j'ai appris les bases, mais quelles bases ! Et depuis quelques semestres nos chemins se séparent, mais à jamais mon binôme cointerne ! On a travaillé, ris, appris ensemble. Ce fut exaltant et stimulant, merci mon bon jeune homme.

Aux autres internes ; Audrey P, toujours joyeuse, souriante, professionnelle, je n'ai jamais eu le plaisir d'être ton cointerne de 6 mois, je sais que j'aurais adoré, malheureusement la vie en a décidé autrement. J'ai quand même eu le privilège d'être représentant à tes côtés, une lourde charge, mais nous avons surmonté la chose parfaitement, c'est passé tout seul.

Soline, toujours un plaisir de croiser ta petite frimousse, souvent en un lendemain de garde que ce soit pour toi ou pour moi. Ces fabuleux voyages dans les différentes villes de notre région voire au-delà pour suivre ce beau DIU d'hématologie biologique... Merci pour ta joie et ta bonne humeur !

À vous, Steven, Thomas, Anne, Max, Anne-Cé, Victoria, Suzanne, Audrey T, Julie, vous êtes désormais pour la plupart des biologistes accomplis. Pour ceux qui sont encore internes, votre moment viendra bientôt !

Merci à vous pour votre aide dans tous les domaines, que ce soit pour le partage des connaissances dans les différentes spécialités jusqu'aux bonnes adresses de bar à Angers. Bon peut-être pas les meilleurs, mais la bière y est souvent appréciée.

Aux internes moins vieux ; Paul, Yaquine, Juliette, Alizée, Aurélien, Mathieu et aux encore moins vieux ; Jérémy, Céline, Aksel, Eloise, Maria, Hugo, Yassir, Guillaume, Paul-Antoine, merci. L'internat aurait eu beaucoup moins de charme sans votre compagnie, ravie que ça ait été avec vous de plus ou moins loin. Kiss sur vous et à bientôt j'espère+++.

## ***À mes amis...***

Robin, Wesley, Luca, Léo, Nicolas, Jules, Pierre-Antoine, Chris, Elena, Marie, Sarkis, Victor, et tous les autres que je ne cite pas, je vous aime tant, j'aimerais qu'on fasse des apéros tous les soirs ensemble, mais vous êtes tous dans des villes si lointaines... Merci d'être là, de me supporter et de participer à ces nombreux délires que l'on a eus et que l'on aura encore.

## ***Et à la famille de pharmacie...***

Les potes, vous avez appris à ma petite personne ce que c'était de s'amuser, rien que d'y penser, je suis fatigué de tous ces TP sans fin à cause de la veille (et un peu du présent quand même).

J'espère que le groupe formé à l'époque va perdurer, même si la vie fera son œuvre et rien de grave, tant que je réussis à voir vos têtes régulièrement.

Big up spécial aux 3 loustics qui ont fait le concours de l'internat avec ma personne, Emma, une voisine et amie de folie, Touff, une petite teigne adorée, et Mych, que du love TMTC, la vie sans toi pas loin dans la même city aurait été bien moins appréciée.

Pour tous les autres, vous avez tous marqué ma vie étudiante et j'espère de tout cœur que vous marquerez ma vie post étudiante. Love you les potes ; Thomas, Elo, Pierre, Hélène, Aziz, Bapt, Vico et Laeticia. Sans oublier ce bon vieux Adam sans qui les moments de rires auraient été tellement plus rares...

Il y a évidemment plein de pharmaciens géniaux que je ne cite pas, mais qui ont permis à ma personne de devenir ce que je suis. ;)

# REMERCIEMENTS

## À ma famille...

Aucun de vous n'a jamais vraiment compris dans quel cursus je me trouvais, ça m'a évidemment toujours fait rire. On retiendra que je suis en médecine, ce sera plus simple.

**Maman**, que dire, quelques oublis, oui, surtout de mon côté lorsqu'il s'agit d'appeler. Un jour, les bonnes résolutions arriveront, je ne désespère pas et toi non plus j'en suis sûr. Merci de tout ce que tu nous as apporté. Je profite de ces quelques lignes pour te rappeler que ton fils t'aime fort. C'est grâce à toi que j'ai pu arriver jusqu'à ce doctorat et je m'y épanouis, merci beaucoup.

**Mamie**, à jamais un soutien, une aide sans faille et une expérience inspirante. Merci pour tout ce que tu as pu faire et ce que tu feras encore pour moi mamie, tu es géniale. Je t'aime mamie.

**Aymeric**, le grand frère. On aura grandi ensemble (moi un peu plus, à priori...), eu des moments bien énervés tous les deux et un parcours semé de désagréments comme tu le sais si bien. Mais on s'en sort bien finalement je trouve ! Je te fais de gros bisous, j'espère que la suite dans la ville que tu as choisie sera à ton goût, que dis-je, à votre goût ! Merci d'être mon grand frère !

**Tonton**, toujours les bons mots, la bonne réflexion. Depuis petit, j'admire la capacité que tu as à tout gérer, tant sur le plan pratique qu'émotionnel. Tu es un super tonton, un peu loin à mon goût, mais tant que tu apprécies ce que tu vis, ça me va. Merci pour tout mon tonton Bruno et à très bientôt, je l'espère !

**Gérard** et **Dalia**, vous avez été de supers amis pour mon papy, et j'ai pour ma part, découvert deux superbes personnes, j'ai adoré partager ces moments avec vous dans cette belle ville de Nantes. Vous avez été d'un grand soutien, et je vous en remercie énormément. Je sais que vous auriez voulu venir me soutenir, parfois on ne fait pas tout ce que l'on veut.

A tout le reste de ma famille et de mes amis que je ne pourrais remercier par manque d'inspiration et par douleurs aux doigts. L'esprit y est et je vous remercie pour tout.

**Lauryn**, je me devais de garder ce dernier mot pour toi, jamais le meilleur dans l'expression de mes sentiments, mais tu le sais, je l'espère, tu es mon phare dans l'obscurité. Blague à part, merci de me supporter, voire de me porter parfois, toujours à bien plus croire en moi que moi-même, enfin, je pense que nous partageons ceci. Déjà plus de 3 ans en ta compagnie, entrecoupé de gardes, et de diverses interruptions fort désagréables parfois. On se dirige tous les deux dans une vie qui me ravit, bien moins éloignés. J'ai hâte d'arriver en novembre et encore plus de l'année d'après si notre projet est toujours possible. Je t'aime, et merci d'être là.

# Table des matières

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Définition .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Clinique .....</b>	<b>1</b>
<b>1.3 Rôle du FVIII .....</b>	<b>2</b>
<b>1.4 Historique de l'hémophilie et de ses traitements .....</b>	<b>3</b>
<b>1.5 Présentation du Nuwiq (Simoctocog alfa, Octapharma).....</b>	<b>5</b>
<b>1.6 Suivi biologique des hémophiles.....</b>	<b>6</b>
<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>10</b>
<b>2.1 Généralités.....</b>	<b>10</b>
<b>2.2 Méthode de mesure.....</b>	<b>11</b>
2.2.1 Technique chromogénique (référence) .....	11
2.2.2 Technique chronométrique .....	13
<b>2.3 Automate utilisé.....</b>	<b>14</b>
<b>2.4 Réactifs utilisés.....</b>	<b>15</b>
<b>2.5 Analyse statistique .....</b>	<b>15</b>
<b>2.6 Patients.....</b>	<b>15</b>
<b>2.7 Préparation des techniques de dosages .....</b>	<b>16</b>
<b>2.8 Calibration .....</b>	<b>17</b>
<b>2.9 Réalisation des dosages.....</b>	<b>19</b>
<b>RESULTATS.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1 Dosages échantillons <i>spikés</i> .....</b>	<b>20</b>
<b>3.2 Dosages échantillons patients .....</b>	<b>25</b>
<b>3.3 Comparaison au taux de récupération .....</b>	<b>31</b>
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>32</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>36</b>
<b>TABLE DES FIGURES .....</b>	<b>39</b>
<b>TABLE DES TABLEAUX .....</b>	<b>39</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>40</b>

## Liste des abréviations

OMS	Organisation mondiale de la santé
FVIII	Facteur VIII
FVIIIr	Facteur VIII recombinant
FIX	Facteur IX
FVIIIa	Facteur VIII activé
FIXa	Facteur IX activé
FIIa	Facteur II activé = thrombine
FXa	Facteur X activé
HA	Hémophilie A
HB	Hémophilie B
FVIII:C	Mesure de l'activité coagulante du FVIII
OSA	<i>One stage assay</i> = test chronométrique
CSA	<i>Chromogenic substrat assay</i> = test chromogénique
PET	Polyéthylène téréphthalate
PPP	Plasma pauvre en plaquettes
ISTH	<i>International Society on Thrombosis and Haemostasis, Inc.</i>
FXII	Facteur XII
IC	Intervalle de confiance
FIXr	Facteur IX recombinants
CV	Coefficient de variation
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VHB	Virus de l'Hépatite B
VHC	Virus de l'Hépatite C
GEHT	Groupe d'Etude sur l'Hémostase et la Thrombose

# Introduction

## 1.1 Définition

L'hémophilie est une affection hémorragique héréditaire, transmise selon un mode récessif lié au chromosome X, résultant d'une mutation dans le gène codant pour le facteur VIII (FVIII) ou le facteur IX (FIX) de la coagulation, responsables respectivement d'un déficit en FVIII (hémophilie A ou HA) ou en FIX (hémophilie B ou HB). Six fois plus fréquente que l'hémophilie B, l'hémophilie A concerne environ une naissance masculine sur 5 000 dont 30% sont liées à une mutation de novo (sans aucune histoire familiale d'hémophilie).<sup>1</sup> La sévérité clinique de cette pathologie réside principalement dans l'importance du déficit en facteur déterminé biologiquement par le dosage de l'activité coagulante du facteur concerné. La démarche diagnostique est la même entre l'HA et l'HB. Elles sont classées en fonction du taux résiduel de facteur : un taux inférieur ou égal à 1% (<0,01 UI/mL) définit une hémophilie sévère, un taux compris entre 1 et 5% (0,01-0,05 UI/mL) définit une hémophilie modérée, et un taux compris entre 5 et 40% (0,05-0,40 UI/mL) définit quant à lui une hémophilie mineure, selon les critères de l'ISTH. Il existe néanmoins des différences liées à la biologie du FVIII, très différente de celle du FIX. Le FVIII est une glycoprotéine synthétisée par diverses cellules (foie, rate, cellules endothéliales, etc.) dont la concentration est étroitement dépendante de la concentration en facteur Willebrand et s'élève physiologiquement pendant la grossesse, avec l'âge, mais également dans des contextes inflammatoires.<sup>2</sup> Le FIX est une protéine de synthèse hépatique nécessitant des modifications post-traductionnelles dépendantes de la vitamine K. La concentration en FIX est physiologiquement basse chez le nouveau-né, mais reste stable par la suite. Si un diagnostic précoce de l'hémophilie est souhaité, le FVIII peut être dosé sur le sang du cordon à la naissance en sachant néanmoins qu'un FVIII retrouvé normal sur sang de cordon n'exclut pas le diagnostic d'HA mineure. Le dosage du FIX est également réalisable dans ces conditions, mais est difficilement interprétable en cas d'HB mineure.<sup>3</sup>

## 1.2 Clinique

Les signes cliniques sont exclusivement des manifestations hémorragiques, telles que des hémarthroses et des hématomes sous-cutanés ou musculaires. La gravité de ces manifestations dépend de leur localisation, du volume des saignements, mais surtout de la

sévérité du déficit en facteur. Des complications peuvent apparaître, comme des arthropathies chroniques par saignements itératifs dans la même articulation, voire même entraîner la mort en cas de saignement incontrôlé. L'hémophilie demeure une pathologie grave, bien que les options thérapeutiques aient considérablement évolué au fil des années.

### 1.3 Rôle du FVIII

Physiologiquement, le rôle majeur du FVIII complète celui du FIX. En effet, le FVIII est le cofacteur du FIX, ensemble, ils forment le complexe « tenase » permettant après activation du FX en FXa d'aboutir à la formation d'un caillot de fibrine sous l'action de la thrombine (FIIa).<sup>(3,4)</sup>

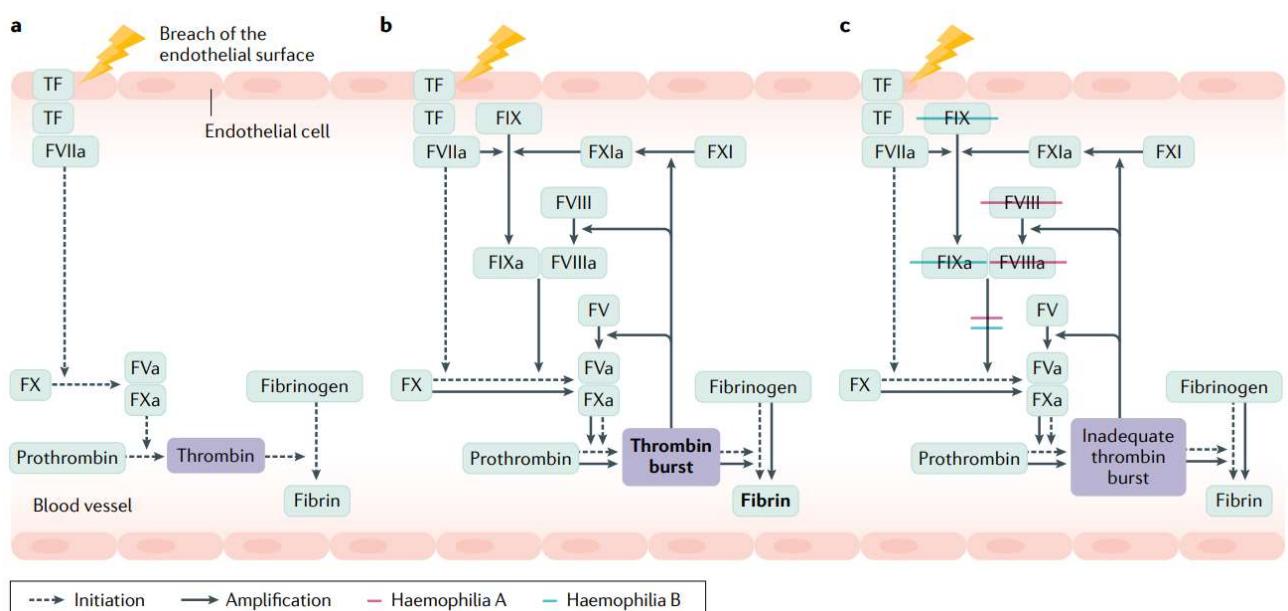


Figure 1. Initiation et amplification de la cascade de coagulation après lésions des vaisseaux sanguins<sup>5</sup>

A : Initiation : le facteur tissulaire (FT) associé au facteur VII activé (FVIIa), génère une production précoce de thrombine

B : Amplification : la thrombine recrute d'autres complexes enzymatiques pour amplifier sa propre formation et ainsi renforcer la solidité du caillot

C : Cascade de la coagulation chez un hémophilie : déficit en FVIII ou en FIX entraîne une sous-production de thrombine qui compromet la capacité à former un caillot de fibrine solide

## 1.4 Historique de l'hémophilie et de ses traitements

La découverte de l'hémophilie, qui ne portait pas encore ce nom, remonte à l'Antiquité. Le Talmud, recueil d'écrits hébraïques du II<sup>e</sup> siècle avant Jésus-Christ, relate que les bébés de sexe masculin étaient dispensés de subir une circoncision si deux de leurs frères avaient déjà succombé à cette intervention avant eux. Bien plus tard, en 1803, un médecin américain décrit une maladie hémorragique affectant uniquement les sujets masculins et dont la transmission se ferait de mère en fils. Par la suite, en 1829, le médecin allemand F. Hopff, lui attribue le nom d'Hémophilie. A partir de 1853, on la surnomme « la maladie royale ». En effet, la reine Victoria, conductrice d'Hémophilie sévère, transmit la maladie à sa descendance. L'union des enfants de la reine avec des membres de la famille impériale de Russie et de la famille royale d'Espagne en perpétua la transmission. A cette époque, il n'existe aucun traitement de la maladie qui fut souvent mortelle.

Les premiers traitements administrés aux patients apparaissent au 19<sup>ème</sup> siècle. En 1840, le premier succès médical permettant l'arrêt de l'hémorragie grave d'un garçon hémophile de 11 ans par transfusion de sang total fait l'objet d'une publication médicale dans le Lancet.<sup>6</sup> Au début du 20<sup>ème</sup> siècle, les transfusions sanguines sont remplacées par des transfusions de plasma, mais s'accompagnent de nombreuses réactions d'intolérances et de traumatismes au site d'injection. A cette époque on ne distinguait pas l'HA de l'HB et il fallut attendre les années 1950 avec les travaux du Dr Rosemary Biggs pour y parvenir.

Dans cette même période, le docteur Judith Graham Pool qui travaillait sur la coagulation, découvre en 1964 que la décongélation lente du plasma permet d'obtenir au fond des tubes, une substance gélatineuse enrichie en FVIII qu'elle nomme alors ; « cryoprécipité ». Ce nouveau produit donne la possibilité aux hémophiles de s'auto-administrer leur traitement à domicile en cas de saignement permettant ainsi d'améliorer la qualité et l'espérance de vie des patients. Ces travaux initieront l'utilisation des concentrés en FVIII. Encore aujourd'hui, ils restent la seule option thérapeutique à disposition dans certains pays.<sup>7</sup>

Dans les années 1970, des concentrés purifiés obtenus à partir de plasmas de donneurs sont autorisés pour la commercialisation. Cependant, les méthodes d'obtention de ces dérivés plasmatiques ne garantissent pas la sécurité microbiologique et dès le début des années 80, on rapporte des infections virales post-transfusionnelles par le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine), mais également par le VHB (Virus de l'Hépatite B) et le VHC (Virus de l'Hépatite C). C'est l'affaire du « sang contaminé ».

