

Développement des inhibiteurs et prise en charge chez les patients hémophiles traités par Facteur VIII ou IX d'origine plasmatique ou recombinante

15 mai 2006

Agence française
de sécurité sanitaire
des produits de santé



Agence française de sécurité sanitaire
des produits de santé

143-147 boulevard Anatole France
F - 93285 Saint-Denis Cedex

www.afssaps.sante.fr

TABLE DES MATIERES

Table des Matières.....	2
Introduction.....	4
Question n° 1 : Inhibiteurs anti-FVIII : Quelles conséquences médicales, psychologiques, sociales et économiques ?	6
Question N°2 : Existe-t-il des arguments pré-cliniques en faveur d'un risque différent selon l'origine plasmatique ou recombinante du facteur VIII ?	9
Question N°3 : Quels sont les patients exposés à un risque majoré d'inhibiteurs anti-FVIII indépendamment des modalités d'administration et du type de FVIII injecté ?.....	13
Question N°4 : Les modalités d'administration du FVIII (doses, âge à la première administration, injections continues ou discontinues, changement de produit...) influencent-elles le risque de développer un inhibiteur ?.....	16
Question N°5 : Le risque d'inhibiteur anti-FVIII est-il différent selon l'origine plasmatique ou recombinante du facteur VIII administré ?.....	22
Question N°6 : Le risque de développer un inhibiteur est-il identique : a) avec tous les facteurs VIII d'origine plasmatique ? b) avec tous les facteurs VIII d'origine recombinante ?.....	22
Question N°7 : Détection et quantification d'un inhibiteur anti-FVIII chez l'hémophile A : Quelles méthodes d'analyse ? Quel suivi chez un hémophile traité ?.....	30
Question n°8 : Chez quels patients avec inhibiteur anti-facteur VIII faut-il initier une tolérance immune ? A quel moment ? Avec quel facteur VIII ? A quelles posologies et selon quelles modalités d'administration ?	34
Question N°9 : Quels sont les critères permettant de définir qu'une tolérance immune : a) est un succès ou un échec ? b) peut être ou doit être interrompue ?.....	40
Question N° 10 : Quelles sont les situations lors d'une tolérance immune pouvant justifier le choix d'un autre facteur VIII ?.....	42
Question n°11 : Quelles sont les alternatives thérapeutiques à la tolérance immune qui sont potentiellement utiles pour la prise en charge d'un patient hémophile A avec inhibiteur ? dans quelles situations faut-il les prescrire ?.....	43
Question N°12 : Quel(s) traitement(s) pour un accident hémorragique survenant chez un hémophile avec inhibiteur et sous tolérance immune : Facteur VII activé recombinant ou Feiba ?.....	47
Question N°13 : Hémophilie B et inhibiteurs anti-FIX : a) le risque d'inhibiteur diffère-t-il selon le patient, certaines situations médicales, le type de Facteur IX utilisé, ou ses modalités d'administration ? b) la tolérance immune doit-elle être conduite selon les mêmes modalités que celles qui sont utilisées chez les hémophiles A avec inhibiteurs anti-FVIII ?.....	50

Conclusions et Perspectives	53
Liste des Participants.....	55
Abreviations	56
Glossaire.....	58
References Bibliographiques.....	59

INTRODUCTION

La survenue d'un inhibiteur est aujourd'hui la complication la plus fréquente du traitement de l'hémophilie. Les facteurs influençant le risque d'inhibiteur chez un hémophile sont d'une part intrinsèques et donc propres au patient lui-même, et d'autre part extrinsèques et donc dépendants des modalités choisies pour le traiter.

À ce titre, le type de facteur administré, recombinant ou d'origine plasmatisque, apparaît comme étant un paramètre sensible voire important.

Le deuxième risque induit par le traitement substitutif chez un hémophile est infectieux, bien qu'il soit devenu aujourd'hui très faible, mais non nul. Ce risque est avéré en ce qui concerne les infections virales, même si dans les dix dernières années, aucun accident de transmission iatrogène d'un agent pathogène n'est intervenu avec les médicaments dérivés du sang. Il est redouté aussi en ce qui concerne le prion, puisqu'une maladie de Creutzfeldt-Jacob nouveau variant (vMCJ) a récemment été diagnostiquée chez un sujet préalablement transfusé par un produit sanguin labile, issu d'un donneur qui a lui-même développé une maladie vMCJ quelques années après son don. Toutefois, le risque de transmission du prion est aujourd'hui non démontré pour les patients traités par des protéines purifiées du plasma, et notamment par des facteurs anti-hémophiliques (*Dossier Afssaps. 2005. Encéphalopathie spongiforme bovine, maladie de Creutzfeldt-Jacob et produits de santé.*)

Le bénéfice du traitement substitutif de l'hémophilie aujourd'hui n'est plus discutable, mais ce double risque, d'inhibiteur d'une part, et infectieux d'autre part, explique les incertitudes exprimées quant au facteur anti-hémophilique devant être choisi afin de garantir un rapport bénéfice/risque optimal chez les patients.

Dans ce contexte, et à l'initiative de l'Afssaps, un groupe d'experts a été réuni afin d'établir une synthèse des données aujourd'hui disponibles sur le problème spécifique du développement des inhibiteurs dans l'hémophilie et dans la mesure du possible, d'établir des recommandations vis-à-vis du diagnostic et du traitement de cette complication, ce dernier reposant essentiellement sur la mise en œuvre d'une tolérance immune.

Au terme d'une première réunion publique à laquelle ont participé aussi des représentants d'une part de l'association des hémophiles et d'autre part des laboratoires pharmaceutiques impliqués dans le traitement de l'hémophilie, une liste de 13 questions a été définie et ce texte présente les réponses exprimées par un groupe de 11 rédacteurs. Avant finalisation, ce rapport a été discuté lors de 2 réunions et soumis à l'ensemble des coordonnateurs des centres régionaux de traitement de l'hémophilie en France, ainsi qu'à trois experts francophones.

Ce texte présente donc, non seulement une synthèse des données relatives aux inhibiteurs développés chez les hémophiles, mais exprime aussi les certitudes et les incertitudes relatives à la prévention, au dépistage, et au traitement de cette complication chez les malades traités.

Ce rapport concerne majoritairement les hémophiles A, plus nombreux et pour lesquels les données exploitables sont beaucoup plus nombreuses, mais aussi les hémophiles B qui posent des problèmes spécifiques quant à leur prise en charge.

Enfin, des recommandations ont été émises selon les données issues de la littérature et certaines d'entre elles, lorsque cela a été jugé possible, ont été classées par niveau de preuve (grade) selon une approche similaire à celle qui est appliquée par l'ACCP pour les anti-thrombotiques[1].

Néanmoins en ce qui concerne l'hémophilie, les essais thérapeutiques (pour lesquels les traitements et le suivi clinique et biologique sont parfaitement définis) sont rares, a fortiori les essais contrôlés comparant plusieurs traitements ou prises en charge.

La plupart des études analysées pour ce texte sont donc des études observationnelles au cours desquelles les traitements et les suivis de malades ne sont pas ou peu modifiés et dont il existe trois principaux types : les cohortes prospectives, les cohortes historiques et les études cas-témoins.

Dans les cohortes prospectives ou historiques, on s'attache à décrire le devenir au fil du temps de sujets présentant au départ des caractéristiques communes, des enfants hémophiles non préalablement traités par exemple. Les cohortes historiques s'appuient sur les données enregistrées dans les dossiers cliniques et la période d'observation est antérieure à la mise en œuvre de l'étude. Dans les cohortes

prospectives, la période d'observation suit la mise en œuvre de l'étude. Dans les deux cas, le risque de développer la maladie, par exemple la survenue d'un inhibiteur, peut être estimé. Les études cas-témoins sont très différentes et consistent à comparer les caractéristiques fixes ou passées d'un groupe de malades (hémophiles avec inhibiteur par exemple) à celles d'un groupe témoin composé de sujets « non malades » (par exemple hémophiles sans inhibiteur).

"Cohortes historiques" et "études cas témoins" sont souvent qualifiées d'études rétrospectives, mais étant donné leur nature très différente, nous avons préféré préciser chaque fois que cela était possible le plan d'étude utilisé.

Dans de nombreuses études sur la survenue d'inhibiteurs en fonction de divers facteurs de risque, le terme incidence est utilisé de manière inappropriée. En effet, l'incidence est un indicateur du nombre de nouveaux cas dans une population définie observée pendant une durée également définie. Or cette durée est souvent variable d'un patient à l'autre sans que cette variabilité soit prise en compte. Ainsi, on peut lire "incidence de 30%" pour signifier que dans une cohorte de 50 enfants non préalablement traités, 15 ont développé un inhibiteur sans prendre en compte le fait que certains ont été suivis jusqu'à 5 JCPA et d'autres plus de 100 JCPA (cf. liste des abréviations). Chez les enfants non préalablement traités, le meilleur indicateur est "l'incidence cumulée" après une durée ou un nombre d'injections défini (par exemple 20 ou 50 JCPA). Cette incidence cumulée s'obtient par un calcul statistique prenant en compte la décroissance au fil du temps du nombre de patients exposés au risque. Chez les patients préalablement traités, le nombre de nouveaux cas est en principe constant (et faible) par intervalles de temps donnés. C'est donc le taux d'incidence (nombre de nouveaux cas/nombre de personnes-années) qu'il convient d'utiliser pour mettre en évidence d'éventuelles variations.

Nous avons donc dans ce texte remplacé le terme "incidence" par "proportion de nouveaux cas" dans les citations de résultats d'études ne prenant pas en compte les durées de suivi des patients traités.

QUESTION N° 1

INHIBITEURS ANTI-FVIII : QUELLES CONSEQUENCES MEDICALES, PSYCHOLOGIQUES, SOCIALES ET ECONOMIQUES ?

I - Etendue du problème.

La prévalence des inhibiteurs anti-FVIII est très variable, entre 4 et 20 % dans la majorité des études. Mais, outre les facteurs de risque propres au patient ou liés aux modalités d'administration du FVIII, les procédures de diagnostic (fréquence et sensibilité des tests) influencent largement les valeurs de prévalence rapportées.

En France, les données actuelles de la cohorte FranceCoag¹ indiquent que sur 1053 hémophiles A sévères, modérés ou mineurs recensés ayant reçu un traitement substitutif, 146 ont un antécédent d'inhibiteur, encore présent chez 60 d'entre eux au dernier contrôle effectué entre 2003 et 2004 (données non publiées). Bien que le réseau FranceCoag n'ait pas encore atteint son objectif d'exhaustivité, il est probable que les hémophiles avec inhibiteur y sont majoritairement recensés. La prévalence est ainsi voisine de 6 %. L'incidence, qui tient compte de l'évolution dans le temps et notamment de la disparition spontanée ou induite des inhibiteurs, n'est pas connue en France. Au Royaume-Uni, pour la période 1977-99, elle a été évaluée à 6,4/1000 patient-années en moyenne, avec une nette augmentation (8,1/1000) depuis le milieu des années 90. Cette valeur est très dépendante de l'âge, puisqu'elle atteint 34,4/1000 patient-années chez l'hémophile A sévère de moins de 5 ans[2].

II - Conséquences médicales de la survenue d'un inhibiteur.

Comparativement aux hémophiles sévères non-infectés par le VIH et sans inhibiteur, les hémophiles avec inhibiteurs ont présenté jusqu'au début des années 1990 une mortalité globale plus élevée (x2), et notamment celle directement en relation avec des accidents hémorragiques (x3,5)[2]. Depuis 1993, cette différence s'est effacée, indiquant l'efficacité de la prise en charge médicale de ces patients, grâce à la mise en œuvre de protocoles d'induction de tolérance immune et à une utilisation plus large de produits plus adaptés ("facteurs de coagulation activés" ou FEIBA[®] et depuis 1996, facteur VIIa recombinant). Néanmoins, cette évolution n'est sans doute perceptible que dans les pays où l'organisation des soins aux hémophiles a été optimisée.

La présence d'un inhibiteur n'augmente pas la fréquence des saignements et ne modifie pas leur type. Paradoxalement, les hémophiles adultes présentent une incidence plus faible d'épisodes hémorragiques, grâce à une prudence majorée des patients dans leur vie quotidienne, la crainte d'événements peu sensibles aux traitements, et/ou une réduction des activités physiques liées à leur handicap[3]. Un handicap sévère est noté en effet chez 80 % des patients, se traduisant par un score orthopédique évalué à 9, sur une échelle de 0 à 15.

Le recul manque pour établir un bilan chez les hémophiles sévères qui, à partir du milieu des années 90, ont pu bénéficier d'un accès plus large au traitement par des concentrés de facteurs de coagulation activés. Toutefois, l'efficacité de ces traitements n'est pas de 100 %, et leur mise en œuvre est moins

¹ Le Réseau FranceCoag, projet coordonné par l'Institut de Veille Sanitaire depuis le 1er janvier 2004, comprend une cohorte prospective multicentrique (*Cohorte FranceCoag*) de patients atteints de maladies hémorragiques dues à des déficits héréditaires en protéines coagulantes. Ce suivi purement observationnel prend le relais du Suivi thérapeutique National des Hémophiles (SNH) mis en place en 1994, et s'insère dans le cadre du suivi clinique habituel des patients sans aucun traitement contrôlé, examen spécifique ou modification du rythme des visites. Les principaux objectifs du Réseau sont :

- la connaissance exhaustive de la répartition géographique, des caractéristiques et de l'évolution de la population atteinte de maladies hémorragiques dues à des déficits héréditaires en protéines coagulantes (ex: *hémophilie, maladie de Willebrand*) prise en charge dans les centres de traitement spécialisés ;
- la disponibilité d'un outil de veille sanitaire permettant l'investigation rapide de toute suspicion de transmission par des préparations de facteurs de coagulation d'un agent transmissible nouvellement identifiable ;
- une meilleure connaissance des facteurs de risque d'inhibiteur chez les enfants atteints d'une hémophilie sévère et des modalités de prise en charge des inhibiteurs chez ces patients ;
- l'évaluation de la faisabilité, de l'observance, de la tolérance et de l'impact de traitements prophylactiques standardisés, et en particulier de la prophylaxie primaire chez les enfants atteints d'une hémophilie sévère.

facile que celle d'un traitement substitutif. Plusieurs administrations de rFVIIa sont par exemple nécessaires pour traiter un épisode hémorragique simple, qui serait résolu par une administration unique de FVIII chez un hémophile sans inhibiteur[4]. Le mode d'utilisation optimal des facteurs de coagulation activés pour le traitement des épisodes aigus, la prophylaxie, font encore l'objet de discussions.

Le recours à la chirurgie orthopédique lourde, comme de toute chirurgie majeure, est devenue possible, mais reste toutefois difficile chez l'hémophile avec inhibiteur. Notamment, la durée d'hospitalisation est supérieure chez l'hémophile avec inhibiteur, 20 jours contre 12 chez l'hémophile sans inhibiteur[5].

Enfin, l'induction d'une tolérance immune est une procédure lourde, limitée par des difficultés d'accès vasculaire, les cathéters veineux centraux et les chambres implantables exposant les patients à des complications infectieuses bactériennes.

III - Conséquences psychosociales de la survenue d'un inhibiteur.

Peu de travaux sur la qualité de vie des hémophiles avec inhibiteur ont été publiés.

Une large étude chez l'adulte[3] a évalué celle-ci à l'aide de deux types de questionnaires avec des résultats globalement concordants. Environ 2 patients sur 3 expriment des difficultés modérées relatives à leur mobilité, 1 sur 3 un manque d'autonomie et 1 sur 2 une gêne modérée dans ses activités quotidiennes. Toujours sur un mode modéré, 71 % expriment une souffrance physique et 35 % un état d'anxiété ou dépressif. Seulement 4 % expriment des problèmes d'intensité extrême pour l'un de ces paramètres. Globalement, la composante physique (handicap et douleur) est plus affectée que la composante sociale ou mentale. Si l'on exclut la composante "activités sociales", la santé mentale de ces hémophiles n'est pas différente de celle de la population générale de référence. Il est intéressant de noter que très peu de différence existe entre les hémophiles d'une même tranche d'âge, qu'ils aient ou non un inhibiteur.

Une étude espagnole récente[6] suggère que les enfants (8-16 ans) avec un inhibiteur présentent, comparativement aux hémophiles sans inhibiteurs, une moindre estime de soi, des relations de qualité réduite avec leurs amis, plus de difficultés scolaires, moins de participation aux activités sportives, et une perception de leur état de santé nettement plus mauvaise. Les conclusions de ce travail sont toutefois limitées par les très faibles effectifs étudiés (4 patients dans chaque groupe).

IV - Conséquences économiques de la survenue d'un inhibiteur.

Jusqu'au milieu des années 90, le coût direct des patients avec un inhibiteur de titre élevé est resté stable et proche (x 1,3) de celui des patients sans inhibiteur ou avec un inhibiteur de titre faible. Mais il a ensuite augmenté régulièrement en France depuis 1988[7]. Les coûts directs étaient représentés, à plus de 90 %, par celui de l'agent hémostatique, ceci indiquant bien que cette catégorie de patients restait à l'écart des progrès thérapeutiques et notamment de la prophylaxie.

L'année 1996 a marqué une évolution nette dans la progression des coûts, qui s'est probablement poursuivie au-delà de 1998, dernière année de cette étude durant laquelle le coût du traitement des patients avec inhibiteur de titre élevé a atteint une valeur environ 3 fois plus élevée que celui des autres catégories de patients. Cette progression est liée à une combinaison de facteurs et notamment à la commercialisation du rFVIIa, au développement des inductions de tolérance, et à une pratique plus libérale de chirurgies majeures qui ne pouvaient plus être retardées.

Une étude américaine couvrant la période 1993-98 a montré qu'au total, la médiane du coût était comparable quel que soit le taux d'inhibiteur[8]. Au contraire, une étude canadienne couvrant à peu près la même période a conclu à un coût 2,25 fois supérieur en cas d'inhibiteur de titre élevé[9]. Toutefois, dans les deux études, le groupe de patients avec inhibiteur était fortement hétérogène, l'essentiel des ressources étant affecté à un très petit nombre de patients.

Une étude prospective conduite en France pendant la période 1997-99 indique que le coût de la prise en charge hospitalière, représenté majoritairement par l'agent hémostatique, est 4 à 6 fois supérieur

chez les hémophiles ayant un titre élevé d'inhibiteur, du fait de l'utilisation de produits plus chers et d'une durée de séjour plus longue en cas d'hémorragie grave ou de chirurgie majeure[5].

L'étude italienne, la plus récente[3], confirme le coût élevé de la prise en charge des hémophiles avec inhibiteur, évalué à environ 18 000 euros/mois, hors induction de tolérance.

Le coût de l'induction de tolérance dépend largement du protocole suivi et de la réponse individuelle du patient qui conditionnent sa durée. Les modèles économiques sont complexes puisqu'ils doivent prendre en compte le gain obtenu à terme en cas de disparition de l'inhibiteur[10, 11].

En conclusion, il faut souligner qu'à ce jour peu de données sont disponibles concernant la qualité de vie des hémophiles avec inhibiteur comparativement aux autres. Dans les pays développés, l'introduction de thérapeutiques adaptées a profondément modifié la prise en charge des patients ayant un inhibiteur de titre élevé. Le recul manque pour évaluer l'impact médical et psychosocial de ces nouvelles stratégies. Toutefois, cette prise en charge est encore complexe, mal standardisée et sub-optimale. Ces patients ne bénéficient pas du même traitement global que ceux qui répondent au traitement substitutif. Enfin aujourd'hui, le coût de la prise en charge de ces patients peut être évalué comme étant grossièrement 4 à 5 fois plus élevé que celui des hémophiles sans inhibiteur.

QUESTION N°2

EXISTE-T-IL DES ARGUMENTS PRÉ-CLINIQUES EN FAVEUR D'UN RISQUE DIFFÉRENT SELON L'ORIGINE PLASMATIQUE OU RECOMBINANTE DU FACTEUR VIII ?

L'administration d'un antigène à un patient qui n'a pas eu l'occasion de développer une tolérance sélective au moment de l'élaboration physiologique de cette tolérance (avant la naissance) comporte toujours un risque d'induction d'une réponse immunitaire. Quelle que soit son origine (plasmatique ou recombinante) et/ou sa formulation, l'administration de Facteur VIII (FVIII) à un patient hémophile comporte toujours un risque d'induction d'anticorps inhibiteurs, variable d'un individu à l'autre mais probablement plus élevé chez ceux n'ayant pratiquement pas d'antigène détectable (hémophiles majeurs).

En termes d'immunogénicité, c'est-à-dire de capacité d'induire une réponse immunitaire, les FVIII plasmatiques et recombinants présentent suffisamment de différences qualitatives pour rendre illusoire toute comparaison directe. De plus, si l'on considère que l'induction d'anticorps inhibant la fonction du FVIII n'est pas synonyme d'immunogénicité, puisque la majorité des anticorps anti-FVIII ne sont pas inhibiteurs[12], il devient très difficile de comparer les deux familles de produits. Il est par contre intéressant de résumer les différences qualitatives identifiées entre ces produits et d'analyser leur impact potentiel sur leur immunogénicité.

A la question de savoir si l'un de ces FVIII induit plus fréquemment que l'autre la production d'anticorps inhibiteurs, il faut rappeler qu'à l'heure actuelle il n'existe aucun modèle animal ou système *in vitro* suffisamment prédictif pour l'étudier avec une fiabilité suffisante. Les modèles les plus récents, basés sur la reconstitution chez l'animal (principalement la souris) d'un système immunitaire humain plus ou moins fonctionnel, sont proches sans l'atteindre, du modèle prédictif. Toutefois, le caractère standardisé de ces modèles ne reflète guère l'extrême diversité de la réponse immunitaire chez l'homme avec ses variables concernant notamment les gènes de réponse immunitaires, spécifiques ou non, le déficit génétique à la base de l'hémophilie et les circonstances cliniques durant lesquelles le FVIII est administré. Néanmoins, les quelques données expérimentales disponibles seront revues ici pour leur intérêt dans l'identification de facteurs de risque potentiels.

I - Arguments pré-cliniques liés au FVIII

• Le polymorphisme du FVIII

Le FVIII était jusqu'il y a peu considéré comme faiblement polymorphique, c'est-à-dire que la séquence d'acides aminés constituant la molécule était considérée comme ne variant pas d'un individu à l'autre. Mais très récemment, des différences significatives ont été identifiées dans la séquence d'acides aminés, et ce y compris dans les régions du FVIII souvent reconnues par des anticorps inhibiteurs, les domaines A2 et C2[13]. Ce polymorphisme, partiellement en relation avec l'origine ethnique, pourrait jouer un rôle dans l'induction d'anticorps inhibiteurs et pourrait rendre compte d'une observation clinique, à savoir que la fréquence d'induction d'inhibiteurs est plus forte dans certains groupes ethniques et notamment chez les noirs.

Une différence d'un seul acide aminé peut modifier profondément l'immunogénicité du FVIII, en particulier pour ce qui concerne l'activation des lymphocytes T[14]. Si, par définition, un FVIII recombinant présente toujours une unique séquence, le FVIII dérivé du plasma représente un mélange de différentes formes. Un lien potentiel est ainsi identifié, un antigène spécifique et constamment exprimé par un FVIII recombinant pouvant induire une activation immunitaire, qui ne serait pas observée après administration de FVIII d'origine plasmatique et issu de multiples donneurs.

Il est trop tôt pour déterminer le rôle exact de ces polymorphismes dans l'induction d'inhibiteurs. Il pourrait cependant concerner non seulement les hémophiles modérés, ayant une molécule non fonctionnelle de FVIII circulant vis-à-vis de laquelle une tolérance s'est développée, mais aussi les hémophiles sévères, eu égard à la plasticité du répertoire des lymphocytes T.

- La glycosylation du FVIII

Les sites de glycosylation du FVIII sont principalement localisés dans le domaine B de la molécule. On connaît l'importance de la glycosylation du FVIII dans les mécanismes de transport intracellulaire avant sécrétion[15]. La glycosylation d'une protéine peut influencer son immunogénicité, par interaction directe avec des lectines de type C présentes à la surface de cellules présentatrices d'antigènes. Cette reconnaissance influence l'activation cellulaire et donc sa capacité d'induire ou non une réponse immunitaire.

Le FVIII recombinant est produit par un système de culture de cellules de mammifère (CHO ou BHK) et des différences de glycosylation ont été identifiées entre les protéines recombinantes et le FVIII dérivé du plasma[16]. D'autres protéines humaines recombinantes présentant des différences notables de glycosylation ont une immunogénicité augmentée. Ce paramètre joue donc probablement un rôle dans l'induction d'anticorps inhibiteurs, mais aucune preuve expérimentale n'étaye aujourd'hui cette hypothèse. Il faut enfin rappeler que la glycosylation est considérée parfois comme protectrice vis-à-vis de l'immunogénicité d'une protéine exogène, dans la mesure où les chaînes de sucre peuvent masquer certains épitopes.

- La proportion de FVIII activé

Les préparations de FVIII recombinant contiennent une proportion variable de FVIII activé. Il n'existe cependant aucune donnée directe permettant de conclure que ce paramètre influence l'immunogénicité de la molécule. La possibilité que l'activation du FVIII conditionne dans une certaine mesure son immunogénicité a toutefois été suggérée lors de l'utilisation de produits plasmatiques associés à une incidence élevée d'inhibiteurs[17].

- Les méthodes de purification du FVIII

Les méthodes de purification du FVIII varient assez largement d'un produit à l'autre. Il n'existe cependant aucune preuve d'une influence directe sur l'immunogénicité du FVIII.

- Les méthodes d'inactivation virale

Ces méthodes concernent essentiellement le FVIII préparé à partir du plasma. Une augmentation de l'incidence d'inhibiteurs a ainsi été rapportée avec un FVIII ayant subi une double inactivation virale avec une pasteurisation[18]. Ce cas illustre la relation qui peut exister entre la méthode d'inactivation virale et notamment le chauffage du FVIII et le développement d'inhibiteurs. Les méthodes modernes comme le traitement par solvant-détergent et la nanofiltration ne semblent pas augmenter l'immunogénicité du FVIII.

II - Arguments pré-cliniques liés aux contaminants du FVIII

- **FVIII recombinants**

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

Enfin, une proportion non négligeable de molécules de FVIII (jusqu'à 20%) présentes dans les préparations de FVIII recombinant n'est pas capable de se fixer au facteur Willebrand, étant ainsi plus sensibles à la protéolyse[19], mais les conséquences en termes d'inhibiteurs ne sont pas connues.

- **FVIII dérivés du plasma**

Les préparations de FVIII dérivées de plasma contiennent, à des taux variables, deux types de contaminants : des protéines co-purifiées avec le FVIII, qui sont essentiellement le fibrinogène, la

fibronectine et des proportions variables d'immunoglobulines (dont une fraction est d'origine murine pour les FVIII immunopurifiés), des molécules ayant une action sur l'immunité, comme le TGF-beta et du facteur Willebrand (vWF). Toutes les préparations de FVIII dérivées du plasma ne contiennent pas de vWF.

De nombreuses publications soutiennent un rôle possible du TGF-beta, voire du fibrinogène et de la fibronectine, en tant que modulateurs de l'immunogénicité du FVIII. Ces études font usage de méthodes analytiques, évaluant notamment des marqueurs cellulaires de surface. Ainsi, une réduction de la proportion de lymphocytes T CD4+, ou de la production de certaines cytokines *in vitro* après stimulation de lymphocytes T a été observée après exposition à du FVIII plasmatique[20, 21]. Il n'est cependant pas démontré que ces effets immunomodulateurs, observés *in vitro*, jouent un rôle *in vivo* dans le contrôle de l'induction d'inhibiteurs.

Le rôle du vWF semble plus complexe. Il est clairement démontré que la liaison du FVIII au vWF masque certains épitopes B (réduisant donc la fixation de certains anticorps) exprimés en particulier par le domaine C2[22]. Cette liaison modifie aussi la conformation du FVIII de telle façon que des épitopes plus ou moins accessibles le deviennent[23]. Ceci implique une modification de l'antigénicité (reconnaissance par des anticorps) et non nécessairement de l'immunogénicité (capacité d'induire une réponse immunitaire) du FVIII.

