

Dosage de l'activité du facteur VIII chez les patients hémophiles A substitués

Factor VIII assays in treated hemophilia A patients

Dominique Lasne¹
 Claire Pouplard²
 Christophe Nougier³
 Valérie Eschwege⁴
 Véronique Le Cam Duchez⁵
 Valérie Proulle⁶
 Motilib Smahi⁷
 Ines Harzallah⁸
 Sophie Voisin⁹
 Pierre Toulon¹⁰
 Frédéric Sobas³
 Hubert Galinat¹¹
 Claire Flaujac¹²
 Catherine Ternisien¹³
 Emmanuelle Jeanpierre¹⁴
 Pour le groupe d'études
 de la biologie des maladies
 hémorragiques du Groupe
 français d'études de
 l'hémostase et la thrombose

¹ Laboratoire d'hématologie générale, Hôpital Necker, AP-HP, Paris ; Université Paris Sud Paris Saclay, Inserm U1176, Le Kremlin-Bicêtre, France <dominique.lasne@aphp.fr>

² Service d'hématologie-hémostase, Hôpital Trousseau, CHU de Tours, EA 7501 Université François Rabelais, Tours, France

³ Service d'hématologie-hémostase, Hospices civils de Lyon, Bron, France

⁴ Service d'hématologie-hémostase, CHU de Nancy, France

⁵ CHU de Rouen, UF Hémostase-hématologie biologique, Rouen, France

⁶ Service hématologie biologique, CHU Bicêtre, AP-HP, Université Paris Sud Paris Saclay, Inserm U1176, Le Kremlin-Bicêtre, France

Résumé. Une surveillance biologique des hémophiles substitués est nécessaire pour ajuster la dose de facteurs administrés qu'ils soient d'origine plasmatisque ou recombinante. La méthode de référence pour le dosage de l'activité du facteur VIII (FVIII:C) chez les patients hémophiles A substitués est la méthode chromogénique, mais elle est peu répandue dans les laboratoires qui utilisent le plus souvent la méthode chromométrique basée sur la mesure du temps de céphaline avec activateur (TCA). Le nombre important de réactifs de TCA et les différents couples automates/réactifs expliquent les difficultés de standardisation de ces dosages. Le groupe français d'études de la biologie des maladies hémorragiques (groupe collaborateur du GFHT et de la filière MHEMO), présente une revue de la littérature et des propositions pour le suivi biologique des patients hémophiles A substitués. Une méthode chromogénique, calibrée avec un standard raccordé à l'étalon international de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), est recommandée pour le suivi des patients traités par FVIII plasmatisque (pdFVIII) ou recombinant (rFVIII) y compris pour les nouveaux rFVIII à demi-vie allongée (*extended half life* : EHL). Une méthode chromométrique est acceptable pour le pdFVIII et la plupart des rFVIII. Pour la surveillance d'un traitement par Refacto AF®, une comparaison préalable avec la méthode chromogénique est requise. Concernant les rFVIII-EHL, la méthode chromométrique n'est acceptable aujourd'hui que pour l'Elocta®. Une grande vigilance doit être apportée lors de l'utilisation d'une méthode chromométrique pour les autres rFVIII-EHL. La majorité des études présente des résultats obtenus avec des plasmas surchargés qui doivent être confirmés avec des plasmas de patients traités.

Mots clés : facteur VIII, hémophilie, dosages chromométriques et chromogéniques

Abstract. Replacement therapy with plasma-derived or recombinant FVIII (pdFVIII or rFVIII) concentrates is the standard of treatment in patients with hemophilia A. The reference method used for measuring factor VIII (FVIII:C) levels in patients treated by FVIII concentrates is the chromogenic substrate assay (CSA). However, the one-stage clotting assay (OSA) is predominantly used in current clinical practice, but this method depends on the activated partial thromboplastin time (APTT) reagent and the coagulation analyzer used, and wide variations in the measurements of FVIII recovery have been reported with some factor concentrates. The French study group on the biology of hemorrhagic diseases (a collaborative group of the GFHT and MHEMO network) presents a review of the literature and proposals for the monitoring of FVIII:C levels in treated hemophilia A patients. The use of CSA calibrated with a plasma reference tested against the current FVIII WHO (World Health

Tirés à part : D. Lasne

⁷ Service d'hématologie-hémostase, Hôpital Simone Veil, Eaubonne, France

⁸ Service d'hématologie-hémostase, Groupe hospitalier régional de Mulhouse et Sud Alsace, France

⁹ Laboratoire hématologie, CHU de Toulouse, France

¹⁰ Service d'hématologie biologique, Hôpital Pasteur, CHU Nice, France

¹¹ Laboratoire d'hématologie, Hôpital La Caval Blanche, CHU de Brest, France

¹² Laboratoire d'hématologie, Centre Hospitalier de Versailles, Le Chesnay, France

¹³ Service d'hématologie-hémostase, Hôtel-Dieu, CHU de Nantes, France

¹⁴ CHU Lille, Institut d'hématologie-transfusion, Inserm U1011, Lille, France

Article reçu le 07 janvier 2019, accepté le 07 janvier 2019

Membres du groupe d'études de la biologie des maladies hémorragiques du Groupe français d'étude de l'hémostase et la thrombose : Martine Alhenc Gelas (CHU HEGP, Paris), Christine Biron (CHU Montpellier), Florence Blanc-Jouvan (CH Annecy), Evelyne Bourgerette (CH Nevers), Benedicte Bulabois (CHU Grenoble), Emilie Comio (CH Chambéry), Magali Donnard (CHU Limoges), Jérôme Duchemin (CHU Cochin, Paris), Anne-Camille Faure (CHU St-Etienne), François Grand (CHU Poitiers), Lelia Grunebaum (CHU Strasbourg), Maryse Guicheteau (CHU Poitiers), Nathalie Hezard (CHU Marseille), Marie-Françoise Hurtaud (CHU Robert-Debré Paris), Fabienne Nedelec Gac (CHU Rennes), Emmanuel De Maistre (CHU Dijon), Raphaël Marlu (CHU Grenoble), Guillaume Mourey (EFS Bourgogne Franche Comté), Perrine Munier (CH Valence), Fabienne Pineau-Vincent (CH Le Mans), Didier Raffenot (CH Chambéry), Yohan Repesse (CHU Caen), Anne Ryman (CHU Bordeaux), Laurent Sattler (CHU Strasbourg), Pauline Sauguet (CH Ajaccio), Anne-Francoise Serre-Sapin (CHU Clermont-Ferrand), Alain Stepanian (CHU Lariboisière Paris), Jean Szymezak (CHU Reims), Marie Tuffigo (CHU Angers), Annelise Voyer (CHU Amiens).