La contamination de nombreux patients, parmi lesquels on compte des hémophiles, motive l'introduction de divers procédés de sécurisation des concentrés plasmatiques de FVIII et

de FIX<sup>8</sup> (nanofiltration, chauffage, traitement par solvant/détergent...). En parallèle, les laboratoires pharmaceutiques mettent au point la fabrication de concentrés de FVIII recombinants (années 2000) (<sup>9,10</sup>) puis des facteurs VIII recombinants (FVIIIr) modifiés afin d'allonger la demi-vie et de diminuer l'immunogénicité par des procédés tels que la pegylation (années 2010).<sup>11</sup>

Dans le même temps, d'autres pistes de traitements sont considérées, comme l'Emicizumab, anticorps murin bispécifique et humanisé qui mime l'action du FVIII dans le complexe « tenase » sans partager d'homologie de structure avec lui. Il représente une avancée majeure pour la prophylaxie des épisodes hémorragiques des patients hémophiles sévères avec ou sans inhibiteurs, mais n'est en aucun cas un traitement de l'hémorragie aigüe.<sup>12</sup> Ce traitement apporte également un avantage en termes de coût en santé dans le traitement au long cours.<sup>13</sup> D'autres cibles « non substitutives » sont également à l'étude ; anticorps anti-thrombine, anticorps anti-TFPI, thérapie génique...<sup>(14, 15)</sup>

Malgré ces nouvelles thérapeutiques innovantes, aucune ne remplace les injections de concentrés de FVIII, qui restent incontournables dans la prise en charge des patients hémophiles et notamment en cas d'hémorragie aiguë ou de chirurgie.

Le choix de concentré de FVIII (plasmatique ou recombinant) est souvent lié au risque d'immunogénicité (élimination du FVIII exogène via la production d'anticorps par le système immunitaire du patient).<sup>16</sup> De nombreux concentrés de FVIII sont disponibles sur le marché, et il est difficile d'établir de façon formelle le risque d'immunogénicité d'une molécule à l'autre.

De nombreuses publications disponibles dans la littérature comparent différentes molécules entre elles et certains résultats sont contradictoires (i.e plasmatique VS recombinant Flora Peyvandi et ses collaborateurs).<sup>17</sup>

## 1.5 Présentation du Nuwiq (Simoctocog alfa, Octapharma)



Figure 2. NUWIQ® utilisé

NUWIQ® 250 UI Pdre/solv p sol inj Fl+Ser/2,5ml / Cip : 3400955004028 / lot : M240B139X / DDP : 09/24 / SN : 6048937645926. Médicament conservé à + 4°C avant ouverture

C'est un concentré de FVIIIr de quatrième génération disponible sur le marché depuis 2014. Il est produit dans une lignée cellulaire humaine (cellules rénales embryonnaires) avec un traitement post-traductionnel de la protéine semblable à celui de l'homme sans modification chimique et sans fusion avec une autre protéine. Il est indiqué dans le traitement et la prophylaxie des épisodes hémorragiques chez les patients atteints d'HA et peut être administré à tous les groupes d'âges. Il a fait l'objet d'étude d'immunogénicité. Klukowska et ses collaborateurs<sup>18</sup> rapportent « l'absence de développement d'inhibiteurs chez les 49 enfants incluent dans leur étude et recevant du NUWIQ® en prophylaxie ». Pour l'étude menée par Mary Mathias et ses collaborateurs<sup>19</sup>, « l'incidence des inhibiteurs à titre élevé (> 5UB/mL) était de 16,2% parmi la population de PUPs (*Previously Untreated Patients*) traités par NUWIQ®. Cette incidence reste inférieure à celle retrouvée avec les FVIIIr produits sur des cellules de hamster (environ à 20%) ».

Le NUWIQ® est considéré comme l'un des FVIIIr les moins immunogènes dans le traitement de l'hémophilie A sévère.(<sup>19,20</sup>)

## 1.6 Suivi biologique des hémophiles

Selon la situation clinique et le traitement administré, il est souvent nécessaire de suivre le taux de FVIII au cours du traitement par la mesure de l'activité coagulante (FVIII:C). Il existe deux principes de dosage :

1. Les tests chronométriques (*Figure 4*) basés sur un temps de coagulation, le TCA, en une étape (*One Stage Assay*, OSA) où seul le FVIII à doser est en quantité limitante. De nombreuses références sont disponibles sur le marché (*Tableau 1*).
2. Les tests chromogéniques basés sur une méthode enzymatique colorimétrique (*Figure 3*). Il s'agit d'une réaction en deux étapes qui permet de mesurer l'activité du FVIII à l'aide d'un substrat chromogène (*Chromogenic Substrate Assay*, CSA) (*Tableau 2*).

Le dosage chromogénique du FVIII:C est la référence internationale pour le titrage des concentrés de FVIII hautement purifiés (plasmatiques ou recombinants) et est également la méthode de référence de la Pharmacopée européenne depuis 1994.<sup>21</sup>

Les tests chronométriques sont acceptables, mais les performances analytiques des réactifs de TCA disponibles sur le marché français ne sont pas équivalentes pour le dosage de FVIII et particulièrement pour le dosage des FVIIIr. Pour Dominique Lasne et ses collaborateurs<sup>22</sup> : « la structure moléculaire des FVIIIr, mais également les modifications post-traductionnelles différentes d'une lignée cellulaire à une autre, peuvent influencer les mesures d'activité ». Les tests chronométriques sont plus simples à mettre en place et beaucoup moins coûteux que les tests chromogéniques ce qui explique qu'ils soient beaucoup plus utilisés par les laboratoires. Dans une étude menée dans 7 pays, 90% des laboratoires d'analyses utilisent un test OSA en routine et 68 % déclarent utiliser un test CSA pour diagnostiquer une HA chez leur patient.<sup>23</sup> Les *Tableaux 1* et *2* récapitulent l'ensemble des réactifs disponibles sur le marché français.

La multiplicité des traitements FVIIIr et des réactifs à disposition a mis en évidence des différences significatives entre les techniques chronométriques et chromogéniques et entre les techniques chronométriques elles-mêmes en fonction des molécules.<sup>(3,22,24)</sup> A titre d'exemple, Ledger et ses collaborateurs<sup>24</sup> ont mis en évidence un risque de sous-estimation

de 50% avec la technique chronométrique en comparaison de la technique chromogénique pour le dosage d'AFSTYLA® (ionoctocog alpha), un FVIIIr. Un facteur de conversion a pu être déterminé afin d'établir une correspondance entre les deux techniques. Cet exemple met en évidence la nécessité d'évaluer les performances de ces tests pour chaque nouvelle molécule de FVIIIr afin d'optimiser la prise en charge des patients traités.<sup>25</sup>

Une étude bibliographique est indispensable et il est vivement conseillé d'évaluer le ou les réactifs utilisés dans son laboratoire pour chaque nouveau traitement.

Le NUWIQ® est commercialisé en 2014 et est rendu disponible au CHU d'Angers en 2022. En amont de son utilisation, nous avons effectué une revue de la littérature concernant ces performances dans le suivi des patients HA.

En 2022, une seule référence bibliographique était disponible. Il s'agit d'une étude multicentrique qui a étudié différents réactifs chronométriques et chromogéniques à partir d'échantillons *spikés* (surchargeés en NUWIQ®), et qui ne met pas en évidence de différences significatives entre les techniques mais qui souligne l'importance de la standardisation des procédures de laboratoire pour réduire la variabilité.<sup>26</sup> Dans ce contexte, nous avons souhaité évaluer les performances des tests disponibles au laboratoire d'Hématologie du CHU d'Angers à la fois sur des échantillons *spikés* et sur des plasmas de patients traités par NUWIQ®. Ceci dans le but de vérifier que la technique disponible à toute heure (24H/24) au laboratoire rend des résultats cohérents. Malheureusement, la technique recommandée CSA n'est pas disponible en 24H/24 au sein du laboratoire du CHU d'Angers. Ces dosages ont été réalisés dans le cadre du soin sans prélèvement biologique supplémentaire.

Tableau 1 : Liste des principaux réactifs de TCA utilisés dans les études pour les dosages chronométriques<sup>22</sup>

<b>Nom du produit</b>	<b>Dénomination courte pour le texte</b>	<b>Activateur</b>	<b>Origine des phospholipides</b>	<b>Fournisseur</b>
APTT-SP	APTT-SP	Silice colloïdale	Synthétique	Werfen
Cephen	Cephen	Equivalent de la silice micronisée	Végétale	Sysmex
Dade-Actin FS	Actin FS	Acide ellagique	Soja	Siemens
Dade-Actin-FSL	Actin FSL	Acide ellagique	Soja, lapin	Siemens
Dade-Actin	Actin	Acide ellagique	Lapin	Siemens
Dapttin TC	Dapttin	Silice et sulphatide	Non renseignée	Technoclone
DG-APTT Synth	DG Synth	Acide ellagique	Synthétique	Grifols
Pathromtin SL	Pathromtin SL	Silice (silicone dioxyde)	Végétale	Siemens
Pathromtin	Pathromtin	Kaolin	Végétale	Siemens
Platelin L	Platelin L	Silice micronisée	Non renseignée	Organon Teknika
Platelin LS	Platelin LS	Silice micronisée	Porc et poulet	Trinity biotech
STA- PTT Automate	PTT-A	Silice micronisée	Lapin	Diagnostica Stago
STA-Cephascreen	Cephascreen	Activateur polyphénolique	Lapin	Diagnostica Stago
STA-CK Prest	CK Prest	Kaolin	Lapin	Diagnostica Stago
SynthAFax	SynthAFax	Acide ellagique	Synthétique	Werfen
SynthASil	SynthASil	Silice colloïdale	Synthétique	Werfen
TriniCLOT aPTT HS	aPTT HS	Silice micronisée	Porc et poulet	Tcoag
TriniCLOT aPTT S	aPTT S	Silice micronisée	Non renseignée	Tcoag
TriniCLOT Automated aPTT	Automated aPTT	Silice	Lapin	Tcoag
Automated aPTT				

Tableau 2 : Liste des principales trousse de réactifs pour le dosage chromogénique des FVIII disponibles en France en 2018<sup>22</sup>

<b>Nom du produit</b>	<b>Dénomination courte pour le texte</b>	<b>Origine des protéines</b>	<b>Fournisseur</b>
FVIII chromogenic	FVIII chromogenic	Bovine	Siemens
Biophen FVIII:C	Biophen FVIII	Humaine	Sysmex
Chromogenix Factor VIII	Coamatic Coamatic FVIII	Bovine	Chromogenix
Chromogenix Factor VIII	Coatest SP Coatest SP FVIII	Bovine	Chromogenix
Electrachrome FVIII	Electrachrome FVIII	Bovine	Werfen
TECHNOCHROM FVIII:C	Technochrom FVIII	Humaine/bovine	Tecnoclone
TriniCHROM FVIII:C	Trinichrom FVIII	Bovine	Stago

## Matériels et méthodes

### 2.1 Généralités

Cette étude prospective/rétrospective monocentrique a été réalisée au Centre Hospitalier Universitaire d'Angers de novembre 2023 à juillet 2024. Elle a été approuvée par le comité d'éthique du centre Hospitalier Universitaire d'Angers le 11/10/2023 et est enregistrée sous le numéro 2023-146.

Le seul critère d'inclusion des patients était le fait d'avoir une maladie hémorragique nécessitant un traitement par NUWIQ® (HA et maladie de Willebrand). Cette étude n'a pas fait l'objet de prélèvement de sang supplémentaire car les dosages ont été réalisés sur les tubes citratés prélevés dans le cadre du soin.

Les patients ont reçu une fiche d'information par l'équipe médicale avec la possibilité de refuser de participer (*Annexe 9* et *Annexe 10*). Le critère d'exclusion principal était donc le refus du patient ou de son représentant légal. Le critère de non-inclusion était le fait d'avoir reçu un traitement pouvant interférer dans le dosage du FVIIIr (comme par exemple l'Emicizumab). Le critère principal de jugement était l'absence de différence significative entre les méthodes de dosages utilisées au laboratoire.

Trois méthodes de dosages de FVIII:C ont été comparées :

- technique chromogénique considérée comme technique de référence,
- technique chronométrique utilisée en routine au laboratoire,
- technique chronométrique avec une calibration spécifique FVIIIr NUWIQ®.

Cette dernière technique a été mise en œuvre sans expérience préalable dans le domaine des calibrations spécifiques au sein du laboratoire du CHU d'Angers. En effet, nous n'avions jamais utilisé ce type de calibration en routine, contrairement à d'autres centres qui ont pu s'en servir pour doser des produits comme le Refacto.<sup>27</sup>

Une ampoule de NUWIQ® a été commandée à la Pharmacie à Usage Intérieur (PUI) du Centre Hospitalier Universitaire d'Angers pour l'ensemble de cette étude.

Les échantillons de sang des patients inclus dans l'étude ont été prélevés dans le cadre du soin et ont été traités suivant les recommandations du GEHT (Groupe d'Etude sur l'Hémostase et la Thrombose) : sang total recueilli dans des tubes sous vide en PET de 3mL à 3,2% de citrate de sodium. Le plasma pauvre en plaquettes (PPP) a été obtenu après une double centrifugation à 2200g pendant 10 minutes à température ambiante.<sup>28</sup>

Les PPP ont été congelés à -80°C dans les 4 heures suivant le prélèvement. Les dosages ont été réalisés en séries sur les échantillons congelés.

Tous les échantillons ont été anonymisés puis jetés à la fin de l'étude.

## 2.2 Méthode de mesure

Les méthodes de dosage du FVIII reposent sur la mesure de son activité (FVIII:C), coagulante ou enzymatique, rendue en pourcentage par rapport à un plasma de référence (Standard raccordé à l'étalement international de l'OMS). Nous avons comparé la technique chromogénique en deux étapes (CSA) et la technique chronométrique en une étape (OSA) utilisée en routine ainsi que la technique chronométrique avec une calibration spécifique NUWIQ® réalisée en interne.

L'ensemble des dosages ont été réalisés sur un automate de type STAR Max de la société STAGO®.

### **2.2.1 Technique chromogénique (référence)**

Cette technique se déroule en deux étapes. Lors de la première étape, un réactif contenant des facteurs de coagulation purifiés (FIXa, FX, FIIa) à des concentrations optimales est mis en contact avec le plasma contenant le FVIII à doser. Ce FVIII est en quantité limitante pour la réaction en comparaison des autres facteurs présents en excès. Cette étape est indépendante des voies d'initiation extrinsèque ou intrinsèque, la thrombine du réactif activant le FVIII<sup>29</sup> présent dans le plasma patient. Le FVIIIfa joue alors son rôle de cofacteur du FIXa (préalablement activé) pour former le complexe « tenase » et activer le FX (FXa). La seconde étape consiste à mesurer l'activité coagulante du FXa générée en mesurant son activité enzymatique sur un substrat chromogène spécifique (oligopeptide porteur d'un groupe paranitroaniline). La quantité de chromophore libérée (substance colorée) est alors proportionnelle à la quantité de FXa générée et donc à celle du FVIII présent dans le plasma à tester. L'intensité lumineuse est mesurée par spectrophotométrie à 405nm (<sup>24,30</sup>) puis convertie en équivalent FVIII:C au moyen d'une courbe de calibration préalablement établie avec un standard FVIII raccordé à l'étalement international de l'OMS pour chaque nouveau lot de réactif. Les limites de linéarité du test chromogénique sont de 1 à 260%.

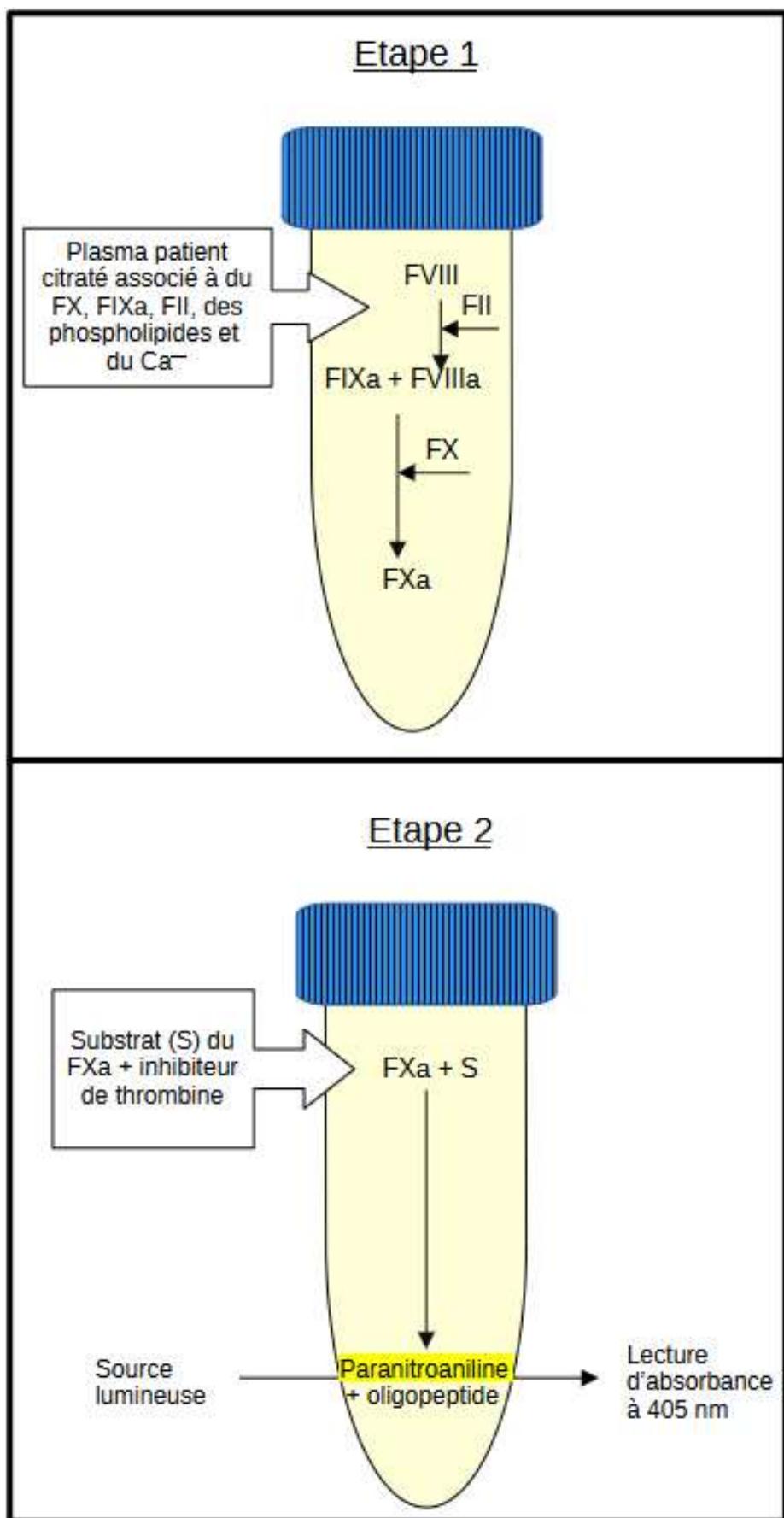


Figure 3. Représentation schématique du principe du dosage chromogénique

## **2.2.2 Technique chronométrique**

Cette technique est basée sur un test de coagulation dont la courbe de calibration est spécifique à chaque lot de réactifs et utilise un standard FVIII raccordé à l'étalon international de l'OMS.<sup>(30, 31)</sup> Il existe deux principes de mesure d'un temps de coagulation, la méthode électromagnétique et la méthode optique. Au CHU d'Angers, les automates de coagulation utilisent la méthode électromagnétique basée sur une détection viscosimétrique. Chaque cuvette de mesure contenant le plasma à tester contient une bille de fer en mouvements oscillatoires dans un champ électromagnétique. Lorsque le caillot se forme, l'amplitude des oscillations de la bille diminue. Le chronomètre s'arrête dès lors que la moyenne glissante des 4 dernières valeurs d'amplitudes est égale à 50% de la moyenne de toutes les amplitudes (*Figure 4*).