La liaison du FVIII au vWF pourrait néanmoins modifier son immunogénicité par divers mécanismes. La "polymérisation" du FVIII, résultant du fait qu'une molécule de vWF peut fixer plusieurs molécules de FVIII, pourrait faciliter l'induction d'une anergie au niveau des lymphocytes B spécifiques. La présentation des épitopes T du FVIII par les cellules présentatrices d'antigène pourrait être modifiée par la présence de vWF. Ces hypothèses attendent cependant une confirmation expérimentale.

III - Arguments expérimentaux

Une seule publication rapporte des arguments soutenant l'hypothèse d'un rôle important du vWF dans l'immunogénicité du FVIII[24]. L'administration intraveineuse de FVIII humain chez la souris rendue hémophile par délétion génique induit la production d'anticorps spécifiques du FVIII. Une comparaison menée entre différentes préparations commerciales de FVIII recombinants ou dérivés de plasma montre que le taux d'anticorps est significativement plus élevé après administration de FVIII recombinant. Ce taux d'anticorps rejoint une valeur équivalente à celle obtenue avec du FVIII plasmatique, si le FVIII recombinant est incubé avec du vWF purifié préalablement à son administration. Ces résultats concernent à la fois les inhibiteurs et les anticorps anti-FVIII non neutralisants, indiquant que c'est bien l'immunogénicité de la molécule de FVIII qui est augmentée en l'absence de vWF.

Cette étude, réalisée avec des quantités de FVIII comparables à celles qui sont utilisées en clinique, ne permet pas de définir le mécanisme par lequel le vWF réduirait l'immunogénicité du FVIII. Il ne s'agit pas d'une immunosuppression non spécifique car la production d'anticorps de spécificité autre n'est pas affectée. Quoi qu'il en soit, même si le FVIII humain est particulièrement immunogène chez la souris hémophile (100% des souris produisent des anticorps anti-FVIII), la stricte comparaison de produits utilisés en clinique soutient clairement une hypothèse qui demande confirmation.

En conclusion,

Il existe des arguments précliniques indiquant que les FVIII recombinants et les FVIII dérivés du plasma se distinguent par leur immunogénicité, mais leur caractère démonstratif n'est pas formel. La comparaison de deux familles de produits aussi différentes reste problématique en l'absence de modèle expérimental fiable, d'autant qu'une diversité importante existe au sein de chaque famille (plasmatique et recombinante). Des questions précises comme l'effet de la présence du vWF pourront être étudiées prochainement à l'aide de modèles animaux permettant une évaluation de la réponse immunitaire au niveau clonal. Le rôle du polymorphisme du FVIII devrait être rapidement défini. L'identification précise des épitopes reconnus par les lymphocytes T et l'évolution de la réponse immunitaire sous

perfusion de FVIII afin d'induire une tolérance immunitaire périphérique devrait apporter des renseignements précieux sur les mécanismes expliquant l'immunogénicité du FVIII.

QUESTION N°3

QUELS SONT LES PATIENTS EXPOSÉS À UN RISQUE MAJORÉ D'INHIBITEURS ANTI-FVIII INDÉPENDAMMENT DES MODALITÉS D'ADMINISTRATION ET DU TYPE DE FVIII INJECTÉ?

Cette question n'a donc été abordée qu'en fonction des caractéristiques de l'individu lui-même (et donc essentiellement génétiques).

Anomalies du gène du FVIII

Le type d'anomalie affectant le gène du FVIII et entraînant l'hémophilie modifie considérablement le risque d'apparition d'inhibiteur. Globalement ces anomalies se répartissent en deux groupes :

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

Ces données sont issues d'une synthèse récente d'Oldenburg *et al*[25], et de données obtenues avec des cohortes homogènes de PUPs traités par FVIII recombinant[26] et de la base de données internationales HAMSTeRS (haemophilia A mutation, structure, test and resource site) (<http://europium.csc.mrc.ac.uk>) qui collige toutes les anomalies génétiques répertoriées, à l'exception des inversions de l'intron 22 et de l'intron 1.

L'inversion de l'intron 22 est la plus fréquente des anomalies génétiques associées à l'hémophilie A sévère[27]; elle est retrouvée dans près de 1 cas sur 2 ; le risque d'inhibiteur chez les malades porteurs de cette mutation est estimé entre 21% et 33%[25, 28].

Les autres anomalies génétiques sont par ordre décroissant de fréquence :

- Les mutations ponctuelles faux-sens (65% des mutations enregistrées dans HAMSTeRS), associées à un faible risque d'inhibiteur (5% environ) ; toutefois, si la mutation concerne la chaîne légère du FVIII (domaines A3, C1 et C2), le risque d'inhibiteur est 3 fois plus important que pour celles touchant la chaîne lourde ; 4 mutations faux-sens et induisant des hémophilies modérées ou mineures sont ainsi clairement à haut risque d'inhibiteur (Arg593His ; Try2105Cys ; Arg2150His ; Trp2229Cys) ; généralement, les mutations "à risque" sont celles qui affectent les séquences peptidiques 482-501 de la chaîne lourde et 2248-2312 de la chaîne légère du FVIII.
- Les mutations non-sens (13% de HAMSTeRS) sont associées à un risque élevé d'inhibiteurs (environ 31%) surtout si elles touchent la chaîne légère (risque multiplié par 5 par rapport à celles affectant la chaîne lourde)
- Les petites délétions ou insertions (11% de HAMSTeRS) sont associées à un risque d'inhibiteur d'environ 16%, sans différence entre insertion ou délétion ; selon que l'insertion (ou la délétion) porte ou non sur un nucléotide d'adénine ("A run" versus "non A run"), le risque est augmenté d'un facteur 4.
- les délétions étendues (> 200 paires de bases) (8.5% de HAMSTeRS) sont associées au risque le plus élevé d'inhibiteur (40% environ) et celui-ci est multiplié par 16 si la délétion touche plusieurs exons et non un seul.
- Les anomalies d'épissage (2% de HAMSTeRS) induisent le risque le plus faible d'inhibiteur (3%)

Cas particulier des hémophiles A non sévères (Facteur VIII entre 1 et 30 %).

Un inhibiteur est plus rarement observé dans cette population. Néanmoins une étude menée au Royaume-Uni a montré qu'en 7 ans (janvier 1990-janvier 1997), 28% des nouveaux cas avec inhibiteurs concernent des hémophiles modérés ou mineurs[29]. L'incidence annuelle d'inhibiteurs

durant cette période est de 3.5 pour 1000, en cas d'hémophilie sévère et 0.85 pour 1000 (soit 4 fois moindre) en cas d'hémophilie modérée et mineure. Les inhibiteurs ont été dépistés en général chez des adultes (age médian : 30 ans) au décours d'un traitement intensif. Neuf mutations différentes ont été identifiées chez 16 patients issus de 11 familles (Arg593Cys, Val663Phe, Gly2009Arg, Tyr2105Cys, Arg2150His, Glu2181Asp, Arg2163His, Trp2229Cys, Phe2260Ile), dont trois (soulignées) avaient déjà été rapportées comme fréquemment associées à un inhibiteur. Des antécédents familiaux ont été retrouvés dans 41% des cas ce qui plaide en faveur d'une forte prédisposition génétique.

Une épreuve thérapeutique à la desmopressine (DDAVP) doit être réalisée chez les Hémophiles A modérés / mineurs, afin dévaluer l'augmentation du facteur VIII et la demi-vie du facteur VIII libéré en réponse à cette molécule. Une bonne réponse permet d'envisager l'utilisation de la DDAVP en cas d'accidents hémorragiques ou d'interventions chirurgicales mineurs, en tenant compte de la demi vie du FVIII libéré qui dans certains cas peut-être courte (< 3 heures).

Système majeur d'histocompatibilité

Vis-à-vis du système HLA, les différences rapportées entre hémophiles avec ou sans inhibiteur ne concernent que les antigènes de classe II. Ainsi, selon une étude allemande portant sur 71 patients atteints d'hémophilie A sévère avec inversion de l'intron 22, l'haplotype HLA-A3, B7, C7, DQA*0102, DQB*0602, DR15 (fréquent en Europe du Nord) est plus fréquent dans les cas avec inhibiteur par rapport à ceux sans inhibiteur (RR : 1.0-4.0), mais la différence n'est pas significative[30].

Une autre étude menée au Royaume-Uni chez 176 hémophiles, dont 44% porteurs de l'inversion de l'intron 22 et 30% avec un inhibiteur de titre élevé, note une fréquence supérieure de l'haplotype HLA-DRB1*1501, DQA1*0101, DQB1*0602 chez les malades avec un anticorps par rapport à la population témoin. Toutefois, seule l'élévation de fréquence de l'allèle DQA1*0102 est significative chez les patients porteurs de l'inversion intron 22[31]. De même, la fréquence plus élevée des allèles HLA-DRB1*01 et HLA-DQB1*05 observée chez des patients hémophiles A mineurs, porteurs de la mutation Arg593Cys, et ayant développé un inhibiteur, n'atteint pas le seuil de signification[32].

Les travaux montrant l'évolution possible d'un peptide de 16 acides aminés (aa) de la chaîne légère du FVIII (aa 1706-1721) à partir d'une lignée cellulaire HLA-DR2 renforcent cependant l'hypothèse d'une relation possible entre les antigènes de classe II et la réponse immune chez l'hémophile[33]. Mais la variabilité des fréquences alléliques dans les populations (ce qui limite forcément les effectifs), ainsi que la variété des anomalies du gène du FVIII dans l'hémophilie, rendent particulièrement difficile ce type d'études.

Origine ethnique

L'origine ethnique influence clairement le développement d'inhibiteurs chez l'hémophile A. Ceci avait été noté dès 1984 dans une étude montrant une fréquence plus grande d'inhibiteurs chez les patients noirs d'origine africaine par rapport à une population caucasienne (20.9% versus 13.9%)[34]. Selon une méta-analyse portant sur 3 études menées aux Etats-Unis, l'une historique[35] et 2 autres prospectives et menées avec Recombinate® et Kogenate®[36, 37], la fréquence des inhibiteurs dans la population hémophile A sévère noire américaine est le double (14 sur 27 soit 52%) de celle observée dans la population caucasienne, à degré de sévérité de l'hémophilie égal (51 sur 191, 25,8%)[38]. Cette fréquence accrue des inhibiteurs est aussi observée dans une moindre mesure dans la population latino-américaine[39]. Cette prédisposition chez les noirs est également retrouvée dans l'étude de cohorte historique menée par le LFB sur le FVIII THP SD (Z Tellier, résultats non publiés) et dans celle ayant été présentée par T Calvez[40] et concernant deux cohortes historiques de patients traités par FVIII plasmatique ou recombinant (RR 4.8 ; IC 95% : 2.1-11.0) avec un risque significatif, à la fois en analyse univariée et multivariée.

Certaines variations génétiques ou polymorphismes concernant le FVIII, et récemment rapportées[13], pourraient contribuer à cette prédisposition.

Facteurs familiaux

Il est établi depuis longtemps que l'existence d'antécédents familiaux d'inhibiteurs accroît d'un facteur 2 environ le risque pour un hémophile de développer un inhibiteur[41, 42]. Cette notion est confirmée par l'étude rapportée par T Calvez (non publiée), avec un RR d'inhibiteur en cas d'antécédents familiaux de 4.2 (0.9-18.6), par rapport aux hémophiles ayant des apparentés n'ayant jamais développé d'anticorps anti-FVIII, mais ce résultat n'est significatif qu'en analyse univariée.

De plus, selon les données d'un registre suédois ayant inclus 460 paires de frères hémophiles A ou B[43], le risque d'inhibiteur est plus élevé chez les sujets noirs et dans les familles avec antécédent d'anticorps (48%) comparativement aux autres (15%), avec un RR de 3,2 (IC 95% 2,1-4,9). 25 paires étaient composées de jumeaux dont 15 avec un statut de monozygote. Un inhibiteur a été diagnostiqué pour 6 jumeaux, dont 3 monozygotes avec dans 2 cas, un antécédent d'anti-FVIII de haut titre chez les 2 frères. Ces données soutiennent l'existence d'une prédisposition génétique vis-à-vis du risque d'inhibiteur.

En conclusion,

- Le risque d'inhibiteur est 4 fois plus élevé chez les hémophiles sévères que dans les formes non sévères.
- Parmi les hémophiles A sévères, le risque de développer un inhibiteur diffère selon l'anomalie génétique causale et décroît comme suit :
 - Délétions étendues touchant plusieurs exons : 68%
 - Mutations non-sens touchant la chaîne légère : 50%
 - Inversion de l'intron 22 : 35%
 - Petites insertions ou délétions de type non A run : 20%
 - Mutations non-sens touchant la chaîne lourde : 14%
 - Délétions étendues ne touchant qu'un seul exon: 12%
 - Mutations faux-sens touchant la chaîne légère : 12%
 - Petites insertions ou délétions de type A run : 6%
 - Mutations faux-sens touchant la chaîne lourde : 4%
 - Anomalies d'épissage : 2%
- Chez les hémophiles modérés ou mineurs, les mutations ponctuelles suivantes sont à considérer comme à risque plus élevé d'inhibiteur : Arg593His ; Trp2105Cys ; Arg2150His ; Trp2229Cys (liste non exhaustive). L'usage de la desmopressine (DDAVP) est recommandé en première intention dans les cas reconnus comme étant bons répondeurs, à l'occasion d'une intervention chirurgicale mineure (grade 1C).
- Les sujets non caucasiens, surtout s'ils sont d'origine africaine, ont un risque augmenté de développer un inhibiteur (d'au moins 2 fois).
- L'existence d'antécédents familiaux d'inhibiteurs accroît le risque de développer un inhibiteur et de manière probablement encore plus significative chez l'hémophile modéré et mineur.
- L'analyse des allèles du système majeur d'histocompatibilité n'apparaît pas discriminante pour l'évaluation du risque d'inhibiteur chez un hémophile.

QUESTION N°4

LES MODALITÉS D'ADMINISTRATION DU FVIII (DOSES, ÂGE À LA PREMIÈRE ADMINISTRATION, INJECTIONS CONTINUES OU DISCONTINUES, CHANGEMENT DE PRODUIT...) INFLUENCENT-ELLES LE RISQUE DE DÉVELOPPER UN INHIBITEUR ?

Age

Dans une série de 62 enfants hémophiles A sévères (FVIII < 2%), dont 15 avec un inhibiteur anti-FVIII (détecté chez tous avant l'âge de 3 ans), Lorenzo *et al*[44] montrent que l'incidence cumulée d'inhibiteur à 3 ans est de 41% (IC 95% : 22-67%) chez ceux traités pour la première fois avant l'âge de 6 mois. Cette incidence est plus faible, 29% (IC 95% : 13-57%), si le premier traitement a été administré entre 6 et 12 mois de vie et diminue à 12% (IC95% : 4-34%) si la 1^{ère} injection de FVIII a été effectuée après l'âge de 12 mois. Le résultat n'est pas influencé (compte tenu de la puissance de l'étude) par le taux basal de FVIII:C (< ou > 1%), la présence ou non de l'inversion de l'intron 22, ou le type de concentrés de FVIII administré.

Une deuxième étude a concerné 81 enfants hémophiles A sévères et suivis à Utrecht dont 12 ont développé un inhibiteur[45]. L'incidence cumulée d'inhibiteur à 100 jours d'exposition est de 34% (IC95% : 7-61%) chez ceux qui ont reçu leur premier traitement avant l'âge de 6 mois, de 20% (IC : 4-36%) pour ceux traités entre l'âge de 6 mois et 1 an, et de 13% (IC : 0-27%) pour ceux traités pour la première fois après l'âge de 1 an. La présence de l'inversion de l'intron 22 n'exerce aucune influence.

Par conséquent et d'après ces deux études, le jeune âge au premier traitement semble constituer un facteur de risque d'inhibiteur, mais les réserves suivantes doivent être émises :

- Les enfants traités le plus précocement sont peut-être ceux qui sont atteints le plus sévèrement et porteurs des mutations les plus délétères (absence complète de FVIII), et donc avec un risque plus élevé d'inhibiteur.
- Dans ces deux études, les facteurs confondants comme les circonstances des premiers traitements, et en particulier leur intensité, la sévérité des manifestations hémorragiques, ou la réalisation concomitante d'une intervention chirurgicale, ne sont pas précisées.

Intensité du traitement et modalités d'administration

Une influence potentielle de l'intensité du traitement vis-à-vis du risque d'inhibiteur a surtout été envisagée dans l'hémophilie A non sévère. Un groupe canadien a ainsi rapporté une série de 54 enfants atteints d'hémophilie A modérée ou mineure (taux moyen de FVIII:C : 17%, extrêmes: 6-38%), dont 29 ont été traités par concentrés de FVIII[46]. Seize d'entre eux ont reçu un traitement intensif (défini par une durée de traitement d'au moins 6 jours consécutifs) administré par perfusion continue dans 7 cas et par bolus chez 9 patients. Quatre des 7 enfants traités par perfusion continue ont développé un inhibiteur anti-FVIII (de titre élevé dans 3 cas, et faible pour le 4^{ème}). Trois de ces enfants étaient porteurs de mutations faux-sens préalablement décrites (Pro1854Leu, Asn2286Lys), ou déjà rapportées chez plusieurs patients canadiens sans inhibiteur (Val2016Ala).

Les auteurs discutent l'hypothèse d'un rôle favorisant de la perfusion continue et ont analysé les données de la littérature. Vingt et une publications mentionnent le développement d'un inhibiteur chez 35 patients atteints d'hémophilie A non sévère et soumis à un traitement intensif (au minimum 4 jours consécutifs) associé dans presque tous les cas à une intervention chirurgicale. La plupart ont été traités durant 7 à 10 jours par perfusion continue (12 cas) ou par bolus (12 cas) (sans précision pour les autres cas). Certains de ces patients cumulaient plusieurs facteurs potentiels de risque, une intervention chirurgicale, une perfusion continue et un changement de concentré de FVIII[47, 48].

Le rôle éventuel des modalités de traitement a été discuté aussi dans l'hémophilie sévère. En témoigne l'histoire d'un hémophile A sévère ayant déjà été exposé plus de 1000 jours à un FVIII plasmatique et traité pour la première fois par un concentré de FVIII recombinant administré en perfusion continue (7 jours) lors d'une intervention chirurgicale[49]. Un inhibiteur de titre élevé (72 UB) a été identifié 3

mois après l'intervention, et ce patient, qui cumulait un changement de concentré, administré par perfusion continue, un traitement intensif et une chirurgie, est donc représentatif de la variété des risques encourus.

La perfusion continue est évoquée comme étant un facteur de risque spécifique[50], et cette relation pourrait être due à :

- Une modification des caractéristiques du FVIII lié au temps de conservation avant son injection,
- Un contact prolongé de la protéine avec le plastique du dispositif injectable,
- Un contact avec la paroi veineuse notamment en cas d'inflammation,
- Une diffusion sous-cutanée avec extravasation du FVIII favorisant l'immunisation.

Les interventions chirurgicales constituent une situation à risque non seulement pour les hémophiles modérés ou mineurs (cause principale du traitement substitutif chez ces malades), mais aussi pour les hémophiles sévères, lorsque la chirurgie est l'une des premières circonstances de traitement. Ceci a été souligné par une équipe indienne qui, dans un groupe de 35 adultes n'ayant pu bénéficier de traitement substitutif régulier et traités pour la première fois à l'occasion d'une intervention chirurgicale, identifie un inhibiteur dans 6 cas (17%) durant la période post-opératoire[51].

De plus la chirurgie entraîne des délabrements tissulaires et une réaction inflammatoire avec génération de cytokines pro-inflammatoires qui pourraient faciliter la réponse immunitaire[52].

Changement de produit

En mai 1990, l'introduction aux Pays-Bas et en Belgique d'un concentré de FVIII de pureté intermédiaire (FVIII CPS P) inactivé par une pasteurisation à la place d'un chauffage à sec, a été suivie de l'apparition de nouveaux inhibiteurs chez des patients déjà largement traités, multipliant par 5 à 31 l'incidence d'anticorps anti-FVIII dans ces 2 pays[53, 54]. Après interruption du traitement, ces inhibiteurs ont disparu.

Le même problème a été constaté en Belgique et en Allemagne en 1995 après l'introduction d'un nouveau concentré de FVIII ayant subi une double inactivation virale avec un traitement par solvant-détergent et une pasteurisation[18, 55]. Les inhibiteurs ont également disparu lorsque les patients n'ont plus été exposés à ce concentré.

Ces deux événements ont été attribués à l'effet de la pasteurisation sur la chaîne légère du FVIII, induisant une augmentation de la génération de FXa et de la liaison aux phospholipides[56]. La présence d'un fragment de protéolyse de 40 Kd, démontrée pour certains lots dans le plasma de départ, pourrait aussi contribuer à l'apparition d'inhibiteurs. Ceci pourrait expliquer que certains pays, comme le Portugal qui avait utilisé aussi ce concentré à grande échelle, n'aient pas observé d'incidence accrue d'inhibiteurs dans la population traitée si les pools de plasma utilisés ne contenaient pas ce fragment de protéolyse.

En raison de ces événements mettant en cause directement l'utilisation d'un type précis de concentré de FVIII vis-à-vis de l'apparition de nouveaux inhibiteurs, il a été admis que l'immunogénicité des nouveaux concentrés de FVIII devait être préférentiellement évaluée chez des malades déjà traités (PTPs) et non plus chez des PUPs, cet avis ayant été exprimé par l'ISTH et confirmé ensuite dans les recommandations européennes[57].

En dehors de ces événements exceptionnels, l'hypothèse selon laquelle un changement de concentré (ou "switch") favorise l'apparition d'inhibiteurs a souvent été évoquée. Dans un groupe de 62 patients (dont 30 hémophiles sévères) largement exposés à différents types de concentrés de FVIII plasmatique de basse pureté, puis traités par des concentrés de pureté intermédiaire ou immunopurifiés ou recombinants, un inhibiteur de faible titre (< 1,5 UB) apparaît chez 11% des malades, mais exclusivement chez ceux traités (10 – 35 jours d'exposition) par un FVIII immunopurifié ou recombinant[58].

Dans un groupe de 431 patients suivis de 1964 à 1997, Yee *et al.* ont rapporté le développement de nouveaux inhibiteurs dans 27 cas d'hémophilie sévère (24/39 - 10%) ou non sévère (3/192-1,5%). Dans 7 cas, l'inhibiteur est survenu chez des patients traités par un seul type de concentré, alors que pour 20 patients, l'anticorps est apparu après administration de plusieurs types de concentrés évoquant la responsabilité de "switchs" successifs[59].

Par ailleurs, les études faisant état d'une fréquence particulièrement élevée d'inhibiteurs sont aussi celles qui comportent le plus de patients exposés à plusieurs variétés de concentrés de FVIII[60, 61].

Le Canada constitue un exemple de changement de thérapeutique à grande échelle. En 1994, l'association des directeurs de centres d'hémophilie canadiens (AHCDC) a décidé, alors qu'ils n'utilisaient jusque là que du FVIII plasmatique, de ne proposer aux patients qu'un seul concentré de FVIII recombinant (Kogenate®), tout en laissant la possibilité à certains malades d'être traités par un concentré de FVIII immunopurifié (Hemofil M®). L'apparition de nouveaux inhibiteurs a été recherchée chez les 814 hémophiles traités par FVIII recombinant et les 58 traités par FVIII plasmatique immunopurifié. Le titrage en inhibiteur (méthode et laboratoire centralisés) a été effectué avant le " switch " puis approximativement pendant 1 an et 2 ans après[62]. Le seuil de positivité était fixé à 0.5 UB et la technique utilisée celle de Bethesda. Les résultats obtenus sont résumés ci-dessous.

Tableau N°1 : Inhibiteurs anti-FVIII et titre avant et après changement de produit[62]

Inhibiteur (UB)	Avant changement	1 an après changement	2 ans après changement
0	499 (61%)	355 (74%)	270 (80%)
≤ 0.5	251 (31%)	105 (22%)	52 (15%)
> 0.5	64 (8%)	18 (4%)	17 (5%)
Perdus de vue		336	139
Total (évalués)	814 (100%)	478 (100%)	339 (100%)

Globalement, l'incidence d'inhibiteurs n'a donc pas changé dans la population étudiée mais 50% des patients sont perdus de vue. De plus, en étudiant individuellement les résultats, l'analyse est la suivante :

Tableau N°2 : Evolution selon le statut initial (inhibiteur ou non) après changement de produit[62]

Inhibiteur	1 an après changement de produit		2 ans après changement de produit	
	Positif avant changement	Négatif avant changement	Positif avant changement	Négatif avant changement
Positif après changement	10 (2%)	9 (2%)	7 (2%)	10 (3%)
Négatif après changement	36 (7.5%)	423 (88.5%)	28 (8%)	294 (87%)
Total (évalués)	478 (100%)		339 (100%)	

Par conséquent, un très faible nombre des patients suivis après le switch a développé un inhibiteur après traitement par FVIII recombinant. Dans le même temps, l'inhibiteur a apparemment disparu chez d'autres malades, mais il faut à nouveau souligner que 50% des patients ont été perdus de vue pendant la première année qui a suivi le switch.

Cette étude est souvent citée comme démontrant que le passage à un traitement par FVIII recombinant d'une population de malades déjà traités (PTPs) n'augmente pas l'incidence d'inhibiteurs. Cependant, concernant cette expérience importante :

- On ne connaît pas le degré de sévérité de l'hémophilie,
- On ne connaît pas les caractéristiques des inhibiteurs nouvellement apparus,
- Il n'y a pas de données sur l'importance des traitements avant ou après le changement de concentré (nombre de jours d'exposition, consommation annuelle, modalités thérapeutiques : prophylaxie, traitement à la demande) ;

- Le nombre des patients perdus de vue est très élevé.

Il est donc difficile dans ces conditions d'évaluer la proportion de patients qui pouvaient être considérés "à risque" (faible nombre de jours d'exposition) avant et après passage au FVIII recombinant et d'apprécier réellement leur degré d'exposition au FVIII recombinant.

Les études menées avec les différents concentrés de FVIII recombinant chez les patients antérieurement traités (PTPs), font habituellement état d'une faible fréquence d'apparition d'inhibiteur, le plus souvent proche de 1 % (Tableau n°3, questions n°5-6).

Le concentré de FVIII délété du domaine B (Refacto[®]) a fait l'objet d'une étude spécifique menée en Italie dans deux cohortes, l'une prospective avec 25 patients et l'autre historique incluant 94 patients[63]. La cohorte prospective comprenait 25 hémophiles sévères (FVIII < 1%), d'âge médian de 31 ans, ayant déjà été exposés plus de 50 jours au FVIII (tous produits), et étudiés 3 et 6 mois après passage au Refacto[®]. Ces patients ont essentiellement été traités à la demande (16% seulement des injections données en prophylaxie). Un patient sur 25 (4%) a développé un inhibiteur après 5 jours d'exposition au Refacto[®], avec un titre faible (2 UB) qui a ensuite atteint 30 UB en 2 mois. Le titre a ensuite diminué sous rFVIIa, autorisant la reprise d'un traitement par FVIII plasmatique sans réapparition de l'inhibiteur.

Les auteurs ont analysé rétrospectivement un autre groupe de 94 malades (dont 53 hémophiles sévères) parmi lesquels 75 (dont 49 hémophiles sévères) qui avaient déjà été exposés au moins 50 jours à un autre FVIII (tous produits) avant d'être traités par Refacto[®] (risque faible d'inhibiteur). Dix-neuf (dont 4 hémophiles sévères) avaient moins de 50 jours d'exposition (risque élevé). Les sujets à risque élevé ont été traités par Refacto[®] durant 7 à 72 jours (médiane : 20 jours) et ceux à risque faible durant 7 à 870 jours (médiane : 29 jours). L'un des 4 hémophiles sévères et considérés étant à risque élevé a développé un inhibiteur. Il s'agissait d'un enfant qui n'avait, avant d'être traité par Refacto[®], été exposé que 3 jours à un autre FVIII recombinant. L'inhibiteur (titre maximum = 7 UB) est apparu après 10 jours de traitement par Refacto[®]. L'enfant a été soumis à une tolérance immune (menée avec Refacto[®]). L'inhibiteur a disparu en 20 semaines, mais la récupération et la demi-vie n'ont été normalisées que 14 mois plus tard.