La variabilité entre les méthodes de dosage de l'activité du facteur VIII (FVIII:C), particulièrement lorsque les patients hémophiles A (HA) sont substitués avec des

Organization) International Standard is recommended for the monitoring of patients treated with pdFVIII or rFVIII including extended half-life (EHL) rFVIII. OSA are adequate for the monitoring of patients treated with pdFVIII or with most of rFVIII concentrates. However, preliminary comparison with CSA is mandatory before measuring FVIII:C by OSA in patients treated by Refacto AF[®]. For rFVIII-EHL, OSA are only acceptable for Elocta[®]. Great caution is therefore required when measuring FVIII:C levels by OSA in patients substituted by other EHL-rFVIII. Indeed, most of recent studies reported data obtained with spiked plasmas, which deserve to be confirmed on plasma samples collected in treated patients.

Key words: factor VIII, hemophilia A, chronometric and chromogenic assays

produits recombinants, est connue depuis plusieurs années [1, 2]. Cette variabilité se révèle encore plus importante avec certains médicaments à durée de vie prolongée [3] et les conséquences en termes de surveillance biologique sont majeures. Le sous-comité scientifique et de standardisation « *FVIII, FIX and rare bleeding disorders* » de l'*International society on thrombosis and haemostasis* (ISTH) a ainsi émis des recommandations concernant le titrage des concentrés de FVIII et préconise que cette activité puisse être évaluée par des méthodes de dosages couramment utilisées dans les laboratoires hospitaliers [4]. La méthode de dosage du FVIII:C la plus répandue est la méthode chronométrique basée sur la mesure du temps de céphaline avec activateur (TCA). Cependant, le nombre important de réactifs de TCA et les différents couples automates/réactifs sont à l'origine des difficultés de standardisation de ces dosages chez les patients hémophiles substitués [5-7]. Le dosage chromogénique du FVIII:C est la référence internationale pour le titrage des concentrés de FVIII hautement purifiés [8] et est également la méthode de référence de la Pharmacopée européenne depuis 1994. Tous les concentrés de FVIII distribués en Europe, qu'ils soient d'origine plasmatisque ou recombinante sont ainsi titrés par cette méthode. Cependant, même si le dosage chromogénique du FVIII:C tend actuellement à se développer, il n'est pas disponible dans tous les laboratoires principalement en raison de sa complexité et de son coût actuellement plus élevé. À ce jour, les résumés des caractéristiques des produits (RCP) de substitution (facteurs VIII plasmatisques ou recombinants) n'indiquent que rarement une conduite à tenir concernant la surveillance biologique.

Le groupe français d'études de la biologie des maladies hémorragiques (groupe collaborateur du Groupe français d'étude sur l'hémostase et la thrombose (GFHT) et de la filière MHEMO : filière de santé maladies hémorragiques constitutionnelles) présente dans ce texte une revue de la littérature ainsi que des propositions pour le suivi biologique des patients hémophiles A substitués. Le détail des différentes méthodes de dosage ainsi que les recommandations pré-analytiques du GFHT sont disponibles dans le guide des analyses en hématologie récemment publié [9].

Méthodologie utilisée pour la rédaction des propositions

La méthodologie adoptée pour élaborer et valider ces propositions a été la suivante : 3 groupes de travail ont pris en charge la rédaction des différents chapitres abordés dans ce texte. Ces textes ont ensuite été relus, discutés et modifiés par un groupe restreint puis soumis à une analyse critique de tous les membres du groupe français d'études de la biologie des maladies hémorragiques. Ces propositions ont finalement été validées par un vote (39 votants soit 90 % des membres), déterminant ainsi la force de chaque proposition. Pour retenir une proposition sur un critère avec un accord fort, au moins 50 % des votants devaient exprimer une note supérieure ou égale à 7 (échelle de notation comprise entre 1 et 10) et moins de 20 % des votants devaient donner une note inférieure à 4. En l'absence d'accord, les propositions devaient être reformulées et soumises à nouveau au vote. La recherche bibliographique a été réalisée sur PubMed. Nous avons sélectionné les publications présentant les résultats et les méthodes de dosages utilisées pour déterminer les taux de FVIII chez des patients substitués ou sur des échantillons surchargés. Les articles publiés depuis 1993 et jusqu'au 30 novembre 2018 dans des revues anglophones ou francophones ont été pris en considération. Pour certains chapitres, lorsque les données de la littérature étaient insuffisantes, nous avons également pris en compte les travaux présentés lors de congrès (communications orales ou affichées) au cours des 3 dernières années.

Les propositions ont été pondérées en fonction des données disponibles. Ainsi, les recommandations ou non recommandations reposent sur des positions des sociétés savantes. Les méthodes acceptables/non acceptables sont basées sur des données publiées dans la littérature (référence PubMed). Lorsque les résultats n'ont fait l'objet que de communications orales ou affichées, les méthodes sont considérées : acceptables – à confirmer ou non acceptables – à confirmer. Dans certaines situations, les données sont discordantes selon les publications et cette notion apparaît dans les tableaux de synthèse. Certaines méthodes n'ont fait

l'objet d'aucune étude publiée ou présentée et sont donc considérées comme non évaluées.

Lorsque les résultats dans les tableaux sont présentés pour chaque étude : « OUI » signifie que l'utilisation du réactif est validée dans l'étude selon les critères des auteurs et « NON » que le réactif n'est pas validé dans l'étude selon les critères des auteurs.