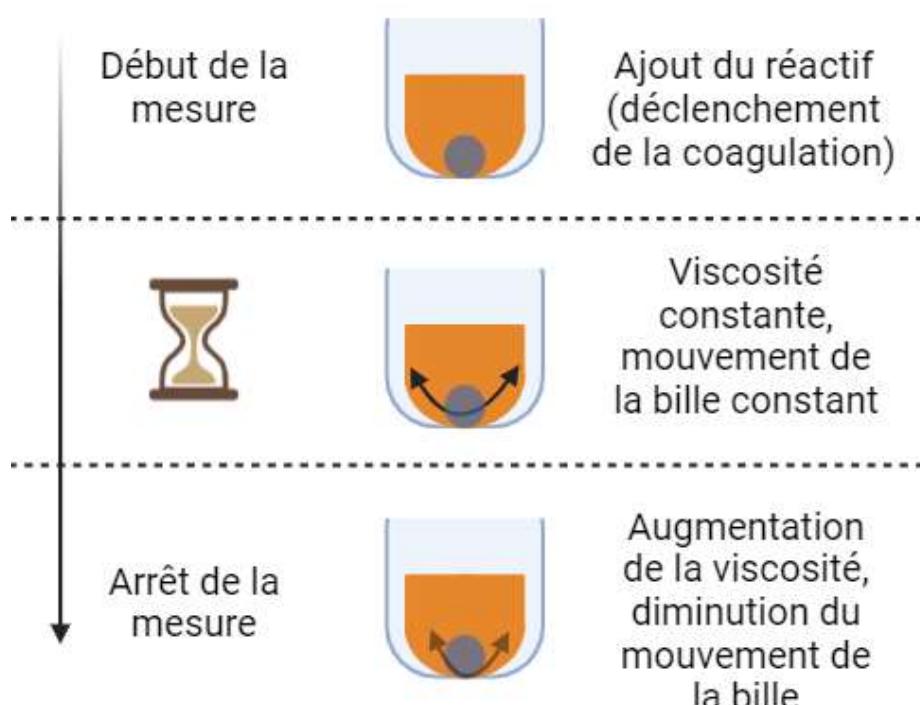


Figure 4. Représentation schématique de la technique de détection viscosimétrique

La technique chronométrique avec la calibration NUWIQ® repose sur le même principe mais utilise une solution calibrante de NUWIQ® à la place de la solution standard de FVIII. Les valeurs de référence du facteur VIII:C sont comprises usuellement entre 50 et 150%<sup>32</sup> (au laboratoire 50-120%). Les limites de linéarité du test chronométriques sont de 0,7 à 400%.

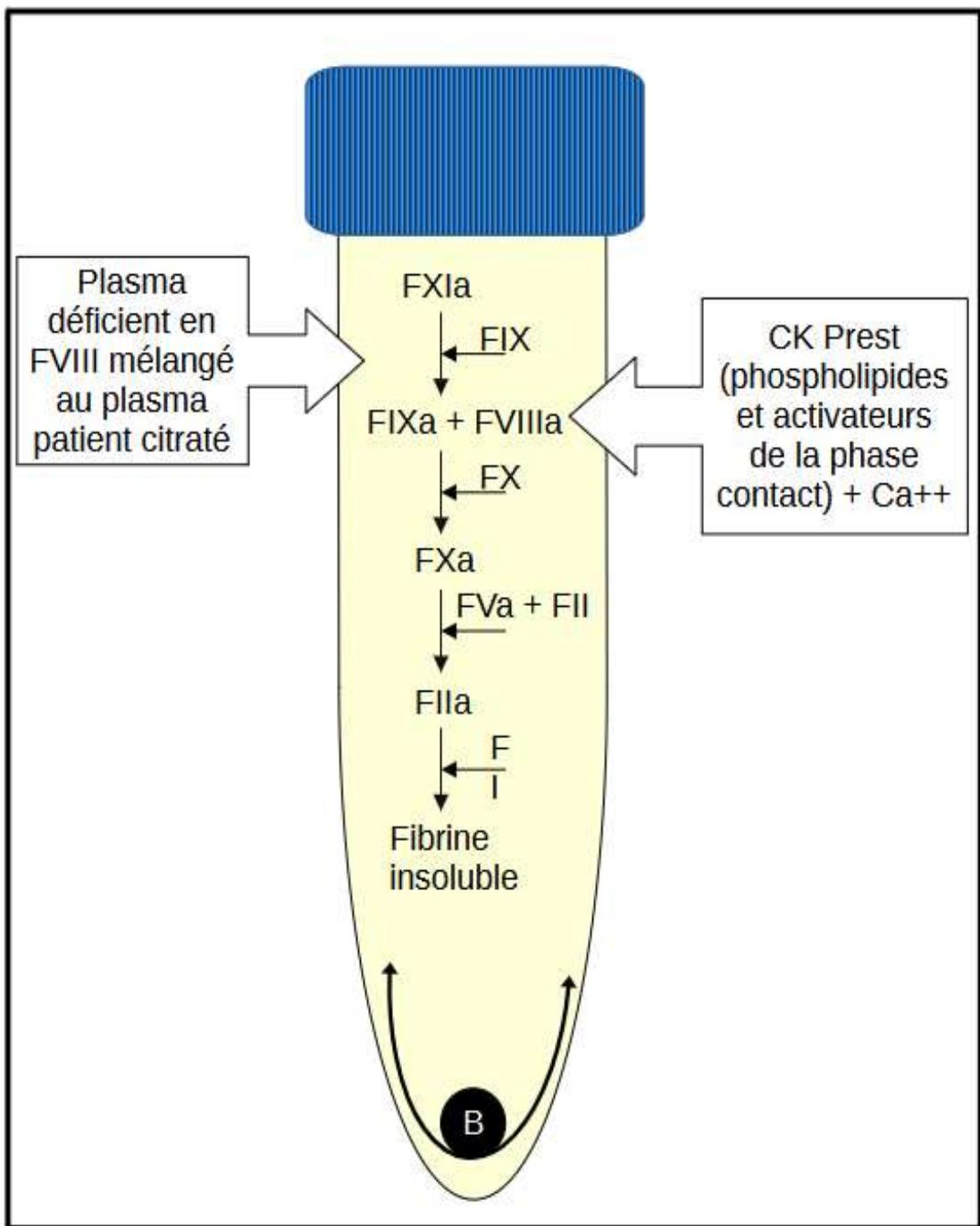


Figure 5. Représentation schématique du principe du dosage chronométrique  
Ce test en routine est réalisé dans une cupule contenant la bille (Figure 4)

### 2.3 Automate utilisé

Le laboratoire d'Hématologie du CHU d'Angers secteur Hémostase est équipé de 4 automates STAR Max de la société STAGO® depuis 2017. Ces automates permettent de

réaliser à la fois des dosages chronométriques, chromogéniques et immunologiques. Tous les dosages de l'étude ont été réalisés sur l'automate du secteur d'hémostase spécialisée.

## 2.4 Réactifs utilisés

Le dosage du facteur VIII:C par technique chromogénique a été réalisé avec le kit de réactif FVIII chromogenic de la société SIEMENS Healthineers® composé de FIXa, FX et d'un substrat chromogène du FXa d'origine bovine (*Annexe 3*). La courbe de calibration a été réalisée pour chaque nouveau lot de réactif, sur 6 points de gamme en duplicate (2 mesures par point de gamme) avec le plasma standard humain Siemens® (FVIII titré avec l'étalon OMS) (*Annexe 6 et 7*).

Le dosage du facteur VIII:C par technique chronométrique (routine et NUWIQ) a été réalisé avec le réactif STA®-CK PREST composé d'une céphaline dérivée de tissu cérébral de lapin couplée à un activateur à base de kaolin et d'un plasma immuno-déplété en FVIII de la société Diagnostica Stago® (*Annexe 4*). La courbe de calibration a été réalisée pour chaque nouveau lot de réactif (CK-Prest et ImmunodeficientFVIII) avec le calibrant UNICAL® STAGO pour la technique de routine et avec une solution de NUWIQ® (NUWIQ® 250 UI Pdre/solv p solv inj Fl+Ser/2,5ml) (*Figure 1*) pour la calibration spécifique.

## 2.5 Analyse statistique

Les données ont été recueillies dans un tableur Excel. L'analyse statistique de cette comparaison de méthodes comprend l'utilisation d'un test de Student pour données appariées réalisé sur le logiciel biostaTGV. De plus, elle comprend l'utilisation d'un test de corrélation de Pearson avec l'utilisation du coefficient de corrélation « r » réalisé sur le logiciel GraphPad Prism 8 (GraphPad Software inc), la réalisation d'un graphique de Bland-Altman sur ce même logiciel et la réalisation d'une régression linéaire non-paramétrique par un test de Passing-Bablock sur le logiciel MedCalc® statistical software.

## 2.6 Patients

Tous les patients inclus dans l'étude présentent un déficit en FVIII et ont reçu une substitution par du NUWIQ® à visée prophylactique dans un contexte chirurgical ou à visée thérapeutique dans le cas d'un saignement actif. Lorsqu'il s'agissait d'un contexte chirurgical, un protocole de traitement spécifique avait été préalablement établi et le patient recevait les informations (fiche de renseignement) au cours d'une consultation au Centre de

Traitements de l'Hémophilie CTH du CHU d'Angers. Quand il s'agissait d'un contexte d'urgence les patients recevaient les informations au moment de leur prise en charge. Les concentrés de FVIIIr sont indiqués dans le traitement et la prophylaxie des épisodes hémorragiques chez des patients atteints d'HA,<sup>33</sup> cependant, ils peuvent être utilisés chez certains patients atteints de maladie de Willebrand, ce qui a été le cas pour 3 patients de l'étude.

Au total : 7 patients, 6 de sexe masculin, 1 de sexe féminin (Willebrand type 3), âgés de 1 mois à 88 ans ont été inclus dans cette étude (*Tableau 3*) et nous ont permis d'analyser 16 échantillons et d'effectuer 48 dosages de FVIII.

Tableau 3 : Caractéristique des patients de l'étude

Patient	Age (en année)	Nombre d'échantillon	Pathologie	Motif d'hospitalisation
1	88	2	Hémophile mineur	Endofuite de type 1a de l'EVAR
2	1.5	2	Willebrand type 3	Pose de site implantable
3	1 mois	7	Hémophile sévère	Hémorragie intracérébrale (craniectomie)
4	23	2	Hémophile mineur	Traumatisme de la cheville gauche
5	51	1	Hémophile mineur	Epistaxis chronique
6	24	1	Willebrand type 2N	Chirurgie de butée de l'épaule
7	31	1	Willebrand type 1	Biopsie rénale

## 2.7 Préparation des techniques de dosages

Le but de notre étude était de vérifier les performances analytiques des techniques de dosage de FVIII disponibles au laboratoire pour le dosage de NUWIQ®.

La *field study* de Tiefenbacher et ses collaborateurs<sup>26</sup> qui a comparé différentes méthodes de dosages (chronométriques et chromogéniques) à partir d'échantillons surchargés en

NUWIQ® (échantillons *spikés*) réalisés dans 19 laboratoires de 9 pays différents (dont la France) ne retrouve pas de différence significative entre les techniques étudiées.

Dans un premier temps, nous avons voulu reproduire les conditions de cette étude à partir d'échantillons *spikés*. Un échantillon *spiqué* résulte de l'ajout d'une quantité connue d'un médicament, ici le NUWIQ® dans une solution de composition connue afin d'en réaliser la dissolution et de pouvoir réaliser des dilutions et des dosages. Ces échantillons ont été préparés au laboratoire à partir d'une ampoule de NUWIQ® préalablement reconstituée avec de l'eau PPI puis diluée dans du plasma immunodéficient en FVIII<sup>26</sup> afin d'obtenir une solution de NUWIQ® à 100 UI/dL (100%). Cette solution mère a constitué le calibrant NUWIQ® pour la technique chronométrique avec calibration spécifique (OSA NUWIQ) mais aussi, le point de départ de la gamme réalisée par la suite (points à 100, 30, 5 et 1%) afin de comparer les performances des 3 techniques (*Annexe 1*).

## 2.8 Calibration

Au préalable nous avons réalisé le paramétrage du nouveau test sur l'automate STAR Max (même méthodologie que le dosage chronométrique de routine), puis la calibration spécifique (plasma standard remplacé par l'échantillon NUWIQ® à 100%). La solution de NUWIQ® a été préparée selon deux modes différents, l'un en utilisant de l'eau PPI et l'autre du plasma immunodéficient en FVIII (immunodefFVIII). La courbe obtenue avec le calibrant NUWIQ-eau PPI (*Annexe 8*) n'a pas donné satisfaction (courbe de calibration anormale et contrôles internes de qualité non conformes), mais nous avons validé la courbe obtenue avec le calibrant NUWIQ-ImmunoDefFVIII.

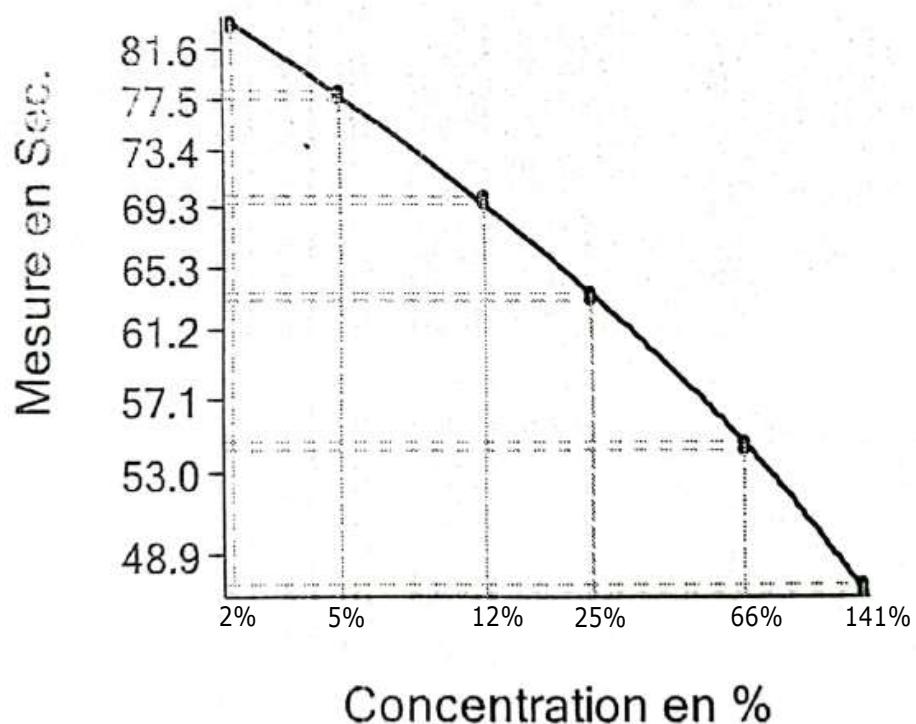


Figure 6. Calibration de Routine : courbe de calibration standard fournisseur (Plasma humain normal lyophilisé)

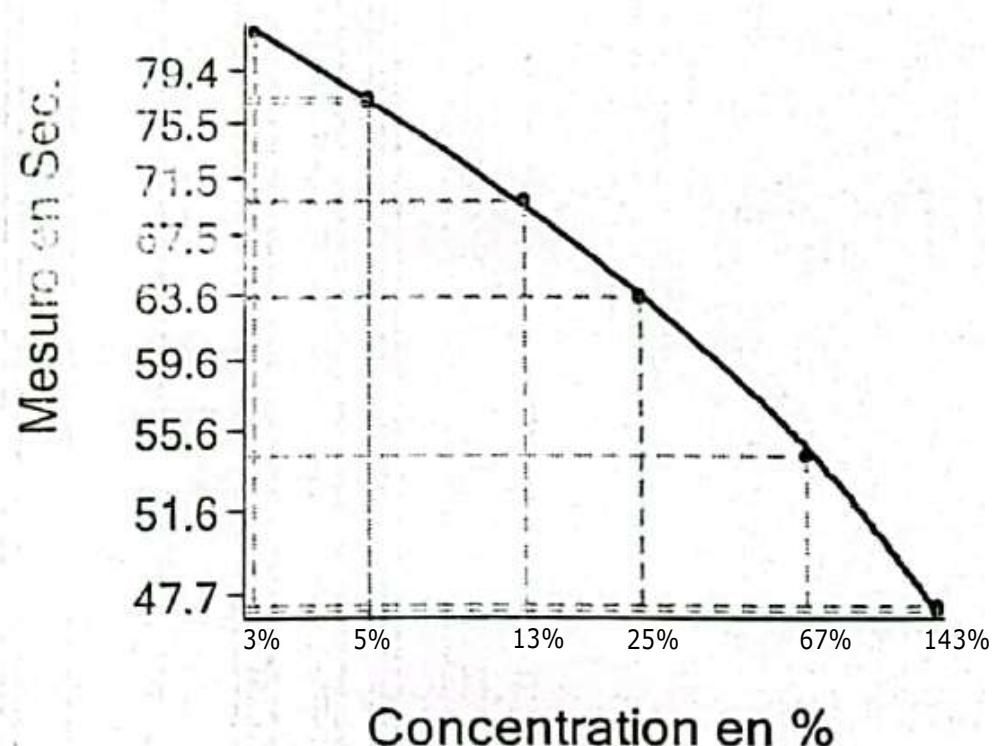


Figure 7. NUWIQimmunodéficient: courbe de calibration « maison » effectuée en mélangeant du NUWIQ® avec du plasma immunodéficient en FVIII

## 2.9 Réalisation des dosages

Nous avons suivi le même protocole que celui utilisé dans l'étude multicentrique pour valider nos techniques. Des échantillons *spikés* à 100%, 30%, 5% et 1% de NUWIQ® théorique ont été analysés avec les 3 techniques 3 jours de suite (*Annexe 1*). Cette première étape était une étape de validation et nous a permis dans un second temps de réaliser des dosages sur des échantillons de plasma de patients ayant reçu du NUWIQ®.