Finalement, et en ne considérant que les 74 hémophiles sévères exposés plus de 50 jours à un FVIII avant traitement par Refacto[®], 1 seul cas d'inhibiteur (1,35%) a été observé.

L'expérience française est sensiblement différente puisque sur un groupe de 70 patients dont 49 hémophiles sévères déjà traités par FVIII, un inhibiteur est apparu après 14 à 63 jours de traitement par le Refacto[®] chez 4 patients (3 hémophiles sévères ayant plus de 120 jours d'exposition au moment du switch et 1 hémophile modéré ayant plus de 20 jours d'exposition)[64]. L'un des hémophiles sévères avait été traité par interféron pour une hépatite C. L'hémophile modéré avait été traité en perfusion continue pour une intervention chirurgicale. La proportion de nouveaux cas d'inhibiteurs est donc de 3/49 (6.1%) et notablement supérieure à celle des études de phase 3 avec Refacto[®] dans ce type de population (1/113 soit 0.9%)[65].

Prophylaxie

Aucune donnée ne démontre formellement que la prophylaxie influence le risque d'inhibiteur. Toutefois, il est frappant d'observer que dans la récente étude prospective menée avec Kogenate FS[®], la proportion de nouveaux cas d'inhibiteurs est de 15% (contrastant avec la fréquence de 28% préalablement observée avec Kogenate[®]), avec une proportion importante d'enfants traités en prophylaxie (70.5% en fin d'étude)[66]. On peut donc émettre l'hypothèse que l'institution précoce d'une prophylaxie chez l'enfant lors des premières expositions pourrait exercer un effet comparable à celui d'une tolérance immune à faibles doses et induire la disparition d'un inhibiteur apparu précocement et demeuré inaperçu.

L'effet protecteur de la prophylaxie précoce a été évoqué dans une étude récente avec 50 enfants hémophiles A sévères dont 19 traités "à la demande" et 31 traités en prophylaxie primaire ou secondaire[67]. Quinze des 19 enfants traités "à la demande" ont développé un inhibiteur alors qu'aucun des 31 enfants en prophylaxie n'a développé d'anti-FVIII. Même en réduisant l'analyse à un

groupe de 20 enfants avec des anomalies génétiques comparables, la proportion des enfants ayant développé un inhibiteur reste plus importante (11/12) parmi ceux traités à la demande. Toutefois, cette étude ne précise pas le nombre de JCPA pour chaque groupe.

Allaitement maternel

Il a été suggéré par certains auteurs que l'allaitement maternel exerçait un effet protecteur vis-à-vis de l'apparition d'inhibiteurs. Le lait maternel participe en effet au développement du système immunitaire digestif et à la mise en place d'une tolérance immune par voie orale. En outre, le lait maternel contient une protéine (human milk fat globulin) homologue au FVIII et au FV. Ceci a conduit une équipe suédoise (le taux d'allaitement maternel en Suède étant particulièrement élevé) à tester cette hypothèse dans un groupe de 116 enfants hémophiles sévères (100 hémophiles A et 16 hémophiles B), dont 25 avaient développé un inhibiteur (19 hémophiles A et 6 hémophiles B). Les auteurs ne rapportent cependant aucune différence significative d'incidence d'inhibiteurs selon le recours ou non à l'allaitement maternel et sa durée[68].

Autres variables

Chez les malades infectés par le VIH, les anti-rétroviraux peuvent restaurer les fonctions immunitaires, évolution qui, associée à un syndrome inflammatoire, peut favoriser l'apparition d'un inhibiteur[69, 70]. Néanmoins, un tel événement peut aussi être contemporain de modifications du traitement substitutif, ce qui rend plus difficile la démonstration d'une relation causale.

Chez les malades infectés par le VHC, le traitement par interféron peut aussi être associé à l'apparition de nouveaux inhibiteurs[71].

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

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

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

Conclusions et recommandations :

- Le jeune âge au premier traitement (< 6 mois) pourrait majorer le risque d'apparition d'inhibiteur, sans pouvoir exclure l'influence des caractères génétiques de l'individu, des circonstances associées au premier traitement et de leur gravité potentielle.

Il n'existe pas d'arguments validés pour recommander de retarder l'âge du premier traitement substitutif.

- L'allaitement maternel ne paraît pas exercer d'effet protecteur particulier vis-à-vis de l'apparition d'un inhibiteur.
- Quels que soient l'âge et la sévérité de l'hémophilie, les traitements intensifs semblent associés à un risque plus élevé d'inhibiteur, surtout dans le contexte d'une intervention chirurgicale.
- L'administration de facteur VIII par perfusion intraveineuse continue (en général lors d'un traitement intensif en situation chirurgicale) pourrait constituer un facteur de risque supplémentaire. Ainsi, au cours d'un traitement intensif par perfusion intraveineuse continue, il est préférable d'utiliser le FVIII classiquement administré au patient et de ne pas changer de produit, en particulier chez les malades régulièrement traités par un FVIII plasmatique et pour lesquels on prévoit de prescrire un FVIII recombinant. Le changement de produit pourra être décidé ultérieurement, à distance du traitement intensif.
- Le risque d'inhibiteur lié à un changement de concentré de FVIII reste mal précisé, mais il ne peut cependant pas être exclu.
- La prophylaxie précoce pourrait réduire le risque d'inhibiteurs. Néanmoins, le recul et l'expérience avec ce type de traitement étant faibles à ce jour, le devenir à long terme (vis-à-vis de ce risque) des enfants ainsi traités reste inconnu.
- Il est recommandé que les patients infectés par le VIH ou le VHC soient particulièrement surveillés vis-à-vis du risque d'inhibiteur, lorsqu'ils sont exposés à des thérapeutiques spécifiques (anti-rétroviraux, interféron).
- La transfusion de PSL n'influence probablement pas le risque d'inhibiteur, mais reflète plutôt la gravité de l'épisode traité.
- Si une injection de FVIII est pratiquée à proximité d'une vaccination, le risque d'inhibiteur pourrait être majoré mais aucune donnée tangible n'a confirmé cette hypothèse. Une surveillance biologique plus rigoureuse est toutefois recommandée. Il est également rappelé que l'administration concomitante de FVIII ou FIX n'est pas nécessaire lors d'une vaccination.

QUESTION N°5

LE RISQUE D'INHIBITEUR ANTI-FVIII EST-IL DIFFERENT SELON L'ORIGINE PLASMATIQUE OU RECOMBINANTE DU FACTEUR VIII ADMINISTRE ?

QUESTION N°6

**LE RISQUE DE DEVELOPPER UN INHIBITEUR EST-IL IDENTIQUE :
AVEC TOUS LES FACTEURS VIII D'ORIGINE PLASMATIQUE ?
AVEC TOUS LES FACTEURS VIII D'ORIGINE RECOMBINANTE ?**

I - Introduction

1 - Pour répondre à ces deux questions, les données de la littérature ont été analysées :

- a) en ne retenant que les articles publiés dans un journal médical avec comité de lecture,
- b) s'il était possible de rattacher le suivi des patients à un type bien défini de facteur VIII administré, qu'il soit d'origine plasmatique ou recombinante,
- c) s'il était possible de définir la population étudiée : hémophilie sévère/modérée ; PUPs (previously untreated patients), PTPs (previously treated patients), MTPs (minimally treated patients).

Les articles publiés dans des suppléments n'ont été utilisés que s'ils concernaient une étude publiée par ailleurs dans un journal avec comité de lecture et s'ils apportaient des renseignements complémentaires intéressants (plus d'informations ou de patients inclus ou suivi plus long).

Par ailleurs, seul un résumé de congrès concernant 69 patients a été analysé[72].

De plus, nous n'avons pas utilisé les études ou suivis de cohorte pour lesquels plusieurs produits ont été utilisés sur des périodes prolongées et si la documentation sur la sévérité de l'hémophilie ou le type de patients inclus (PTPs, MTPs ou PUPs) était insuffisante.

Pour les produits d'origine plasmatique, seules les publications concernant ceux de pureté intermédiaire ou de haute pureté et ayant subi au moins un procédé de réduction virale (MDS encore sur le marché européen ou nord américain ou proche de MDS encore commercialisés), ont été analysés. Pour les produits recombinants, nous avons pris en compte toutes les études les concernant.

2 - Pour l'analyse des données, les critères de définition de la sévérité de l'hémophilie A, des inhibiteurs, des types de patients et les facteurs de risque favorisant la survenue des inhibiteurs lorsqu'ils étaient notés dans l'article, ont été pris en compte (cf. glossaire).

3- L'analyse comparée des études s'est révélée difficile en raison de protocoles différents, avec des variations concernant notamment les éléments suivants :

- Le taux de facteur VIII < 1, 2 ou 3%, ou variable dans la population étudiée avec des hémophiles A sévères et modérés/mineurs, ou parfois non définis. Plusieurs études concernant les facteurs VIII d'origine plasmatique ont été réalisées chez des jeunes hémophiles afin de vérifier leur innocuité sur le plan viral et non le risque d'inhibiteurs.
- Le type d'étude, pouvant être un essai thérapeutique ouvert (sans groupe contrôle) avec un protocole bien défini (comme pour les études internationales menées avec les facteurs VIII recombinants), ou une étude de cohorte observationnelle historique ou prospective.
- Le type de laboratoire effectuant la recherche/titrage des inhibiteurs, centralisé ou local.

- Le rythme de suivi biologique avec une recherche trimestrielle d'inhibiteur pour les études concernant les FVIII recombinants, ce qui n'était généralement pas le cas avec les FVIII d'origine plasmatique.
- Le nombre de patients étudiés, le plus souvent assez faible (au maximum une centaine).
- Les facteurs de risque de développement d'un inhibiteur (notamment génétiques), rarement précisés ou de façon partielle.

II – Analyse des données de la littérature concernant les hémophiles A sévères

Il n'existe dans la littérature aucune étude ayant comparé les FVIII recombinants à ceux d'origine plasmatique aussi bien chez les PTPs que chez les PUPs.

1 – PTPs

Les études réalisées chez les PTPs permettent d'évaluer l'immunogénicité d'un produit dans une population considérée comme à faible risque d'inhibiteur[57]. Les hémophiles A modérés ou mineurs ne devraient être considérés comme PTPs que pour une valeur de JCPA > 100 ou 150 et pas seulement s'ils ont déjà été traités dans le passé par un facteur VIII. Si la valeur de JCPA n'est pas précisée, il n'est pas possible de savoir si un patient est un PTP ou non. Pour cette analyse, "l'épidémie" d'inhibiteurs survenue dans trois pays européens (Belgique, Hollande, Allemagne) avec deux nouveaux concentrés plasmatiques de facteur VIII[53-55] n'a pas été prise en compte, bien que ces événements aient montré l'intérêt d'une pharmacovigilance soigneuse vis à vis de nouveaux produits pouvant induire un risque immunogène élevé.

A. Facteurs VIII d'origine plasmatique (pFVIII)

En ce qui concerne les PTPs, et en dehors de l'épidémie d'inhibiteurs survenue en Europe avec deux concentrés pasteurisés et précédemment discutée, il n'y a pas d'étude publiée avec un nombre suffisant de patients permettant de comparer les pFVIII entre eux et les pFVIII aux FVIII recombinants dans cette population.

B. Facteurs VIII recombinants (rFVIII)

Plusieurs études prospectives ont été réalisées chez les PTPs avec les différents rFVIII (Recombinate/Bioclata[®], Kogenate/Helixate[®], Refacto[®], Kogenate SF/Helixate NexGen[®], Advate[®]). Elles concernent des patients atteints d'hémophilie sévère (FVIII < 2%), et nous avons exclu quand cela était possible les quelques cas modérés ou mineurs éventuellement inclus.

Le nombre des patients inclus dans ces études est relativement faible (de 67 à 113) avec une durée de suivi variable et la proportion d'inhibiteur est comprise entre 0 à 1,17% (tableau N°3).

Du fait de l'incidence faible d'inhibiteur dans cette population de PTPs (patients à faible risque), ce type d'études ne pouvait éventuellement dépister qu'une apparition très anormale d'inhibiteurs liée à un produit particulièrement immunogène, comme ce fut le cas avec les pFVIII en Europe[53-55]. Pour permettre la comparaison entre deux produits relativement peu immunogènes, ces études devraient inclure plusieurs centaines de patients, évalués durant plusieurs années.

Une étude de pharmacovigilance réalisée à l'échelon mondial par la firme Baxter[73] a identifié 89 patients ayant développé un inhibiteur sous Recombinate[®] entre 1993 et 2002. Mais, cette étude ne précise ni la valeur du dénominateur (nombre de patients traités par Recombinate[®]), ni le statut des hémophiles traités (PUP ou autre). Le nombre de cas d'inhibiteurs déclarés est variable d'un pays à l'autre avec 37 patients en France identifiés dans le cadre du Suivi National des Hémophiles ou de la pharmacovigilance, et seulement 21 aux USA et 13 en Allemagne. En réalité ces études, du fait d'une déclaration probablement non exhaustive des cas d'inhibiteurs, ne reflètent donc le plus souvent qu'imparfaitement l'ampleur du problème.

Afin d'obtenir des données fiables, il faudrait suivre systématiquement au niveau européen de grandes cohortes de patients traités par un produit, avec des recueils de données comparables, un même suivi et une définition homogène pour chaque classe de patients (PTP, MTP ou PUP).

C. En conclusion, concernant les PTPs,

Il est donc impossible de répondre rigoureusement à la question relative à un risque d'inhibiteur différent entre les produits recombinants actuellement sur le marché du fait des faibles effectifs de patients évalués dans ces études vis-à-vis d'un évènement estimé relativement rare.

2 - PUPs

Les études réalisées chez les PUPs, ne recevant qu'un seul type de produit sur une période de plusieurs années si possible et avec un minimum de 50 à 150 CED, permettent d'évaluer l'immunogénicité d'un facteur VIII dans une population considérée comme étant à haut risque d'inhibiteur.

A. Facteur VIII d'origine plasmatique (pFVIII)

Les études cliniques et/ou les recueils de données historiques ou prospectives concernent des effectifs de PUPs très faibles (15 à 37), excepté pour une étude (72 enfants), avec des durées et des modalités de suivi variables. Seule l'incidence d'inhibiteurs de type "fort répondeur" peut être évaluée, un certain nombre d'anticorps transitoires n'ayant vraisemblablement pas été détecté. La proportion de nouveaux cas d'inhibiteurs "fort répondeurs" rapportée avec 4 facteurs VIII d'origine plasmatique (tableau N°4) est de 0/15, 0/37, 1/23 et 4/72 et apparaît donc relativement basse. Par contre, elle semble plus élevée (3/18) avec un autre produit immunopurifié[74].

Cependant, le très faible nombre de patients inclus (en dehors de la cohorte française) explique qu'il soit impossible de conclure avec certitude qu'un pFVIII immunopurifié induit un risque plus élevé d'inhibiteurs par rapport aux autres. De plus ces études rapportent des données anciennes ayant plus de 10 ans. Même si l'incidence peut paraître assez faible comparée aux données obtenues avec les rFVIII, elle reflète peut-être de façon imprécise le risque d'inhibiteurs actuel induit par les FVIII plasmatiques utilisés aujourd'hui.

B. Facteur VIII recombinants (rFVIII)

Les 3 premiers produits mis sur le marché (Recombinate/Bioclata[®], Kogenate/Helixate[®], Refacto[®]) ont fait l'objet d'études cliniques prospectives internationales chez un nombre de PUPs compris entre 65 et 101. Kogenate[®] a aussi fait l'objet d'une étude "post-marketing" au Japon[75] et le Recombinate[®] d'un recueil de données historiques et prospectives en France[76]. Les résultats de ces études publiées sont résumés dans le tableau N°5. La proportion de nouveaux cas d'inhibiteurs au recul le plus important est de 29% pour le Kogenate/Helixate[®] (23 % de forts répondeurs). Elle est très voisine (32 %) avec le Recombinate/Bioclata[®] (14% de "fort répondeurs") et le Refacto[®] (16 % de "fort répondeurs"). Les données "post-marketing", obtenues pour le Kogenate[®] au Japon et pour le Recombinate[®] en France, sont similaires aux résultats des études cliniques internationales prospectives.

La proportion de nouveaux cas d'inhibiteurs avec le Kogenate Bayer/Helixate NexGen[®], FVIIIr de nouvelle génération, apparaît plus faible, évaluée à 13,5% (11% de forts répondeurs), en dépit d'un suivi plus rigoureux que pour les études précédentes (inhibiteur testé en fonction du nombre de CED et non plus tous les 3 mois)[66]. Cette étude n'a toutefois inclut que 37 PUPs et le recul n'est que de 3,5 ans. Il faut souligner aussi que 71% des patients inclus (37 PUPs et 24 MTPs) étaient en prophylaxie avec pour conséquence une éventuelle modification de l'incidence d'inhibiteurs (prévention des inhibiteurs ? tolérance immune? inhibiteurs bas ou transitoires plus difficiles à dépister ?)[67].

L'étude PUPs avec Advate[®] vient juste de débiter, et aucune donnée n'est à ce jour disponible.

C. En conclusion, concernant les PUPs,

Il est impossible de répondre de façon formelle et rigoureuse aux 2 questions posées du fait du petit nombre de sujets inclus dans chaque étude et de populations mal définies ou différentes en termes notamment de facteurs de risque liés aux patients (anomalie génétique sous-jacente, origine ethnique, antécédents familiaux d'inhibiteur...).

Il semble néanmoins y avoir plus d'inhibiteurs chez les hémophiles PUPs traités par un rFVIII par rapport aux patients ayant reçu certains pFVIII. Cette perception peut être liée à des différences de suivi et de sensibilité des tests de dépistage utilisés, ou à des modalités thérapeutiques variables appliquées au cours du temps. Toutefois, un effet bénéfique potentiel du facteur Willebrand ou de molécules immunosuppressives présentes dans les pFVIII non immunopurifiés est discuté pour expliquer cette différence potentielle.

Il est donc très difficile aujourd'hui d'émettre des recommandations claires quant au type de FVIII (recombinant ou d'origine plasmatique) devant être prescrit en 1^{ère} intention chez un hémophile A sévère non préalablement traité (PUP).

Vis-à-vis de ce choix, trois éléments essentiels sont à analyser :

- Le risque d'inhibiteur parfaitement démontré quel que soit le type de produit, mais qui semble moindre avec les FVIII d'origine plasmatique, en particulier s'ils contiennent du facteur Willebrand,
- Le risque infectieux, antérieurement démontré (risque viral) ou non (risque prion) chez l'hémophile, et aujourd'hui très faible mais peut-être non nul,
- L'efficacité clinique du traitement, en tenant compte de la récupération et de la demi-vie du facteur anti-hémophilique administré.

Par conséquent, chez l'hémophile A,

- Si l'on privilégie la sécurité sur le plan infectieux, il est possible d'administrer en première intention un facteur VIII recombinant.
- Si l'on privilégie la sécurité vis-à-vis du risque d'inhibiteur, il est possible d'administrer en première intention un FVIII d'origine plasmatique.

III – Perspectives

Il n'est pas possible de faire une méta-analyse des différents essais thérapeutiques ou des études de cohortes historiques ou prospectives disponibles, du fait de l'hétérogénéité des données, comme cela avait déjà été souligné[77]. Le risque de développement d'un inhibiteur chez un hémophile A sévère qui n'a jamais été traité semble supérieur avec la majorité des facteurs VIII recombinants, mais il est possible qu'un nombre important d'anticorps transitoires n'ait pas été dépisté avec les produits plasmatiques, en raison d'un suivi moins régulier, avec des données non exhaustives. On ne peut donc que comparer les résultats concernant les inhibiteurs de type fort répondeur. Il faut noter aussi que durant la longue période de temps nécessaire à ces études ou à ces recueils de données (1989-2005), les stratégies thérapeutiques ont beaucoup évolué, avec comme conséquence une variation possible et contemporaine du risque de développer un inhibiteur.

Afin de mieux identifier l'immunogénicité d'un produit par rapport à un autre, il est donc nécessaire de développer des études "post-marketing" en incluant un très grand nombre de patients, en différenciant PTPs, MTPs et PUPs, et en assurant un recueil comparable des données. Toutefois, les protocoles souvent différents de ces études ne permettent pas toujours d'obtenir des données suffisamment informatives.

Concernant les PUPs, seule une étude prospective, multicentrique (et donc internationale), et randomisée permettrait de savoir si un FVIII recombinant est réellement plus immunogène qu'un FVIII d'origine plasmatique. Ce type d'étude n'a néanmoins jamais été réalisé en France ou ailleurs.

Une telle étude implique de fait, l'inclusion d'un grand nombre de patients (et donc une durée d'étude longue), un protocole rigoureux et bien conduit (et donc contraignant), permettant la prise en compte de tous les facteurs de risque d'inhibiteur (connus ou inconnus) ainsi que des modalités thérapeutiques et de suivi.

De plus, afin de permettre un taux d'inclusion suffisant, ce type d'étude nécessite une adhésion, non seulement des médecins impliqués dans le suivi des hémophiles et sans doute de plusieurs laboratoires pharmaceutiques mais aussi et surtout des patients eux-mêmes ou de leurs familles. À ce titre, il est essentiel de souligner combien la perception du risque infectieux associé aux produits d'origine plasmatisque est très variable d'un patient à l'autre, d'un médecin à l'autre, d'un pays à l'autre, et que ce facteur peut limiter considérablement la faisabilité d'une telle étude.

Les problèmes suivants doivent aussi être résolus :

- La définition actuelle de l'hémophilie sévère (FVIII < 1%) doit être respectée ce qui n'est pas toujours le cas, même pour les études les plus récentes, et ce malgré les recommandations de l'ISTH[78].
- La définition d'un inhibiteur transitoire doit être précisée. Un inhibiteur de titre faible (< 5 UB) ne doit être pris en compte que dans le cas où le patient a continué à être traité à la demande, une tolérance immune précoce voire même une prophylaxie pouvant empêcher l'apparition d'un anticorps de titre élevé.

Il est essentiel de poursuivre en France la collaboration mise en place entre les centres d'hémophilie ayant permis d'une part, la réalisation de recueils historiques et prospectifs sur le facteur VIII LFB[79, 80], et un facteur VIII recombinant[76], et d'autre part, de mettre en place le suivi d'une large cohorte d'hémophiles (Suivi National des Hémophiles ou SNH et réseau FranceCoag). L'inclusion de tous les enfants PUPs dans la cohorte suivie par le réseau FranceCoag paraît donc impérative. Il est nécessaire aussi de maintenir une pharmacovigilance active chez les PTPs traités avec les nouveaux produits. À ce titre, il convient de rappeler à tous les praticiens responsables de patients hémophiles que tout nouvel inhibiteur, ainsi que tout effet secondaire, doit systématiquement être déclaré à FranceCoag et à la pharmacovigilance.

Tableau N°3 : Études chez les PTPs avec un taux de FVIII < 2 % et traités par un FVIII recombinant

Références	White, 1997 [81]	Schwartz, 1990 [82]	Courter, 2001 [83] et Lusher , 2003 [65]	Abshire, 2000 [84]	Tarantino, 2004 [85]
Produit	Recombinat [®]	Kogenat [®]	Refacto [®]	Kogenat SF [®]	Advate [®]
Nombre de patients	67	85	113	71	108
Nombre de JCPA avant administration	ND	ND	ND mais âge > 5 ans	= 100 ED	= 150 ED
Durée de suivi	3,7 ans	5 mois	5 ans	18/24 mois (USA/UE)	ND
Nombre d'unités administrées	17 700	ND	46 000	120500	12 600
JCPA-Médiane (extrêmes)	184 (14 - 799)	618 (69-807)	ND	ND	117
Nombre de patients avec inhibiteur	0	1 (FR)	1 (FR)	0	1 (fR)
% d'inhibiteurs	0%	1,17%	0,88%	0%	0,92%

ND = non documenté ; FR = Fort répondeur (titre > 5UB) ; fR = Faible Répondeur (titre ≤ 5 UB)

Tableau N°4 : Études chez les PUPs traités par un FVIII d'origine plasmatique

Références	Schimpft [86]	Yee [87]	Guérois [79]	Goudemand [80]	Addiego [88]	Philipp [74]
Type d'étude	Prospective	Historique	Historique et prospective	Historique et prospective	Prospective	Prospective
Produit	Kryoglobuline S-TIM 3®	BPL 8Y®	FVIII THPSD LFB®	FVIII THPSD LFB®	Hemofil M®	Monoclote P®
Pureté	Intermédiaire	Intermédiaire	Haute pureté (chromatographie)	Haute pureté (chromatographie)	Haute pureté (immunoaffinité)	Haute pureté (immunopurifié)
Réduction virale	Chauffage par vapeur	Chauffage 80°C 72 H	Solvant-Détergent	Solvant-Détergent	Solvant-Détergent	Pasteurisation
Nombre de patients	15	37	56	72	23	18
Origine africaine (%)	NR	NR	NR	4 / 72 (5,6%)	ND	ND
ATCD familiaux d'inhibiteur	NR	NR	NR	6 / 72 (8,3%)	ND	ND
Taux de FVIII	< 3%	< 2%	< 1%	< 1%	≤ 3%	< 1%
Période	avant 1995	1985-95	1988-93	1988-98		1989-1997
Durée de suivi	2-75 semaines	18-110 mois	1-76 mois	11 mois - 10 ans	6-24 mois	24 mois
Inhibiteur						
Titrage	UB	Sur TCA ou UB	UB	UB	UB	Oxford ou UB
Centralisé ?	Non	Non	Non	Non	ND	ND
Intervalle entre 2 tests	>> 3 mois	3-4 mois; parfois 1-2 par an	3-6 mois, parfois 1 par an	Tous les 5,5 mois en moyenne	3 mois	6 mois
Nombre total d'inhibiteurs/total de patients (%)	0/15	1/37 (2,7%)	5/56 (8,9%)	8/72 (11%)	2/22 (9%)	6/18 (33,3%)
Forts répondeurs (%)	0/15	0	2/56 (3,6%)	4/72 (5,5%)	1/22 (4,5%)	2/18 (11,1%)
Faibles répondeurs (%)	0/15	1/37 (2,7%)	3/56 (5,3%)	4 / 72 (5,5%)	1/22 (4,5%)	4/18 (22,2%)
Médiane JCPA si inhibiteur		16	16 (6-19)	15 (4-286)	4 et 5	15,5 (6-38)

ND = non documenté ; Forts répondeurs = titre > 5 U ; Faibles répondeurs = titre ≤ 5 UB

Tableau N°5 :Études chez les PUPs traités par un FVIII recombinant

	Kogenate® internationale		Kogenate® Japon	Recombinate® internationale		Recombinate® France	Refacto® internationale	Kogenate-SF® internationale
Références	Lusher[37]	Lusher[89]	Yoshioka[75]	Bray[36]	Gruppo[72]	Rothschild[76]	Lusher[65]	Kreutz[66]
Type d'étude	Prospective	Prospective	PMS	Prospective	Prospective	Retrospective	Prospective	Prospective
Produit	Kogenate®	Kogenate®	Kogenate®	Recombinate®	Recombinate®	Recombinate®	Refacto®	Kogenate-SF®
Nombre de patients	49	65	31	69	69	50	101	37 (+24 MTP)
Taux de FVIII	< 2%	< 2%	< 1%	< 2%	< 2%	< 1%	< 2%	< 2%
Période	1989-92	1989-1995	1993-99	1989-92	1989-97	1993-97	1994-2001	1997-2001
Durée de suivi	3,5 ans	5,5 ans	6 ans	3,5 ans	7,3 ans	4 ans	6 ans	3,5 ans
Population								
Origine africaine (%)	ND	12,30%	ND	14,50%	14,50%	6%	2,90%	8,1% (5/61)
ATCD familiaux d'inhibiteur	ND	15,40%	ND	ND	10%	8%	6,90%	21,3% (13/61)
Inhibiteur								
Titrage	UB	UB	UB	UB	UB	UB	UB	Nijm
Centralisé ?	oui	oui	non	oui	oui	non	oui	oui
Intervalle entre 2 tests	3 mois	3 mois	3 mois	3 mois	3 mois	84% 3 mois	3 mois	tous les 3-4 ED (20 ED) tous les 10 ED (50 ED) puis tous les 3 mois
Nombre total d'inhibiteurs/ total de patients (%)	14/49 (28,5%)	19 /65 (29%)	11/31 (32,3%)	17/69 (24,6%)	22/69 (31,8%)	14/50 (28%)	32 /101 (31,6%)	5/37 (13,5%)
Forts répondeurs (%)	10/49 (20,4%)	15/65 (23%)	6/31 (19%)	8/69 (11,6%)	10/69 (14%)	7/50 (14%)	16/101 (15,8%)	4/37 (10,8%)
Faibles répondeurs	3/49 (6,1%)	4/65 (6,1%)	5/31 (8,1%)	9/69 (13%)	12/69 (17,4%)	7/50 (14%)	16/101 (15,8%)	1/37 (2,7%)
Mediane de JCPA si inhibiteur	9(3-18)	9 (3-54)	12 (1-48)	9(3-45)	10 (3-69)	17 (3-69)	12 (3-49)	9 (3-18)

ND : Donnée non documentée ; Forts répondeurs = titre > 5 UB ; Faibles répondeurs = titre ≤ 5 UB

QUESTION N°7

DÉTECTION ET QUANTIFICATION D'UN INHIBITEUR ANTI-FVIII CHEZ L'HÉMOPHILE A : QUELLES MÉTHODES D'ANALYSE ? QUEL SUIVI CHEZ UN HÉMOPHILE TRAITÉ ?