Synthèse des réactifs disponibles pour le dosage du facteur VIII

Les différents réactifs de TCA utilisés pour le dosage du FVIII par méthode chronométrique ainsi que les différentes trousse de réactifs pour la méthode chromogénique sont présentés dans les *tableaux 1 et 2*.

Facteurs VIII d'origine plasmatique

Les différentes molécules et leurs caractéristiques

Deux facteurs VIII d'origine plasmatique sont actuellement disponibles sur le marché français pour le traitement des accidents hémorragiques et le traitement prophylactique des hémophiles A : le Factane® (LFB) et l'Octanate® (Octapharma). Ces deux molécules contiennent de faibles concentrations de facteur Willebrand d'origine humaine.

Titrage des FVIII plasmatiques par les industriels

En Europe, l'activité en unité internationale (UI) du facteur VIII contenu dans les différentes préparations est déterminée par dosage chromogénique par rapport à un étalon de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) selon les recommandations de la Pharmacopée européenne (dilution des échantillons dans des plasmas d'hémophiles A sévères, utilisation de tampon à 1 % d'albumine).

Surveillance biologique : études disponibles

Les fournisseurs ne préconisent pas de méthode spécifique (chronométrique ou chromogénique) pour la surveillance des hémophiles A traités par FVIII plasmatique. Le test le plus utilisé chez ces patients reste la méthode chronométrique. Cependant, les performances analytiques des réactifs de TCA disponibles sur le marché français (*tableau 1*) ne sont pas équivalentes pour le dosage de ce facteur. Il est recommandé de réaliser une calibration à l'aide d'un standard raccordé à l'étalon international de l'OMS.

Les différences de résultats des dosages du FVIII par méthode chronométrique et méthode chromogénique sont moins importantes lorsque les patients sont substitués avec les FVIII plasmatiques, comparés aux FVIII recombinants.

Tableau 1. Liste des principaux réactifs de TCA utilisés dans les études pour les dosages chromométriques.

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

Tableau 2. Liste des principales trousse de réactifs pour le dosage chromogénique des FVIII disponibles en France en 2018 [10].

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

Tableau 3. Facteurs VIII plasmatiques : propositions pour le dosage du FVIII après substitution.

	Factane®	Octanate®
Méthode chromogénique	Recommandée	Recommandée
Méthode chromométrique	Acceptable	Acceptable

Recommandé/non recommandé : position des sociétés savantes ; acceptable/non acceptable : données publiées dans la littérature ; acceptable – à confirmer/non acceptable – à confirmer : résultats n'ayant fait l'objet que de communications orales ou affichées ; non évalué : absence d'étude.

Ainsi des résultats obtenus sur des échantillons de patients traités par Hemofil M® (FVIII d'origine plasmatique non distribué en France, Baxter) [4] ou par Factane® [5] montrent un biais de 10 % entre les deux méthodes avec des taux de FVIII:C plus élevés par méthode chromogénique.

Quelle(s) méthode(s) utiliser pour surveiller un patient traité par du FVIII plasmatique ?

Selon la Pharmacopée européenne, les méthodes recommandées sont les méthodes chromogéniques. En l'absence de résultats discordants dans la littérature, les méthodes chromométriques sont acceptables (tableau 3).

Proposition 1

Il est recommandé d'utiliser une méthode chromogénique, calibrée avec un standard raccordé à l'étalon international de l'OMS, pour le suivi des patients traités par FVIII d'origine plasmatique. L'utilisation d'une méthode chromométrique est acceptable. Accord fort.

Tableau 4. Liste des différents FVIII recombinants disponibles en France [11].

Molécule rFVIII	Spécialité	Industriel	Lignée cellulaire	DCI
rFVIII pleine longueur	Kogenate® Helixate Nexgen®	Bayer/CSL Behring	BHK	Octocog alfa
	Kovaltry®	Bayer	BHK	Octocog alfa
	Advate®	Shire	CHO	Octocog alfa
rFVIII B délété ou B tronqué	Refacto AF®	Pfizer	CHO	Moroctocog alfa
	Novoeight®	Novo Nordisk	CHO	Turoctocog alfa
	Nuwik®	Octapharma	HEK	Simoctocog alfa

Facteurs VIII recombinants conventionnels

Les différentes molécules et leurs caractéristiques

Les caractéristiques des différents FVIII recombinants (rFVIII) disponibles en France sont présentées dans le *tableau 4*.

Titrage des FVIII recombinants par les industriels

En accord avec les recommandations de la Pharmacopée européenne, tous les concentrés de FVIII recombinants présentés dans le *tableau 4* sont titrés par méthode chromogénique.

Surveillance biologique : études disponibles

Lors de la surveillance des patients hémophiles traités par FVIII recombinants, de nombreuses discordances ont été rapportées entre les dosages par méthodes chromométrique et chromogénique. Classiquement, les taux de FVIII:C obtenus avec un dosage chromométrique lors de traitement par rFVIII sont 20 à 50 % plus faibles que ceux mesurés par méthode chromogénique [8, 12]. Ces discordances fluctuent en fonction de la composition du réactif utilisé (activateur, nature et concentration en phospholipides) dans la méthode chromométrique et du FVIII recombinant mesuré. La structure moléculaire des rFVIII, mais également les modifications post-traductionnelles différentes d'une lignée cellulaire à une autre (lignée CHO, BHK, HEK), peuvent influencer les mesures d'activité.

Kogenate®/Helixate Nexgen®

Des différences sont décrites entre les activités chromométrique et chromogénique du FVIII:C notamment lorsque la méthode chromométrique utilise le kaolin [13]. Dans une étude multicentrique (52 centres participants) réalisée à partir de plasma de patients traités par Kogenate®, Kitchen *et al.* obtiennent des taux plus bas de FVIII:C par méthode chromométrique comparés aux résultats obtenus par méthode chromogénique, avec une moyenne de différence de -22 % avec le SynthASil (n = 20) et -27 % avec l'Actin FS (n = 15) [14]. Une moyenne de différence de

-17,8 % est également observée dans le travail de Pouplard *et al.* en 2016 [15] réalisé sur 16 échantillons de patients traités par Kogenate®/Helixate Nexgen®.