Les dosages des échantillons patients ont été réalisés en série et chaque échantillon a été évalué par les 3 techniques le même jour. Avant d'effectuer les dosages, chaque série était validée au préalable par le passage de solutions de contrôle de FVIII (2 niveaux, niveau normal et niveau pathologique). Les échantillons conservés à -80°C ont été décongelés au bain-marie à 37°C pendant 5 minutes en suivant les recommandations du GEHT.<sup>28</sup>

## Résultats

### 3.1 Dosages échantillons *spikés*

Tableau 4 : Résultats des différents dosages sur les trois méthodes en fonction des jours et des valeurs de FVIIIr ajoutés dans les échantillons *spikés*

JOUR	Taux de référence de NUWIQ	Etalonnage FVIII routine		Etalonnage FVIII NUWIQ
		CSA (%)	OSA routine (%)	OSA NUWIQ (%)
1	100%	111	98,6	104,4
	30%	30	29,2	31,6
	5%	7	5,5	5,9
	1%	1	1,5	1,6
2	100%	103	94,8	101,5
	30%	33	27,8	31
	5%	7	5,8	6,2
	1%	2	1,7	1,8
3	100%	104	90	96,1
	30%	29	27,5	29
	5%	6	5,2	5,7
	1%	<1	1,5	1,6

Moyennes des dosages sur 3 jours

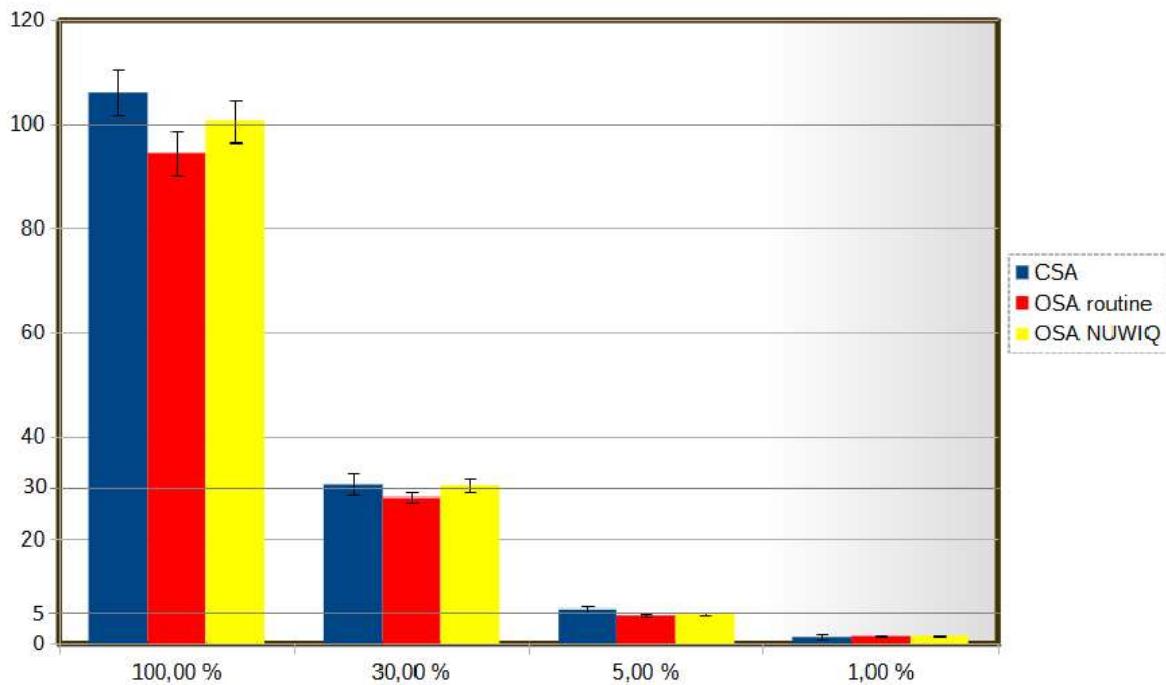


Figure 8 : Histogramme des valeurs moyennes retrouvées sur les trois tests et écarts types associés sur échantillons spikés (Annexe 2)

En bleu le test chromogénique de référence (CSA) en rouge le test chronométrique utilisé en routine (OSA routine) et en jaune le test chronométrique avec une calibration « maison » par du NUWIQ® (OSA NUWIQ)

Tableau 5 : Valeur numérique des Moyennes et Coefficient de Variation (CV) pour une moyenne à 100, 30, 5 et 1% de valeur attendue

Valeur attendue	100%	30%	5%	1%
Moyenne CSA	106	30,7	6,7	1,3
CV CSA	4,1	6,8	8,5	43,8
Moyenne OSA routine	94,4	28,2	5,5	1,6
CV OSA routine	4,6	3,2	4,9	5,4
Moyenne OSA NUWIQ	100,6	30,5	5,9	1,7
CV OSA NUWIQ	4,2	4,6	4,7	6,5

L'histogramme de la *Figure 8* et le *Tableau 5* montrent que la calibration spécifique semble la plus proche des valeurs théoriques. La technique chromogénique surestime l'échantillon à 100%. Selon le GEHT, le CV de reproductibilité maximum recommandé est

fixé à 7,9%,<sup>28</sup> nos CV se retrouvent toutes inférieures à cette valeur exceptée pour la technique CSA (valeurs basses). Les résultats obtenus sont très acceptables concernant les deux techniques chronométriques. Afin de comparer les valeurs attendues aux valeurs théoriques, nous avons réalisé un test de Student pour données appariées dont les valeurs attendues de « p-values » sont regroupées dans le *Tableau 6*.

Tableau 6 : p-value des méthodes de dosage comparées aux valeurs attendues (référence)

	CSA	OSA routine	OSA NUWIQ
P-value	<b>0,0367*</b>	0,1123	0,2408

Si la p-value calculée est strictement inférieure à 0,05 (p-value < 0,05) c'est qu'il existe une différence significative entre la valeur attendue et les valeurs trouvées par la méthode de dosage qui est comparée.

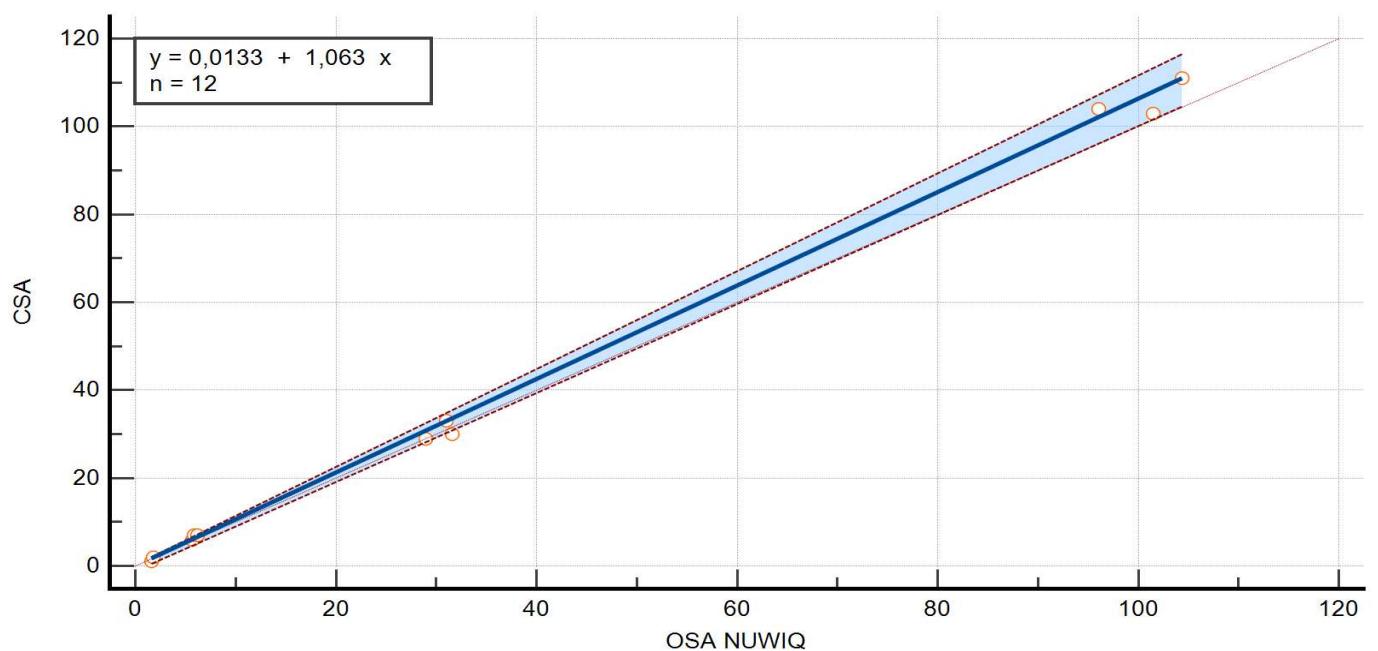
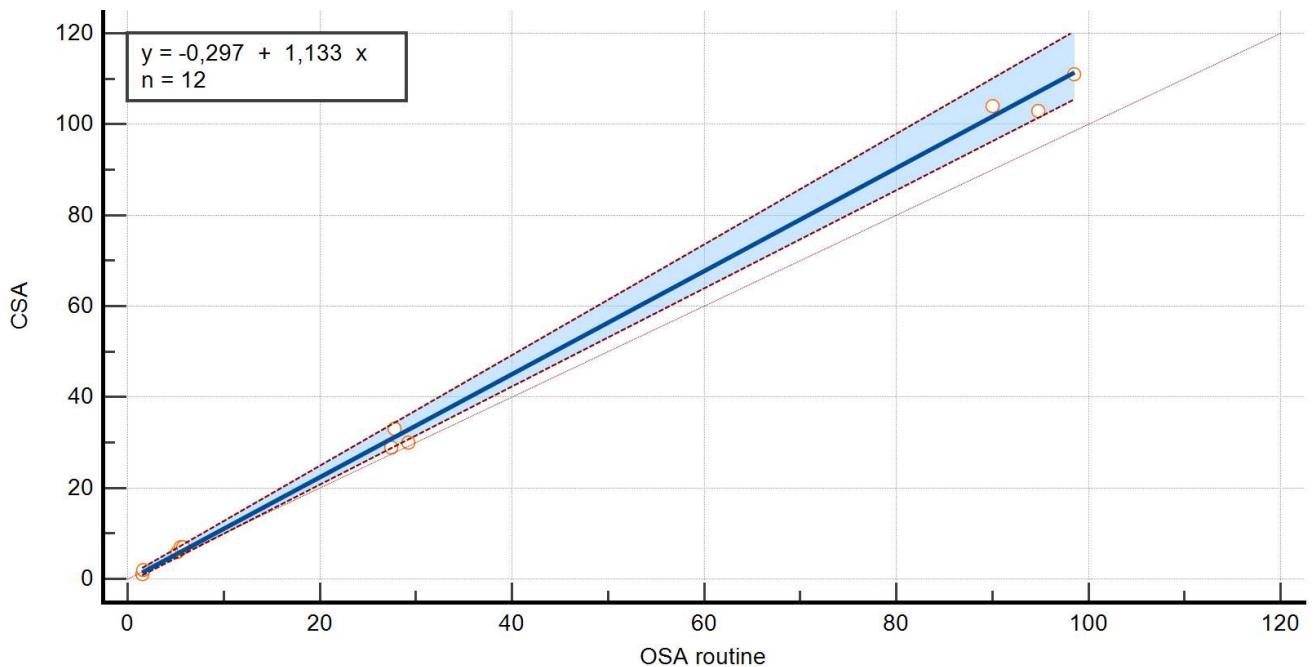
Les p-values calculées décrivent une différence significative entre les valeurs attendues et les valeurs obtenues avec la techniques CSA et elles décrivent également une absence de différence significative par rapport à la valeur attendue pour les chronométriques OSA routine et OSA NUWIQ.

Le faible nombre de points comparés peut expliquer ces résultats. Néanmoins, cette différence statistique n'impacte pas l'interprétation biologique.

Nous avons également comparé les techniques entre elles par le calcul de coefficients de corrélation de Pearson entre chacun des tests :

- Entre le test considéré de référence CSA et le test de routine OSA routine pour lesquels on obtient un coefficient de corrélation  $r = 0,99$
- Entre le test considéré de référence CSA et le test chronométrique NUWIQ (OSA NUWIQ) pour lesquels on obtient un coefficient de corrélation  $r = 0,99$
- Entre les deux tests chronométriques de routine et chonométrique NUWIQ pour lesquels on obtient un coefficient de corrélation  $r = 1$

Ces résultats, tous très proches de  $r = 1$ , mettent en évidence une corrélation statistique entre chacun des tests.



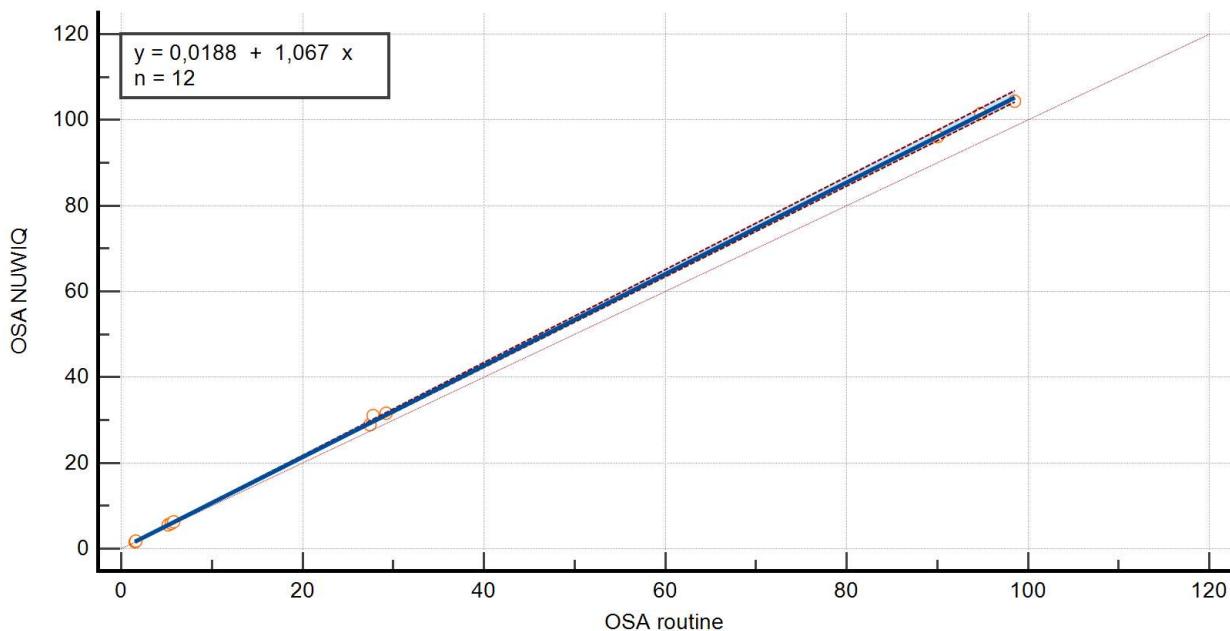


Figure 11. Test de Passing-Bablok entre OSA NUWIQ et OSA routine

Pente : 1,07 IC[1,06;1,08], Ordonnée à l'origine : 0,02 IC[-0,03;0,12]

Nous avons également réalisé des droites de régression linéaire. Chacune d'entre elles présente une pente proche de 1 et une ordonnée à l'origine proche de 0. Ces résultats montrent qu'il existe une relation linéaire entre nos valeurs et donc qu'il existe une corrélation entre les techniques comme l'indiquait le coefficient de corrélation de Pearson (*Figures 9, 10 et 11*). Ces résultats montrent aussi que le test chromogénique donne des valeurs plus élevées en comparaison des autres tests. Les *Figures 9, 10 et 11* mettent en évidence une droite de corrélation dont la pente est supérieure à 1. La *Figure 10* indique que la technique CSA et la technique OSA NUWIQ sont les plus comparables et sont corrélées, puisque l'intervalle de confiance à 95% de la pente de cette droite est très proche de 1. La *Figure 11* montre quant à elle que les 2 techniques chronométriques présentent une corrélation importante mais que la technique OSA NUWIQ rend de façon systématique des valeurs plus fortes. Enfin on remarque que les techniques OSA NUWIQ et CSA donnent des valeurs plus élevées que la technique OSA de routine lors de dosage d'échantillons *spikés* par du NUWIQ®. Ces résultats sont à confirmer par les tests sur les échantillons patients.