Introduction

Les inhibiteurs anti FVIII sont des anticorps dirigés contre le FVIII dont ils neutralisent l'activité coagulante (anticoagulants circulants anti-FVIII) par des mécanismes variés (en bloquant la liaison du FVIIIa au FIXa, au FX, aux phospholipides ou en augmentant sa dégradation protéolytique)[90, 91]. Les inhibiteurs anti-FVIII peuvent aussi reconnaître des sites du FVIII non impliqués pour son activité procoagulante[12].

I. Quelles méthodes d'analyse ?

Les inhibiteurs anti-FVIII neutralisent l'activité coagulante du FVIII selon une cinétique qui est fonction de la température et du temps[92].

La plupart des inhibiteurs anti-FVIII de l'hémophile ont une cinétique de type 1 caractérisée par une inhibition linéaire, rapide et complète du FVIII avec un maximum d'inactivation atteint en 2 heures environ. Plus rarement, la cinétique est de type 2 avec une première phase de neutralisation rapide suivie d'une deuxième phase d'inactivation plus lente avec neutralisation incomplète du FVIII[93].

La décroissance du FVIII est appréciée par le dosage du FVIII coagulant (FVIII:C) résiduel d'un mélange du plasma du malade avec une source de FVIII.

- Dans la méthode d'Oxford (" nouvelle " méthode), la source de FVIII est un concentré de FVIII (3-6 U/ml) incubé (mélange " test ") durant 4 heures à 37° avec le plasma du malade (1 vol/4 vol) en même temps qu'un mélange contrôle (1 vol concentré FVIII/4 vol tampon imidazole). Le FVIII résiduel dans le mélange test est exprimé en % du taux mesuré dans le mélange contrôle[94].
- Dans la méthode de Bethesda, la source de FVIII est un plasma normal mélangé volume à volume avec le plasma du malade (mélange test). Le mélange est incubé à 37° durant 2 heures en même temps qu'un mélange contrôle (1 vol plasma normal/1 vol tampon imidazole). Pour être interprétable, le taux de FVIII résiduel dans le mélange test doit être compris entre 25% et 75% ce qui, en dehors de ces fourchettes, nécessite des ajustements par dilution du plasma du malade. Dans ces conditions, 1 UB est définie comme la quantité d'inhibiteur capable de neutraliser 50% du FVIII:C contenue dans 1 ml de plasma normal[95].

Si le plasma testé contient du FVIII (hémophile traité ou hémophile non sévère), il doit être chauffé 30 min à 56°C afin de détruire le FVIII circulant et de dissocier d'éventuels complexes antigène-anticorps[96].

La comparaison historique des 2 méthodes demandée par l'ISTH a établi une relation de 1 unité Oxford pour 1,21 unité Bethesda[97]. La méthode de Bethesda a dès lors été considérée comme la méthode de référence.

La méthode de Bethesda présentait toutefois deux écueils identifiés en 1995 par un groupe hollandais et susceptibles d'expliquer la fréquence élevée d'inhibiteurs de titre faible sans corrélation clinique constatée par les utilisateurs :

- Une élévation du pH dans le mélange plasmatique durant les 2 heures d'incubation avec comme conséquence une dégradation du FVIII,
- Une différence de concentration protéique entre le mélange " test " plasmatique et le mélange " contrôle " comportant 1 vol de tampon pour 1 vol de plasma.

La variante Nijmegen[98] comprend donc deux modifications par rapport à la méthode Bethesda :

- Un tamponnement par l'imidazole du plasma normal utilisé comme source de FVIII dans le mélange " test " ou " contrôle ",
- Le recours à un plasma déplété en FVIII dans le mélange " contrôle " en remplacement du tampon imidazole.

La comparaison des deux méthodes (Bethesda/Nijmegen) faite en 1995, puis plus tard lors d'une large étude canadienne[99], montre que des titres faibles d'inhibiteurs, dépistés par la méthode Bethesda (0.5-0.9 UB) et sans expression clinique apparente, ne sont pas détectés par la méthode Nijmegen. Cette dernière a dès lors été proposée comme la méthode de référence par l'ISTH en 1996.

Des différences d'interprétation des titres d'inhibiteur ont cependant été mises en évidence avec la méthode Nijmegen selon la nature du plasma déplété en FVIII et en relation avec la présence ou non dans ce dernier de facteur Willebrand (VWF)[100]. L'absence de VWF induit une instabilité du FVIII:C influençant les titres mesurés d'où la proposition de remplacer le plasma déplété en FVIII par une solution d'albumine à 4%, avec l'avantage en outre d'un moindre coût[101].

En réalité, dans la mesure où la plupart des laboratoires utilisent comme source de plasma normal un plasma de référence lyophilisé tamponné lors de sa reconstitution, on peut admettre que la stabilité du pH du mélange plasma normal/plasma malade est assurée, ce qui améliore notablement la performance de la méthode de détection[102].

Le dépistage des inhibiteurs anti-FVIII est réalisé selon une méthode dépendante du TCA. Les recommandations de l'UKHCDO[103] sont de dépister les inhibiteurs anti-FVIII en mesurant le TCA d'un mélange plasma malade/plasma normal immédiatement après le mélange puis après 2 heures d'incubation, en ajustant le seuil de détection en fonction de normes locales établies selon la méthode de Ewing et Kasper[104]. Cependant, l'établissement de telles normes est un obstacle allant à l'encontre d'une standardisation harmonieuse de cette méthode. Il n'est en outre pas certain que cette recommandation soit appliquée, et ce même au Royaume-Uni[105].

Le seuil de positivité selon la méthode Bethesda n'a pas été défini par le SSC/ISTH. En général, ce seuil est fixé à 0.6 UB (recherche positive ≥ 0.6 UB). Une étude récente menée au Royaume-Uni a mis en évidence la difficulté persistante de standardisation du dosage de FVIII sur lequel est basé la méthode Bethesda et ses variantes[106]. Il n'est donc guère surprenant dans ces conditions d'observer des CV élevés (25-50%) pour le titrage des inhibiteurs anti-FVIII dans les études multicentriques (SSC/ISTH, Venise 2004).

Les hémophiles avec un inhibiteur anti-FVIII sont classés en "forts" ou "faibles" répondeurs, selon le développement ou non d'une réponse anamnétique lors de la réintroduction du FVIII. La valeur seuil du titre, permettant de classer un inhibiteur anti-FVIII en "fort " ou "faible " répondeur, a été fixée à 5 UB par le SSC/ISTH (faible répondeur : ≤ 5 UB, fort répondeur : > 5 UB)[78]. Il n'existe pas jusqu'à présent de définition consensuelle pour les inhibiteurs dits transitoires qui sont de faible titre et ne persistent que durant une période brève avant de disparaître spontanément.

Les inhibiteurs anti-FVIII dits " non neutralisants " sont recherchés par différentes méthodes immunochimiques : ELISA ou immunoprécipitation. Ces techniques détectent des anticorps non dépistés par la méthode Bethesda et susceptibles de diminuer la demi-vie du FVIII injecté. Elles sont par ailleurs mieux standardisées que les tests de coagulation[107-109]. Les résultats obtenus avec ces tests ELISA sont toutefois contradictoires. En effet, une équipe italienne retrouve une proportion importante (38-81%) d'hémophiles A sans inhibiteur anti-FVIII décelable par la méthode Bethesda, mais pour lesquels le test ELISA est positif[107, 110], alors qu'un groupe australien n'identifie cette situation que chez 4 malades sur 26 étudiés[111]. La technique d'immunoprécipitation appliquée à la cohorte PUPs Recombinate[®] ne permet pas de corrélérer la diminution de récupération du FVIII observée chez 16 des 72 enfants explorés, avec la présence d'anticorps anti-FVIII détectés par cette technique[109]. La signification de ces anticorps non neutralisants reste donc incertaine.

Mesure de la récupération et de la demi-vie

La présence d'un inhibiteur se traduit par une diminution de la récupération et/ou de la demi-vie du FVIII injecté. Les modalités permettant l'étude de la demi-vie et résumées ci-après ont été définies par les sous-comités de standardisation de l'ISTH en 1991[112] et révisées en 2001[113] :

- Une dose de 25-50 U/kg est administrée 72 h après la dernière injection de FVIII.
- Le taux de FVIII est mesuré avant l'injection puis, 10-15 min, 30 min, 1, 3, 6, 9, 24, 28, 32, et 48 heures après.

En pratique, il est souvent impossible d'effectuer la totalité de ces prélèvements en particulier chez l'enfant. Il est nécessaire cependant de garantir au moins 4 points de dosage afin de pouvoir établir une droite de régression linéaire[114]. Le premier dosage (entre 30 et 60 minutes) est destiné à apprécier le taux maximum de FVIII atteint (récupération). Les autres (au minimum 4h, 6h et 24h) permettent de mesurer la demi-vie. Si un taux mesurable de FVIII persiste à la 24^{ème} heure, un dernier prélèvement doit être effectué 48 h après l'injection.

La récupération est communément obtenue par une simple division avec au numérateur, la différence (en U/ml) entre le taux basal de FVIII et celui mesuré 30 à 60 minutes après l'injection, et au dénominateur la dose injectée (en U/kg). Le taux habituel de récupération est de l'ordre de 2%/U/kg avec de larges variations individuelles, surtout chez l'enfant (dont la récupération est plus basse que chez l'adulte).

La demi-vie est calculée habituellement après avoir établi une droite de régression linéaire avec les points de mesure obtenus. Divers programmes de calcul, en modèle compartimental ou non compartimental, sont utilisables, mais ils ne permettent pas forcément d'obtenir le même résultat[115]. La décroissance du taux de FVIII se fait en 2 phases : l'une rapide et l'autre plus lente qui est utilisée pour le calcul de la demi-vie, d'où la nécessité de disposer de points de mesure tardifs à 24 voire 48 heures. Le temps de demi disparition est le temps correspondant à une disparition de 50% de la dose injectée, mais il n'est en pratique guère d'utilité. La demi-vie du FVIII est de l'ordre de 12 heures avec de larges variations, surtout liées à l'âge. Des demi-vies voisines de 6 heures peuvent ainsi être calculées chez l'enfant sans inhibiteur[103].

Recommandations

- Le dépistage et le titrage d'un inhibiteur anti-FVIII sont à faire en utilisant la méthode Bethesda.
- Si le plasma à tester contient du FVIII (hémophile traité ou hémophile non sévère), il doit préalablement à l'analyse être chauffé 30 min à 56°C.
- Si le plasma source de FVIII utilisé pour les mélanges "test" et "contrôle" est un pool de plasmas normaux, il doit être tamponné en imidazole 0.1 M, pH 7.4 (selon la méthode de Nijmegen).
- Si le plasma source de FVIII utilisé est un plasma de référence lyophilisé (tamponné lors de sa reconstitution), on peut admettre que la stabilité du pH du milieu durant les 2 heures d'incubation à 37° est garantie.
- Le titre à partir duquel le plasma d'hémophile étudié est identifié comme positif pour un inhibiteur anti-FVIII est de 0.6 UB.
- Le seuil de définition d'un inhibiteur "fort répondeur" est de 5 UB (les titres ≤ 5 UB correspondent à des inhibiteurs "faibles répondeurs").
- Le TCA sur un mélange plasma normal + plasma testé avant ou après incubation 2 heures à 37° n'est pas recommandé comme méthode de dépistage du fait de l'impossibilité de standardiser le seuil de positivité.
- Les tests « non neutralisants » (ELISA ou autres tests immunochimiques) ne sont à considérer que comme des explorations complémentaires, car la signification d'un résultat positif dans le cas où la recherche par la méthode de Bethesda est négative est encore incertaine.

- En cas de doute, une étude de la récupération et de la demi-vie peut être effectuée ; les valeurs seuils ne sont pas vraiment établies, mais une récupération inférieure à 66% de la normale peut néanmoins être considérée comme diminuée ; selon l'UKHCDO, une demi-vie inférieure à 6 heures peut être considérée comme raccourcie.

II. Quel suivi chez un hémophile traité ?

La très grande majorité des inhibiteurs anti-FVIII surviennent chez l'hémophile sévère au décours des premières administrations de FVIII. Selon 10 études menées chez des enfants PUPs, la médiane d'apparition d'un inhibiteur anti-FVIII varie entre 9 et 36 JCPA avec des valeurs extrêmes comprises entre 2 et 195 JCPA. Quatre études rapportent la survenue d'un inhibiteur avant le 4^{ème} jour d'exposition et quatre mentionnent également le développement d'un anti-FVIII après plus de 50 jours d'exposition dont deux au delà de 100 JCPA[116].

La recherche d'inhibiteurs anti-FVIII est donc à faire régulièrement et fréquemment chez le jeune hémophile sévère dès lors que les premiers traitements par FVIII ont été administrés. L'avantage d'une détection précoce est de permettre le cas échéant la mise en place rapide d'un protocole d'induction de tolérance immune. L'UKHCDO recommande ainsi de rechercher un inhibiteur anti-FVIII tous les 5 jours d'exposition au FVIII, ou tous les 3 mois jusqu'au vingtième JCPA, puis tous les 6 à 12 mois[103]. Les études prospectives les plus récentes recherchent un inhibiteur anti-FVIII tous les 3-4 jours d'exposition jusqu'au 20^{ème} JCPA, puis tous les 10 jours d'exposition jusqu'au 50^{ème} JCPA, puis tous les 3 mois durant au minimum 2 ans[66].

Une injection récente de FVIII peut suffire à saturer un anticorps de faible titre ; dans ces conditions la recherche d'inhibiteur est à faire au minimum 72 heures après la dernière injection de FVIII (soit environ 3 demi-vies).

En cas de doute, la recherche d'inhibiteur peut être complétée par une mesure de la récupération, voire de la demi-vie du FVIII.

Recommandations

Chez l'hémophile sévère :

- La recherche d'inhibiteur est à faire tous les 5-10 jours d'exposition jusqu'au 50^{ème} JCPA (ou à défaut tous les 3 mois si ce rythme de suivi ne peut pas être appliqué), puis tous les 3 mois jusqu'au 100^{ème} JCPA, puis tous les 6 à 12 mois.
- Un inhibiteur doit être systématiquement recherché :
 - Avant et après (2 à 3 semaines suivant la dernière injection) tout traitement intensif (plus de 6 jours consécutifs de traitement),
 - Après tout changement de concentré de FVIII (après environ 10-20 jours d'exposition),
 - Après un délai de 3 jours au moins succédant la dernière injection de FVIII.
- En cas de tolérance immune, un schéma spécifique de recherche d'inhibiteur est à prévoir (voir question N°8)

Chez l'hémophile modéré et mineur :

- La recherche d'inhibiteur est à faire systématiquement après tout traitement intensif (plus de 6 jours consécutifs de traitement), 2 à 3 semaines après la dernière injection de FVIII.

QUESTION N°8

CHEZ QUELS PATIENTS AVEC INHIBITEUR ANTI-FACTEUR VIII FAUT-IL INITIER UNE TOLÉRANCE IMMUNE ? À QUEL MOMENT ? AVEC QUEL FACTEUR VIII ? À QUELLES POSOLOGIES ET SELON QUELLES MODALITÉS D'ADMINISTRATION ?

Introduction

Il y a maintenant près de 30 ans que Brackmann et Gormsen[117] ont rapporté que l'administration régulière de fortes doses de facteur VIII (FVIII) permettait d'éradiquer un inhibiteur anti-FVIII. Les études qui ont suivi ont montré que, ce qui est défini comme l'induction d'une tolérance immune (ITI), éradiquait l'inhibiteur anti-FVIII chez plus de 80% d'hémophiles A sévères élus [118-123] [124].

L'obtention d'une ITI, qui permet de restaurer un traitement efficace par des concentrés de FVIII, réduit le risque de séquelles articulaires et améliore considérablement la qualité de vie du patient. L'ITI représente un investissement à long terme et son coût doit être comparé à celui du traitement d'un hémophile qui conserve un inhibiteur toute sa vie. Le bénéfice clinique est réel : les alternatives thérapeutiques sont moins efficaces à ce jour pour prévenir le développement de l'arthropathie hémophilique et l'ITI évite des interventions orthopédiques particulièrement onéreuses chez un patient avec inhibiteur[9, 125].

Nos connaissances actuelles proviennent d'études non randomisées et de données issues de 3 grandes enquêtes historiques :

- L' "International Immune Tolerance Registry" (IITR)[126] avec 228 patients,
- Le "North American Immune Tolerance Registry" (NAITR)[123, 124] avec 164 patients,
- Le "German Immune Tolerance Registry" (GITR)[127] avec 114 patients.

Certains patients sont communs à plusieurs registres, mais dans la plupart des cas, des régimes variés de traitement ont été appliqués et l'issue de l'ITI a été jugée selon des critères différents.

Même si l'approche optimale reste encore largement discutée, ces registres ont cependant permis de déterminer les paramètres influençant l'issue de l'ITI et de reconnaître les patients avec des facteurs prédictifs favorables. Il n'y a cependant pas de consensus sur le régime thérapeutique à utiliser.

Facteurs influençant l'efficacité d'une ITI

- **Le titre de l'inhibiteur au moment de l'induction** est le facteur prédictif le plus important : il affecte à la fois l'issue et la durée de l'ITI. Un titre < 10 UB/ml lors de l'initiation est bien corrélé avec le succès dans les 2 grands registres NAITR et IITR ($p < 0,004$ et $< 0,001$ respectivement)[119, 123, 124]. Le pourcentage de succès était de 85% chez les patients avec un inhibiteur < 10 UB et seulement de 43% chez ceux avec un titre > 10 UB ; la durée (médiane) de l'ITI était de 11 mois chez les premiers et de 15 mois chez les seconds. La plupart des études ont confirmé cette donnée[120, 121].
- **Le pic historique de l'inhibiteur avant l'ITI** n'est pas significativement corrélé avec l'issue, même si des pics très élevés (> 500 UB, voire > 200 UB) sont plus souvent associés à des échecs.
- **Le pic de l'inhibiteur après l'initiation de l'ITI** : le registre NAITR a montré que ce paramètre était significativement corrélé avec l'issue, un pic > 500 UB étant associé à une résistance.
- **Le délai entre la détection de l'inhibiteur et l'initiation de l'ITI** : la plupart des études préconisent que l'ITI soit débutée le plus précocement possible après la découverte de l'inhibiteur. La période la plus favorable pour initier l'ITI est de fait celle où l'inhibiteur apparaît et durant laquelle il peut être saturé plus facilement; la tolérance est plus difficile à obtenir lors d'une réponse immune secondaire. Kreuz[120] a rapporté que, plus le nombre de jours d'exposition au FVIII entre la détection de l'inhibiteur et le début de l'ITI est élevé, plus le délai pour obtenir la tolérance est long. Un intervalle court entre la détection de l'inhibiteur et l'initiation de l'ITI prédit

le succès dans certaines études[119, 120] mais pas dans d'autres[121, 123, 124] ; cependant, la tolérance est obtenue plus rapidement ce qui réduit le coût et diminue le risque de séquelles fonctionnelles chez le patient. Dans deux études[128, 129], l'initiation de l'ITI a été différée jusqu'à ce que le titre de l'inhibiteur devienne < 10 UB, avec un pourcentage d'issues favorables $> 80\%$.

- **L'âge à l'initiation de l'ITI** est aussi un facteur prédictif souligné dans la plupart des études, la tolérance étant plus facile à obtenir chez le jeune enfant[119-121].

- **Les doses de FVIII** : l'influence des doses de FVIII administrées reste très débattue. Les posologies varient largement et 3 régimes peuvent être individualisés :

- Fortes doses > 100 à 300 UI/kg/jour
- Faibles doses ≥ 50 UI/kg 3 fois par semaine
- Doses intermédiaires = 50 à 100 UI/kg/jour

Les régimes décrits dans la littérature sont résumés dans le tableau N°6. Certains ont combiné l'apport de FVIII avec un traitement immunosuppresseur, ou une immunoadsorption de l'inhibiteur sur colonne de Protéine A[118, 130] ; il n'est cependant pas démontré aujourd'hui que ces méthodes soient plus efficaces pour obtenir une tolérance immune.

Le registre IITR indique que les fortes posologies ≥ 100 UI/kg/jour sont significativement plus efficaces que les posologies de 50 UI/kg/jour, particulièrement chez les patients avec un titre d'inhibiteur > 10 UB[119].

Le registre NAITR indique que l'échec et le succès ne dépendent pas de la posologie, bien que les fortes doses ≥ 100 UI/kg/jour permettent d'obtenir une tolérance plus rapidement que les faibles doses ($15,9$ mois versus $23,6$ mois). [123, 124].

Une méta-analyse des registres IITR et NAITR[131] montre que l'issue de la tolérance immune est indépendante de la dose si le titre de l'inhibiteur lors de l'initiation de l'ITI est < 10 UB, et si le pic historique est < 200 UB (tableau N°7) ; avec ces critères, un régime de 50 UI/kg 3 fois par semaine permet, comme un régime de 100 UI/kg/jour, d'obtenir une tolérance immune dans 88% des cas[120-122].

Le régime de Van Creveld[121] appliqué à 24 jeunes enfants a permis d'obtenir une mise en tolérance dans plus de 87% des cas ayant un titre historique < 40 UB et dans 75% des patients avec un titre > 40 UB ; la tolérance a été obtenue avec une médiane de 6 mois dans le premier groupe et de 19 mois pour le deuxième.

Ainsi, même si la comparaison des régimes reste difficile, il semble important d'identifier les patients avec facteurs prédictifs défavorables, et chez lesquels il faut probablement utiliser de fortes doses (≥ 100 UI/kg/jour).

- **Le type de FVIII administré pour l'ITI** : depuis que les facteurs VIII de haute pureté et recombinants sont disponibles, certains auteurs considèrent qu'ils sont moins efficaces pour induire une tolérance par rapport aux concentrés de pureté intermédiaire. Kreuz[132] a ainsi rapporté que chez 6 patients en échec sous FVIII recombinant, la tolérance immune avait été obtenue après un "switch" avec un facteur VIII plasmatique contenant du facteur Willebrand. Aucune étude randomisée n'a été réalisée pour confirmer cette observation. L'équipe de Brackmann[133] a aussi rapporté, qu'avec le même régime de Bonn appliqué entre 1990 et 2000 , 50% des patients seulement avaient eu une issue favorable à l'ITI, cette diminution d'efficacité, par rapport aux ITI menées avant 1990 , étant attribuée à l'utilisation de FVIII recombinant. Ces auteurs ont émis l'hypothèse que le facteur Willebrand, contenu dans certains concentrés plasmatiques, protégeait et masquait le domaine C2 du FVIII prolongeant ainsi sa demi-vie et augmentant les chances de tolérance ; d'autres hypothèses suggèrent que les concentrés de pureté intermédiaire contiennent des anticorps anti-idiotypes ou exercent des effets immunomodulateurs favorisant la tolérance immune[134]. Une autre hypothèse est que la "polymérisation" fonctionnelle du FVIII sur le vWF induirait plus facilement une anergie.

L'analyse du NAITR montre cependant une issue favorable d'ITI identique sous concentrés de pureté intermédiaire et concentrés de haute pureté (plasmatiques et recombinants) ($67,5\%$ et 75%

respectivement)[124]. Une étude rapportant des ITI réalisées exclusivement sous FVIII recombinant, avec des régimes variables et dans une petite série de patients, indique également des issues favorables comparables[135].

- **L'anomalie moléculaire** : aucun des 3 grands registres n'a analysé l'influence de l'anomalie moléculaire du gène du FVIII sur l'issue d'une ITI.
- **Les infections durant l'ITI**, favorisées en particulier par une voie veineuse centrale, peuvent entraîner une augmentation du titre de l'inhibiteur ; cette complication peut prolonger l'ITI, voire conduire à l'échec.

Recommandations

Une tolérance immune doit être conduite en concertation avec un Centre Régional de Traitement de l'Hémophilie (Grade 1C+)[103].

Tout patient débutant une ITI devrait être inclus dans une étude randomisée pour laquelle il est éligible, ou dans un registre national ou international (Grade 1C+)[103].

Une information précise doit être délivrée au patient ou à ses parents ; il est important de s'assurer de l'adhésion du patient ou de la famille au protocole de traitement proposé et un consentement signé est souhaitable (Grade 1C).

- **A quels patients proposer une ITI ?**

L'ITI doit être envisagée chez tout patient avec une hémophilie A sévère chez lequel un inhibiteur anti-FVIII est découvert et confirmé (Grade 1C+). L'évaluation doit analyser les facteurs influençant l'issue de l'ITI. Sont considérés comme des facteurs de bon pronostic : un titre d'inhibiteur < 10 UB lors de l'initiation de l'ITI, un pic historique avant l'ITI < 200 UB, un délai court entre la détection de l'inhibiteur et le début de l'ITI, l'absence de nouvelle injection de FVIII entre la détection de l'inhibiteur et le début de l'ITI, et un jeune âge.

- **A quel moment débiter une ITI ?**

L'ITI doit être débutée aussi rapidement que possible après la détection de l'inhibiteur (Grade 1C). Dans la majorité des cas, le moment le plus favorable est celui de la réponse primaire, quel que soit le titre de l'inhibiteur.

Lors d'une réponse immune secondaire, il est recommandé de différer l'ITI si le titre de l'inhibiteur est > 10 UB, jusqu'à ce que celui-ci retombe en dessous de 10 UB (Grade 1C).

- **Avec quel FVIII faut-il initier une ITI ?**

Tous les types de concentrés de FVIII sont susceptibles d'induire avec succès une tolérance immune. Cependant, l'ITI doit préférentiellement être initiée avec le concentré de FVIII qui avait été choisi pour traiter le patient et sous lequel le patient a développé l'inhibiteur (Grade 2C).