Kovaltry®

Une étude multicentrique (41 centres participants) réalisée sur des plasmas surchargés montre que le Kovaltry® (Bay 81-8973) peut être dosé par méthode chromométrique ou chromogénique avec des ratios moyens méthode chromogénique/méthode chromométrique compris entre 1,04 et 1,14 [16]. Ces résultats sont confirmés dans l'étude d'efficacité et de sécurité Léopold I et II [17].

Advate®

L'Advate® est souvent utilisé comme FVIII recombinant de référence dans les études [16-21]. Ainsi, pour des valeurs cibles comprises entre 0,6 et 0,9 UI.mL⁻¹, la plupart des études rapportent des taux moyens de FVIII plus élevés par méthode chromogénique (+ 12 % à + 19 %). Pour des valeurs cibles inférieures à 0,05 UI.mL⁻¹, une sous-estimation des concentrations est rapportée, à l'exception du travail de Kitchen *et al.* qui n'observe pas de différences sur les taux bas de FVIII [14]. L'étude multicentrique de Pouplard *et al.* réalisée uniquement sur des échantillons de patients traités ayant des taux de FVIII:C supérieurs à 0,15 UI.mL⁻¹, montre une différence des taux de 10 % (déviation standard : 7,2 %) entre les deux méthodes avec des taux plus élevés par méthode chromogénique [15].

Refacto AF®

Des discordances ont rapidement été observées entre les deux méthodes de dosage lors de la commercialisation du Refacto® puis du Refacto AF®. Une sous-estimation des taux de FVIII:C de l'ordre de 30 à 50 % par méthode chromométrique a été publiée par plusieurs équipes [1, 12]. Ces différences sont d'autant plus importantes que le taux de FVIII:C mesuré est élevé, et l'activité du FVIII mesurée par méthode chromogénique est bien corrélée au taux antigénique de FVIII chez les patients HA sévères traités (ratio 1,03). L'étude de Kitchen *et al.* en 2016, réalisée sur un contrôle externe de qualité, montre une surestimation de 27 % par la méthode chromogénique, malgré l'utilisation du standard Refacto AF® lorsque l'Actin est utilisée dans

la méthode chromométrique. Par contre aucune différence n'est objectivée avec le SynthASil [14]. Plusieurs travaux ont validé l'utilisation d'un plasma de calibration spécifique pour les méthodes chromométriques (Standard Refacto AF®) permettant de réduire les discordances entre les méthodes [8, 12, 15, 22, 23]. Cependant, l'utilisation d'un standard spécifique à un produit donné constitue une charge importante pour le laboratoire et nécessite de connaître avec certitude le produit de substitution reçu par le patient. La variabilité des résultats selon le réactif activateur du TCA nécessite une grande vigilance et le dosage chromogénique reste la méthode de dosage à privilégier.

Novoeight®

Une étude internationale multicentrique (36 centres) réalisée avec un plasma déficient surchargé en Novoeight® rapporte des ratios FVIII chromogénique/FVIII chromométrique variant de 0,68 à 1,30 avec une surestimation des valeurs basses par méthode chromométrique et une surestimation des valeurs élevées par méthode chromogénique [18]. Cet effet n'est pas spécifique de la molécule puisque la même observation est faite avec l'Advate®. Les laboratoires participants ont utilisé différents types d'activateurs (silice, acide ellagique ou kaolin) sans différence significative des taux de FVIII selon l'activateur utilisé. Les auteurs concluent qu'il est possible d'utiliser le dosage chromométrique ou chromogénique pour la surveillance thérapeutique des patients traités par Novoeight®. L'étude de Pickering *et al.* a évalué différentes troupes chromogéniques (Coamatic FVIII, Coatest FVIII, Biophen FVIII, FVIII chromogénique) en utilisant des plasmas d'HA sévères surchargés en Novoeight® [10]. Deux calibrants différents (WHO 8th Standard international et *Standard human plasma* (SHP) Siemens) ont également été évalués. Quelle que soit la troupe chromogénique, les valeurs les plus proches des valeurs cibles sont mesurées avec le calibrant WHO 8th. Avec ce calibrant, les différences relatives observées sont inférieures à 20 % quelle que soit la concentration. En revanche, avec certaines troupes chromogéniques, une différence relative supérieure à 20 % est observée en utilisant la calibration avec le standard SHP.

Nuwiq®

Une étude de phase III réalisée par Klukowska *et al.* a comparé les paramètres de pharmacocinétique du Nuwiq® obtenus avec les deux méthodes de dosage [24]. Aucune mention n'est faite sur les réactifs utilisés. L'analyse montre que le taux de FVIII:C est plus élevé que la valeur cible lorsque les dosages sont réalisés par méthode chromogénique. Il existe donc, notamment pour les taux élevés de FVIII, une différence entre ces deux méthodes de dosage.

Quelle(s) méthode(s) utiliser pour surveiller un patient traité par du FVIII recombinant ?

Le MASAC (*Medical and scientific advisory council*) du NHF (*National hemophilia foundation*), l'EMA (*European medicines agency*), ainsi que la Pharmacopée européenne préconisent l'utilisation de la méthode chromogénique pour déterminer la concentration plasmatique du FVIII dans un contexte de suivi de patients traités avec des concentrés anti-hémophiliques recombinants. En fonction des données de la littérature et des molécules de FVIII recombinant, les méthodes de dosage de FVIII:C pouvant être utilisées sont présentées dans le *tableau 5*.

Proposition 2

Il est recommandé d'utiliser une méthode chromogénique calibrée avec un standard raccordé à l'étalon international de l'OMS pour le suivi des patients traités par FVIII recombinants. Si une méthode chromométrique est utilisée pour surveiller un patient traité par Refacto AF®, celle-ci doit avoir été comparée à la méthode chromogénique. Accord fort.