### 3.2 Dosages échantillons patients

Tableau 7: Résultats des différents dosages sur les trois méthodes réalisées sur les échantillons de patients

Patient	Ech	FVIII de base (%)	Pic ?	Etal routine		Etal NUWIQ	Poso (UI/kg) / TT (%)	vWAg (%)	Fib (g/L)
				CSA (%)	OSA (%)				
1	1	33		149	146,6	164,9	33 / 99		6,07
	2	33		129	126,9	133,5			
2	3	2	OUI	95	99,6	102,6	52,6 / 105,2	113	2,42
	4	2		168	169,6	174,1			
3	5	<1		260	207,2	208,4			
	6	<1		143	101,5	104,6			
	7	<1		87	70,6	74			
	8	<1		74	66,1	71,1			
	9	<1		110	82,1	87,9			
	10	<1		105	84,7	88,9			2,5
	11	<1		79	78,6	84,6			
4	12	11	OUI	230	224,3	246	45 / 101	87	2,97
	13	11		67	65,6	68,7			
5	14	16	OUI	149	159,4	173,2	42 / 100	72	3,60
6	15	70	OUI	182	164,4	171,8	12 / 94		
7	16	31,5	OUI	223	133,4	142,3	58 / 147,5	144	2,65

Légende : Ech : échantillon/ FVIII de base : taux de base de FVIII chez le patient/ Pic ? : OUI si prélèvement au pic, le pic étant 15 minutes après la fin de l'injection de NUWIQ®/ Etal : étalonnage/ Poso : posologie/ TT : taux théorique à atteindre si récupération normale (2 % pour 1UI/kg de FVIII injecté), / vWAg : valeur de l'antigène Willebrand/ Fib : taux de fibrinogène

Sur le *Tableau 7*, sont notés les résultats des dosages sur les trois techniques de nos échantillons patients. Du fait que les patients de l'étude présentaient des pathologies différentes, on retrouve des taux basaux de FVIII différents. Des différences sont observables pour 7 échantillons (5, 6, 7, 8, 9, 10 et 16) avec des résultats supérieurs avec la technique CSA par rapport aux deux autres. Nous avons également comparé le taux de FVIII au facteur Willebrand quand il était disponible, et aucune discordance majeure entre le taux de FVIII et le taux de Willebrand antigène n'a été retrouvé. Concernant les taux théoriques à atteindre après injection du NUWIQ®, des discordances sont à noter pour les échantillons 1, 12, 14 et 15 avec systématiquement une surestimation de nos tests par rapport à la valeur attendue.

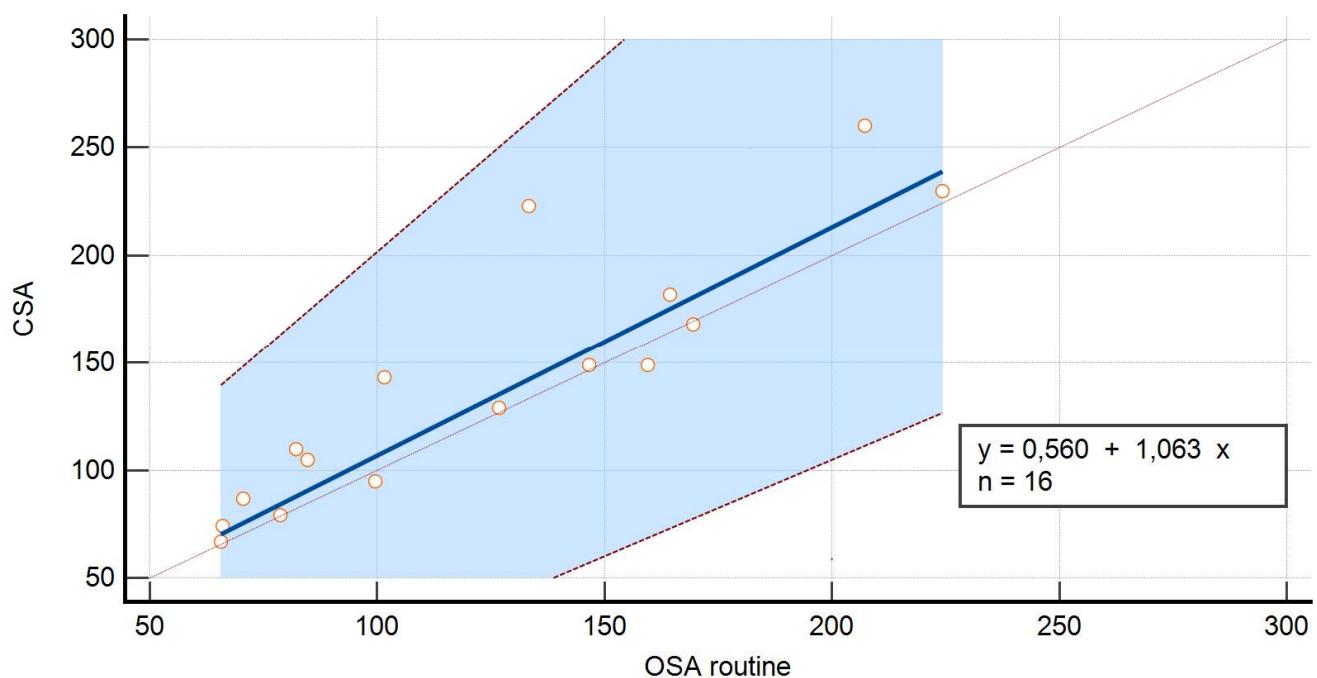


Figure 12. Test de Passing-Bablock des échantillons patients entre les tests CSA et OSA routine  
Pente : 1,063 IC[0,90;1,81], Ordonnée à l'origine : 0,56 IC[-74;20]

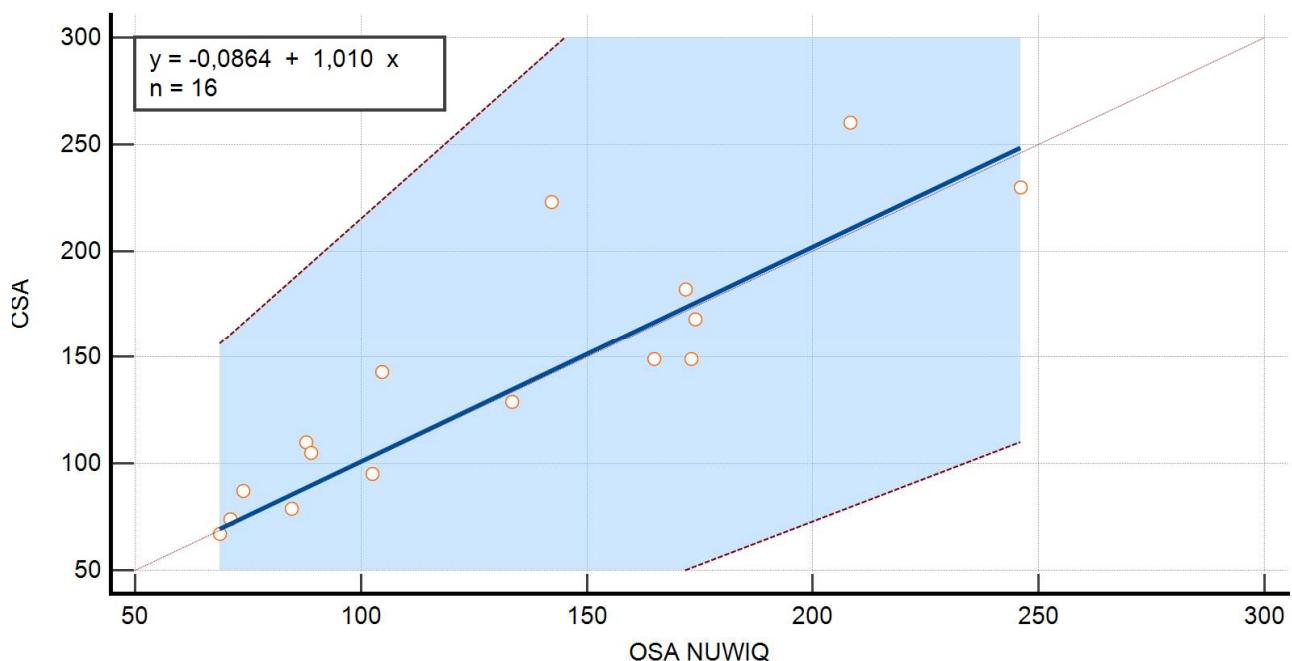


Figure 13. Test de Passing-Bablock des échantillons patients entre les tests CSA et OSA NUWIQ  
Pente : 1,010 IC[0,81;1,88], Ordonnée à l'origine : 0,09 IC[-89;27]

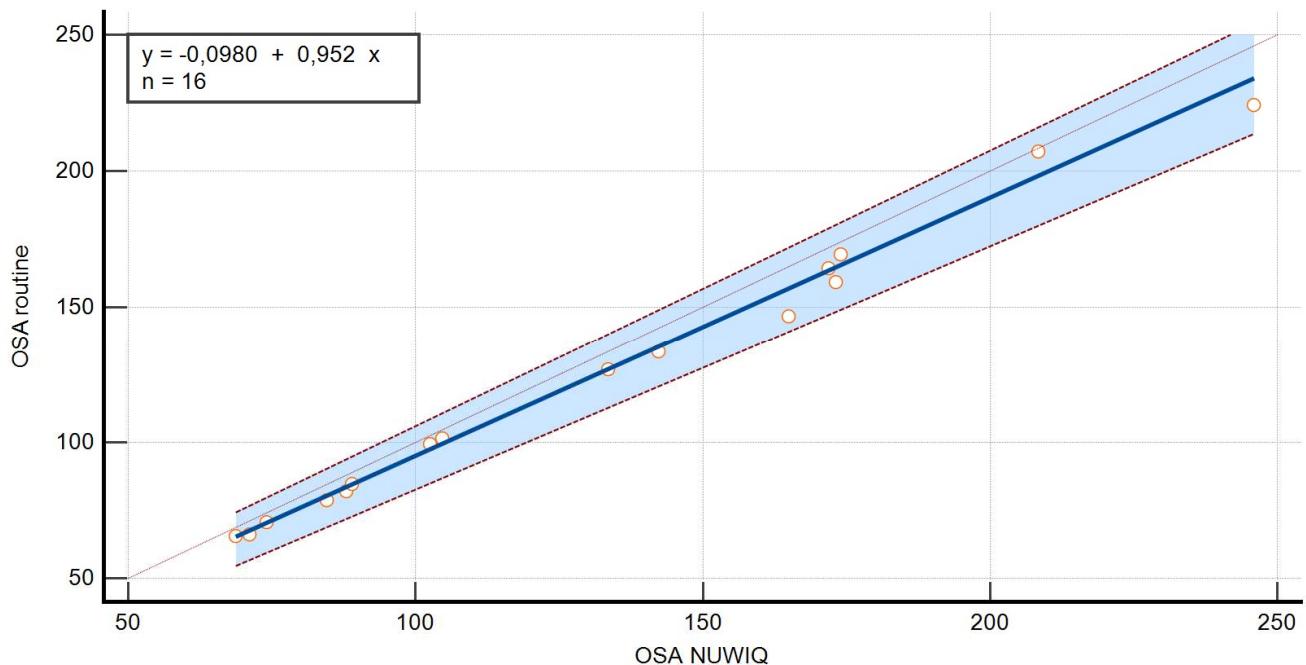


Figure 14. Test de Passing-Bablok des échantillons patients entre les tests OSA routine et OSA NUWIQ

Pente : 0,952 IC[0,90;1,01], Ordonnée à l'origine : 0,098 IC[-7;4,5]

Nous avons réalisé des tests de Passing-Bablok pour comparer les dosages d'échantillons patients, ils sont représentés dans les *Figures 12, 13, et 14*. Nous constatons que la droite de régression linéaire suit de près la droite « idéale » de pente « 1 » et d'ordonnée à l'origine « 0 » ce qui tend à dire que les méthodes sont comparables. De plus, la droite « idéale » se situe dans l'intervalle de confiance de la pente à chaque comparaison. A noter que la dispersion des valeurs est plus importante entre les méthodes CSA et OSA qu'entre les deux méthodes OSA.

## Difference par rapport à la moyenne: CSA/OSA routine

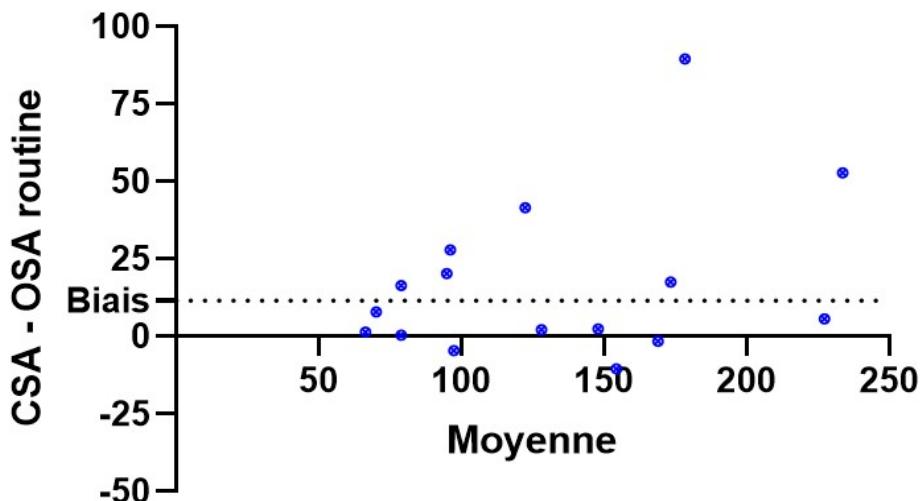


Figure 15. Graphique de Bland-Altman CSA/OSA routine

Représente la différence des résultats entre la méthode CSA et OSA routine en fonction de la moyenne des résultats obtenues chez nos patients

## Difference par rapport à la moyenne: CSA/OSA NUWIQ

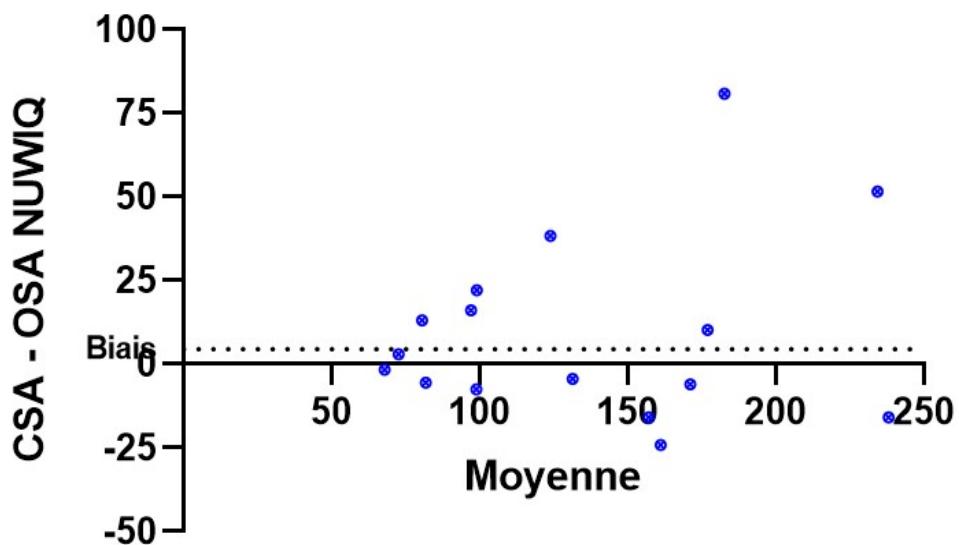


Figure 16. Graphique de Bland-Altman CSA/OSA NUWIQ

Représente la différence des résultats entre la méthode CSA et OSA NUWIQ en fonction de la moyenne des résultats obtenues chez nos patients

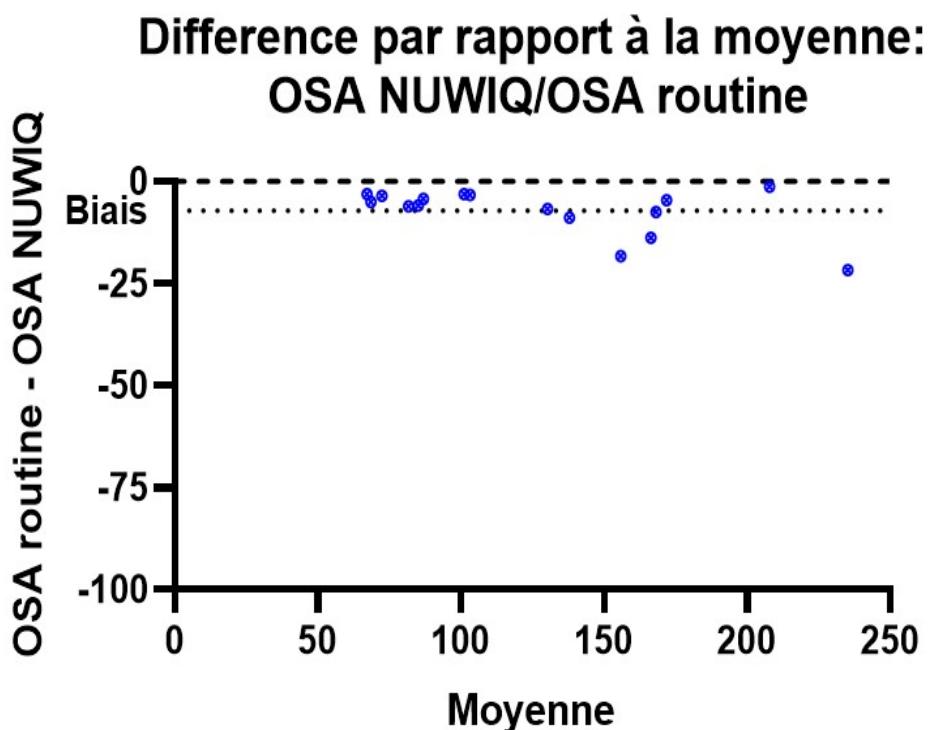


Figure 17. Graphique de Bland-Altman OSA routine/OSA NUWIQ

Représente la différence des résultats entre la méthode OSA routine et OSA NUWIQ en fonction de la moyenne des résultats obtenues chez nos patients

Les graphiques de Bland-Altman permettent de visualiser la corrélation entre les méthodes de dosage et d'évaluer la présence ou non d'une tendance.