- **A quelles posologies faut-il initier une ITI ?**

Chez l'enfant faible répondeur avec un titre d'inhibiteur de 0,6 à 5 UB, un traitement régulier, avec des doses comprises entre 50 UI/kg 3 fois par semaine et 100 UI/kg/jour, est suggéré ; si le titre devient supérieur à 5 UB, les modalités proposées pour les forts répondeurs sont applicables.

Chez le fort répondeur et en l'absence d'étude prospective et randomisée, on ne peut recommander aucun régime spécifique. Cependant, le titre historique de l'inhibiteur, considéré comme l'un des meilleurs facteurs prédictifs, est un élément d'orientation .

- Le régime "faibles doses", 3 fois par semaine, est proposé pour de très jeunes patients avec un titre maximum d'inhibiteur < 40 UB (Grade 2C+).
- Quel que soit l'âge du patient, si le pic historique de l'inhibiteur est > 200 UB, un régime " fortes doses " peut être proposé (Grade 2C+).

- Si le pic historique de l'inhibiteur est > 50 UB et < 200 UB, et le titre à l'initiation < 10 UB, les différents régimes semblent donner des issues comparables, mais avec un délai d'autant plus long que la posologie en UI/kg/jour est faible.
- Si le pic historique de l'inhibiteur a été > 50 UB et < 200 UB, et le titre à l'initiation de l'ITI > 10 UB, des posologies > 50 UI/kg/jour augmentent les chances de succès (Grade 2C).
- **Quelles modalités d'administration ?**
La voie veineuse périphérique est recommandée chaque fois que possible. Les régimes "fortes doses" peuvent imposer une voie veineuse centrale, d'autant plus que toute interruption de l'ITI doit être évitée puisqu'elle peut conduire à l'échec (Grade 2C).
- **Quelle surveillance ?**
Durant l'ITI, le titre de l'inhibiteur doit être évalué au minimum tous les mois jusqu'à ce que l'inhibiteur anti-FVIII ne soit plus détectable. A ce stade, la récupération du FVIII injecté doit être déterminée tous les mois jusqu'à normalité ; lorsque le régime est devenu prophylactique, la demi-vie doit être mesurée, à 72 heures d'une injection, et tous les 3 mois jusqu'à normalité (Grade 1C).
- **Réduction progressive des doses :**
Après disparition de l'inhibiteur et obtention d'une récupération normale, une réduction progressive des doses est appliquée aux régimes "fortes doses" ou "doses intermédiaires" journalières, avec des paliers mensuels. Le schéma suivant, 100 UI/kg/jour, puis 50 UI/kg/jour, puis 50 UI/kg tous les 2 jours, puis régime prophylactique 3 fois par semaine pendant au moins 1 an, est proposé, mais doit être adapté au cas par cas et selon les résultats des contrôles biologiques.

Induction d'une tolérance immune dans l'hémophilie A modérée ou mineure

Le risque de développer un inhibiteur dans l'hémophilie A modérée ou mineure traitée par FVIII est très inférieur à celui de l'hémophilie A sévère. Cependant, des mutations à haut risque ont été décrites[136]. Les inhibiteurs reconnaissent fréquemment le FVIII endogène du patient, le transformant en hémophile A sévère. Le temps de disparition de l'inhibiteur est variable et une ITI peut être proposée chez les patients dont l'inhibiteur persiste et favorise la survenue d'épisodes hémorragiques. Il y a néanmoins très peu de cas rapportés dans la littérature. Tous les régimes d'ITI ont été utilisés avec un pourcentage de succès d'environ 30%[136], résultat mitigé pouvant être lié à un âge médian des patients assez élevé, voisin de 30 ans. La réponse à l'ITI serait meilleure chez l'enfant.

Tableau N°6 : Principaux protocoles de tolérance immune

<u>Protocole</u>	<u>Régime thérapeutique</u>
Bonn[122]	Protocole 1 : FVIII 100 UI/kg, 2 fois par jour FEIBA 100 UI/kg, 2 fois par jour Protocole 2 : FVIII 150 UI/kg, 2 fois par jour
Van Creveld[121]	Saturation de l'inhibiteur Puis FVIII 25 à 50 UI/kg 2 fois par jour pendant 1 à 2 semaines Puis régime de tolérance 25 UI/kg toutes les 48 heures.
Malmö[118]	Saturation de l'inhibiteur et injection de FVIII pour maintenir en circulation un taux de 30% pendant 10 à 14 jours Cyclophosphamide 12-15 mg/kg IV J1 et J2 Cyclophosphamide 2-3 mg/kg per os J3 à J10 Immunoglobulines IV 2,5 à 5 g à J1 et 0,4 g/kg / jour à J4 et J5 Immunoabsorption sur colonne de Protéine A si l'inhibiteur est > 10 UB à l'initiation, jusqu'à obtention d'un titre < 10 UB.

Tableau N°7 : Méta-analyse des registres ITR et NAITR [131]: efficacité selon la dose, le titre de l'inhibiteur avant l'ITI et la valeur du pic historique (n=278)

Pic historique (UB)	Titre avant ITI (UB)	Dose UI/kg/j	Succès		
			N	%	
< 50	<10	<50	30/36	83	
		50-99	33/38	87	
		100-199	18/19	95	
		≥200	23/24	96	
	10-20	<50	2/3	67	
		50-199	11/14	89	
		≥200	1/3	33	
	>20	50-199	3/9	33	
		≥200	1/3	33	
	50-200	<10	<50	8/12	67
50-99			14/17	82	
≥200			3/4	75	
10-20		50-99	2/6	33	
		≥200	3/4	75	
>20		50-99	8/12	67	
		≥200	5/7	71	
>200		<10	50-99	5/11	45
			≥200	7/7	100
	10-20	50-99	1/3	33	
		≥200	3/4	75	
	>20	50-99	1/23	4	
		≥200	12/18	67	

QUESTION N°9

QUELS SONT LES CRITÈRES PERMETTANT DE DÉFINIR QU'UNE TOLÉRANCE IMMUNE :

- A) EST UN SUCCÈS OU UN ÉCHEC?
B) PEUT ÊTRE OU DOIT ÊTRE INTERROMPUE?

Introduction

La définition du succès d'une tolérance immune (ou ITI) a reposé, depuis la description initiale de ce traitement par Brackmann en 1977[117], sur différents critères. Ces derniers combinent l'absence d'inhibiteur détectable, une récupération normale ou pratiquement normale, une demi-vie du FVIII normale ou pratiquement normale, et l'absence de réapparition ultérieure de l'anticorps sous traitement prophylactique, ou de façon plus générale l'absence de réponse anamnesticque après ré-administration de facteur VIII[103].

L'échec a en règle été défini en miroir, et implique que les critères précédents ne soient pas réunis, mais avec des combinaisons variables.

Il n'existe de fait à ce jour aucun consensus basé sur des preuves fortes, sur les critères qui permettent d'affirmer qu'une ITI est un succès ou un échec. Par conséquent, il en va de même en ce qui concerne les critères d'interruption d'une ITI.

Critères de succès

Les critères de succès total les plus utilisés depuis les 5 dernières années et listés ci-dessous sont à évaluer après une période de 72 heures au minimum sans injection de facteur VIII :

- Anticorps indétectable par la méthode Bethesda ;
- Récupération $\geq 66\%$ de la récupération théorique (à définir en fonction de l'âge) ;
- Demi-vie ≥ 6 heures.

Un succès partiel est défini au terme d'une période de traitement comprise entre 12 et 33 mois selon les critères suivants :

- Réduction du titre de l'anticorps à moins de 5 UB,
et/ou récupération $< 66\%$,
et/ou demi-vie < 6 heures.

Ce succès partiel sur le plan biologique doit être accompagné par une réponse clinique aux injections de facteur VIII, celles-ci ne devant pas provoquer de réponse anamnesticque.

Critères de rechute

Une rechute peut être affirmée chez un patient en rémission complète après une ITI sur les critères suivants :

- (1) Inhibiteur positif par la méthode Bethesda ($\geq 0,6$ UB) et récupération $< 66\%$,
et/ou (2) Récupération diminuée à 2 reprises et/ou demi-vie diminuée $< 6h$.

Critères d'échec

Un échec peut être affirmé chez un patient lorsque l'inhibiteur persiste à un titre significatif et qu'il empêche tout traitement d'un accident hémorragique par du facteur VIII, au terme d'une tolérance immune bien conduite et à doses optimales.

La durée maximale de l'ITI au terme de laquelle un échec peut être affirmé est variable et mal définie, comprise selon les études entre 12 et 33 mois, voire plus longue dans certains cas.

Le protocole «Essai international randomisé et contrôlé sur l'induction d'une tolérance immune » (www.itistudy.com) en cours propose la définition suivante de l'échec : réduction de moins de 20%

du titre maximal de l'inhibiteur sous ITI, pendant une période continue de 6 mois, et après les 3 premiers mois de traitement.

Néanmoins, cette définition ne tient pas compte d'une éventuelle efficacité clinique de l'ITI, se traduisant par l'absence d'accident hémorragique en dépit de la persistance d'un inhibiteur à un titre significatif et avec diminution de la demi-vie et de la récupération du FVIII, cette situation pouvant justifier la poursuite de la tolérance immune.

Critères d'interruption

L'arrêt d'une tolérance immune doit être envisagé dans les circonstances suivantes :

- En cas de réactions allergiques graves au facteur VIII.
- En cas d'échec au terme d'une induction de tolérance bien conduite pendant plus de 24 mois. En effet, la médiane de disparition de l'inhibiteur varie de 1 à 24 mois selon les séries publiées, avec une large majorité de patients pour lesquels le succès de l'ITI est total en moins de 12 mois. La probabilité de succès au-delà de 24 mois est donc très faible et cette durée peut raisonnablement être proposée comme maximale.
- En cas de non compliance conduisant à une administration trop irrégulière de FVIII.

Avant arrêt d'une tolérance immune, il est recommandé dans chaque cas de discuter une éventuelle modification du protocole thérapeutique (augmentation des doses de FVIII injecté, modification du rythme des injections, voire changement de produit).

En pratique, il est donc recommandé de ne décider une interruption d'ITI qu'au terme d'une analyse soigneuse du dossier impliquant plusieurs médecins spécialistes de l'hémophilie.

En conclusion,

Compte tenu de l'absence de données comparatives claires concernant la question posée, il peut être proposé d'appliquer les mêmes critères que ceux qui sont utilisés dans le cadre du protocole international randomisé d'induction de tolérance immune (www.itistudy.com).

QUESTION N° 10

QUELLES SONT LES SITUATIONS LORS D'UNE TOLÉRANCE IMMUNE POUVANT JUSTIFIER LE CHOIX D'UN AUTRE FACTEUR VIII ?

Introduction

Le changement de produit lors d'une induction de tolérance immune est une stratégie principalement argumentée par 2 types de données. Les unes sont expérimentales et soutiennent que la réactivité des anticorps anti-FVIII peut varier selon que le concentré de facteur VIII contient ou non du facteur Willebrand. D'autres données sont cliniques et issues principalement d'un centre en Allemagne[133, 134]. Ainsi, les auteurs ont noté que les facteurs VIII recombinants ne permettaient pas d'obtenir une tolérance immune avec la même proportion de succès que celle antérieurement atteinte avec les facteurs VIII d'origine plasmatique (~60% de succès versus ~80-90% initialement). Ce constat explique qu'un changement de type de facteur VIII ait été proposé en cas d'échec de la tolérance immune.

Les hypothèses physiopathologiques émises sont notamment que le facteur Willebrand préviendrait la dégradation du facteur VIII, et masquerait certains épitopes reconnus par l'inhibiteur. De plus, les concentrés de facteur VIII d'origine plasmatique contiendraient des anticorps anti-idiotypiques et des molécules qui pourraient exercer des effets inhibiteurs sur les fonctions immunitaires.

Identification des situations pouvant être à l'origine d'un changement de produit

Un changement de facteur VIII peut être envisagé :

- En cas d'échec (défini selon les critères proposés en réponse à la question précédente) au terme de 12 à 24 mois de traitement bien conduit,
- Si l'anticorps persiste en plateau ou augmente durant 3 mois au minimum et au terme d'au moins 12 mois de traitement bien conduit.

En pratique,

Dans les situations énoncées ci-dessus, et si un FVIII recombinant a été administré sans succès lors d'une tolérance immune, l'utilisation d'un FVIII contenant du facteur Willebrand est possible.

Le seul produit ayant été évalué sur de courtes séries dans ce contexte précis est HAEMATE-P[®], qui est notablement différent de FACTANE[®] mais qui n'a pas d'AMM en France.

Par conséquent, on peut discuter l'utilisation du FACTANE[®] en première intention (dose quotidienne de 50 à 200 UI/kg/j) ou de l'OCTANATE[®], FVIII contenant du facteur Willebrand et disponible en France fin 2005, mais pour lequel l'expérience est très réduite

QUESTION N°11

QUELLES SONT LES ALTERNATIVES THÉRAPEUTIQUES À LA TOLÉRANCE IMMUNE QUI SONT POTENTIELLEMENT UTILES POUR LA PRISE EN CHARGE D'UN PATIENT HÉMOPHILE A AVEC INHIBITEUR ? DANS QUELLES SITUATIONS FAUT-IL LES PRESCRIRE ?

Introduction

Ce texte discute des principales possibilités thérapeutiques restant à disposition après échec d'une tolérance immune. Il est basé sur une analyse de la littérature publiée entre 1992 et 2005. Les propositions les plus récentes résultent, d'une part d'une meilleure compréhension des mécanismes conduisant à l'apparition des inhibiteurs ou expliquant leur mode d'action[137], et d'autre part de données fournies par le traitement de l'hémophilie acquise.

La réponse immune contre le FVIII dépend des lymphocytes T (Ly T)[138]. Ainsi, le changement de classe des immunoglobulines (Ig) par recombinaison génétique est bien démontré, et ces mécanismes dépendent d'interactions entre les Ly T et les Ly B. De même, il est connu que la diminution des Ly T CD4⁺, telle qu'elle est observée dans l'immunodéficience acquise, s'accompagne d'une diminution parallèle du titre d'anticorps anti-FVIII.

Cependant, bien que les modèles murins confirment l'activation des Ly T, l'administration intraveineuse du FVIII permet aussi aux Ly B de la zone marginale de répondre directement en produisant des anticorps (Ac) dirigés contre le FVIII, sans l'aide des Ly T.

Il est donc difficile actuellement de proposer une stratégie immunosuppressive optimale.

Concernant le mode d'action des inhibiteurs anti-FVIII, trois mécanismes majeurs peuvent être retenus. La majorité des inhibiteurs agissent par encombrement stérique en prévenant les interactions physiologiques du FVIII. Ils sont donc dirigés contre différents domaines fonctionnels de la molécule de FVIII. D'autres inhibiteurs sont dirigés contre des épitopes non fonctionnels et sont difficiles à mettre en évidence par les méthodes classiques de détection. Ils pourraient agir soit en diminuant la stabilité de la molécule, soit en accélérant sa clairance *in vivo*. Enfin, la dernière catégorie d'inhibiteurs, plus récemment caractérisée, est celle des anticorps catalytiques qui sont capables directement de dégrader le FVIII[139].

Il convient aussi de rappeler que des anticorps anti-FVIII similaires, en termes de spécificité et d'affinité, à ceux retrouvés chez l'hémophile A ou dans l'hémophilie acquise, peuvent également être détectés dans le plasma de sujets normaux[140]. Ces données soutiennent l'hypothèse selon laquelle le développement d'un inhibiteur pourrait résulter, quel que soit le terrain sous-jacent (hémophile, pathologie auto-immune ou sujet sain), de l'expansion de clones préexistants d'anti-FVIII naturels. Elles expliquent aussi que des approches thérapeutiques similaires puissent être couronnées de succès dans l'hémophile A ou lors d'une hémophilie acquise.

Alternatives thérapeutiques en cas d'échec de la tolérance immune.

Ces alternatives sont essentiellement l'immunoabsorption et l'immunosuppression. Cependant, la recherche fondamentale dans ce domaine laisse entrevoir que de nouvelles modalités thérapeutiques pourront être envisagées dans les prochaines années.

Immunoabsorption

Deux méthodes sont actuellement validées pour éliminer par immunoaffinité les anticorps. Elles utilisent soit la protéine A du staphylocoque (Immunosorba), soit des anticorps de mouton dirigés contre les immunoglobulines humaines (Ig-Therasorb). D'autres colonnes, visant à éliminer plus spécifiquement les anticorps anti-FVIII et utilisant une résine de polystyrène substituée par un groupement sulfonate-L-tyrosyl méthylester qui mime un épitope du FVIII reconnu par les inhibiteurs, sont en développement[141].

Ces méthodes, initialement appliquées au traitement de l'hémophilie acquise, sont aujourd'hui parties intégrantes du protocole thérapeutique dit de Malmö et leur utilisation vise à réduire le titre de l'inhibiteur avant la tolérance immune[142].

Cependant, seules de petites séries de patients traités avec ces techniques d'immunoabsorption ont été décrites.

Freiburghaus *et al.* ont ainsi rapporté en 1998 l'histoire de cinq patients hémophiles A sévères et fort répondeurs dont les pics historiques étaient >300 UB. Associée à une tolérance immune avec administration de doses élevées de FVIII, l'immunoabsorption a permis de traiter avec succès des hémarthroses, une hématurie et une hémorragie viscérale mettant en jeu un pronostic vital immédiat, et de gérer dans deux cas la pose d'un Port-A-Cath[142].

Jansen *et al.* ont aussi décrit en 2001 l'histoire de trois patients hémophiles A sévères et fort répondeurs (titre de l'inhibiteur compris entre 29 à 82 UB). L'immunoabsorption a été associée dans deux cas à une tolérance immune et dans le troisième à des doses élevées de FVIII pour le traitement d'une hémorragie intracérébrale dont l'issue a été favorable[143]. Les auteurs concluent que cette méthode est prometteuse pour le traitement des patients avec un inhibiteur, surtout quand une réduction rapide de son titre est nécessaire.

Cette approche, qui n'est disponible que dans quelques centres, ne peut donc être proposée pour le traitement d'épisodes hémorragiques aigus qu'en cas d'échec des autres thérapeutiques (facteur VIIa ou fractions activées), mais avec un niveau de recommandation qui est faible (2C).

Immunosuppression

L'immunosuppression a également été proposée initialement pour le traitement de l'hémophilie acquise. Quatre méthodes peuvent être envisagées : le cyclophosphamide, la cyclosporine A, les anti-CD20 et les anti-CD154 (CD40 ligand).

- Cyclophosphamide

Le cyclophosphamide est proposé en association avec une immunoabsorption et des immunoglobulines intraveineuses (0,4 g/kg pendant 5 jours) aux doses suivantes : 12 à 15 mg/kg en intraveineux (IV) pendant 2 jours, puis 2 à 3 mg/kg per os (PO) pendant 8 à 10 jours). Ce protocole dit de Malmö a permis d'obtenir 62,5% de succès[144].

Un protocole simplifié sans immunoglobulines a été décrit par Kobrinsky *et al.* en 2004[145]. Le cyclophosphamide a été utilisé par voie IV à la dose 1 à 2,9 g/m² toutes les 3 semaines chez trois patients qui ont tous répondu. L'un des patients a été traité à nouveau selon les mêmes modalités et avec succès dans le contexte d'une rechute de son inhibiteur au terme d'une rémission de 2,8 années.

L'utilisation du cyclophosphamide en deuxième intention après échec d'une ITI n'est pas documentée.

- Cyclosporine A

Les cas publiés dans la littérature ne concernent que l'hémophilie acquise. La cyclosporine A a été dans la majorité des cas ajoutée en deuxième intention en cas d'échec de l'association corticoïdes-cyclophosphamide.

- Anti-CD20

L'anticorps monoclonal anti-CD20, Rituximab, agirait notamment en éliminant les Ly B CD20⁺ par cytotoxicité dépendante des anticorps, impliquant une lyse par le complément et une apoptose.

Aggarwal *et al.* ont récemment publié une synthèse de son utilisation dans le traitement de l'hémophilie acquise[146]. Les résultats analysés concernent 20 patients avec 68% de succès total et 12% de réponse partielle avec arrêt du syndrome hémorragique, soit un taux global de réponse à ce traitement de 80%.

En tenant compte des premiers résultats favorables obtenus dans l'hémophilie acquise et dans un cas d'hémophilie mineure[147], Mathias *et al.* ont utilisé le Rituximab chez deux hémophiles sévères (un A et un B) avec inhibiteur, mais avec une réponse favorable dans un cas seulement[148].

Il n'est donc pas recommandé actuellement d'utiliser le Rituximab dans l'hémophilie sévère avec inhibiteur, et d'autres études sont nécessaires afin de mieux évaluer le rapport bénéfice/risque de ce médicament dans cette indication.

- Anti-CD40 ligand

Le rôle critique de l'interaction CD40 – CD40 ligand (CD40L, CD154) pour l'homéostasie des Ly B et la réponse secondaire au FVIII, a été démontré à l'aide d'un modèle murin[149]. L'interaction CD40 – CD40L intervient aussi dans l'activation et la maturation des lymphocytes B lors du contact

avec un antigène. Cette interaction est essentielle dans le changement isotypique, processus important pour les inhibiteurs anti-FVIII qui sont principalement des IgG₄. Un protocole utilisant un anti-CD40L (hu5c8) a donc été proposé. Il implique des cycles de 4 semaines de traitement avec une administration d'hu5c8 à la dose de 10 mg/kg à J1, suivie 40 à 60 heures plus tard de 100 UI/kg de FVIII. Une réponse anamnestic est recherchée à J12 de chaque cycle. En cas de réponse anamnestic aux trois premiers cycles, la dose de hu5c8 est doublée[150]. En 2000, 4 patients étaient inclus dans le protocole, mais aucun n'avait achevé le traitement.

CD40L est exprimé sur les plaquettes et cette notion pourrait en partie expliquer le risque thrombotique associé à l'administration d'un anticorps anti-CD40L[151, 152]

En attendant que d'autres études soient publiées, il n'est donc pas recommandé actuellement d'utiliser les anti-CD40L chez l'hémophile avec inhibiteur.

Autres approches

Ces méthodes consistent principalement à assurer une prophylaxie des accidents hémorragiques par l'apport de fractions activées. Les autres procédures sont expérimentales et en cours d'évaluation chez l'animal, à l'exception de la greffe hépatique ayant permis dans un cas la disparition de l'inhibiteur.

- Prophylaxie par fractions activées

Lorsque la mise en place d'une induction de tolérance immune est impossible ou lorsque celle-ci s'avère être un échec, un traitement prophylactique par des fractions activées peut être envisagé. Quel que soit le contexte, cette éventualité ne peut concerner que les malades présentant de nombreux épisodes d'hémorragie spontanée et susceptibles de remettre en cause le pronostic fonctionnel. Elle ne se justifie pas pour ceux qui ne développent que rarement des manifestations hémorragiques et qui relèvent alors d'un traitement « à la demande » selon les modalités habituelles.

Il y a peu d'expériences rapportées d'utilisation du FEIBA[®] ou du Novoseven[®] à titre prophylactique. Néanmoins le FEIBA[®] à la dose de 50-100 U/kg tous les 2 à 3 jours peut être utilisé avec une certaine efficacité[153]. Un protocole de prophylaxie par Novoseven[®] est en cours d'évaluation par NovoNordisk.

La possibilité de mener un traitement prophylactique au long cours chez un hémophile avec inhibiteur réduirait les conséquences des hémarthroses répétées et améliorerait le pronostic articulaire.

- Tolérisation par apport endogène de FVIII

Un patient fort répondeur a ainsi bénéficié d'une greffe de foie pour un carcinome hépatocellulaire dans les suites d'une hépatite C. L'immunosuppression post-opératoire a associé le mycophénolate mophétil (1 g toutes les 12 heures), le tacrolimus (1,5 mg toutes les 12 heures) et la prednisone (40 mg/j). Lors du bilan réalisé à J284, le taux de FVIII était normalisé[154].

Ce résultat est en accord avec les données obtenues dans un modèle animal en utilisant la greffe de moelle osseuse après transfert du gène du FVIII par vecteur rétroviral[155].

Une approche similaire de tolérance par thérapie génique, utilisant un vecteur exprimant les domaines A2 et C2 du FVIII fusionnés à un gène d'IgG, a été également évaluée chez la souris[156].

Il s'agit de résultats très préliminaires et qui ne permettent aucune recommandation chez l'homme.

On peut tout juste souligner que la greffe de foie n'est pas contre-indiquée chez un hémophile ayant un inhibiteur.

Blocage de l'activité inhibitrice de l'anticorps anti-FVIII

Un peptide mimant la séquence du FVIII reconnue par l'inhibiteur peut *in vitro* bloquer l'interaction antigène – anticorps et restaurer l'activité du FVIII[157].

Un résultat similaire a été obtenu avec un Ac anti-idiotypique neutralisant le site de l'anticorps inhibiteur[158]. Toutefois, aucune thérapeutique nouvelle et résultant de ces études n'est actuellement disponible.

Recommandations

1. Une immunoabsorption peut être proposée chez un hémophile A fort répondeur en échec de tolérance immune et présentant un syndrome hémorragique sévère résistant au facteur VIIa et/ou aux fractions activées. Ce traitement ne peut néanmoins être proposé qu'au sein ou sous le contrôle d'un centre expérimenté vis à vis de cette procédure. Le niveau de cette recommandation est 2C+.
2. Un traitement immunosuppresseur basé sur l'utilisation du cyclophosphamide n'est pas recommandé chez un hémophile A sévère fort répondeur en échec de tolérance immune.
3. Le rituximab n'est pas recommandé en première intention chez l'hémophile avec inhibiteur tant que des données complémentaires démontrant son efficacité dans cette indication ne sont pas disponibles.

QUESTION N°12

QUEL(S) TRAITEMENT(S) POUR UN ACCIDENT HÉMORRAGIQUE SURVENANT CHEZ UN HÉMOPHILE AVEC INHIBITEUR ET SOUS TOLÉRANCE IMMUNE : FACTEUR VII ACTIVÉ RECOMBINANT OU FEIBA ?

Introduction

Tant qu'une tolérance immune n'est pas acquise chez un hémophile A avec inhibiteur, le risque d'évènements hémorragiques récidivants persiste, et l'utilisation du facteur VII activé recombinant (NovoSeven[®]) ou du complexe prothrombinique activé (FEIBA[®]) doit être discutée pour le traitement de ces accidents. Il faut noter néanmoins que chez un certain nombre de patients en cours de traitement de tolérance immune, le nombre d'accidents hémorragiques est parfois relativement faible malgré un titre d'inhibiteur encore élevé et l'absence ou le très faible taux de facteur VIII circulant après l'injection. Mais d'autres patients continuent à saigner de façon régulière nécessitant un traitement pour les accidents hémorragiques classiques ou graves.

Chez l'hémophile B avec inhibiteur, l'utilisation du FEIBA[®], qui contient une quantité importante de FIX, doit être limitée aux cas d'échecs de traitement par le NovoSeven[®].

Chez l'hémophile A avec inhibiteur, deux situations différentes peuvent être distinguées :

- La première est celle où une ITI n'est pas en cours et durant laquelle ne pas relancer de l'inhibiteur est un objectif majeur, en particulier si l'on prévoit d'initier une tolérance immune.
- La seconde situation, est celle où la tolérance immune est déjà initiée et durant cette période, un certain nombre de mesures visant à éviter de relancer l'inhibiteur ne sont pas nécessairement appropriées.