Facteurs VIII recombinants à demi-vie prolongée ou *extended half life* (rFVIII-EHL)

Les différentes molécules et leurs caractéristiques

Les stratégies utilisées pour mettre au point des FVIII recombinants à demi-vie prolongée ou EHL reposent sur le développement de protéine de fusion (fragment d'immunoglobuline) ou sur la modification chimique du FVIII (couplage de polymères de type polyéthylène glycol (PEG)) (*tableau 6*). Un rFVIII délété avec une chaîne unique a également été développé.

Parmi les FVIII à demi-vie prolongée actuellement disponibles, on distingue :

- une molécule issue de la fusion d'un rFVIII tronqué d'une partie du domaine B (rBDD-FVIII) et d'un dimère du domaine Fc d'IgG1 humaine : Elocta® ;
- des molécules issues du couplage du polyéthylène glycol (PEG) au rFVIII : rFVIII-PEG. Cette réaction entraîne une grande diversité de rFVIII-PEG en raison de la variabilité de la longueur des chaînes PEG (5 à 60 kDa) et du nombre de chaînes PEG branchées ;
- un rFVIII à chaîne unique dans lequel la plus grande partie du domaine B et 4 acides aminés du domaine A3 acide adjacent présents dans le facteur VIII de type sauvage complet ont été supprimés. Il a été démontré qu'Afstyla®

Tableau 5. Propositions pour le dosage du FVIII après substitution par un FVIII recombinant.

	rFVIII pleine longueur	rFVIII B délété ou B tronqué	
	Advate®, Kogenate®, Helixate Nexgen®, Kovaltry®	Refacto AF®	Novoeight® Nuwiq®
Méthode chromogénique	Recommandée	Recommandée	Recommandée
Méthode chromométrique	Acceptable	Acceptable avec le standard Refacto AF	Acceptable

Recommandé/non recommandé : position des sociétés savantes ; acceptable/non acceptable : données publiées dans la littérature ; acceptable – à confirmer/non acceptable – à confirmer : résultats n'ayant fait l'objet que de communications orales ou affichées ; non évalué : absence d'étude. (*) Le dosage par méthode chromométrique a été validé avec l'utilisation d'un standard Refacto AF®.

Tableau 6. Liste des différents FVIII recombinants à demi-vie prolongée.

Dénomination	Molécules	Industriel	Substance active	Caractéristiques	Commentaires
Elocta®	rFVIII-Fc	Sobi	Efmoroctocog	Lignée cellulaire HEK 293 (humaine)	FVIII pleine longueur fusionné de façon covalente au fragment Fc d'une IgG1 humaine
Adynovi® /Adynovate®	rFVIII-PEG	Shire	Bax-855	Produit sur des lignées cellulaires CHO (hamster)	FVIII pleine longueur 2 PEG de 10 kDa
BAY 94-9027		Bayer	Bay 94-9027	Lignée cellulaire HEK293 (humaine)	FVIII domaine B délété 1 PEG de 60 kDa
N8-GP		Novo Nordisk	Turoctocog alpha pegol	Lignée cellulaire CHO (hamster)	FVIII domaine B tronqué (21 aa) Glycopegylation ; 1 PEG de 40 kDa
Afstyla®	rFVIII monochaine B délété	CSL Behring	Ionoctocog alfa	Lignée cellulaire CHO (hamster)	La chaîne lourde et la chaîne légère du FVIII ont été liées de façon covalente. Lors de l'activation par la thrombine, cette construction permet la génération de FVIII activé

avait une meilleure affinité au facteur Willebrand (VWF) par rapport à un rFVIII à chaîne complète.

Titration des FVIII recombinants EHL par les industriels

En accord avec les recommandations de la Pharmacopée européenne, les FVIII recombinants à demi-vie prolongée sont titrés par méthode chromogénique.

Surveillance biologique : études disponibles

Elocta®

Trois publications internationales [25-27] et 3 abstracts de congrès internationaux [28-30] rapportent des résultats de dosages sur des plasmas provenant de patients traités par Elocta® (tableau 7). Dans les études cliniques internationales, les dosages ont été centralisés et réalisés par méthode chromométrique avec l'Actin FSL et par méthode chromogénique. La première étude multicentrique de phase 1/2a

réalisée chez 16 patients ayant reçu de l'Elocta® ou de l'Advate® montre une excellente corrélation entre les 2 méthodes de dosage du FVIII:C avec ces 2 médicaments (Pearson R^2 : 0,94 et 0,95) [26]. Cependant, des taux plus élevés sont obtenus avec la méthode chromogénique avec un biais de 21 % et de 32 % respectivement pour le rFVIII et le rFVIII-Fc, cet effet étant plus marqué pour des concentrations supérieures à 0,5 UI.mL⁻¹. Des résultats comparables obtenus sur les échantillons de l'étude de phase 3 A-Long ont été présentés par Pouplard *et al.* [28].

L'étude monocentrique réalisée au Kremlin-Bicêtre sur 195 échantillons issus de 68 patients traités [29], montre des résultats comparables entre les deux méthodes de dosage et en utilisant du kaolin (CK Prest) ou un réactif chromogénique le Biophen FVIII. La corrélation entre les 2 méthodes est excellente ($r^2 = 0,97$), et des taux plus élevés sont obtenus par méthode chromogénique sans que l'erreur relative ne dépasse 13 % pour les taux de FVIII compris entre 0,1 et 1,2 UI/mL⁻¹. Le travail multicentrique du Groupe

Tableau 7. Elocta® : conclusion des différentes études pour le dosage du FVIII .