Cette analyse révèle qu'il existe un biais positif de 16,86% entre la méthode CSA et la méthode OSA routine sur la *Figure 15* : la méthode CSA tend à rendre des valeurs plus élevées par rapport à la méthode OSA de routine. Ces résultats concordent avec ce qui a été décrit dans la littérature avec en moyenne une augmentation de 15% environ avec la méthode chromogénique par rapport à la méthode chronométrique lors du dosage du NUWIQ®.<sup>34</sup>

De la même manière, un biais positif de 9,6% entre la méthode CSA et la méthode OSA NUWIQ est mis en évidence sur la *Figure 16* : la méthode CSA tend à rendre des valeurs plus élevées par rapport à la méthode OSA NUWIQ. Ces résultats mettent en évidence que la technique OSA NUWIQ rend des résultats inférieurs à la méthode CSA.

Le biais obtenu lors de la comparaison CSA/OSA NUWIQ est largement inférieur à celui retrouvé lors de la comparaison CSA/OSA routine. Cela indique que la technique chromogénique et OSA NUWIQ sont les plus proches (*Figures 15 et 16*).

Enfin la *Figure 17* met en évidence un biais négatif de 7,3% entre la méthode OSA routine et la méthode OSA NUWIQ. Ce résultat montre que les deux techniques chronométriques fournissent les résultats les plus proches.

### **3.3 Comparaison au taux de récupération**

Selon le PNDS de 2019 ; « en pratique, l'injection d'1 UI/kg de FVIII entraîne une augmentation moyenne d'environ 2% du taux de FVIII circulant (on parle de taux de récupération qui est égal en théorie à 2% par unité internationale par kilogramme (UI/kg)) »,<sup>35</sup> et le pic plasmatique se situe environ 10 à 15 minutes après la fin de l'injection.<sup>36</sup>

Pour nos patients, nous avons calculé les taux de récupération lorsque c'était possible c'est à dire lorsque le prélèvement était effectué au pic (15 minutes post-injection) et que nous connaissions le taux de base de FVIII et la quantité injectée de FVIIIr. Ces valeurs sont présentées dans le *Tableau 7*. Devant le faible nombre de taux de récupération disponibles nous n'avons pas effectué de comparaison statistique. Néanmoins, on constate que les résultats des dosages sont très différents des taux de récupération à l'exception du patient 7 avec les techniques chronométriques.

## Discussion

L'objectif de ce travail était de comparer les méthodes de dosage de FVIII disponibles au laboratoire pour le suivi des patients traités par NUWIQ®. Nous avons évalué les performances de la technique chronométrique de routine et de la technique chromogénique (présentée comme la méthode de référence) sur des échantillons surchargés en NUWIQ® et sur échantillons de patients traités par NUWIQ®. Nous avons également voulu développer une méthode de dosage spécifique du NUWIQ® à partir de notre technique chronométrique de routine et d'une calibration spécifique à partir d'une solution de NUWIQ® et d'en évaluer les performances.

Nous avons inclus au total 7 patients et recueilli 16 échantillons différents. Cet effectif est satisfaisant compte tenu de la diminution de l'utilisation des concentrés de FVIII avec l'arrivée de l'Emicizumab notamment, mais il reste faible (N= 30 souhaitable pour une évaluation statistique).

Il est difficile de déterminer la méthode la plus spécifique pour doser le FVIII après substitution dans les échantillons de patients car il est difficile d'affirmer le taux théorique de FVIII chez un patient substitué même au pic (taux de FVIII sur un prélèvement réalisé 15 minutes après la fin de l'injection). En effet, ce taux théorique varie d'un patient à un autre pour une même quantité de FVIII injectée. Il dépend du taux de récupération individuel qui varie avec la sévérité du déficit, le groupe sanguin, la situation clinique, l'âge, etc.

Une seconde difficulté réside dans le fait que suivant la pathologie, le taux de FVIII endogène des patients varie. Dans notre cohorte, les patients 1, 4, 5, 6 et 7 (hémophilie mineure ou maladie de Willebrand 1 et 2) présentent un taux de FVIII endogène supérieur à 10% contrairement aux patients 2 et 3 (hémophilie sévère et maladie de Willebrand de type 3) qui présentent un taux de FVIII <1%. Nous mesurons donc à chaque fois une partie plus ou moins importante du FVIII endogène, associée au FVIII exogène NUWIQ®, ce qui rend l'évaluation de nos techniques difficile. Nous considérons cependant que nos résultats sont tout à fait satisfaisants étant donné que sur nos échantillons de patients, les 3 méthodes de dosage sont acceptables. Le faible nombre d'échantillons nous a limité dans l'analyse statistique mais nous a permis de démontrer que les trois techniques étaient acceptables pour le suivi des patients. Il nous tenait tout particulièrement à cœur d'évaluer la technique chronométrique de

routine en tant que technique de dosage de FVIII disponible au laboratoire 24H/24. Ces résultats permettent de valider l'utilisation de ce test pour le suivi des patients traités par NUWIQ®. Une étude multicentrique serait intéressante afin de confirmer ces résultats et d'évaluer d'autres techniques sur des échantillons de patients.

Concernant la calibration NUWIQ, la technique chronométrique calibrée avec du NUWIQ dilué en « eau PPI » n'a pas été retenue. En effet la matrice du calibrant était trop différente du plasma habituel et n'a pas permis d'aboutir à une courbe de calibration satisfaisante en raison du manque de facteurs de coagulation et donc de fibrinogène. En revanche, la calibration spécifique NUWIQ « immunodéficient » dont la matrice est du plasma a permis d'obtenir une courbe satisfaisante.

Ces méthodes de dosage avec une calibration « médicament » sont encore très peu utilisées et nécessitent que les laboratoires pharmaceutiques s'engagent à fournir les calibrants aux laboratoires réalisant les dosages. De plus elles impliquent que les laboratoires maîtrisent cette méthode de calibration. Des études évaluant les performances des calibrations spécifiques pour le dosage de FIXr EHL (Extended Half Life) sont en cours, et il est tout à fait envisageable que l'utilisation de ces techniques se démocratise. Ce travail nous a permis de prendre en main la calibration spécifique. Concernant le NUWIQ, cette calibration a un intérêt limité car nos résultats démontrent que la technique chronométrique de routine est suffisante pour assurer le suivi biologique des patients.

Notre étude a révélé des discordances importantes sur les dosages des plasmas de patients ; nous avons mis en évidence des valeurs très élevées avec la technique CSA par rapport aux deux techniques OSA. Dans un premier temps, nous avons vérifié qu'il ne s'agissait pas d'un problème de dosage, même si cette hypothèse est peu probable car les dosages ont été réalisés dans des séries différentes, des jours différents et avec des réactifs différents. Pour ce faire, nous avons contrôlé les dosages pour lesquels nous avions suffisamment de plasma (*Annexe 5*). Les résultats retrouvés étaient similaires aux premiers. Contrairement aux techniques OSA, la méthode CSA est une technique spectrophotométrique qui est sensible aux modifications de l'aspect du plasma. Si un échantillon est ictérique, lactescent ou encore hémolysé, la lecture spectrophotométrique peut être altérée. Ce type d'interaction n'existe pas avec les techniques chronométriques à détection électromagnétique. Afin de vérifier si les discordances retrouvées chez les patients 3 et 7 (échantillons 5, 6, 7, 8, 9, 10 et 16) pouvaient être expliquées par ce type d'interférence, nous avons vérifié l'aspect des

plasmas. Pour le patient N°3, trois de ses échantillons étaient fortement ictériques (*Tableau 8*). Cette observation pourrait donner un début d'explication au sujet des discordances CSA/OSA, cependant, dans la configuration du test, les échantillons de plasma sont dilués au 1/40<sup>ème</sup> avant analyse ce qui limite l'influence de cette interférence. De plus nous avons observé ce même type de discordances sur des échantillons dont l'aspect (ictère, lactescence et hémolyse) était tout à fait normal.

Tableau 8 : Paramètre HIL des dosages discordants entre CSA et OSA routine/NUWIQQ

Echantillon	5	6	7	8	9	10	16
HIL	1/4/1	1/4/1	1/3/1	1/2/1	1/1/1	1/1/1	1/1/1
CSA	260	143	87	74	110	105	223
OSA routine	207,2	101,5	70,6	66,1	82,1	84,7	133,4
OSA NUWIQ	208,4	104,6	74	71,1	87,9	88,9	142,3

Une autre explication à ces discordances pourrait être lié au FVIII endogène. En effet, certaines mutations du FVIII associées à un phénotype non sévère conduisent à la production de FVIII dont le dosage peut varier en fonction des tests utilisés (sur ou sous-estimation possible). Ce problème se pose surtout au moment du diagnostic de l'hémophilie et il est fortement recommandé d'effectuer le dosage avec une technique chromogénique et une technique chronométrique. (4,37,38)

Dans notre cohorte, cette hypothèse ne peut pas expliquer les différences observées, car elles sont inconstantes pour un même patient.

La technique CSA qui est la technique recommandée n'a pas démontré les meilleurs résultats dans notre étude. Sur les échantillons *spikés*, les résultats sont statistiquement différents des valeurs théoriques, mais les différences observées n'impactent pas les décisions biologiques.

Par ailleurs, cette technique a révélé de plus grosses discordances par rapport aux techniques chronométriques sur certains échantillons (échantillons 5, 6, 9 et 16). En effet la technique CSA présente dans ces cas précis des valeurs très supérieures aux valeurs obtenues avec les techniques chronométriques ; ces valeurs peuvent paraître aberrantes par rapport aux taux théoriques ciblés. Le dosage de l'échantillon 16 laisse penser que les dosages chronométriques sont plus proches de la réalité que le dosage CSA mais un seul échantillon est insuffisant pour affirmer cette hypothèse.

La réalisation de comparaisons supplémentaires entre ces techniques en vie réelle entre des patients traités par NUWIQ® pourrait apporter des explications. Pour les échantillons 1, 12, 14 et 15 les valeurs obtenues avec les 3 techniques sont comparables entre elles, mais très élevées par rapport à la valeur théorique calculée. Chez ces patients, hémophiles mineurs et Willebrand 2N, une hypothèse serait que leur taux de FVIII avant substitution soit plus élevé que leur taux basal habituel. Nous n'avions pas d'échantillons avant substitution pour affirmer cette hypothèse. Une explication probable est une augmentation du FVIII basal en situation de stress ou d'inflammation. Pour l'inflammation nous avons vérifié quand c'était possible le taux de fibrinogène. Le patient 1 est le seul patient qui présente un dosage de fibrinogène augmenté, signe d'inflammation, ce qui pourrait expliquer une augmentation du taux basal de FVIII. Nous avons également comparé les dosages de FVIII au dosage de facteur Willebrand lorsqu'il était disponible mais cela n'a pas permis d'expliquer les variations observées puisque les taux de Willebrand étaient comparables aux taux de FVIII. Pour les patients 4 et 5 Nous n'avons pas d'hypothèse pour expliquer les différences.

En conclusion, cette étude a permis de valider l'utilisation de notre technique de routine 24H/24 pour le suivi des patients traités par NUWIQ.

Ce travail a également permis de mettre en place une calibration spécifique NUWIQ® avec des résultats très satisfaisants. Cette méthode de dosage est simple à mettre en place car elle repose sur la méthode chronométrique de routine, mais elle demeure très couteuse car elle requiert une solution de NUWIQ®, et du plasma immunodéficient en FVIII pour la préparation du calibrant. De plus elle nécessite plus de temps technique que la technique de routine. Il est donc préférable pour le laboratoire d'utiliser la technique chronométrique de routine pour le dosage du NUWIQ®. Néanmoins, la mise au point de la calibration spécifique réalisée avec l'aide de l'équipe technique a rendu possible l'utilisation de cette nouvelle approche de dosage.

## Bibliographie

1. Giuseppe Castaldo , Valeria D'Argenio , Paola Nardiello et al. Haemophilia A : molecular insights.Clin Chem Lab Med. 2007;45 : 450–61.
2. Biomnis, laboratoire de biologie médicale spécialisée. Fiche détaillée du Facteur Willebrand.Biomnis – PRÉCIS DE BIOPATHOLOGIE ANALYSES MÉDICALES SPÉCIALISÉES. 2012.
3. Centre de Référence Hémophilie et autres déficits constitutionnels en protéines de la coagulation. <https://www.hemophilie-crh.fr/wp-content/uploads/2023/07/PNDS-hemophilie-2023.pdf>.Juin 2023
4. D.M. Adcock, K.Strandberg, M.Shima et al. Advantages, Disadvantages and Optimization of One-Stage and Chromogenic Factor Activity Assays in Haemophilia A and B. International Journal of Laboratory Hematology. 2018 ; 40(6) : 621-9.
5. Erik Berntorp, Kathelijn Fischer, Daniel P. Hart et al. Haemophilia. Nature Reviews. 2021 ; 7:45
6. Hector E. Castro, Maria Fernanda Briceno, Claudia P. Casas, Juan David Rueda. The History and Evolution of the Clinical Effectiveness of Haemophilia Type A Treatment. International Journal of Laboratory Hematology. Mars 2014 ; 30(1) : 1-11.
7. Wolfgang Schramm. The History of Haemophilia – a Short Review , Thrombosis Research. Novembre 2014 ; 134 : 4-9.
8. Emmanuelle Fillion. Clinical Relationships Tested by Iatrogenicity. Social Science & Medicine. Novembre 2008 ; 67(9) : 1400-9.
9. HAS, Recommandations du dépistage de l'infection par le vih en France. Recommandations - Dépistage de l'infection par le VIH en France - Modalités de réalisation des tests de dépistage (has-sante.fr) , consulté en Juillet 2024.
10. Burn-out et Radosevich, Nanofiltration of Plasma-derived Biopharmaceutical Products. Haemophilia. Janvier 2003;9(1) : 24-37
11. Muhli Cen Ar, Can Balkan, and Kaan Kavakli. Extended Half-Life Coagulation Factors: A New Era in the Management of Hemophilia Patients - PMC. Turkish journal of Hematology.2019 Sep; 36(3) : 141–154.
12. Patrick T Ebbert, Frederico Xavier, Craig D. Seaman, et al., Emicizumab Prophylaxis in Patients with Haemophilia A with and without Inhibitors. Haemophilia. Janvier 2020 ; 6(1) : 41-6.
13. Santiago Bonanad, María Teresa Álvarez, Ramiro Núñez et al. Costs of the Management of Hemophilia A with Inhibitors in Spain. Global & Regional Health Technology Assessment. 2021 ; 8 : 35-42.
14. Pratima Chowdary. Anti-Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) Therapy. International Journal of Hematology. Janvier 2020. 111(1) : 45-50.

15. Cédric Hermans. Les nouveaux traitements de l'hémophilie. <https://www.louvainmedical.be/fr/article/les-nouveaux-traitements-de-lhemophilie>. Consulté en Juillet 2024.
16. Mannucci, Mancuso, et Santagostino. How we choose factor VIII to treat hemophilia. *Blood*. Mai 2012 ; 119(18) : 4108-14.
17. Peyvandi et Garagiola, « Product type and other environmental risk factors for inhibitor development in severe hemophilia A ».
18. A. Klukowska, T. Szczepański, V.Vdovin. Long-term tolerability, immunogenicity and efficacy of Nuwiq® (human-cl rhFVIII) in children with severe haemophilia A. *Haemophilia*. Mars 2018 ; 24(4) : 595-603.
19. Mary Mathias, Aby Abraham, Mark J. Belletrutti et al. Simoctocog Alfa (Nuwiq®) in Previously Untreated Patients with Severe Haemophilia A—Final Efficacy and Safety Results from the NuProtect study. *European Journal of Haematology*. Octobre 2023 ; 111(4) : 544-552.
20. Anna Klukowska, Robert F. Sidonio Jr et al. Simoctocog alfa (Nuwiq®) in children: early steps in life's journey for people with severe hemophilia A. *Therapeutic advances in Hematology*. 2024 ; 15: 1-13.
21. Trevor W. Barrowcliffe, Sanjeev Raut, Dawn Sands, Anthony R. Hubbard. Coagulation and Chromogenic Assays of Factor VIII Activity. 2002 ; 28(3):247-256.
22. Dominique Lasne, Claire Pouplard, Christophe Nougie et al. Factor VIII assays in treated hemophilia A patients. *Annales de Biologie Clinique*. 2019 ; 77 (1) : 53-65.
23. Kitchen, Signer-Romero, et Key. Current Laboratory Practices in the Diagnosis and Management of Haemophilia. *Hemophilia*. Juillet 2015. 21(4) : 550-7.
24. Peyvandi, Oldenburg, et Friedman. A Critical Appraisal of One-stage and Chromogenic Assays of Factor VIII Activity. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. Fevrier 2016 ; 14(2) 248-261.
25. K .ST. Ledger, A Feussner, U. Kalinak et al. International Comparative Field Study Evaluating the Assay Performance of AFSTYLA in Plasma Samples at Clinical Hemostasis Laboratories . *Journal of Thrombosis and Haemostasis*.Mars 2018 ; 16(3) : 555-564.
26. Stefan Tiefenbacher, Manuela Albisetti, Peter Baker et al. Estimation of Nuwiq® (simoctocog alfa) activity using one-stage and chromogenic assays—Results from an international comparative field study. *Hémophilie*. 2019 Jul; 25(4): 708–717.
27. Van den Bossche, Peerlinck, et Jacquemin, « New Challenges and Best Practices for the Laboratory Monitoring of Factor VIII and Factor IX Replacement ». *International Journal of Laboratory Hematology*. 2018 ; 40 :21-29.
28. GEHT. Tableau de synthèse des recommandations pré-analytiques en hémostase. Tableau synthèse GEHT2015\_internet v4 (sfth.fr). Consulté en Novembre 2023
29. Sriram Krishnaswamy. FVIII-VWF dos-à-dos Blood. Août 2015; 126(8): 923–4.