Chez l'hémophile A avec inhibiteur et sous tolérance immune, le choix entre NovoSeven[®] entre FEIBA[®] pour le traitement d'un accident hémorragique, implique de prendre en compte les 6 points suivants :

- 1) Le traitement d'un accident hémorragique par le FVIII est souvent inefficace lorsque le titre de l'inhibiteur est supérieur à 5 UB, ou du moins la réponse thérapeutique est peu prévisible.
- 2) Lorsque le titre d'anticorps est $\leq 5UB$, une efficacité des concentrés de FVIII est davantage prévisible, mais avec un risque de relance anamnastique.
- 3) Quel que soit le taux de l'inhibiteur, toute modification dans le rythme ou la dose de FVIII administré peut entraîner chez un hémophile sous tolérance immune une augmentation du titre de l'inhibiteur[159].
- 4) Les 2 médicaments ayant une AMM en France pour le traitement des accidents hémorragiques ou la chirurgie chez les hémophiles avec inhibiteurs, sont le Facteur VII activé recombinant (NovoSeven[®], Novo Nordisk) et le complexe prothrombinique activé (FEIBA[®], Baxter). Leur mode d'action hémostatique est différent et sur le plan clinique, le succès, les complications ou l'échec du traitement, dépendent de nombreux paramètres qui ne sont pas tous prévisibles.
- 5) Le FEIBA[®] est un médicament dérivé du plasma, qui contient des traces de FVIII qui peuvent relancer l'inhibiteur chez certains hémophiles A[160-162], mais ce risque est moindre chez un patient sous ITI. Une réponse anamnastique a néanmoins été observée chez un patient recevant une forte dose de facteur VIII quotidienne après traitement d'un accident hémorragique par concentré de complexe prothrombinique activé[159]. Le facteur VII activé recombinant du fait de sa production par génie génétique ne contient ni facteur VIII ni facteur IX, et son administration n'est donc pas associée à un risque de remontée du titre de l'inhibiteur ou à une réponse anamnastique[163].
- 6) Il existe des variations individuelles non prévisibles (sauf expérience antérieure) dans la réponse à ces 2 médicaments.

Traitement d'un accident hémorragique banal (par exemple, hémarthrose)

Si le titre de l'anticorps est faible (≤ 5 UB) au moment de l'accident hémorragique, il est possible d'administrer une dose adaptée de FVIII selon le titre de l'inhibiteur. Cependant la modification de dose ou de rythme d'administration du facteur VIII peut dans un certain nombre de cas entraîner une remontée du titre de l'inhibiteur voire une vraie réponse anamnestic, mais cette évolution n'est pas prévisible. Il est donc recommandé d'avoir recours au facteur VIIa recombinant en première intention pour ces accidents hémorragiques ne mettant pas en jeu le pronostic vital ou fonctionnel.

Si le titre de l'anticorps est > 5 UB, l'administration de FVIII ne doit pas être envisagée, et seuls le NovoSeven[®] ou le FEIBA[®] sont utilisables pour le traitement d'un accident hémorragique.

Selon les données disponibles et relatives à l'efficacité clinique du NovoSeven[®] et du FEIBA[®], et en l'absence d'étude prospective randomisée comparant ces 2 médicaments, il est licite *a priori* de proposer indifféremment l'un ou l'autre en première intention.

Néanmoins, le NovoSeven[®] est recommandé dans la plupart des cas, en raison d'un risque de relance de l'inhibiteur avec le FEIBA[®].

Le FEIBA[®] est une option recommandée en cas d'inefficacité avérée du rFVIIa à traiter un accident hémorragique ou des épisodes antérieurs de saignement. Il est nécessaire au préalable de vérifier que le NovoSeven[®] a été administré suffisamment tôt par rapport au début du saignement [164-166] et avec une posologie suffisante et adaptée, en particulier chez l'enfant[167, 168].

En cas d'utilisation du FEIBA[®], il est souhaitable de contrôler le titre d'inhibiteur 2 à 3 semaines plus tard afin de vérifier l'absence de remontée, cette évolution ayant déjà été observée antérieurement[160-162], mais elle ne concernait dans la série française que des malades traités en dehors d'une ITI[162].

Enfin, les éléments suivants peuvent aussi influencer le choix entre FEIBA[®] et NovoSeven[®]:

- Pour des raisons le plus souvent non identifiées, certains patients répondent favorablement à l'un de ces médicaments et non à l'autre.
- De plus, certains accidents hémorragiques, et notamment muqueux, peuvent répondre favorablement chez un même patient à l'un de ces médicaments et non à l'autre.
- Avec ces deux médicaments, des complications thrombotiques (infarctus du myocarde; thrombose veineuse) ont été rapportées[169-171], mais en l'absence d'étude comparative, il est impossible de savoir si ce risque est identique ou différent avec l'un ou l'autre.

Accident hémorragique grave ou chirurgie

L'efficacité clinique du NovoSeven[®] et du FEIBA[®] est démontrée et semble comparable selon les données de la littérature[4, 161, 162, 168, 172-174], mais ces 2 médicaments n'ont jamais été évalués comparativement dans une étude randomisée. Il est donc difficile de savoir si l'un d'eux est supérieur à l'autre.

Concernant la chirurgie majeure électorale ou en urgence, beaucoup plus de patients ont été traités le plus souvent en dehors d'une ITI par le NovoSeven[®][173, 175-180] que par le FEIBA[®][161, 162, 172, 181, 182], bien que ce dernier soit sur le marché depuis la fin des années 1970 alors que le rFVIIa est disponible depuis 1996 en Europe.

En pratique,

Les recommandations générales suivantes peuvent être émises[183-186] :

- En cas d'accident hémorragique mettant en jeu le pronostic vital ou en cas de chirurgie majeure, le choix du traitement est difficile et doit prendre en compte la situation du patient concerné (titre maximum d'inhibiteur; titre actuel; type d'accident hémorragique ou de chirurgie ; ...).
- Si le titre de l'inhibiteur est bas ou peut-être abaissé par une immunoabsorption sur protéine A (applicable si la chirurgie électorale peut être différée), l'administration de fortes doses de facteur VIII

(calculées en fonction du titre de l'inhibiteur) peut permettre d'obtenir un taux de VIII circulant suffisant avec une correction totale ou partielle du TCA pour une période de 4 à 10 jours.

- Si le titre de l'inhibiteur est bas chez un hémophile connu comme fort répondeur, il ne paraît pas souhaitable d'utiliser le FEIBA[®] en première intention en raison du risque de relance anamnétique de l'inhibiteur en 4 à 10 jours empêchant tout recours ultérieur à du facteur VIII nécessaire en cas de reprise hémorragique à court terme. Le rFVIIa est donc le traitement à privilégier car la priorité est de ne pas relancer l'inhibiteur tout en permettant à tout moment et en urgence l'administration de facteur VIII. Cette recommandation est surtout importante pour les patients traités en dehors d'une ITI.
- Si le titre de l'inhibiteur est élevé (> 10 ou 20 UB), les deux options actuelles sont le NovoSeven[®] et le FEIBA[®]. La relance de l'inhibiteur n'a pas d'importance dans ce cas (le recours à du FVIII étant de toute façon impossible dans ce cas), sauf si une ITI peut être envisagée. Le choix prendra en compte alors la notion éventuelle de bonne réponse ou d'échec de l'un de ces deux produits chez le patient concerné et l'expérience clinique publiée avec ces traitements.
- Si une transfusion de concentrés de globules rouges est nécessaire, il est souhaitable que ceux-ci soient lavés, afin de ne pas apporter de FVIII majorant le risque de relance de l'inhibiteur[187], mais cette recommandation qui est très importante pour les patients traités en dehors d'une ITI peut ne pas être appliquée pour ceux en cours de tolérance immune.
- La dose préconisée de FEIBA[®] est de 75 à 100 U/kg par injection sans dépasser 200 U/kg par jour afin de limiter le risque de thromboses parfois décrites avec des posologies supérieures. Pour un accident hémorragique ou une chirurgie, la dose initiale recommandée est le plus souvent de 75 U/kg. Elle peut être répétée si besoin 2 fois par jour pour un accident hémorragiques modéré ou une chirurgie mineure et 3 fois par jour pour un saignement grave ou une chirurgie importante. Dans les cas les plus sévères et ne répondant pas de façon optimale aux doses plus standards, la posologie peut être majorée à 100 U/kg par injection deux fois par jour durant une courte période.
- Pour le NovoSeven[®], la dose préconisée est de 90 à 120 µg/kg, les injections étant répétées toutes les 2 heures jusqu'à arrêt du saignement ou durant 18 à 24 heures en cas de chirurgie avant l'espacement des injections. Dans certains cas, des doses plus élevées ont été préconisées (> 120 µg/kg jusqu'à 270 µg/kg) pour la ou les premières doses chez l'enfant et l'adulte jeune. Mais cet usage hors AMM du NovoSeven[®] ne se conçoit qu'en cas de récupération basse ou de demie-vie courte du rFVIIa[167, 188] ou afin d'améliorer l'efficacité du traitement si elle est considérée comme insuffisante et avant de décider d'un changement de stratégie[168, 188, 189].
- L'association séquentielle des 2 médicaments, NovoSeven[®] et FEIBA[®], pour le traitement d'un accident hémorragique rebelle, rarement décrite [190], n'a fait l'objet d'aucune étude, et n'est pas recommandée, en raison d'un risque thrombotique non évalué et qui pourrait être significatif. Il est possible par contre, en cas d'inefficacité clinique avérée avec l'un de ces traitements, de recourir à l'autre en respectant un délai d'au moins 2 à 3 heures en cas de relais NovoSeven[®] vers FEIBA[®], et de 6 à 7 heures en cas de relais FEIBA[®] vers NovoSeven[®].
- Il n'existe pas à l'heure actuelle de paramètre biologique courant ayant fait la preuve de son utilité pour apprécier l'efficacité d'un traitement par le NovoSeven[®] ou le FEIBA[®], et certains tests globaux d'hémostase (thromboélastographie, mesure de la génération de thrombine) sont en cours d'évaluation.

QUESTION N°13

HÉMOPHILIE B ET INHIBITEURS ANTI-FIX :

A) LE RISQUE D'INHIBITEUR DIFFÈRE-T-IL SELON LE PATIENT, CERTAINES SITUATIONS MÉDICALES, LE TYPE DE FACTEUR IX UTILISÉ, OU SES MODALITÉS D'ADMINISTRATION ?

B) LA TOLÉRANCE IMMUNE DOIT-ELLE ÊTRE CONDUITE SELON LES MÊMES MODALITÉS QUE CELLES QUI SONT UTILISÉES CHEZ LES HÉMOPHILES A AVEC INHIBITEURS ANTI-FVIII ?

Introduction

L'hémophilie B est plus rare que l'hémophilie A et le risque d'inhibiteur étant plus faible, l'expérience acquise vis-à-vis de cette complication est réduite avec un faible nombre de patients étudiés.

Ce constat explique aujourd'hui, que les données relatives aux inhibiteurs anti-FIX soient moins nombreuses et que les recommandations établies pour l'hémophilie A soient pour l'essentiel appliquées à l'hémophile B avec anticorps.

Sur le plan clinique, les inhibiteurs anti-FIX peuvent être associés à des accidents allergiques sévères après administration de concentrés de facteur IX et parfois compliqués d'un syndrome néphrotique grave, ce risque devant être pris en compte lors de la prise en charge médicale des malades.

I. Le risque d'inhibiteur diffère-t-il selon le patient, certaines situations médicales, le type de facteur IX utilisé, ou ses modalités d'administration ?

Le risque d'inhibiteur dans l'hémophilie B est moins élevé que dans l'hémophilie A. Il concerne selon les études 1,5 à 10% des formes sévères, sauf dans la population suédoise pour laquelle la proportion de nouveaux cas d'inhibiteurs a été évaluée à 23%[191].

L'anomalie génétique a une importance reconnue. En effet, l'apparition d'un inhibiteur est souvent associée à une large délétion génique (risque estimé entre 25 et 50%), ou à une mutation non-sens aboutissant à un codon stop (risque compris entre 5 et 25%)[192]. L'absence de molécule de FIX décelable (FIXAg indétectable) semble donc être un élément favorisant[193-195].

D. Lillicrap recommande par conséquent une identification précoce de l'anomalie génétique chez tout nouvel hémophile B[192]. Si une large délétion ou une mutation non-sens est mise en évidence, il préconise aussi de discuter une hospitalisation lors des 15-25 premiers JCPA, ce qui permet de traiter de façon optimale une éventuelle réaction anaphylactique. Cette complication sévère est de fait une manifestation spécifique aux inhibiteurs anti-FIX[196]. Elle peut révéler le développement d'un inhibiteur et survenir quelle que soit l'origine, plasmatique ou recombinante du FIX injecté.

Une influence de l'origine ethnique sur le risque d'inhibiteur anti-FIX n'est pas évoquée dans la littérature. Le jeune âge ne semble pas être un facteur prédisposant. Toutefois, le faible nombre de cas publiés ne permet pas de mettre en évidence un risque différent selon ces paramètres.

En tenant compte des quelques données à ce jour disponibles, des situations médicales particulières telles que les hémorragies graves ou la chirurgie, ne sont pas identifiées comme modifiant le risque d'inhibiteur anti-FIX.

L'influence du type de facteur IX utilisé ne peut être qu'imparfaitement évaluée selon les données fournies par les études publiées, lesquelles ont concerné :

- deux facteurs IX d'origine plasmatique : le facteur IX HPSD (LFB)[194] et précurseur du Betafact[®] actuellement utilisé, et un facteur IX immunopurifié, Mononine[®] (Aventis Behring)[197, 198],
- un facteur IX recombinant, le Benefix[®] (Wyeth)[195, 199].

La proportion de nouveaux cas d'inhibiteurs anti-FIX évaluée dans ces études varie entre 3 et 7 % et ne semble en effet pas différente d'un produit à l'autre.

La variabilité interindividuelle importante du taux de récupération du F IX injecté, dépendante de l'âge d'une part, et du type de médicament administré d'autre part, n'est pas associée à une différence perceptible du risque d'inhibiteur.

Les modalités d'administration du facteur IX (bolus ou perfusion continue) ne semblent pas influencer le risque d'inhibiteur[195]. Il faut souligner toutefois que dans une étude, un inhibiteur est apparu chez un patient traité par le Benefix[®] administré en IV continu, ce malade ayant reçu antérieurement du facteur IX par voie sous-cutanée[200].

En pratique, et comme pour l'hémophile A, les données actuelles sont insuffisantes pour permettre une recommandation claire quant au type de FIX (recombinant ou d'origine plasmatique) devant être prescrit en 1^{ère} intention chez un hémophile B sévère non préalablement traité (PUP).

Un seul facteur IX recombinant (BENEFIX[®]) est disponible en Europe et son efficacité est parfois moindre que celle d'un FIX d'origine plasmatique, avec la nécessité d'administrer des doses plus élevées. Toutefois les données disponibles avec ce FIX étant insuffisantes chez l'enfant de moins de 6 ans, il ne peut être utilisé, selon l'AMM, dans cette population.

II. La tolérance immune doit-elle être conduite selon les mêmes modalités que celles utilisées chez les hémophiles A avec anti-FVIII ?

Selon les recommandations émises au Royaume-Uni, les hémophiles B avec inhibiteurs doivent être pris en charge et traités de la même façon que les hémophiles A[103].

Trois registres ont inclus des hémophiles B traités par tolérance immune, l'IITR[119], le NAITR[123, 124, 201] et le GITR[127, 202].

Chez ces patients, les doses de facteur IX utilisées ont été les mêmes que celles de FVIII chez les hémophiles A.

Toutefois, la réponse à l'ITI apparait moins bonne que dans l'hémophilie A[203], et la décision d'un tel traitement doit donc être argumentée.

De plus, l'administration de facteur IX lors d'une ITI peut être compliquée par des réactions anaphylactiques associées parfois à des manifestations thrombotiques ou à un syndrome néphrotique[124, 196, 204]. Ce dernier survient avec un délai médian de 9 mois (extrêmes : 8-36 mois) et est associé à un taux d'échec de l'ITI plus élevé[205].

Par conséquent, la décision d'initier une tolérance immune chez un hémophile B doit être argumentée dans chaque cas[184, 202, 206].

L'utilisation d'un protocole de tolérance immune avec de fortes doses de FIX, associé à une immuno-adsorption de l'anticorps si le titre initial est > 10 UB, à des immunoglobulines IV et à du cyclophosphamide (protocole type Malmö), permettrait une meilleure efficacité de l'ITI et de réduire le risque de syndrome néphrotique[202, 207].

Au total, les recommandations qui peuvent être émises sont cependant identiques dans l'hémophilie A et B :

- Une tolérance immune doit être conduite en concertation avec un Centre Régional de Traitement de l'Hémophilie (Grade 1C+)[103], au terme d'une évaluation préalable soigneuse du rapport bénéfice/risque
- Tout patient débutant une ITI devrait être inclus dans une étude randomisée pour laquelle il est éligible, ou dans un registre national ou international (Grade 1C+)[103, 206].
- Une information précise doit être délivrée au patient ou à ses parents ; il est en effet important de s'assurer de l'adhésion du patient ou de sa famille au protocole de traitement proposé et un consentement signé est souhaitable (Grade 1C).
- L'ITI doit être débutée dès que possible, le diagnostic d'inhibiteur étant confirmé (recommandation grade 1C), et les posologies de facteur IX seront définies selon les mêmes modalités que celles proposées pour l'hémophile A.

- Le centre de traitement doit avoir la maîtrise du traitement des accidents hémorragiques et la pose d'un accès veineux de type site implantable est préférable (grade B) notamment si un régime "fortes doses" est proposé.
- En cas de complications hémorragiques, le Novoseven[®] est recommandé en première intention. Le FEIBA[®] étant associé à un risque de relance de l'inhibiteur chez l'hémophile B, est à réserver aux cas d'échec du Novoseven[®].
- Il est recommandé que l'ITI soit initiée en milieu hospitalier afin de prévenir et de traiter d'éventuelles réactions anaphylactiques. En cas d'antécédent allergique, des mesures spécifiques préventives sont préconisées.
- Le protocole dit « de Malmö », associant notamment du cyclophosphamide et des immunoglobulines polyvalentes n'est à envisager qu'au terme d'une discussion préalable du dossier avec plusieurs médecins spécialistes de l'hémophilie.
- Les modalités de surveillance biologique et les critères de succès sont les mêmes que pour l'hémophilie A. La seule différence concerne la recherche et le titrage de l'inhibiteur, avec un temps d'incubation du mélange plasma normal + plasma testé qui n'est que de 30 minutes à 37° au lieu de 2 heures.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le rapport de synthèse présenté dans ce document est le fruit du travail collaboratif réalisé par les membres du groupe d'experts, réunis à l'initiative de l'Afssaps, dont la mission était d'établir une synthèse des données aujourd'hui disponibles sur le problème spécifique du développement des inhibiteurs dans l'hémophilie et dans la mesure du possible, d'établir des recommandations vis-à-vis du diagnostic et du traitement de cette complication, ce dernier reposant essentiellement sur la mise en œuvre d'une tolérance immune. Par conséquent, ce texte présente, non seulement une synthèse des données relatives aux inhibiteurs développés chez les hémophiles, mais exprime aussi les certitudes et incertitudes relatives à la prévention, au dépistage, et au traitement de cette complication chez les malades traités. Les conclusions, recommandations et perspectives dégagées tout au long de ce rapport reflètent ainsi la position collégiale de la communauté scientifique et médicale française impliquée dans le domaine du traitement de l'hémophilie, en matière de prise en charge et de stratégies thérapeutiques à offrir aux patients concernés.

Les travaux et réflexions menés par le groupe d'experts ont permis de dégager certaines orientations, notamment en matière d'études et de définition de protocoles qui seraient à mettre en place, afin d'améliorer la compréhension de la problématique « Inhibiteurs et Hémophilie » et la prise en charge des patients concernés. Sont résumées ci-après, les principales perspectives et argumentaires afférents dégagés au décours de l'étude des treize questions soulevées.

- Les travaux de recherche préclinique actuellement en cours permettront probablement de répondre à un certain nombre de questions. L'effet du vWF pourra être très prochainement étudié à l'aide de modèles animaux permettant une évaluation de la réponse immunitaire au niveau clonal. De même, le rôle du polymorphisme du FVIII dans le contrôle de la réponse immunitaire anti-FVIII devrait être rapidement définie. L'identification précise des épitopes reconnus par les lymphocytes T et l'évolution de la réponse immunitaire après administration de FVIII afin d'induire une tolérance immunitaire périphérique devrait apporter des renseignements précieux sur les mécanismes expliquant l'immunogénicité du FVIII.
- A ce jour, peu de données sont disponibles sur la relation qui pourrait exister entre les modalités d'administration des facteurs anti-hémophiliques et l'apparition d'inhibiteurs. Le recueil à long terme d'informations sur l'administration par perfusion continue, mais également le traitement en prophylaxie, s'avère indispensable. D'autre part, la communauté scientifique est dans l'attente des résultats de deux études évaluant l'efficacité du Novoseven[®] et du Feiba[®], pour la prophylaxie des accidents hémorragiques.
- Comme précisé dans le rapport en réponse aux questions 5 et 6, il n'existe dans la littérature aucune étude ayant comparé les FVIII recombinants à ceux d'origine plasmatique, aussi bien chez les PTPs que chez les PUPs. Par ailleurs, il n'est pas possible de réaliser une méta-analyse des différents essais thérapeutiques ou des études de cohortes historiques ou prospectives disponibles, du fait de l'hétérogénéité des protocoles utilisés. Néanmoins, il pourrait y avoir plus d'inhibiteurs chez les hémophiles PUPs traités par un FVIII recombinant comparativement à ceux ayant reçu certains FVIII plasmatiques. À ce titre, les résultats d'une étude française publiée récemment (Goudemand et al. Blood. 2006; 107 : 46-51) sont en faveur d'un risque d'inhibiteur plus élevé chez les patients traités par un FVIII recombinant. Toutefois, seule une étude prospective, randomisée, avec une méthodologie rigoureuse et donc difficile à mettre en œuvre, ou à défaut un suivi exhaustif et renforcé d'une très large cohorte de PUPs, permettrait peut-être de conclure avec certitude que le risque d'inhibiteur est différent avec les FVIII plasmatiques et recombinants.
- En ce qui concerne les PTPs, compte-tenu de l'absence d'étude dans cette population avec les FVIII plasmatiques et des faibles effectifs de patients évalués dans les études prospectives réalisées avec les produits recombinants actuellement sur le marché, il est impossible de répondre rigoureusement à la question relative à un risque d'inhibiteur (événement estimé relativement rare

dans cette population) différent selon l'origine plasmatique ou recombinante du FVIII administré. C'est pourquoi dans ce contexte, il est indispensable de maintenir une pharmacovigilance active chez les PTPs traités avec les nouveaux produits. À ce titre, il convient de rappeler à tous les praticiens responsables de patients hémophiles que tout inhibiteur nouveau, ainsi que tout effet secondaire, doit systématiquement être déclaré au Centre Régional de Pharmacovigilance ainsi qu'au Réseau FranceCoag.

- En ce qui concerne les PUPs, il s'est avéré impossible d'émettre des recommandations fortes quant au type de FVIII (recombinant ou d'origine plasmatique) devant être prescrit en première intention. Néanmoins, le groupe d'experts a considéré qu'il est possible d'administrer en première intention un facteur VIII recombinant si l'on privilégie la sécurité sur le plan infectieux. Si la réduction du risque de survenue d'un inhibiteur est jugée comme prioritaire, il est possible d'administrer en première intention un FVIII d'origine plasmatique. Les arguments du choix doivent être expliqués au patient ou à la famille et la décision prise en accord avec ceux-ci.

De fait, seule une étude prospective, multicentrique et randomisée permettrait de savoir si un FVIII recombinant est plus immunogène qu'un FVIII d'origine plasmatique chez les PUPs. Les pré-requis d'une telle étude sont importants et difficiles à satisfaire, avec notamment la difficulté d'obtenir l'adhésion, non seulement des médecins impliqués dans le suivi des hémophiles, mais aussi des patients eux-mêmes ou de leurs familles et des laboratoires pharmaceutiques.

- Il apparaît donc nécessaire, afin de mieux identifier le potentiel immunogène d'un produit par rapport à un autre, de développer des études "post-commercialisation" en incluant un très grand nombre de patients, en différenciant PTPs, MTPs et PUPs, et en assurant un recueil comparable des données. Dans cette optique, le Blood Products Working Party (Groupe européen de recommandations cliniques en matière de médicaments dérivés du sang et recombinants de l'Agence européenne du médicament - EMEA -) a initié la révision des documents intitulés « Notes for Guidance for the clinical evaluation of human plasma-derived and recombinant FVIII and FIX products » and « Core SPC for human plasma-derived and recombinant FVIII and FIX products », en insistant tout particulièrement sur la nécessaire harmonisation des études "post-commercialisation", afin d'obtenir des données suffisamment informatives pour être interprétables.
- Les points suivants doivent également être résolus :
 - La définition actuelle de l'hémophilie sévère (FVIII < 1%) doit être respectée ce qui n'est pas toujours le cas, même pour les études les plus récentes, et ce malgré les recommandations de l'ISTH.
 - La définition d'un inhibiteur transitoire doit être précisée. Un inhibiteur de titre faible (< 5 UB) ne doit être pris en compte que dans le cas où le patient a continué à être traité à la demande, une tolérance immune précoce voire même une prophylaxie pouvant empêcher l'apparition d'un anticorps de titre élevé.
- Au niveau national, il est essentiel de poursuivre la collaboration mise en place entre les centres d'hémophilie, ayant permis d'une part l'établissement de recueils historiques et prospectifs sur les FVIII plasmatiques ou recombinants utilisés en France, et d'autre part, de mettre en place le suivi d'une large cohorte d'hémophiles (Suivi National des Hémophiles ou SNH et Réseau FranceCoag). L'inclusion de tous les enfants PUPs dans la cohorte suivie par le Réseau FranceCoag apparaît donc impérative.

Enfin, l'actualisation régulière des conclusions et recommandations émises dans ce rapport, notamment au regard des données nouvelles de la littérature, est apparue indispensable aux membres du groupe d'experts, mais également à l'ensemble des partenaires impliqués dans le traitement de l'hémophilie (associations de patients, prescripteurs, institutions et laboratoires pharmaceutiques), qui ont pu s'exprimer sur le sujet lors de la Réunion publique du 29/06/2005 de restitution des travaux.

LISTE DES PARTICIPANTS

Liste des experts rédacteurs

Edith Fressinaud, Nantes
Jenny Goudemand, Lille
Yves Gruel, Tours (Coordonateur)
Claude Guérois, Tours
Thierry Lambert, Paris
Yves Laurian, Paris
Claude Négrier, Lyon
Benoît Polack, Grenoble
Chantal Rothschild, Paris
Jean-Marie Saint-Rémy, Louvain (Belgique)
Pierre Sié, Toulouse

Liste des experts ayant participé aux réunions de travail ou à la relecture critique du texte

Michel Biour, Paris
Annie Borel-Derlon, Caen
Thierry Calvez, Paris
Hervé Chambost, Marseille
Jacques Cohen, Reims
Ludovic Drouet, Paris
Philippe De Moerloose, Genève (Suisse)
Dominique Lasne, Paris
Agnès Lillo-Le Louët, Paris
Hervé Le Louët, Paris
Claire Pouplard, Tours
Kathelijne Peerlinck, Louvain (Belgique)
Georges Rivard, Montréal (Canada)
Jean-François Schved, Montpellier
Yvette Sultan, Paris
Sylvie Villard, Montpellier

Liste des membres Afssaps

Contributeurs scientifiques

Marie-Christine Annequin
Peggy Chocarne
Pierre Démolis
Nathalie Grené-Lerouge
Carmen Kreft-Jais
Christelle Ratignier
Isabelle Sainte-Marie
Jean-Hugues Trouvin
Pierrette Zorzi-Morre

Communication et Publication

Henriette Chaibriant
Ilhem Ouertani
Isabelle Vernhes

ABREVIATIONS

Ac : Anticorps

ACCP : American College of Chest Physicians

AFSSaPS : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

BHK: Baby Hamster Kidney cell (cellules de rein de hamster nouveau né)

CED : Cumulative Exposure Days

CHO : Chinese Hamster Ovary cell (cellules d'ovaire de hamster chinois)

CV : Coefficient de Variation

DDAVP : 1-Déamino-8-D-Arginine Vasopressine ou desmopressine

ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

FVIII : Facteur VIII

FVIII :c: FVIII coagulant

FIX : Facteur IX

FXa : Facteur X activé

fr/FR : faible/fort répondeur

GITR : German Immune Tolerance Registry

HAMSTeRS : Haemophilia A Mutation, Structure, Test and Ressource Site
(<http://europium.csc.mrc.ac.uk>)

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

IC : Intervalle de Confiance

Ig : Immunoglobuline

IITR : International Immune Tolerance Registry

ISTH: International Society on Thrombosis and Haemostasis

ITI : Induction de la Tolérance Immune

IV : Intraveineuse

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

LFB : Laboratoire Français du Fractionnement et des Biotechnologies

Ly : Lymphocytes

MDS : Médicaments Dérivés du Sang

MTPs: Minimally Treated Patients

NAITR: North American Immune Tolerance Registry

pFVIII : Facteur VIII d'origine plasmatique

PSL: Produits Sanguins Labiles

PTPs : Previously Treated Patients (patients déjà traités)

PUPs : Previously Untreated Patients (patients non préalablement traités)

rFVIIa : Facteur VII activé recombinant

rFVIII : Facteur VIII recombinant

RR : Risque Relatif

SNH : Suivi National des Hémophiles

SSC: Scientific and Standardization Committee

TCA: Temps de Céphaline Activé

UB: Unité Bethesda

UI: Unités Internationales

UKHCDO: United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organization

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VHC : Virus de l'Hépatite C

vWF : von Willebrand factor (facteur Willebrand)

GLOSSAIRE

Degrés de sévérité de l'hémophilie A :

- Hémophile A sévère : FVIII < 1% ou < 2 %
- Hémophilie A modérée/mineure : FVIII compris entre 2 à 30 %

Définition des patients :

- PUPs : patients non encore traités par FVIII et n'ayant pas reçu de concentrés érythrocytaires avant la première injection de facteur VIII.
- PTPs : patients déjà traités et avec un nombre de journées cumulées en présence de l'antigène (JCPA ou CED pour les anglo-saxons) supérieur à 100 ou 150[57].
- MTPs : patients très peu traités avant passage au nouveau produit faisant l'objet de l'étude (faible nombre de CED, mais pas de définition reconnue en terme de nombre maximal de CED).