	Sommer <i>et al.</i> [21]	Powell <i>et al.</i> [26]	Pouplard <i>et al.</i> [28]	Perrier Cornet <i>et al.</i> [29]	Pouplard <i>et al.</i> [30]
Méthode chromométrique					
Réactifs : acide ellagique, kaolin, silice, polyphénols	Oui				
Actin FSL		Oui	Oui		
CK Prest				Oui	Oui
SynthASil					Oui
aPTT HS					Oui
Méthode chromogénique					
Réactifs : Biophen FVIII, FVIII chromogénic, Technochrom FVIII, Coatest SP FVIII	Oui				
FVIII Chromogénic		Oui	Oui		
Biophen FVIII				Oui	

Oui : réactif validé dans l'étude selon les critères des auteurs ; non : réactif non validé dans l'étude selon les critères des auteurs.

français d'études biologiques des maladies hémorragiques [30] rassemble 387 dosages effectués lors d'études de pharmacocinétique réalisées chez plus de 100 patients. Un biais de 20 % entre la méthode chromogénique et la méthode chromométrique est observé pour des taux de FVIII supérieurs à 1 UI/mL⁻¹. Ce biais est inférieur à 15 % lorsque les taux sont inférieurs à 1 UI/mL⁻¹. Les dosages par méthode chromométrique ont été réalisés avec le CK Prest (n = 337), le SynthASil (n = 9), ou l'aPTT HS (n = 41).

Une étude *in vitro* multicentrique (30 laboratoires) réalisée sur des échantillons de plasmas déficients en FVIII surchargés avec des doses croissantes d'Elocta® ou d'Advate® a été publiée par Sommer *et al.* en 2014 [21]. Les dosages ont été effectués avec les réactifs propres à chaque laboratoire en méthode chromométrique (acide ellagique, silice, kaolin et polyphénol) et 4 troussees différentes ont été utilisées pour la méthode chromogénique (Biophen FVIII, FVIII chromogénic, Technochrom FVIII, Coatest SP FVIII). Ces deux FVIII recombinants (EHL ou non-EHL) se comportent de façon identique lorsqu'ils sont dosés par méthode chromométrique ou chromogénique. Le réactif de TCA utilisé ne semble pas avoir d'impact sur les résultats mais le détail des résultats obtenus avec chaque réactif n'est pas mentionné dans l'article. Ces résultats *in vitro* sont en accord avec les études réalisées sur des plasmas de patients traités par rFVIII-Fc. Comme avec les autres FVIII recombinants étudiés, il existe une excellente corrélation entre les 2 méthodes pour les dosages de FVIII, quels que soient les réactifs utilisés, avec une sous-estimation cliniquement acceptable des résultats par méthode chromométrique par rapport à la méthode chromogénique. Les résultats obtenus *in vitro* et *ex vivo* avec le rFVIII-Fc montrent que l'erreur relative est inférieure à 25 % quel que soit le couple réactif/automate

utilisé et sans utiliser de standard spécifique à la molécule pour la calibration.

Quelle méthode utiliser chez un patient traité par Elocta® ?

La méthode chromogénique est recommandée. La méthode chromométrique est acceptable. Accord fort.

Afstyla®

Le fournisseur de ce médicament dans le résumé des caractéristiques du produit (RCP) recommande d'utiliser un dosage chromogénique pour le suivi des patients traités ou d'appliquer un facteur de multiplication de 2 si le taux de FVIII:C est mesuré par méthode chromométrique. Une étude multicentrique récente réalisée par 23 laboratoires a montré que sur des échantillons surchargés en Afstyla® une sous-estimation du taux de FVIII:C par méthode chromométrique est observée quel que soit le domaine de mesure (compris entre 0,04 et 1 UI/mL⁻¹) et le type de réactifs activateurs utilisés (kaolin, silice, acide ellagique, silicone dioxide) [20]. Cependant selon Bowyer A. *et al.*, le facteur de multiplication de 2 entraîne une surestimation relative très importante (> 100 %) des taux bas proches de 0,02 UI/mL⁻¹ et peut induire, selon la zone de mesure une surestimation des taux avec l'aPTT-SP, le SynthAFax ou l'Actin FS et une sous-estimation avec le SynthASil [31]. Des observations récentes dans nos laboratoires indiquent que ce ratio de 2 n'est pas universel et qu'il doit être vérifié localement pour chaque réactif de TCA.

Quelle méthode utiliser chez un patient traité par Afstyla® ?

La méthode chromogénique est recommandée. Concernant la méthode chromométrique, une sous-estimation de l'ordre de 50 % est rapportée. Si une méthode chromométrique est utilisée pour surveiller un patient, celle-ci doit avoir été comparée à la méthode chromogénique. Accord fort.

Adynovi®

Une étude internationale multicentrique (35 laboratoires) réalisée sur des plasmas déficients surchargés avec Adynovi® ou Advate® a été publiée par Turecek en 2016 [19]. Les résultats obtenus par méthode chromométrique sont très proches des valeurs cibles et ce, quel que soit le réactif activateur de TCA utilisé (silice, kaolin, acide ellagique ou polyphénol). La méthode chromogénique n'a été réalisée que par 11 centres et les résultats obtenus sont en moyenne augmentés de 14 % par rapport à la valeur cible (tableau 8). Une étude suisse indépendante et n'impliquant que huit laboratoires a comparé des méthodes chromométriques aux méthodes chromogéniques en utilisant des courbes de calibration réalisées avec des standards habituels ou un standard spécifique préparé avec l'Adynovi® [32]. Différents activateurs ont été utilisés (silice, kaolin ou acide ellagique). Lorsque les calibrations sont réalisées avec un plasma standard classique, les auteurs mettent en

Tableau 8. Adynovi® : conclusion des différentes études pour le dosage du FVIII.

	Turecek <i>et al.</i> [19]	Bulla <i>et al.</i> [32]
Méthode chromométrique		
Actin FSL	Oui	
Actin FS	Oui	
Pathromtin SL		Non
CK-Prest	Oui	Non
PTT-A	Oui	
Cephascreen	Oui	
Automated aPTT	Oui	
SynthASil	Oui	
APTT-SP	Oui	Non
Méthode chromogénique		
FVIII chromogenic	Oui	Oui avec SS*
FVIII Chromogenic, Coamatic FVIII, Electrachrome FVIII	Oui	
Biophen FVIII		Oui avec SS*

Oui : réactif validé dans l'étude selon les critères des auteurs ; non : réactif non validé dans l'étude selon les critères des auteurs ; *SS : standard spécifique.