30. Potgieter, Damgaard, et Hillarp. One-Stage vs. Chromogenic Assays in Haemophilia. European Journal of Haematology. 2015; 94(77) : 38-44.
31. Richard A. Marlar, Karin Strandberg, Midori Shima et al. Clinical Utility and Impact of the Use of the Chromogenic vs One-stage Factor Activity Assays in Haemophilia A and B. European Journal of Haematology. Janvier 2020 ; 104(1) : 3-14.
32. Mourey et Poret. Mise en place de la mesure de l'activité du facteur VIII par méthode chromogénique au laboratoire d'hémostase de l'Etablissement Français du Sang de Besançon. Comparaison avec la méthode chromométrique en un temps. Spectra Biologie. Mai 2014 ; 208:63-73.
33. Agence européenne du médicament, Résumé des caractéristiques du produit ; NUWIQ® . Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. Consulté en décembre 2023.
34. A. Klukowska, T. Szczepański, V. Vdovin. Novel, human cell line-derived recombinant factor VIII (Human-cl rhFVIII, Nuwiq®) in children with severe haemophilia A: efficacy, safety and pharmacokinetics. Haemophilia. Septembre 2015 ; 22(2) : 232-9.
35. Centre de référence Hémophilie et autre déficits constitutionnels de la coagulation, [hassante.fr/upload/docs/application/pdf/2023-06/pnds\\_hemophilie\\_2023.pdf](https://hassante.fr/upload/docs/application/pdf/2023-06/pnds_hemophilie_2023.pdf). Consulté en Mars 2024.
36. Castaman et Linari. Pharmacokinetic Drug Evaluation of Recombinant Factor VIII for the Treatment of Hemophilia A. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology. Février 2018 ;14(2) 143-151.
37. Bowyer, Duncan, et Antovic. Role of Chromogenic Assays in Haemophilia A and B Diagnosis. Hemophilia. Juillet 2018 ; 24(4) : 578-583.
38. Trossaërt, Boisseau, Quemener et al. Prevalence, Biological Phenotype and Genotype in Moderate/Mild Hemophilia A with Discrepancy between One-stage and Chromogenic Factor VIII Activity. Journal of Thrombosis and Haemostasis. Mars 2011 ; 9(3) : 524-530.

## Table des figures

Figure 1. Initiation et amplification de la cascade de coagulation après lésions des vaisseaux sanguins....	2
Figure 2. NUWIQ® utilisé.....	5
Figure 3. Représentation schématique du principe du dosage chromogénique. ....	12
Figure 4. Représentation schématique de la technique de détection viscosimétrique .....	13
Figure 5. Représentation schématique du principe du dosage chronométrique.....	14
Figure 6. Calibration de Routine : courbe de calibration standard fournisseur (Plasma humain normal lyophilisé) .....	18
Figure 7. NUWIQimmunodéficient: courbe de calibration « maison » effectuée en mélangeant du NUWIQ® avec du plasma immunodéficient en FVIII .....	18
Figure 8. Histogramme des valeurs moyennes retrouvées sur les trois tests et écarts types associés sur échantillons <i>spikés</i> .....	21
Figure 9. Test de Passing-Bablock entre CSA et OSA routine .....	23
Figure 10. Test de Passing-Bablock entre CSA et OSA NUWIQ .....	23
Figure 11. Test de Passing-Bablock entre OSA NUWIQ et OSA routine .....	24
Figure 12. Test de Passing-Bablock des échantillons patients entre les tests CSA et OSA routine.....	27
Figure 13. Test de Passing-Bablock des échantillons patients entre les tests CSA et OSA NUWIQ .....	27
Figure 14. Test de Passing-Bablock des échantilresponslons patients entre les test OSA routine et OSA NUWIQ .....	28
Figure 15. Graphique de Bland-Altman CSA/OSA routine.....	29
Figure 16. Graphique de Bland-Altman CSA/OSA NUWIQ .....	29
Figure 17. Graphique de Bland-Altman OSA routine/OSA NUWIQ .....	30

## Table des tableaux

Tableau 1 : Liste des principaux réactifs de TCA utilisés dans les études pour les dosages chronométriques .....	8
Tableau 2 : Liste des principales trousse de réactifs pour le dosage chromogénique des FVIII disponibles en France en 2018 .....	9
Tableau 3 : Caractéristique des patients de l'étude.....	16
Tableau 4 : Résultats des différents dosages sur les trois méthodes en fonction des jours et des valeurs de FVIIIr ajoutés dans les échantillons <i>spikés</i> .....	20
Tableau 5 : Valeur numérique des Moyennes et Coefficient de Variation (CV) pour une moyenne à 100, 30, 5 et 1% de valeur attendue.....	21
Tableau 6 : p-value des méthodes de dosage comparées aux valeurs attendues (référence) .....	22
Tableau 7: Résultats des différents dosages sur les trois méthodes réalisées sur les échantillons de patients .....	25
Tableau 8 : Paramètre HIL des dosages discordants entre CSA et OSA routine/NUWIQ .....	34

# Annexes

## Annexe 1 : Protocole de dosage détaillé

### Réalisation des calibrants et des échantillons à doser (spikés) :

Solution de 250 UI en NUWIQ® dans 2.5 mL (poudre à reconstituer) (100 UI/mL)

Seringue présente dans la boîte médicament pour mettre en solution le NUWIQ®. Pré remplie à 2.5 mL.

Vider dans un tube Falcon la seringue de NUWIQ® après reconstitution comme indiqué dans la notice médicament.

→ Solution mère à 10 000 % soit 10 000 UI/dL.

Prélever 250 µL de cette solution reconstituée et ajouter 4.750 mL d'eau PPI, homogénéiser

→ Solution à 500 % de FVIII (*objectif de cette étape : économie de plasma immunodéficient*).

Prélever 1 mL dans la solution à 500 % et ajouter 4 mL de solution immunodéficiente en FVIII, homogénéiser

→ Solution à 100 % de facteur VIII

Réaliser 3 aliquots de 800 µL nommés 100a, 100b et 100c et un aliquot de 1,5 mL (gamme de calibration). Congeler ces aliquots à -80°C.

Pour la solution à 500 % restante ; réaliser plusieurs aliquots de 0.25 mL : 4 mL /0.25 = 16 aliquots (si recalibration automate nécessaire ; rajouter 1 mL de plasma immunodéficient ou d'eau PPI après décongélation à un aliquot).

Ajouter à un de ces aliquots de 0.25 mL 1 mL d'eau PPI (calibration spécifique NUWIQ<sup>eau PPI</sup>).

**Au final : une solution NUWIQ<sup>eau PPI</sup>, une solution NUWIQ<sup>immunodéficient</sup>, 15 aliquots de 0.25 mL à 500 % et 3 aliquots de 800 µL de solution à 100 % au -80°C.**

### Calibration + Dosage des 3 aliquots de NUWIQ® (100 %) :

JO	Calibration de l'automate pour les techniques spécifiques 50 µL par dilution, et 6 dilutions effectuées 2 X ce qui aboutit à 600 µL et toujours la nécessité de 300 µL de volume mort donc 900 µL minimum. Décongeler l'Aliquot de standard NUWIQ <sup>immunodéficient</sup> et de standard NUWIQ <sup>eau PPI</sup> pendant 5 minutes à 37°C. Faire une copie de la calibration de routine (seul le calibrant change) et reconstituer les réactifs habituels. Effectuer la calibration spécifique NUWIQ <sup>immunodéficient</sup> avec la solution de 1,5mL décongelée. Effectuer la calibration spécifique NUWIQ <sup>eau PPI</sup> avec la solution de 1,25 mL décongelée.
J1	Passer les contrôles de routine sur la technique chromogénique et sur les techniques chronométriques (routine et spécifiques), pour contrôler les réactifs et l'automate. Contrôles OK : décongeler 5 minutes au bain-marie à 37°C la solution à doser 100a puis mélanger par retournement sans faire de bulle. Doser dans la solution à 100 % de NUWIQ® (100a) le FVIII avec les techniques chronométriques et chromogénique. Récupérer 300 µL du volume restant et ajouter 700 µL de plasma immunodéficient en facteur VIII pour réaliser une solution à 30 % de NUWIQ®. Doser après homogénéisation le FVIII dans la solution à 30 % de NUWIQ® avec les techniques chronométriques et chromogénique. Récupérer 125 µL du volume restant et ajouter 625 µL de plasma immunodéficient en facteur VIII pour réaliser une solution à 5 % de NUWIQ®. Doser après homogénéisation le FVIII dans la solution à 5 % de NUWIQ® avec les techniques chronométriques et chromogénique. Récupérer 150 µL du volume restant et ajouter 600 µL de plasma immunodéficient en facteur VIII pour réaliser une solution à 1 % de NUWIQ®. Doser après homogénéisation le FVIII dans la solution à 1 % de NUWIQ® avec les techniques chronométriques et chromogénique.
J2	Répéter les étapes réalisées à J1 à l'aide de la solution 100b.
J3	Répéter les étapes réalisées à J1 à l'aide de la solution 100c

Spécificité de la technique chronométrique : dosage en % de facteur VIII dans l'échantillon (1% équivaut à 1UI/dL de facteur VIII). Réalisation de deux dilutions différentes par dosage). Si la différence entre les deux dilutions est inférieure à 10 %, effectuer la moyenne des deux dilutions et rendre ce résultat. Résultat = moyenne de deux dilutions consécutives.

Technique chromogénique : le résultat d'un dosage et rendu en l'état, en pourcentage de Facteur VIII.

Prérequis : 2 dilutions par dosage chronométrique (50 µL de plasma par dilution) pour 3 dosages en technique chronométrique, et un dosage chromogénique nécessitant 50 µL. Soit un total de 350 µL. Présence d'un volume mort de 250 µL donc 600 µL minimum nécessaires à condition de n'avoir besoin d'aucunes repasse.

Il n'est pas nécessaire de réaliser J(N+1) le lendemain de J(N)

**Annexe 2 :** Tableau des valeurs moyennes des tests en *spikiing*

Moyenne/ écart-type	CSA	OSA routine	OSA NUWIQ
100%	106 (+/- 4,4)	94,43 (+/- 4,3)	100,615 (+/- 4,2)
30%	30,7 (+/- 2,1)	28,15 (+/- 0,93)	30,53 (+/- 1,4)
5%	6,7 (+/- 0,6)	5,48 (+/- 0,3)	5,9 (+/- 0,3)
1%	1,33 (+/- 0,6)	1,55 (+/- 0,1)	1,7 (+/- 0,12)

**Annexe 3 :** Tableau des lots du test chronométrique et dates de péremption des réactifs utilisés lors de la réalisation des manipulations

	Lot	DDP
Immunodéficient	270748	31-10-25
CK Prest	263716	28-02-25

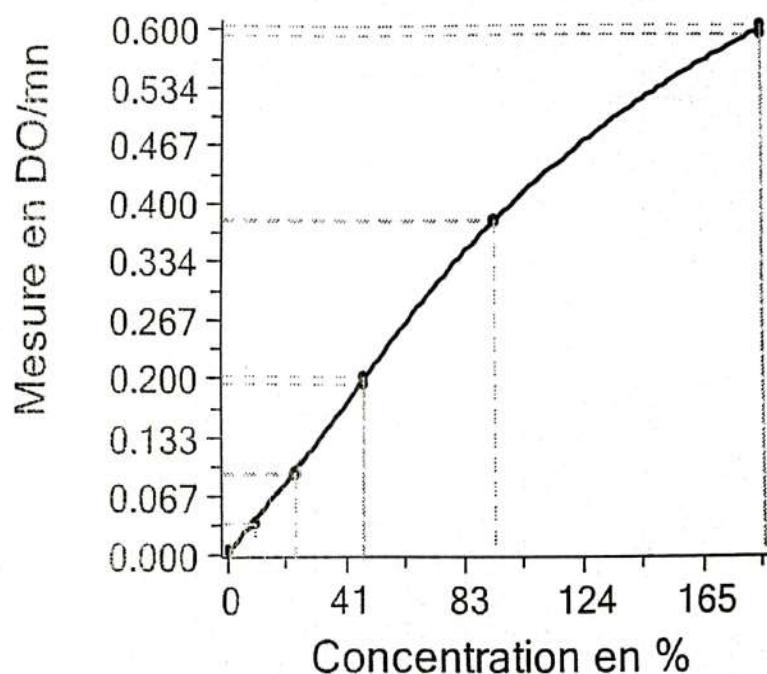
**Annexe 4 :** Tableau des lots du test chromogénique et dates de péremption des réactifs utilisés lors de la réalisation des manipulations

	Lot	DDP
Substrat	551460	04-10-25
FIX	551362	03-10-25
FX	551156	03-10-25
Contrôle N	507937A	06-12-25
Contrôle P	556745A	22-01-25

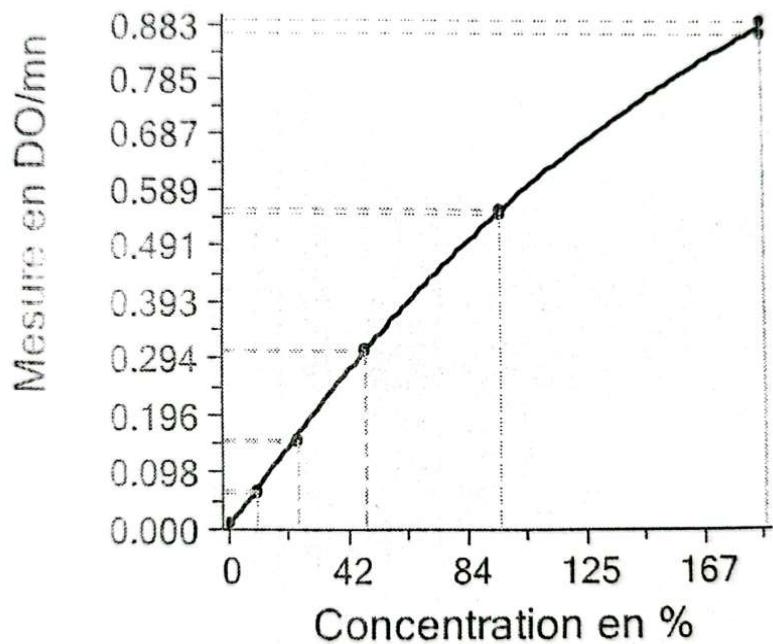
**Annexe 5 :** Dosage/ redosage d'échantillons de nos patients

Patient/échantillon	CSA	OSA routine	OSA NUWIQ
4/ (échantillon sans traitement)	20%	20,7%	24,2%
5/ (échantillon sans traitement)	17%	20%	24%
7/ 16	229% / 194% (dilution manuelle)		

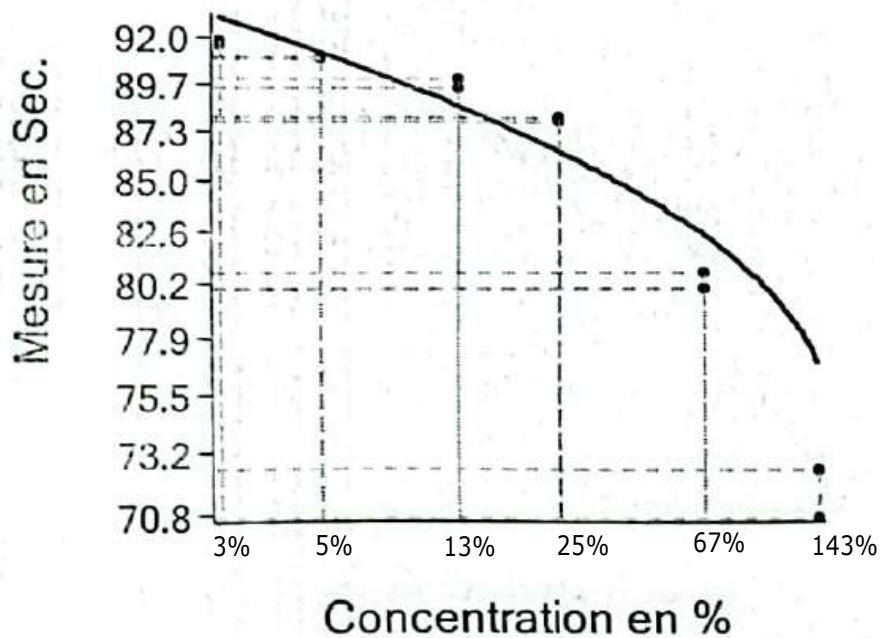
**Annexe 6 :** Courbe de calibration du FVIII chromogénique utilisée pour les échantillons 1 à 14



**Annexe 7 :** Courbe de calibration du FVIII chromogénique utilisée pour les échantillons 15 et 16 + les repasses



**Annexe 8 :** NUWIQ<sup>eau PPI</sup> courbe de calibration « maison » effectuée en mélangeant du NUWIQ® avec de l'eau PPI



## Annexe 9 : Lettre d'information pour un patient mineur (parents)

<b>LETTRE D'INFORMATION POUR LES PARENTS D'UN PARTICIPANT MINEUR</b>	
<b>PROJET D'ETUDE :</b> Comparaison d'une méthode chronométrique et d'une méthode chromogénique pour la mesure de l'activité du FVIII recombinant NUWIQ® (simoctocog alpha) dans une étude de vie réelle.	
<b>Promoteur</b> CHU d'Angers 4, rue Larrey 49933 Angers cedex 9	<b>Médecin coordonnateur</b> Nom : Dr Beurrier / Dr Denis Le Seve Service de Médecine vasculaire, centre de traitement de l'Hémophilie, CHU Angers Téléphone : 02 41 35 65 92

Madame, Monsieur,

Votre enfant est invité à participer à une étude dans le cadre de la prise en charge de sa maladie hémorragique.