Classification des inhibiteurs anti FVIII :

- Inhibiteur positif : $\geq 0,6$ UB
- Inhibiteur " fort répondeur " : > 5 UB[78] à n'importe quel moment dans la vie du patient
- Inhibiteur " faible répondeur " : ≤ 5 UB
- Inhibiteurs transitoires : il n'y a pas de définition consensuelle, mais le plus souvent inhibiteurs de titre bas, pouvant dépasser parfois 5 UB, qui disparaissent " spontanément " après un certain délai, sans modification du schéma thérapeutique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. Guyatt G., Schunemann HJ., Cook D., Jaeschke R., Pauker S. Applying the grades of recommendation for antithrombotic and thrombolytic therapy: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy, *Chest*. 126 (2004), 179S-187S.
- [2]. Darby SC., Keeling DM., Spooner RJ., Wan Kan S., Giangrande PL., Collins PW., Hill FG., Hay CR. The incidence of factor VIII and factor IX inhibitors in the hemophilia population of the UK and their effect on subsequent mortality, 1977-99, *J Thromb Haemost*. 2 (2004), 1047-1054.
- [3]. Gringeri A., Mantovani LG., Scalone L., Mannucci PM. Cost of care and quality of life for patients with hemophilia complicated by inhibitors: the COCIS Study Group, *Blood*. 102 (2003), 2358-2363.
- [4]. Key NS., Aledort LM., Beardsley D., Cooper HA., Davignon G., Ewenstein BM., Gilchrist GS., Gill JC., Glader B., Hoots WK., Kisker CT., Lusher JM., Rosenfield CG., Shapiro AD., Smith H., Taft E. Home treatment of mild to moderate bleeding episodes using recombinant factor VIIa (Novoseven) in haemophiliacs with inhibitors, *Thromb Haemost*. 80 (1998), 912-918.
- [5]. Gautier P., D'Alche-Gautier MJ., Coatmelec B., Marques-Verdier A., Bertrand MA., Dieval J., Berthier AM. Cost related to replacement therapy during hospitalization in haemophiliacs with or without inhibitors: experience of six French haemophilia centres, *Haemophilia*. 8 (2002), 674-679.
- [6]. Remo E., Arranz P., R M. Psychosocial impact of inhibitors on haemophilia patients' quality of life. In: EC R-M, CA L, editors. *Inhibitors in Patients with Haemophilia*. Oxford; 2002. p. 187-192.
- [7]. Goudemand J. Hemophilia. Treatment of patients with inhibitors: cost issues, *Haemophilia*. 5 (1999), 397-401.
- [8]. Bohn RL., Aledort LM., Putnam KG., Ewenstein BM., Mogun H., Avorn J. The economic impact of factor VIII inhibitors in patients with haemophilia, *Haemophilia*. 10 (2004), 63-68.
- [9]. Chang H., Sher GD., Blanchette VS., Teitel JM. The impact of inhibitors on the cost of clotting factor replacement therapy in Haemophilia A in Canada, *Haemophilia*. 5 (1999), 247-252.
- [10]. Lacey L. Economic impact of treating inhibitor patients, *Pathophysiol Haemost Thromb*. 32 Suppl 1 (2002), 29-32.
- [11]. Knight C., Paisley S., Wight J., Jones ML. Economic modelling of different treatment strategies for haemophilia A with high-responding inhibitors, *Haemophilia*. 9 (2003), 521-540.
- [12]. Gilles JG., Arnout J., Vermynen J., Saint-Remy JM. Anti-factor VIII antibodies of hemophiliac patients are frequently directed towards nonfunctional determinants and do not exhibit isotypic restriction, *Blood*. 82 (1993), 2452-2461.
- [13]. Howard T., Machiah D., TT T., Viel K., Channell C., Soria JM., Ameri A., Iyer R., Brown C., Doering C., Almasy L., Watts R., Davis J., Abshire T. African-Americans express multiple haplotypic forms of the wildtype Factor VIII (FVIII) protein: a possible role for pharmacogenetics in FVIII inhibitor development?, *Blood*. 104 (2004), 113a.
- [14]. Jacquemin M., Vantomme V., Buhot C., Lavend'homme R., Burny W., Demotte N., Chaux P., Peerlinck K., Vermynen J., Maillere B., van der Bruggen P., Saint-Remy JM. CD4+ T-cell clones specific for wild-type factor VIII: a molecular mechanism responsible for a higher incidence of inhibitor formation in mild/moderate hemophilia A, *Blood*. 101 (2003), 1351-1358.
- [15]. Miao HZ., Sirachainan N., Palmer L., Kucab P., Cunningham MA., Kaufman RJ., Pipe SW. Bioengineering of coagulation factor VIII for improved secretion, *Blood*. 103 (2004), 3412-3419.
- [16]. Hironaka T., Furukawa K., Esmon PC., Fournel MA., Sawada S., Kato M., Minaga T., Kobata A. Comparative study of the sugar chains of factor VIII purified from human plasma and from the culture media of recombinant baby hamster kidney cells, *J Biol Chem*. 267 (1992), 8012-8020.
- [17]. Barrowcliffe TW., Kembell-Cook G., Tubbs JE. Inhibitor development and activated factor VIII in concentrates, *Thromb Haemost*. 70 (1993), 1065-1066.
- [18]. Peerlinck K., Arnout J., Di Giambattista M., Gilles JG., Laub R., Jacquemin M., Saint-Remy JM., Vermynen J. Factor VIII inhibitors in previously treated haemophilia A patients with a double virus-inactivated plasma derived factor VIII concentrate, *Thromb Haemost*. 77 (1997), 80-86.
- [19]. Lin Y., Yang X., Chevrier MC., Craven S., Barrowcliffe TW., Lemieux R., Ofosu FA. Relationships between factor VIII:Ag and factor VIII in recombinant and plasma-derived factor VIII

concentrates, *Haemophilia*. 10 (2004), 459-469.

[20]. Wadhwa M., Dilger P., Tubbs J., Mire-Sluis A., Barrowcliffe T., Thorpe R. Identification of transforming growth factor-beta as a contaminant in factor VIII concentrates: a possible link with immunosuppressive effects in hemophiliacs, *Blood*. 84 (1994), 2021-2030.

[21]. Hodge G., Flower R., Han P. Effect of factor VIII concentrate on leucocyte cytokine production: characterization of TGF-beta as an immunomodulatory component in plasma-derived factor VIII concentrate, *Br J Haematol*. 106 (1999), 784-791.

[22]. Suzuki T., Arai M., Amano K., Kagawa K., Fukutake K. Factor VIII inhibitor antibodies with C2 domain specificity are less inhibitory to factor VIII complexed with von Willebrand factor, *Thromb Haemost*. 76 (1996), 749-754.

[23]. Gilles JG., Lavend'homme R., Peerlinck K., Jacquemin MG., Hoylaerts M., Jorieux S., Mazurier C., Vermeylen J., Saint-Remy JM. Some factor VIII (FVIII) inhibitors recognise a FVIII epitope(s) that is present only on FVIII-vWF complexes, *Thromb Haemost*. 82 (1999), 40-45.

[24]. Behrmann M., Pasi J., Saint-Remy JM., Kotitschke R., Kloft M. Von Willebrand factor modulates factor VIII immunogenicity: comparative study of different factor VIII concentrates in a haemophilia A mouse model, *Thromb Haemost*. 88 (2002), 221-229.

[25]. Oldenburg J., Schroder J., Hermann Brackmann H., Muller-Reible C., Schwaab R., Tuddenham E. Environmental and genetic factors influencing inhibitor development, *Semin Hematol*. 41 (2004), 82-88.

[26]. Goodeve AC., Williams I., Bray GL., Peake IR. Relationship between factor VIII mutation type and inhibitor development in a cohort of previously untreated patients treated with recombinant factor VIII (Recombinate). Recombinate PUP Study Group, *Thromb Haemost*. 83 (2000), 844-848.

[27]. Lakich D., Kazazian HH, Jr., Antonarakis SE., Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A, *Nat Genet*. 5 (1993), 236-241.

[28]. Goodeve A. The incidence of inhibitor development according to specific mutations--and treatment?, *Blood Coagul Fibrinolysis*. 14 Suppl 1 (2003), S17-21.

[29]. Hay CR. Factor VIII inhibitors in mild and moderate-severity haemophilia A, *Haemophilia*. 4 (1998), 558-563.

[30]. Oldenburg J., Picard JK., Schwaab R., Brackmann HH., Tuddenham EG., Simpson E. HLA genotype of patients with severe haemophilia A due to intron 22 inversion with and without inhibitors of factor VIII, *Thromb Haemost*. 77 (1997), 238-242.

[31]. Hay CR., Ollier W., Pepper L., Cumming A., Keeney S., Goodeve AC., Colvin BT., Hill FG., Preston FE., Peake IR. HLA class II profile: a weak determinant of factor VIII inhibitor development in severe haemophilia A. UKHCDO Inhibitor Working Party, *Thromb Haemost*. 77 (1997), 234-237.

[32]. Bril WS., MacLean PE., Kaijen PH., van den Brink EN., Lardy NM., Fijnvandraat K., Peters M., Voorberg J. HLA class II genotype and factor VIII inhibitors in mild haemophilia A patients with an Arg593 to Cys mutation, *Haemophilia*. 10 (2004), 509-514.

[33]. Chicz RM., Urban RG., Gorga JC., Vignali DA., Lane WS., Strominger JL. Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles, *J Exp Med*. 178 (1993), 27-47.

[34]. Gill FM. The natural history of factor VIII inhibitors in patients with hemophilia A, *Prog Clin Biol Res*. 150 (1984), 19-29.

[35]. Addiego J., Kasper C., Abildgaard C., Lusher J., Hilgartner M., Glader B., Aldort L., Hurst D., Bray G. Increased frequency of inhibitors in African American haemophilia A patients, *Blood*. 84 (1994), 239a.

[36]. Bray GL., Gomperts ED., Courter S., Gruppo R., Gordon EM., Manco-Johnson M., Shapiro A., Scheibel E., White G, 3rd., Lee M. A multicenter study of recombinant factor VIII (recombinate): safety, efficacy, and inhibitor risk in previously untreated patients with hemophilia A. The Recombinate Study Group, *Blood*. 83 (1994), 2428-2435.

[37]. Lusher JM., Arkin S., Abildgaard CF., Schwartz RS. Recombinant factor VIII for the treatment of previously untreated patients with hemophilia A. Safety, efficacy, and development of inhibitors. Kogenate Previously Untreated Patient Study Group, *N Engl J Med*. 328 (1993), 453-459.

[38]. Scharrer I., Bray GL., Neutzling O. Incidence of inhibitors in haemophilia A patients--a review of recent studies of recombinant and plasma-derived factor VIII concentrates, *Haemophilia*. 5 (1999), 145-154.

- [39]. Aledort LM., Dimichele DM. Inhibitors occur more frequently in African-American and Latino haemophiliacs, *Haemophilia*. 4 (1998), 68.
- [40]. Goudemand J., Rothschild C., Demiguel V., Lambert T., Calvez T. The type of products (plasmatic vs recombinant) may exert an influence on FVIII inhibitor incidence in previously untreated severe hemophilia A patients (PUPs), *Blood*. 102 (2003), Abstract # 2954.
- [41]. Frommel D., Allain JP. Genetic predisposition to develop factor VIII antibody in classic hemophilia, *Clin Immunol Immunopathol*. 8 (1977), 34-38.
- [42]. White GC, 2nd., McMillan CW., Blatt PM., Roberts HR. Factor VIII inhibitors: a clinical overview, *Am J Hematol*. 13 (1982), 335-342.
- [43]. Astermark J., Berntorp E., White GC., Kroner BL. The Malmo International Brother Study (MIBS): further support for genetic predisposition to inhibitor development in hemophilia patients, *Haemophilia*. 7 (2001), 267-272.
- [44]. Lorenzo JL., Lopez A., Altisent C., Aznar JA. Incidence of factor VIII inhibitors in severe haemophilia: the importance of patient age, *Br J Haematol*. 113 (2001), 600-603.
- [45]. van der Bom JG., Mauser-Bunschoten EP., Fischer K., van den Berg HM. Age at first treatment and immune tolerance to factor VIII in severe hemophilia, *Thromb Haemost*. 89 (2003), 475-479.
- [46]. Sharathkumar A., Lillicrap D., Blanchette VS., Kern M., Leggo J., Stain AM., Brooker L., Carcao MD. Intensive exposure to factor VIII is a risk factor for inhibitor development in mild hemophilia A, *J Thromb Haemost*. 1 (2003), 1228-1236.
- [47]. Baglin T., Beacham E. Is a change of factor VIII product a risk factor for the development of a factor VIII inhibitor?, *Thromb Haemost*. 80 (1998), 1036-1037.
- [48]. Yee TT., Lee CA. Is a change of factor VIII product a risk factor for the development of a factor VIII inhibitor?, *Thromb Haemost*. 81 (1999), 852.
- [49]. van den Berg HM., Roosendaal G., Voorberg J., Mauser-Bunschoten EP. Inhibitor development in a multitransfused patient with severe haemophilia A, *Thromb Haemost*. 82 (1999), 151-152.
- [50]. Koestenberger M., Raith W., Muntean W. High titre inhibitor after continuous factor VIII administration for surgery in a young infant, *Haemophilia*. 6 (2000), 120.
- [51]. Ghosh K., Jijina F., Shetty S., Madkaikar M., Mohanty D. First-time development of FVIII inhibitor in haemophilia patients during the postoperative period, *Haemophilia*. 8 (2002), 776-780.
- [52]. Grzelak I., Olszewski WL., Zaleska M., Durlik M., Lagiewska B., Muszynski M., Rowinski W. Blood cytokine levels rise even after minor surgical trauma, *J Clin Immunol*. 16 (1996), 159-164.
- [53]. Rosendaal FR., Nieuwenhuis HK., van den Berg HM., Heijboer H., Mauser-Bunschoten EP., van der Meer J., Smit C., Strengers PF., Briet E. A sudden increase in factor VIII inhibitor development in multitransfused hemophilia A patients in The Netherlands. Dutch Hemophilia Study Group, *Blood*. 81 (1993), 2180-2186.
- [54]. Peerlinck K., Arnout J., Gilles JG., Saint-Remy JM., Vermynen J. A higher than expected incidence of factor VIII inhibitors in multitransfused haemophilia A patients treated with an intermediate purity pasteurized factor VIII concentrate, *Thromb Haemost*. 69 (1993), 115-118.
- [55]. Laub R., Di Giambattista M., Fondu P., Brackmann HH., Lenk H., Saenko EL., Felch M., Scandella D. Inhibitors in German hemophilia A patients treated with a double virus inactivated factor VIII concentrate bind to the C2 domain of FVIII light chain, *Thromb Haemost*. 81 (1999), 39-44.
- [56]. Raut S., Di Giambattista M., Bevan SA., Hubbard AR., Barrowcliffe TW., Laub R. Modification of factor VIII in therapeutic concentrates after virus inactivation by solvent-detergent and pasteurisation, *Thromb Haemost*. 80 (1998), 624-631.
- [57]. White GC., DiMichele D., Mertens K., Negrier C., Peake IR., Prowse C., Schwaab R., Yoshioka A., Ingerslev J. Utilization of previously treated patients (PTPs), noninfected patients (NIPs), and previously untreated patients (PUPs) in the evaluation of new factor VIII and factor IX concentrates. Recommendation of the Scientific Subcommittee on Factor VIII and Factor IX of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, *Thromb Haemost*. 81 (1999), 462.
- [58]. Zanon E., Zerbinati P., Girolami B., Bertomoro A., Girolami A. Frequent but low titre factor VIII inhibitors in haemophilia A patients treated with high purity concentrates, *Blood Coagul Fibrinolysis*. 10 (1999), 117-120.

- [59]. Yee TT., Pasi KJ., Lilley PA., Lee CA. Factor VIII inhibitors in haemophiliacs: a single-centre experience over 34 years, 1964-97, *Br J Haematol.* 104 (1999), 909-914.
- [60]. Ehrenforth S., Kreuz W., Scharrer I., Linde R., Funk M., Gungor T., Krackhardt B., Kornhuber B. Incidence of development of factor VIII and factor IX inhibitors in haemophiliacs, *Lancet.* 339 (1992), 594-598.
- [61]. Ljung R., Petrini P., Lindgren AC., Tengborn L., Nilsson IM. Factor VIII and factor IX inhibitors in haemophiliacs, *Lancet.* 339 (1992), 1550.
- [62]. Giles AR., Rivard GE., Teitel J., Walker I. Surveillance for factor VIII inhibitor development in the Canadian Hemophilia A population following the widespread introduction of recombinant factor VIII replacement therapy, *Transfus Sci.* 19 (1998), 139-148.
- [63]. Gringeri A., Tagliaferri A., Tagariello G., Morfini M., Santagostino E., Mannucci P. Efficacy and inhibitor development in previously treated patients with haemophilia A switched to a B domain-deleted recombinant factor VIII, *Br J Haematol.* 126 (2004), 398-404.
- [64]. Roussel-Robert V., Torchet MF., Legrand F., Rothschild C., Stieltjes N. Factor VIII inhibitors development following introduction of B-domain-deleted recombinant factor VIII in four hemophilia A previously treated patients, *J Thromb Haemost.* 1 (2003), 2450-2451.
- [65]. Lusher JM., Lee CA., Kessler CM., Bedrosian CL. The safety and efficacy of B-domain deleted recombinant factor VIII concentrate in patients with severe haemophilia A, *Haemophilia.* 9 (2003), 38-49.
- [66]. Kreuz W., Gill JC., Rothschild C., Manco-Johnson MJ., Lusher JM., Kellermann E., Gorina E., Larson PJ. Full-length sucrose-formulated recombinant factor VIII for treatment of previously untreated or minimally treated young children with severe haemophilia A: results of an international clinical investigation, *Thromb Haemost.* 93 (2005), 457-467.
- [67]. Morado M., Villar A., Jimenez Yuste V., Quintana M., Hernandez Navarro F. Prophylactic treatment effects on inhibitor risk: experience in one centre, *Haemophilia.* 11 (2005), 79-83.
- [68]. Knobe KE., Tengborn LI., Petrini P., Ljung RC. Breastfeeding does not influence the development of inhibitors in haemophilia, *Haemophilia.* 8 (2002), 657-659.
- [69]. Werwitzke S., Tiede A., Stoll M., von Depka M. Immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS) as a cause for inhibitor development in hemophilia, *J Thromb Haemost.* 2 (2004), 193-194.
- [70]. Bleak S., Rodgers GM. Appearance of an inhibitor to factor VIII in a hemophilia A patient with HIV infection treated with combination anti-retroviral therapy, *Am J Hematol.* 58 (1998), 155.
- [71]. Castenskiold EC., Colvin BT., Kelsey SM. Acquired factor VIII inhibitor associated with chronic interferon-alpha therapy in a patient with haemophilia A, *Br J Haematol.* 87 (1994), 434-436.
- [72]. Gruppo RA., Chen H., Schroth P., Bray G. Safety and Immunogenicity of recombinant factor VIII (Recombinate) in previously untreated patients (PUPs): a 7.3 year update, *Haemophilia.* 4 (1998), 291.
- [73]. Ewenstein BM., Gomperts ED., Pearson S., O'Banion ME. Inhibitor development in patients receiving recombinant factor VIII (Recombinate rAHF/Bioclata): a prospective pharmacovigilance study, *Haemophilia.* 10 (2004), 491-498.
- [74]. Philipp CS. Viral safety of a pasteurized, monoclonal antibody-purified factor VIII concentrate in previously untreated haemophilia A patients, *Haemophilia.* 7 (2001), 146-153.
- [75]. Yoshioka A., Fukutake K., Takamatsu J., Shirahata A. Clinical evaluation of a recombinant factor VIII preparation (Kogenate) in previously untreated patients with hemophilia A, *Int J Hematol.* 78 (2003), 467-474.
- [76]. Rothschild C., Laurian Y., Satre EP., Borel Derlon A., Chambost H., Moreau P., Goudemand J., Parquet A., Peynet J., Vicariot M., Beurrier P., Claeysens S., Durin A., Faradji A., Fressinaud E., Gaillard S., Guerin V., Guerois C., Pernod G., Pouzol P., Schved JF., Gazengel C. French previously untreated patients with severe hemophilia A after exposure to recombinant factor VIII : incidence of inhibitor and evaluation of immune tolerance, *Thromb Haemost.* 80 (1998), 779-783.
- [77]. Briet E., Rosendaal FR., Kreuz W., Rasi V., Peerlinck K., Vermynen J., Ljung R., Rocino A., Addiego J., Lorenzo JJ., et al. High titer inhibitors in severe haemophilia A. A meta-analysis based on eight long-term follow-up studies concerning inhibitors associated with crude or intermediate purity factor VIII products, *Thromb Haemost.* 72 (1994), 162-164.
- [78]. White GC, 2nd., Rosendaal F., Aledort LM., Lusher JM., Rothschild C., Ingerslev J.

Definitions in hemophilia. Recommendation of the scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, *Thromb Haemost.* 85 (2001), 560.

[79]. Guerois C., Laurian Y., Rothschild C., Parquet-Gernez A., Duclos AM., Negrier C., Vicariot M., Fimbel B., Fressinaud E., Fiks-Sigaud M., et al. Incidence of factor VIII inhibitor development in severe hemophilia A patients treated only with one brand of highly purified plasma-derived concentrate, *Thromb Haemost.* 73 (1995), 215-218.

[80]. Goudemand J., D'Oiron R., Rothschild C., Parquet A., Gembara P., Claeysens S., Guérois C., Vicariot M., Berthier AM., Beurrier P., Briquel ME., Derlon A., Fiks-Sigaud M., Fressinaud E., Gaillard S. Incidence des inhibiteurs anti-FVIII chez des patients traités par facteur VIII-LFB, *STV.* 10 (1998), 77-81.

[81]. White GC, 2nd., Courter S., Bray GL., Lee M., Gomperts ED. A multicenter study of recombinant factor VIII (Recombinate) in previously treated patients with hemophilia A. The Recombinate Previously Treated Patient Study Group, *Thromb Haemost.* 77 (1997), 660-667.

[82]. Schwartz RS., Abildgaard CF., Aledort LM., Arkin S., Bloom AL., Brackmann HH., Brettler DB., Fukui H., Hilgartner MW., Inwood MJ., et al. Human recombinant DNA-derived antihemophilic factor (factor VIII) in the treatment of hemophilia A. recombinant Factor VIII Study Group, *N Engl J Med.* 323 (1990), 1800-1805.

[83]. Courter SG., Bedrosian CL. Clinical evaluation of B-domain deleted recombinant factor VIII in previously untreated patients, *Semin Hematol.* 38 (2001), 52-59.

[84]. Abshire TC., Brackmann HH., Scharrer I., Hoots K., Gazengel C., Powell JS., Gorina E., Kellermann E., Vosburgh E. Sucrose formulated recombinant human antihemophilic factor VIII is safe and efficacious for treatment of hemophilia A in home therapy--International Kogenate-FS Study Group, *Thromb Haemost.* 83 (2000), 811-816.

[85]. Tarantino MD., Collins PW., Hay CR., Shapiro AD., Gruppo RA., Berntorp E., Bray GL., Tonetta SA., Schroth PC., Retzios AD., Rogy SS., Sensel MG., Ewenstein BM. Clinical evaluation of an advanced category antihemophilic factor prepared using a plasma/albumin-free method: pharmacokinetics, efficacy, and safety in previously treated patients with haemophilia A, *Haemophilia.* 10 (2004), 428-437.

[86]. Schimpf K., Schwarz P., Kunschak M. Zero incidence of inhibitors in previously untreated patients who received intermediate purity factor VIII concentrate or factor IX complex, *Thromb Haemost.* 73 (1995), 553-555.

[87]. Yee TT., Williams MD., Hill FG., Lee CA., Pasi KJ. Absence of inhibitors in previously untreated patients with severe haemophilia A after exposure to a single intermediate purity factor VIII product, *Thromb Haemost.* 78 (1997), 1027-1029.

[88]. Addiego JE, Jr., Gomperts E., Liu SL., Bailey P., Courter SG., Lee ML., Neslund GG., Kingdon HS., Griffith MJ. Treatment of hemophilia A with a highly purified factor VIII concentrate prepared by anti-FVIIIc immunoaffinity chromatography, *Thromb Haemost.* 67 (1992), 19-27.

[89]. Lusher J., Abildgaard C., Arkin S., Mannucci PM., Zimmermann R., Schwartz L., Hurst D. Human recombinant DNA-derived antihemophilic factor in the treatment of previously untreated patients with hemophilia A: final report on a hallmark clinical investigation, *J Thromb Haemost.* 2 (2004), 574-583.

[90]. Lollar P. Pathogenic antibodies to coagulation factors. Part one: factor VIII and factor IX, *J Thromb Haemost.* 2 (2004), 1082-1095.

[91]. Ananyeva NM., Lacroix-Desmazes S., Hauser CA., Shima M., Ovanesov MV., Khrenov AV., Saenko EL. Inhibitors in hemophilia A: mechanisms of inhibition, management and perspectives, *Blood Coagul Fibrinolysis.* 15 (2004), 109-124.

[92]. Biggs R., Bidwell E. A method for the study of antihemophilic globulin inhibitors with reference to six cases, *Br J Haematol.* 5 (1959), 379-395.

[93]. Biggs R., Austen DE., Denson KW., Rizza CR., Borrett R. The mode of action of antibodies which destroy factor VIII. I. Antibodies which have second-order concentration graphs, *Br J Haematol.* 23 (1972), 125-135.

[94]. Rizza CR., Biggs R. The treatment of patients who have factor-VIII antibodies, *Br J Haematol.* 24 (1973), 65-82.