évidence une surestimation systématique des taux de FVIII que ce soit par la méthode chromométrique (+27 à 113 %) ou chromogénique (+11 à 83 %). Cette surestimation est d'autant plus importante que la valeur cible est élevée. Seule l'utilisation d'un standard spécifique permet de mesurer des taux de FVIII proches des valeurs attendues (tableau 8).

Quelle méthode utiliser chez un patient traité par Adynovi® ?

La méthode chromogénique est recommandée. Les données publiées sont insuffisantes et/ou contradictoires pour émettre des propositions concernant les dosages par méthode chromométrique. Accord fort.

BAY 94-9027

Selon l'étude réalisée par Gu *et al.*, la pégylation du rFVIII BAY 94-9027 pourrait perturber les tests de coagulation réalisés avec certains réactifs à base de silice (tableau 9) [33]. En effet, sur des échantillons surchargés avec ce rFVIII-PEG ou avec du WHO 8th Standard International FVIII et dosés avec des réactifs à base de silice (APTT-SP, PTT-A), de polyphénol (Cephascreen) ou d'acide ellagique (SynthAFax, Actin), les auteurs montrent que des résultats proches des valeurs cibles sont obtenus par méthode chromométrique, uniquement avec les réactifs contenant de l'acide ellagique. Sur les échantillons BAY 94-9027, des temps de coagulation plus longs sont observés lorsque la silice est utilisée entraînant une sous-estimation des taux de FVIII:C. Des valeurs proches des valeurs cibles sont obtenues par méthode chromogénique.

L'impact de la silice sur le dosage du FVIII:C dans des plasmas déficients surchargés en BAY 94-9027 a été largement étudié par Church dans une étude multicentrique (52 laboratoires). Les résultats de ce travail présentés en 2016 à l'ASH confirment les résultats précédemment obtenus avec l'APTT-SP et PTT-A avec des taux de recouvrement de l'ordre de 20 % avec ces deux réactifs (tableau 9). L'article publié en 2018 par le même auteur ne permet plus une analyse spécifique de ces deux réactifs [34], il valide l'utilisation du SynthASil (résultats compris entre 118 et 103 % des valeurs cibles), du Pathromtin SL (résultats compris entre 129 et 111 % des valeurs cibles) et de l'Actin FSL (résultats compris entre 107 et 89 % des valeurs cibles). Le type d'activateur ne semble pas responsable à lui seul des différences observées sur les taux de FVIII:C des patients substitués par BAY 94-9027. En effet, alors que l'Actin FS induit une surestimation des taux de FVIII:C de plus de 40 % par rapport aux valeurs cibles, l'Actin FSL permet l'obtention de taux plus proches des valeurs attendues. Le CK Prest et le Pathromtin SL ne sont pas validés pour les taux inférieurs à 0,5 UI.mL⁻¹ car ils surestiment

Tableau 9. BAY 94-9027 : conclusions des différentes études pour le dosage du FVIII :C.

	Gu <i>et al.</i> [33]	Church <i>et al.</i> d'après [34]
Méthode chronométrique		
Actin	Oui	Non
Actin FSL		Oui
Actin FS		Non
Pathromtin SL		Non
PTT-A	Non	Non
Cephascreen	Oui	
CK Prest		Non
APTT-SP	Non	Non
SynhAFax	Oui	
SynthASil		Oui
Méthode chromogénique		
Biophen FVIII	Oui	
Coamatic FVIII		Oui
Electrachrome FVIII		Oui

Oui : réactif validé dans l'étude selon les critères des auteurs ; non : réactif non validé dans l'étude selon les critères des auteurs.

les résultats. Les trousse chromogéniques (FVIII chromogénic, Coamatic FVIII et Electrachrome FVIII (non disponible en France)) sont utilisables d'après cette étude.

Quelle méthode utiliser chez un patient traité par BAY 94-9027 ?

La méthode chromogénique est recommandée. Les données publiées sont insuffisantes et/ou contradictoires pour émettre des propositions concernant les dosages par méthode chronométrique. Accord fort.

N8-GP

Dans l'étude de Pickering *et al.* réalisée sur plasmas surchargés en N8-GP, différentes trousse chromogéniques ont été étudiées (Coamatic FVIII, Coatest SP FVIII, Biophen FVIII et FVIII chromogénic). Les auteurs rapportent de bonnes performances avec ces 4 trousse (*tableau 10*) [10]. Ces résultats ne sont pas confirmés par un travail réalisé dans deux centres européens [35] qui montre qu'avec ces 4 mêmes trousse de réactifs les résultats obtenus sont de 10 à 40 % supérieurs à valeur cible. Les méthodes chronométriques réalisées avec l'Actin FS, l'Actin et le Pathromtin SL permettent d'obtenir des taux de FVIII:C très proches des valeurs cibles. En revanche, une sous-estimation des taux de plus de 25 % est observée avec l'Actin FSL, le SynthASil et le SynthAFax pour des valeurs cibles

Tableau 10. N8-GP : conclusion des différentes études pour le dosage du FVIII :C

	Pickering <i>et al.</i> [10]	Hillarp <i>et al.</i> [35]
Méthode chronométrique		
Actin		Oui
Actin FSL		Non
Actin FS		Oui
Pathromtin SL		Oui
APTT-SP		Non
SynhAFax		Oui *
SynthASil		Oui *
Méthode chromogénique		
Biophen FVIII	Oui	Non
Coamatic FVIII	Oui	Oui
FVIII chromogénic	Oui	Oui
Coatest SP FVIII	Oui	Non

Oui : réactif validé dans l'étude selon les critères des auteurs ; non : réactif non validé dans l'étude selon les critères des auteurs. *Utilisé avec les automates Werfen et déficients Werfen.

supérieures ou égales à 0,2 UI.mL⁻¹. Cet effet est encore plus marqué avec l'APTT-SP (*tableau 10*).

Quelle méthode utiliser chez un patient traité par N8-GP ?

Les données publiées concernant la méthode chromogénique valident l'utilisation de certaines trousse. Les données publiées concernant la méthode chronométrique sont insuffisantes pour émettre des propositions. Accord fort.