Le CHU d'Angers réalise une étude dont l'objectif est de comparer deux techniques de dosage de facteur VIII disponibles au laboratoire afin d'optimiser le suivi biologique du traitement par Nuwiq® de votre enfant.

Cette étude sera réalisée à partir de l'analyse des données collectées suite à la prise en charge réalisée. Le CHU d'Angers est le gestionnaire de cette étude, il en est responsable, en assure l'organisation et la gestion des données. Le traitement de données réalisé dans le cadre de cette étude est nécessaire à l'exécution de la mission de recherche en santé, d'intérêt public, dont est investi le CHU d'Angers.

### **1. DÉROULEMENT DE LA RECHERCHE**

Les dosages sont réalisés dans le cadre du soin et ne demandent pas de prélèvement biologique supplémentaire.

Les informations concernant votre enfant (âge, sexe, taille...) et en particulier des données médicales d'intérêt (symptômes cliniques, résultats de laboratoire, etc...) pourront être recueillies.

Un fichier informatique comportant les données de votre enfant va être constitué. Toutes ces informations seront traitées et analysées de manière confidentielle. Son nom et son prénom ne figureront pas dans ce fichier. Seuls les professionnels de santé, personnellement en charge du suivi et de cette étude, auront connaissance de ces données.

Le traitement de ces données a pour finalité la réalisation de cette étude, dont l'objectif est l'amélioration des connaissances actuelles et l'optimisation de la prise en charge des patients traités par Nuwiq®.

## **2. RISQUES POTENTIELS DE CETTE ETUDE :**

**Aucun risque pour votre enfant**, aucun prélèvement supplémentaire n'est nécessaire, tout ceci est réalisé dans le cadre du soin, avec utilisation des protocoles habituels en vigueur.

## **3. BENEFICES POTENTIELS DE LA RECHERCHE**

Améliorer les connaissances autour du traitement par Nuwiq®, optimiser la prise en charge des patients concernant leur maladie hémorragique.

## **4. PARTICIPATION VOLONTAIRE**

**La participation de votre enfant à cette étude est entièrement libre et volontaire.**

Vous êtes libre de refuser que votre enfant y participe ainsi que de mettre un terme à sa participation à l'étude à n'importe quel moment, sans devoir vous justifier et sans que cela n'entraîne de conséquences. Dans ce cas, vous devez informer le médecin de l'étude de votre décision.

## **5. OBTENTION D'INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES**

Un médecin participant à l'étude pourra répondre à vos questions concernant cette étude.

## **6. CONFIDENTIALITE ET UTILISATION DES DONNEES MEDICALES**

Pour analyser les résultats de cette étude, un traitement informatique des données personnelles de votre enfant va être mis en œuvre.

*Ce traitement est réalisé dans le cadre des missions d'intérêt public confiées au CHU d'Angers. Il est conforme au règlement européen sur la protection des données personnelles (UE 2016/679 du 27 avril 2016) et à la Loi Informatique et Libertés (loi n°78-17 du 6 janvier 1978 modifiée).*

Les personnes qui auront accès au dossier de votre enfant pour cette étude sont l'équipe soignante qui le prend en charge, et l'équipe réalisant cette étude. Toutes ces personnes sont tenues au secret professionnel.

Les données recueillies seront transmises au CHU d'Angers. L'investigateur s'engage à ne jamais divulguer le nom de votre enfant et à coder ses données avant de les transmettre au gestionnaire de la base de données. Ses données seront associées à un code anonymisant.

Les données codées de l'étude pourront également être transmises aux autorités de santé françaises.

Les données seront codées par le gestionnaire de la base de données de la façon suivante avant toute transmission à un tiers :

- retrait du code patient,
- le mois et l'année de naissance de votre enfant seront remplacés par l'âge,
- les initiales seront supprimées,
- toutes les dates seront remplacées par des délais.

*Le traitement des données de cette recherche entre dans le cadre de la «Méthodologie de Référence» (MR-001) en application des dispositions de la loi relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés. Le CHU d'Angers, promoteur de la recherche, a signé un engagement de conformité à cette « Méthodologie de Référence ».*

*Si vous avez des questions, remarques ou réclamations à formuler concernant la gestion de des données personnelles de votre enfant, merci de prendre contact avec le médecin qui le suit dans le cadre de l'étude ou avec l'investigateur principal du centre. Si vous avez des questions sur la protection des données dans le cadre de l'étude, vous pouvez contacter le Délégué à la Protection des données du CHU d'Angers (par mail : [dpo@chu-angers.fr](mailto:dpo@chu-angers.fr) ou par courrier : Mr le Délégué à la Protection des données du CHU d'Angers 4, rue Larrey 49933 ANGERS Cedex 9).*

La Commission Nationale Informatique et Libertés (<https://www.cnil.fr>, adresse : 3 Place de Fontenoy - TSA 80715 - 75334 PARIS CEDEX 07) est l'autorité française habilitée à recevoir toute réclamation officielle concernant le traitement des données de votre enfant.

## **7. PROTECTION DES PERSONNES**

Cette recherche sera menée conformément à la loi n°2012-300 du 5 mars 2012 et aux textes réglementaires relatifs aux recherches impliquant la personne humaine, ainsi qu'aux lois de bioéthique (loi n° 2004-800 du 6 août 2004, loi n° 2011-2012 du 29 décembre 2011 et loi n° 2021-1017 du 2 août 2021).

La participation de votre enfant à cette étude nécessite qu'il soit affilié ou bénéficiaire d'un régime de sécurité sociale.

## **8. ASSURANCE**

Le Promoteur a souscrit auprès de la SHAM (Société Hospitalière d'Assurances Mutualles, 18 rue Edouard Rochet, 69372 Lyon Cedex 08) une assurance garantissant sa propre responsabilité civile, ainsi que celle de tout médecin ou collaborateur impliqué dans la réalisation de l'étude, pour toute la durée de l'étude (contrat d'assurance SHAM: numéro 147412). Il assurera également l'indemnisation intégrale des conséquences dommageables de l'étude pour la personne qui s'y prête et ses ayants droit, sauf preuve à sa charge que le dommage n'est pas imputable à sa faute ou à celle de tout intervenant, sans que puisse être opposé le fait d'un tiers ou le retrait volontaire de la personne qui avait initialement consenti à se prêter à l'étude.

**Si vous acceptez de faire participer votre enfant à cette recherche, merci de compléter et de signer le formulaire de recueil de consentement en deux exemplaires. Vous conserverez cette lettre d'information et un exemplaire du formulaire de consentement.**

## FORMULAIRE DE CONSENTEMENT POUR LES PARENTS D'UN PARTICIPANT MINEUR

**Comparaison d'une méthode chronométrique et d'une méthode chromogénique pour la mesure de l'activité du FVIII recombinant NUWIQ® (simoctocog alpha) dans une étude de vie réelle.**

### **Médecin coordonnateur**

Nom : Dr Beurrier /Denis Le Seve

Service: Médecine vasculaire, centre de traitement de l'Hémophilie, CHU Angers

Téléphone : 02 41 35 65 92

### **Le médecin nous a proposé de faire participer notre enfant à l'étude sur le NUWIQ**

Nous avons lu et compris la lettre d'information dont nous avons reçu un exemplaire. Nous avons compris les informations écrites et orales qui nous ont été communiquées. Le médecin a répondu à nos questions concernant cette étude et savons que nous pouvons en poser si besoin.

Nous avons eu le temps nécessaire pour réfléchir à l'implication de notre enfant dans cette recherche. Nous sommes conscients que la participation de notre enfant est entièrement libre et volontaire. Nous avons compris que les frais spécifiques à l'étude ne seront pas à notre charge.

Nous pouvons à tout moment décider que notre enfant quitte la recherche sans motiver notre décision et sans qu'elle n'entraîne de conséquences.

Nous avons compris que les données traitées à l'occasion de la recherche seront gérées dans le respect de la confidentialité. Elles pourront uniquement être consultées par les personnes soumises au secret professionnel appartenant à l'équipe du médecin de l'étude, à l'équipe mandatée par le promoteur ou par les représentants des autorités de santé.

Nous acceptons le traitement informatisé des données à caractère personnel concernant notre enfant dans les conditions prévues par le Règlement Général de Protection des Données et par la loi Informatique et liberté.

**Nous acceptons librement et volontairement que notre enfant participe à l'étude du NUWIQ, dans les conditions établies par la loi, et telles que précisées dans la lettre d'information qui nous a été remise.**

Notre consentement ne décharge pas les organisateurs de la recherche de leurs responsabilités.

<b>Représentants légaux du participant mineur</b> <i>(A remplir par les représentants légaux du participant mineur eux-mêmes)</i>			
Nom, prénom		Nom, prénom	
Qualité*	Père, Mère, Titulaire de l'autorité parentale	Qualité*	Père, Mère, Titulaire de l'autorité parentale
Date		Date	
Signature		Signature	

\* Barrer les mentions inutiles

**Cas particulier où un seul des deux parents est présent pour signer le consentement dans des délais compatibles avec les exigences méthodologiques propres à la réalisation de la recherche**

Je soussigné, Mme/M. (Nom, Prénom) ..... atteste que je suis le seul parent présent pour signer le consentement et je m'engage à transmettre la lettre d'information à l'autre parent dès que possible.

**Cas particulier où il n'existe qu'un seul représentant légal de l'enfant**

Je soussigné, Mme/Mr (Nom, Prénom) ..... atteste que je suis le seul titulaire de l'exercice de l'autorité parentale.

*Fait en deux exemplaires originaux : un pour l'investigateur et un pour les parents du participant mineur.*

## Annexe 10 : Lettre d'information pour un patient majeur

### LETTER D'INFORMATION

#### PROJET D'ETUDE :

Comparaison d'une méthode chronométrique et d'une méthode chromogénique pour la mesure de l'activité du FVIII recombinant NUWIQ® (simoctocog alpha) dans une étude de vie réelle.

#### Médecin Coordinateur

Dr Beurrier / Dr Denis Le Seve

Service de Médecine vasculaire, centre de traitement de l'Hémophilie, CHU Angers

Tel : 02 41 35 65 92

Madame, Monsieur,

Vous avez été admis dans le service de médecine vasculaire du CHU d'Angers dans le cadre de la prise en charge de votre maladie hémorragique par Nuwiq®.

Le CHU d'Angers réalise une étude dont l'objectif est de comparer deux techniques de dosage de facteur VIII disponibles au laboratoire afin d'optimiser le suivi biologique du traitement par Nuwiq®. Ces dosages sont réalisés dans le cadre du soin et ne demandent pas de prélèvement biologique supplémentaire.

Cette étude sera réalisée à partir de l'analyse des données collectées suite à la prise en charge réalisée. Le CHU d'Angers est le gestionnaire de cette étude, il en est responsable, en assure l'organisation et la gestion des données.

Un fichier informatique comportant vos données va être constitué. Toutes ces informations seront traitées et analysées de manière confidentielle. Vos noms et prénoms ne figureront pas dans ce fichier. Seuls les professionnels de santé, personnellement en charge du suivi et de cette étude, auront connaissance de ces données.

Le traitement de vos données a pour finalité la réalisation de cette étude, dont l'objectif est l'amélioration des connaissances actuelles et l'optimisation de la prise en charge des patients atteints d'une maladie hémorragique.

Ce traitement sera réalisé conformément au règlement européen n° 2016/679 du 27 avril 2016 sur la protection des données personnelles (règlement général sur la protection des données) et à la loi n° 78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés (loi Informatique et Libertés).

Vous disposez d'un droit d'accès, de rectification, d'effacement et de limitation du traitement de vos données. Ces droits s'exercent auprès du médecin du centre qui vous a pris en charge, du coordinateur de cette étude ou du Délégué à la Protection des données du CHU d'Angers ([dpo@chu-angers.fr](mailto:dpo@chu-angers.fr), Délégué à la Protection des Données - 4 Rue Larrey 49933 ANGERS Cédex 9). La Commission Nationale Informatique et Libertés (<https://www.cnil.fr>) est l'autorité française habilitée à recevoir toute réclamation officielle concernant le traitement de vos données.

Conformément à la législation en vigueur pour ce type d'étude, vos données codées seront conservées pendant une durée de 2 ans après la dernière publication liée à l'étude. Passé ce délai, le lien entre votre identité et les données codées sera détruit et les données seront anonymisées.

Les données seront anonymisées par le gestionnaire de la base de données de la façon suivante avant toute transmission à un tiers :

- retrait du code patient,
- les mois et année de naissance seront remplacés par l'âge,
- les initiales seront supprimées,
- toutes les dates liées à votre prise en charge seront remplacées par des délais.

En application de la loi Informatique et Libertés, le traitement de vos données est effectué dans le cadre de la méthodologie de référence « MR-004 », dédiée notamment aux études en santé, à laquelle le CHU d'Angers a signé un engagement de conformité.

**Vous êtes libre de refuser que vos données soient utilisées pour cette étude et de décider à tout moment de changer d'avis.** Le refus n'aura aucun effet sur votre relation avec l'équipe médicale et l'équipe soignante, ni sur la qualité de vos soins futurs. En cas de refus, nous vous remercions de bien vouloir informer le médecin qui vous a pris en charge en retournant le formulaire d'opposition ci-joint.

Merci de conserver cette notice d'information

**Opposition à l'utilisation des données pour l'étude**

**A compléter par le(la) patient(e)**

Prénom/Nom : .....

Je n'accepte pas que les données recueillies au cours de ma prise en charge soient utilisées pour cette étude.

Date : ..... / ..... / .....

Signature :

Document à retourner au service de médecine vasculaire du CHU d'Angers  
4 rue Larrey  
49933 ANGERS CEDEX 9

# RÉSUMÉ

## Comparaison d'une méthode chronométrique et d'une méthode chromogénique pour la mesure de l'activité du FVIII recombinant NUWIQ® (simoctocog alpha) dans une étude de vie réelle.

# ABSTRACT

**But de l'étude :** Vérifier les performances analytiques de deux techniques de dosage du Facteur VIII disponibles au laboratoire du CHU d'Angers (chronométrique (OSA) et chromogénique (CSA)) pour le suivi des patients traités par NUWIQ® (Facteur VIII recombinant). Ces deux techniques ont été comparées à une technique chronométrique avec une calibration spécifique NUWIQ® développée en interne.

**Matériels et méthodes :** Premièrement, 3 techniques de dosage ont été comparées à partir d'échantillons surchargés en NUWIQ® (*spikés*). Puis, nous avons comparé ces 3 techniques sur des échantillons de patients traités par NUWIQ®. Cette étude prospective/rétrospective monocentrique a permis d'analyser 16 échantillons de 7 patients ayant reçu du NUWIQ® dans notre centre entre 2023 et 2024.

**Résultats :** Les dosages des échantillons *spikés* ont révélé la corrélation des trois méthodes de dosage. Il a été observé que la méthode de dosage CSA est moins précise que les méthodes OSA.

La comparaison des 3 techniques pour le dosage de FVIII des échantillons patients démontre également une corrélation. Déterminer la technique la plus précise est difficile pour le suivi des patients, il est impossible de connaître la valeur exacte de FVIII après substitution, cependant la technique CSA a parfois révélé des valeurs supérieures à celles obtenues avec les techniques OSA. Des hypothèses ont été évoquées pour expliquer ces discordances, comme des interférences analytiques.

**Discussion :** Cette étude a permis de valider l'utilisation des techniques de dosage du FVIII disponibles au laboratoire d'hématologie afin d'assurer le suivi des patients substitués par NUWIQ®. Elle a également permis de démontrer les performances de la technique OSA avec la calibration NUWIQ® et ouvre la voie à une utilisation de ce principe de dosage pour d'autres molécules. Les discordances visualisées avec la technique CSA pourront faire l'objet d'une évaluation sur de prochains dosages de patients substitués par NUWIQ®.

**Mots-clés :** Calibration spécifique, NUWIQ®, Facteur VIII recombinant, Technique chronométrique, Technique chromogénique, Hémophilie A, Echantillons *spikés*, CSA, OSA

## Comparison of a chronometric method and a chromogenic method for measuring recombinant FVIII activity (NUWIQ® - simoctocog alfa) in a real-world study.

**Aims :** The aim of this study was to assess the analytical performance of two Factor VIII (FVIII) assay techniques available at the Angers University Hospital laboratory (chronometric (OSA) and chromogenic(CSA)) for monitoring patients treated with NUWIQ® (recombinant Factor VIII). These two methods were compared to an in-house developed OSA technique specifically calibrated for NUWIQ®.

**Materials and Methods :** Initially, we compared the three assay techniques using samples spiked with NUWIQ®. Subsequently, this comparison was conducted on patient samples treated with NUWIQ®. This single-center, prospective/retrospective study analyzed 16 samples from 7 patients who received NUWIQ® as part of their care at the Angers University Hospital between 2023 and 2024.

**Results :** The assays of spiked samples showed a correlation between the three dosage methods. However, it was observed that the CSA assay method is less precise than the OSA methods. The comparison of these tests for FVIII quantification in patients samples also demonstrated a correlation between the techniques studied. Determining the most accurate method for patient monitoring is challenging due to the inability to know the exact FVIII value post-substitution. Nevertheless, the CSA method sometimes yielded higher values than those obtained with the two OSA methods. Several hypotheses, such as analytical interferences, have been suggested to explain these discrepancies.

**Discussion :** This study validated the use of the FVIII assay techniques available in the hematology laboratory to ensure proper monitoring of patients receiving NUWIQ® substitution. It also demonstrated the excellent performance of the OSA method with NUWIQ® calibration, suggesting its potential application for other molecules (recombinant FVIII or recombinant FIX). Finally, the discrepancies identified with the CSA technique warrant further evaluation in future assays of patients treated with NUWIQ®.

**Keywords :** Specific calibration, NUWIQ®, Recombinant Factor VIII, Chronometric assay, Chromogenic assay, Hemophilia A, Spiked samples, CSA, OSA