[95]. Kasper CK., Aledort L., Counts R., Edson JR., Fratantoni J., Green D., Hampton J., Hilgartner

- M., Lazerson J., Levine P., McMillan C., Pool JG., Shapiro S., Shulman NR., Von Eyes J. A more uniform measurement of factor VIII inhibitors, *Thromb Diath Haemorrh.* 34 (1975), 869-872.
- [96]. Allain JP., Frommel D. Antibodies to factor VIII. Variations in stability of antigen-antibody complexes in hemophilia A, *Blood.* 42 (1973), 437-444.
- [97]. Austen DE., Lechner K., Rizza CR., Rhymes IL. A comparison of the Bethesda and new Oxford methods of factor VIII antibody assay, *Thromb Haemost.* 47 (1982), 72-75.
- [98]. Verbruggen B., Novakova I., Wessels H., Boezeman J., van den Berg M., Mauser-Bunschoten E. The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: improved specificity and reliability, *Thromb Haemost.* 73 (1995), 247-251.
- [99]. Giles AR., Verbruggen B., Rivard GE., Teitel J., Walker I. A detailed comparison of the performance of the standard versus the Nijmegen modification of the Bethesda assay in detecting factor VIII:C inhibitors in the haemophilia A population of Canada. Association of Hemophilia Centre Directors of Canada. Factor VIII/IX Subcommittee of Scientific and Standardization Committee of International Society on Thrombosis and Haemostasis, *Thromb Haemost.* 79 (1998), 872-875.
- [100]. Verbruggen B., Giles A., Samis J., Verbeek K., Mensink E., Novakova I. The type of factor VIII deficient plasma used influences the performance of the Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII inhibitors, *Thromb Haemost.* 86 (2001), 1435-1439.
- [101]. Verbruggen B., Van Heerde W., Novakova I., Lillicrap D., Giles A. A 4% solution of bovine serum albumin may be used in place of factor VIII deficient plasma in the control sample in the Nijmegen modification of the Bethesda assay factor VIII:C inhibitor assay, *Thromb Haemost.* 88 (2002), 362-364.
- [102]. Reber G., Arousseau MH., Dreyfus M., Delahousse B., Caron C., Trzeciack MC., Aillaud MF., Horellou MH., Laurian Y., Si P. Inter-laboratory variability of the measurement of low titer factor VIII:C inhibitor in haemophiliacs: improvement by the Nijmegen modification of the Bethesda assay and the use of common lyophilized plasmas, *Haemophilia.* 5 (1999), 292-293.
- [103]. Hay CR., Baglin TP., Collins PW., Hill FG., Keeling DM. The diagnosis and management of factor VIII and IX inhibitors: a guideline from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization (UKHCDO), *Br J Haematol.* 111 (2000), 78-90.
- [104]. Ewing NP., Kasper CK. In vitro detection of mild inhibitors to factor VIII in hemophilia, *Am J Clin Pathol.* 77 (1982), 749-752.
- [105]. Keeling D., Beavis J., Sukhu K. A simple inhibitor screen is more sensitive than a Bethesda assay in monitoring for the development of inhibitors in haemophilia A and B, *Br J Haematol.* 128 (2005), 885.
- [106]. Preston FE., Kitchen S., Jennings I., Woods TA., Makris M. SSC/ISTH classification of hemophilia A: can hemophilia center laboratories achieve the new criteria?, *J Thromb Haemost.* 2 (2004), 271-274.
- [107]. Dazzi F., Tison T., Vianello F., Radossi P., Zerbinati P., Carraro P., Poletti A., Girolami A. High incidence of anti-FVIII antibodies against non-coagulant epitopes in haemophilia A patients: a possible role for the half-life of transfused FVIII, *Br J Haematol.* 93 (1996), 688-693.
- [108]. Klinge J., Auerswald G., Budde U., Klose H., Kreuz W., Lenk H., Scandella D. Detection of all anti-factor VIII antibodies in haemophilia A patients by the Bethesda assay and a more sensitive immunoprecipitation assay, *Haemophilia.* 7 (2001), 26-32.
- [109]. Mondorf W., Klinge J., Luban NL., Bray G., Saenko E., Scandella D. Low factor VIII recovery in haemophilia A patients without inhibitor titre is not due to the presence of anti-factor VIII antibodies undetectable by the Bethesda assay, *Haemophilia.* 7 (2001), 13-19.
- [110]. Vianello F., Radossi P., Tison T., Dazzi F., Tagariello G., Davoli PG., Girolami A. Prevalence of anti-FVIII antibodies in severe haemophilia A patients with inversion of intron 22, *Br J Haematol.* 97 (1997), 897-899.
- [111]. Ling M., Duncan EM., Rodgers SE., Street AM., Lloyd JV. Low detection rate of antibodies to non-functional epitopes on factor VIII in patients with hemophilia A and negative for inhibitors by Bethesda assay, *J Thromb Haemost.* 1 (2003), 2548-2553.
- [112]. Morfini M., Lee M., Messori A. The design and analysis of half life and recovery studies for factor VIII and factor IX. Factor VIII/IX standardisation subcommittee of the International Society for Thrombosis and Haemostasis., *Thromb Haemost.* 66 (1991), 384-386.
- [113]. Lee M., Morfini M., Schulman S., Ingerslev J., Haemostasis. AtFFSaSCotISfTa. The design

- and analysis of pharmacokinetic studies of coagulation factors. In: ISTH web site; 2001.
- [114]. Kasper C. Laboratory tests for factor VIII inhibitors, their variation, significance and interpretation, *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2 (1991), 7-10.
- [115]. Pascual B., Montoro JB. Comparative study of four different pharmacokinetic programme computer programs : case study of a factor VIII preparation, *Eur J Clin Pharmacol*. 52 (1997), 59-62.
- [116]. Wight J., Paisley S. The epidemiology of inhibitors in haemophilia A: a systematic review, *Haemophilia*. 9 (2003), 418-435.
- [117]. Brackmann HH., Gormsen J. Massive factor-VIII infusion in haemophiliac with factor-VIII inhibitor, high responder, *Lancet*. 2 (1977), 933.
- [118]. Nilsson IM., Berntorp E., Zettervall O. Induction of immune tolerance in patients with hemophilia and antibodies to factor VIII by combined treatment with intravenous IgG, cyclophosphamide, and factor VIII, *N Engl J Med*. 318 (1988), 947-950.
- [119]. Mariani G., Ghirardini A., Bellocco R. Immune tolerance in hemophilia-principal results from the International Registry. Report of the factor VIII and IX Subcommittee, *Thromb Haemost*. 72 (1994), 155-158.
- [120]. Kreuz W., Ehrenforth S., Funk M., Auerswald G., Mentzer D., Joseph-Steiner J., Beeg T., Klarmann D., Scharrer I., Kornhuber B. Immune tolerance therapy in paediatric haemophiliacs with factor VIII inhibitors: 14 years follow-up, *Haemophilia*. 1 (1995), 24-32.
- [121]. Mauser-Bunschoten EP., Nieuwenhuis HK., Roosendaal G., van den Berg HM. Low-dose immune tolerance induction in hemophilia A patients with inhibitors, *Blood*. 86 (1995), 983-988.
- [122]. Brackmann HH., Oldenburg J., Schwaab R. Immune tolerance for the treatment of factor VIII inhibitors--twenty years' 'bonn protocol', *Vox Sang*. 70 Suppl 1 (1996), 30-35.
- [123]. DiMichele DM., Kroner BL. Analysis of the North American Immune Tolerance Registry (NAITR) 1993-1997: current practice implications. ISTH Factor VIII/IX Subcommittee Members, *Vox Sang*. 77 Suppl 1 (1999), 31-32.
- [124]. DiMichele DM., Kroner BL. The North American Immune Tolerance Registry: practices, outcomes, outcome predictors, *Thromb Haemost*. 87 (2002), 52-57.
- [125]. Goudemand J. Pharmaco-economic aspects of inhibitor treatment, *Eur J Haematol Suppl*. 63 (1998), 24-27.
- [126]. Mariani G., Kroner B. International immune tolerance registry, 1997 update, *Vox Sang*. 77 Suppl 1 (1999), 25-27.
- [127]. Lenk H. The German National Immune Tolerance Registry, 1997 update. Study Group of German Haemophilia Centres, *Vox Sang*. 77 Suppl 1 (1999), 28-30.
- [128]. Smith MP., Spence KJ., Waters EL., Beresford-Webb R., Mitchell MJ., Cuttler J., Alhaq A., Brown SA., Savidge GF. Immune tolerance therapy for haemophilia A patients with acquired factor VIII alloantibodies: comprehensive analysis of experience at a single institution, *Thromb Haemost*. 81 (1999), 35-38.
- [129]. Rocino A., de Biasi R. Successful immune tolerance treatment with monoclonal or recombinant factor VIII concentrates in high responding inhibitor patients, *Vox Sang*. 77 Suppl 1 (1999), 65-69.
- [130]. Berntorp E., Nilsson IM. Immune tolerance and the immune modulation protocol, *Vox Sang*. 70 Suppl 1 (1996), 36-41.
- [131]. Kroner BL. Comparison of the international immune tolerance registry and the North American immune tolerance registry, *Vox Sang*. 77 Suppl 1 (1999), 33-37.
- [132]. Kreuz W., Mentzer D., Auerswald G., Becker S., Joseph-Steiner J. Successful immune tolerance of factor VIII inhibitor in children after changing from high to intermediate purity factor VIII concentrate, *Haemophilia*. 2 Suppl 1 (1996), 19.
- [133]. Auerswald G., Spranger T., Brackmann HH. The role of plasma-derived factor VIII/von Willebrand factor concentrates in the treatment of hemophilia A patients, *Haematologica*. 88 (2003), EREP05.
- [134]. Berntorp E. Immune tolerance induction: recombinant vs. human-derived product, *Haemophilia*. 7 (2001), 109-113.
- [135]. Batlle J., Lopez MF., Brackmann HH., Gaillard S., Goudemand J., Humbert J., De Moerloose P., Maass E., Mauz-Korholz C., Sultan Y., Stieltjes N. Induction of immune tolerance with recombinant factor VIII in haemophilia A patients with inhibitors, *Haemophilia*. 5 (1999), 431-435.

- [136]. Hay CR., Ludlam CA., Colvin BT., Hill FG., Preston FE., Wasseem N., Bagnall R., Peake IR., Berntorp E., Mauser Bunschoten EP., Fijnvandraat K., Kasper CK., White G., Santagostino E. Factor VIII inhibitors in mild and moderate-severity haemophilia A. UK Haemophilia Centre Directors Organisation, *Thromb Haemost.* 79 (1998), 762-766.
- [137]. Saint-Remy JM., Lacroix-Desmazes S., Oldenburg J. Inhibitors in haemophilia: pathophysiology, *Haemophilia.* 10 Suppl 4 (2004), 146-151.
- [138]. Reding MT., Wu H., Krampf M., Okita DK., Diethelm-Okita BM., Key NS., Conti-Fine BM. CD4+ T cell response to factor VIII in hemophilia A, acquired hemophilia, and healthy subjects, *Thromb Haemost.* 82 (1999), 509-515.
- [139]. Lacroix-Desmazes S., Bayry J., Misra N., Horn MP., Villard S., Pashov A., Stieltjes N., d'Oiron R., Saint-Remy JM., Hoebeke J., Kazatchkine MD., Reinbolt J., Mohanty D., Kaveri SV. The prevalence of proteolytic antibodies against factor VIII in hemophilia A, *N Engl J Med.* 346 (2002), 662-667.
- [140]. Moreau A., Lacroix-Desmazes S., Stieltjes N., Saenko E., Kaveri SV., D'Oiron R., Sultan Y., Scandella D., Kazatchkine MD. Antibodies to the FVIII light chain that neutralize FVIII procoagulant activity are present in plasma of nonresponder patients with severe hemophilia A and in normal polyclonal human IgG, *Blood.* 95 (2000), 3435-3441.
- [141]. Huguet HC., Lasne D., Rothschild C., Siali R., Jozefonvicz J. Extracorporeal adsorption of anti-factor VIII allo-antibodies on randomly functionalized polystyrene resins, *Thromb Haemost.* 91 (2004), 259-266.
- [142]. Freiburghaus C., Berntorp E., Ekman M., Gunnarsson M., Kjellberg BM., Nilsson IM. Immunoabsorption for removal of inhibitors: update on treatments in Malmo-Lund between 1980 and 1995, *Haemophilia.* 4 (1998), 16-20.
- [143]. Jansen M., Schmaldienst S., Banyai S., Quehenberger P., Pabinger I., Derfler K., Horl WH., Knobl P. Treatment of coagulation inhibitors with extracorporeal immunoabsorption (Ig-Therasorb), *Br J Haematol.* 112 (2001), 91-97.
- [144]. Freiburghaus C., Berntorp E., Ekman M., Gunnarsson M., Kjellberg B., Nilsson IM. Tolerance induction using the Malmo treatment model 1982-1995, *Haemophilia.* 5 (1999), 32-39.
- [145]. Kobrinsky NL., Sjolander DE., Moser DK., Stegman DA. Ablation of hemophilic FVIII inhibitors with FVIII priming, cyclophosphamide immune suppression, and rapid tapering of FVIII immune tolerance, *Am J Hematol.* 76 (2004), 180-184.
- [146]. Aggarwal A., Grewal R., Green RJ., Boggio L., Green D., Weksler BB., Wiestner A., Schechter GP. Rituximab for autoimmune haemophilia: a proposed treatment algorithm, *Haemophilia.* 11 (2005), 13-19.
- [147]. Wiestner A., Cho HJ., Asch AS., Michelis MA., Zeller JA., Peerschke EI., Weksler BB., Schechter GP. Rituximab in the treatment of acquired factor VIII inhibitors, *Blood.* 100 (2002), 3426-3428.
- [148]. Mathias M., Khair K., Hann I., Liesner R. Rituximab in the treatment of alloimmune factor VIII and IX antibodies in two children with severe haemophilia, *Br J Haematol.* 125 (2004), 366-368.
- [149]. Qian J., Burkly LC., Smith EP., Ferrant JL., Hoyer LW., Scott DW., Haudenschild CC. Role of CD154 in the secondary immune response: the reduction of pre-existing splenic germinal centers and anti-factor VIII inhibitor titer, *Eur J Immunol.* 30 (2000), 2548-2554.
- [150]. Ewenstein BM., Hoots WK., Lusher JM., DiMichele D., White GC, 2nd., Adelman B., Nadeau K. Inhibition of CD40 ligand (CD154) in the treatment of factor VIII inhibitors, *Haematologica.* 85 (2000), 35-39.
- [151]. Kawai T., Andrews D., Colvin RB., Sachs DH., Cosimi AB. Thromboembolic complications after treatment with monoclonal antibody against CD40 ligand, *Nat Med.* 6 (2000), 114.
- [152]. Danese S., Fiocchi C. Platelet Activation and the CD40/CD40 Ligand Pathway: Mechanisms and Implications for Human Disease, *Crit Rev Immunol.* 25 (2005), 103-122.
- [153]. Leissinger CA. Use of prothrombin complex concentrates and activated prothrombin complex concentrates as prophylactic therapy in haemophilia patients with inhibitors, *Haemophilia.* 5 Suppl 3 (1999), 25-32.
- [154]. Ashrani AA., Reding MT., Shet A., Osip J., Humar A., Lake JR., Key NS. Successful liver transplantation in a patient with severe haemophilia A and a high-titre factor VIII inhibitor, *Haemophilia.* 10 (2004), 735-737.

- [155]. Evans GL., Morgan RA. Genetic induction of immune tolerance to human clotting factor VIII in a mouse model for hemophilia A, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95 (1998), 5734-5739.
- [156]. Lei TC., Scott DW. Induction of tolerance to Factor VIII inhibitors by gene therapy with immunodominant A2 and C2 domains presented by B-cells as Ig fusion proteins, *Blood*. (2005).
- [157]. Villard S., Piquer D., Raut S., Leonetti JP., Saint-Remy JM., Granier C. Low molecular weight peptides restore the procoagulant activity of factor VIII in the presence of the potent inhibitor antibody ESH8, *J Biol Chem*. 277 (2002), 27232-27239.
- [158]. Gilles JG., Grailly SC., De Maeyer M., Jacquemin MG., VanderElst LP., Saint-Remy JM. In vivo neutralization of a C2 domain-specific human anti-Factor VIII inhibitor by an anti-idiotypic antibody, *Blood*. 103 (2004), 2617-2623.
- [159]. White GC, 2nd., Taylor RE., Blatt PM., Roberts HR. Treatment of a high titer anti-factor-VIII antibody by continuous factor VIII administration: report of a case, *Blood*. 62 (1983), 141-145.
- [160]. Lechner K., Nowotny C., Krinninger B., Zegner M., Deutsch E. Effect of treatment with activated prothrombin complex concentrate (FEIBA) on factor VIII-antibody level, *Thromb Haemost*. 40 (1979), 478-485.
- [161]. Hilgartner MW., Knatterud GL. The use of factor eight inhibitor by-passing activity (FEIBA immuno) product for treatment of bleeding episodes in hemophiliacs with inhibitors, *Blood*. 61 (1983), 36-40.
- [162]. Negrier C., Goudemand J., Sultan Y., Bertrand M., Rothschild C., Lauroua P. Multicenter retrospective study on the utilization of FEIBA in France in patients with factor VIII and factor IX inhibitors. French FEIBA Study Group. Factor Eight Bypassing Activity, *Thromb Haemost*. 77 (1997), 1113-1119.
- [163]. Johannessen M., Andreasen RB., Nordfang O. Decline of factor VIII and factor IX inhibitors during long-term treatment with NovoSeven, *Blood Coagul Fibrinolysis*. 11 (2000), 239-242.
- [164]. Lusher JM. Early treatment with recombinant factor VIIa results in greater efficacy with less product, *Eur J Haematol Suppl*. 63 (1998), 7-10.
- [165]. Lusher JM. Recombinant activated factor VII for treatment of intramuscular haemorrhages: a comparison of early versus late treatment, *Blood Coagul Fibrinolysis*. 9 Suppl 1 (1998), S111-114.
- [166]. Lusher JM. Acute hemarthroses: the benefits of early versus late treatment with recombinant activated factor VII, *Blood Coagul Fibrinolysis*. 11 Suppl 1 (2000), S45-49.
- [167]. Villar A., Aronis S., Morfini M., Santagostino E., Auerswald G., Thomsen HF., Erhardtsen E., Giangrande PL. Pharmacokinetics of activated recombinant coagulation factor VII (NovoSeven) in children vs. adults with haemophilia A, *Haemophilia*. 10 (2004), 352-359.
- [168]. Parameswaran R., Shapiro AD., Gill JC., Kessler CM. Dose effect and efficacy of rFVIIa in the treatment of haemophilia patients with inhibitors: analysis from the Hemophilia and Thrombosis Research Society Registry, *Haemophilia*. 11 (2005), 100-106.
- [169]. Ehrlich HJ., Henzl MJ., Gomperts ED. Safety of factor VIII inhibitor bypass activity (FEIBA): 10-year compilation of thrombotic adverse events, *Haemophilia*. 8 (2002), 83-90.
- [170]. Roberts HR., Monroe DM, 3rd., Hoffman M. Safety profile of recombinant factor VIIa, *Semin Hematol*. 41 (2004), 101-108.
- [171]. Roberts HR. Recombinant factor VIIa: how safe is the stuff?, *Can J Anaesth*. 52 (2005), 8-11.
- [172]. Hilgartner M., Aledort L., Andes A., Gill J. Efficacy and safety of vapor-heated anti-inhibitor coagulant complex in hemophilia patients. FEIBA Study Group, *Transfusion*. 30 (1990), 626-630.
- [173]. Scharrer I. Recombinant factor VIIa for patients with inhibitors to factor VIII or IX or factor VII deficiency, *Haemophilia*. 5 (1999), 253-259.
- [174]. Santagostino E., Gringeri A., Mannucci PM. Home treatment with recombinant activated factor VII in patients with factor VIII inhibitors: the advantages of early intervention, *Br J Haematol*. 104 (1999), 22-26.
- [175]. Hedner U., Glazer S., Pingel K., Alberts KA., Blomback M., Schulman S., Johnsson H. Successful use of recombinant factor VIIa in patient with severe haemophilia A during synovectomy, *Lancet*. 2 (1988), 1193.
- [176]. Ingerslev J. Efficacy and safety of recombinant factor VIIa in the prophylaxis of bleeding in various surgical procedures in hemophilic patients with factor VIII and factor IX inhibitors, *Semin Thromb Hemost*. 26 (2000), 425-432.
- [177]. Shapiro AD., Gilchrist GS., Hoots WK., Cooper HA., Gastineau DA. Prospective, randomised

- trial of two doses of rFVIIa (NovoSeven) in haemophilia patients with inhibitors undergoing surgery, *Thromb Haemost.* 80 (1998), 773-778.
- [178]. Faradji A., Bonnomet F., Lecocq J., Grunebaum L., Desprez D., Kern O., Barbier L., Sibia J. Knee joint arthroplasty in a patient with haemophilia A and high inhibitor titre using recombinant factor VIIa (NovoSeven): a new case report and review of the literature, *Haemophilia.* 7 (2001), 321-326.
- [179]. Rodriguez-Merchan EC., Wiedel JD., Wallny T., Hvid I., Berntorp E., Rivard GE., Goddard NJ., Querol F., Caviglia H. Elective orthopaedic surgery for inhibitor patients, *Haemophilia.* 9 (2003), 625-631.
- [180]. Slaoui M., Lambert T., Stieltjes N., Claeysens S., Borel-Derlon A. Intestinal surgery with activated recombinant factor VII prophylaxis in patients with haemophilia A and high responding inhibitors: a report of five cases, *Blood Coagul Fibrinolysis.* 15 (2004), 687-691.
- [181]. Tjonfjord GE. Activated prothrombin complex concentrate (FEIBA) treatment during surgery in patients with inhibitors to FVIII/IX: the updated Norwegian experience, *Haemophilia.* 10 Suppl 2 (2004), 41-45.
- [182]. Tjonfjord GE., Brinch L., Gedde-Dahl T., Brosstad FR. Activated prothrombin complex concentrate (FEIBA) treatment during surgery in patients with inhibitors to FVIII/IX, *Haemophilia.* 10 (2004), 174-178.
- [183]. Hay CR., Colvin BT., Ludlam CA., Hill FG., Preston FE. Recommendations for the treatment of factor VIII inhibitors: from the UK Haemophilia Centre Directors' Organisation Inhibitor Working Party, *Blood Coagul Fibrinolysis.* 7 (1996), 134-138.
- [184]. Lusher JM. Inhibitor antibodies to factor VIII and factor IX: management, *Semin Thromb Hemost.* 26 (2000), 179-188.
- [185]. Kulkarni R., Aledort LM., Berntorp E., Brackman HH., Brown D., Cohen AR., Ewing NP., Gringeri A., Gruppo R., Hoots K., Leissenger C., Peerlinck K., Poon MC., Wong WY. Therapeutic choices for patients with hemophilia and high-titer inhibitors, *Am J Hematol.* 67 (2001), 240-246.
- [186]. Habermann B., Hochmuth K., Hovy L., Scharrer I., Kurth AH. Management of haemophilic patients with inhibitors in major orthopaedic surgery by immunoadsorption, substitution of factor VIII and recombinant factor VIIa (NovoSeven): a single centre experience, *Haemophilia.* 10 (2004), 705-712.
- [187]. Laurian Y., Girma J., Allain JP., Verroust F., Larrieu MJ. Absence of anamnestic response after transfusion of washed red blood cells in haemophilia A patients with antibody to factor VIII, *Scand J Haematol.* 28 (1982), 233-237.
- [188]. Cooper HA., Jones CP., Champion E., Roberts HR., Hedner U. Rationale for the use of high dose rFVIIa in a high-titre inhibitor patient with haemophilia B during major orthopaedic procedures, *Haemophilia.* 7 (2001), 517-522.
- [189]. Kenet G., Lubetsky A., Luboshitz J., Martinowitz U. A new approach to treatment of bleeding episodes in young hemophilia patients: a single bolus megadose of recombinant activated factor VII (NovoSeven), *J Thromb Haemost.* 1 (2003), 450-455.
- [190]. Key NS., Christie B., Henderson N., Nelsestuen GL. Possible synergy between recombinant factor VIIa and prothrombin complex concentrate in hemophilia therapy, *Thromb Haemost.* 88 (2002), 60-65.
- [191]. Ljung R. Gene mutations and inhibitor formation in patients with hemophilia B, *Acta Haematol.* 94 (1995), 49-52.
- [192]. Lillicrap D. Factor IX mutations and inhibitor development in hemophilia B, *Haematologica.* 88 (2003), 75-77.
- [193]. Dimichele D. Inhibitors: resolving diagnostic and therapeutic dilemmas, *Haemophilia.* 8 (2002), 280-287.
- [194]. Parquet A., Laurian Y., Rothschild C., Navarro R., Guerois C., Gay V., Durin A., Peynet J., Sultan Y. Incidence of factor IX inhibitor development in severe haemophilia B patients treated with only one brand of high purity plasma derived factor IX concentrate, *Thromb Haemost.* 82 (1999), 1247-1249.
- [195]. Shapiro AD., Di Paola J., Cohen A., Pasi KJ., Heisel MA., Blanchette VS., Abshire TC., Hoots WK., Lusher JM., Negrier C., Rothschild C., Roth DA. The safety and efficacy of recombinant human blood coagulation factor IX in previously untreated patients with severe or moderately severe

hemophilia B, *Blood*. 105 (2005), 518-525.

- [196]. Warrier I., Ewenstein BM., Koerper MA., Shapiro A., Key N., DiMichele D., Miller RT., Pasi J., Rivard GE., Sommer SS., Katz J., Bergmann F., Ljung R., Petrini P., Lusher JM. Factor IX inhibitors and anaphylaxis in hemophilia B, *J Pediatr Hematol Oncol*. 19 (1997), 23-27.
- [197]. Kim HC., McMillan CW., White GC., Bergman GE., Horton MW., Saidi P. Purified factor IX using monoclonal immunoaffinity technique: clinical trials in hemophilia B and comparison to prothrombin complex concentrates, *Blood*. 79 (1992), 568-575.
- [198]. Kisker CT., Eisberg A., Schwartz B. Prophylaxis in factor IX deficiency product and patient variation, *Haemophilia*. 9 (2003), 279-284.
- [199]. Roth DA., Kessler CM., Pasi KJ., Rup B., Courter SG., Tubridy KL. Human recombinant factor IX: safety and efficacy studies in hemophilia B patients previously treated with plasma-derived factor IX concentrates, *Blood*. 98 (2001), 3600-3606.
- [200]. Chowdary P., Dasani H., Jones JA., Loran CM., Eldridge A., Hughes S., Collins PW. Recombinant factor IX (BeneFix) by adjusted continuous infusion: a study of stability, sterility and clinical experience, *Haemophilia*. 7 (2001), 140-145.
- [201]. DiMichele D., Kroner B. The maintenance of tolerance after successful immune tolerance induction in hemophilia A and B: the North American Registry. Factor VIII/IX Subcommittee of the International Society for Thrombosis and Hemostasis, *Haematologica*. 85 (2000), 40-42; discussion 42-44.
- [202]. Berntorp E. The Malmö immune tolerance experience in hemophilia B, *Haematologica*. 88 (2003), 71-74.
- [203]. DiMichele DM. Immune tolerance: a synopsis of the international experience, *Haemophilia*. 4 (1998), 568-573.
- [204]. Ewenstein BM., Takemoto C., Warrier I., Lusher J., Saidi P., Eisele J., Ettinger LJ., DiMichele D. Nephrotic syndrome as a complication of immune tolerance in hemophilia B, *Blood*. 89 (1997), 1115-1116.
- [205]. Warrier I. Management of haemophilia B patients with inhibitors and anaphylaxis, *Haemophilia*. 4 (1998), 574-576.
- [206]. Warrier I. Immune tolerance induction in hemophilia B. International immune tolerance registry, *Haematologica*. 88 (2003), 71-74.
- [207]. Berntorp E., Astermark J., Carlborg E. Immune tolerance induction and the treatment of hemophilia. Malmo protocol update, *Haematologica*. 85 (2000), 48-50; discussion 50-41.