Quelle(s) méthode(s) utiliser pour surveiller un patient traité par du rFVIII-EHL ?

En fonction des données de la littérature et des molécules de rFVIII-EHL, les dosages de FVIII:C pouvant être utilisés sont présentés dans le *tableau 11*.

Proposition 3

La méthode chromogénique est recommandée pour tous les rFVIII à demi-vie prolongée. La méthode chronométrique n'est acceptable aujourd'hui que pour le rFVIII-Fc. Une grande vigilance doit être apportée lors de l'utilisation d'une méthode chronométrique pour le dosage des autres rFVIII-EHL. Accord fort.

Tableau 11. Propositions pour le dosage du FVIII après substitution par un rFVIII-EHL.

	rFVIII Sc B tronqué	rFVIII Fc	rFVIII B délété ou B tronqué PEG		
	Afstyle®	Elocta®	Adynovi®	BAY 94-9027	N8-GP
Méthode chromogénique	Recommandée	Recommandée	Recommandée	Recommandée	Recommandée avec certaines trouses
Méthode chromométrique	Acceptable uniquement après comparaison avec la méthode recommandée	Acceptable	Données discordantes	Non acceptable : réactifs PTT-A et APTT-SP Données discordantes avec les autres réactifs de TCA	Données discordantes

Recommandée/non recommandée : position des sociétés savantes ; acceptable/non acceptable : donnée publiées dans la littérature ; acceptable – à confirmer/non acceptable – à confirmer : résultats n'ayant fait l'objet que de communications orales ou affichées ; non évalué : absence d'étude) ; Données discordantes : conclusions différentes selon les études ; (*) Un facteur de correction de 2 est proposé par le RCP mais il n'est pas universel.

Conclusion

L'apparition de nouveaux facteurs anti-hémophiliques à demi-vie prolongée est une avancée pour la prise en charge des patients mais constitue un réel challenge pour les laboratoires qui utilisaient jusqu'à aujourd'hui des méthodes de dosages chromométriques pour doser le FVIII:C chez les patients substitués. La modification des molécules et plus particulièrement les modifications visant à allonger la demi-vie des médicaments a mis en exergue des différences entre les résultats obtenus selon la méthode de dosage (chromogénique ou chromométrique) et selon les réactifs utilisés pour la méthode chromométrique. Ces différences s'expliquent en partie par le fait que les techniques de dosages chromométriques traditionnelles sont calibrées avec des plasmas standards issus de molécules FVIII non recombinantes. Une des solutions proposées pour pallier ces discordances a été d'utiliser des standards spécifiques aux molécules, mais ils ne sont disponibles que pour un nombre limité d'entre elles. Ces observations imposent aux biologistes une très grande vigilance lors de la surveillance des hémophiles substitués. Le comportement de ces nouvelles molécules vis-à-vis des méthodes de dosages du FVIII:C n'est malheureusement pas bien caractérisé avant leur mise sur le marché et ce malgré les recommandations internationales. Les facteurs de corrections pouvant être proposés pour certaines d'entre elles ne s'avèrent pas toujours applicables dans tous les laboratoires d'analyses médicales car les facteurs de variabilité ne concernent pas uniquement l'activateur du réactif de TCA mais probablement aussi les phospholipides et les automates. De plus, un même facteur de correction est rarement applicable sur tout le domaine de mesure. Un certain nombre d'études citées

dans ce document ont été réalisées sur des échantillons de plasma surchargé en médicaments et les résultats doivent être confirmés sur des échantillons de patients substitués.

Dans certaines situations liées à l'urgence de la prise en charge du patient, si un test recommandé n'est pas disponible 24h/24, les laboratoires pourront être amenés à réaliser une méthode considérée comme « non acceptable » dans nos propositions mais seulement s'ils l'ont comparée avec la méthode recommandée. Il est important de souligner que dans ces conditions, les résultats obtenus avec les 2 méthodes seront différents et la question se pose de transmettre un résultat souvent sous-estimé aux cliniciens sur le compte rendu d'examens. L'ensemble des rédacteurs de ce texte s'accorde sur le fait que les résultats biologiques ne doivent en aucun cas être modifiés par un quelconque facteur de correction avant d'être transmis. Une interprétation du résultat faisant état des différences observées par rapport à une méthode acceptable ou recommandée devra impérativement figurer sur le compte rendu biologique. Dans ces conditions, le biologiste doit donc absolument avoir connaissance du traitement anti-hémophilique administré, afin d'interpréter correctement le résultat.

En conclusion, ces propositions ont pour but d'aider les biologistes à mieux connaître les performances et limites des différentes méthodes de dosage utilisables pour la surveillance des médicaments susceptibles d'être administrés chez les patients. Mais les données de la littérature et les tests biologiques disponibles sont susceptibles d'évoluer remettant en cause certaines de nos propositions.

Enfin, de nouveaux traitements non substitutifs sont déjà commercialisés ou en fin de développement (emicizumab, fitusiran, anti-TFPI...). Une fois encore les techniques chromométriques traditionnelles ne constituent pas un outil

adapté pour la surveillance des patients traités et le développement ou l'adaptation de nouveaux tests pour la surveillance biologique (dosage spécifique, tests globaux) devient un nouveau challenge pour le biologiste.

Liens d'intérêts : C. Pouplard : activité de conseil (Roche, Sobi), invitation à des congrès (Bayer, Schire, Roche, Sobi) ; H. Galinat : interventions ponctuelles (Diagnostica Stago, Werfen, Sobi, CSL Behring, Octapharma, Pfizer, LFB) ; V. Proulle : invitation à des conférences (Sobi, CSL Behring, Shire Baxalta, Bayer, Octapharm, Pfizer, Novonordisk) ; les autres auteurs : invitation à des congrès en qualité d'auditeur ou expert.

Références

1. Caron C, Dautzenberg M-D, Delahousse B, Droulle C, Pouzol P, Dubanchet A, *et al.* A blinded in vitro study with Refacto mock plasma samples : similar FVIII results between the chromogenic assay and a one-stage assay when using a higher cephalin dilution. *Haemophilia* 2002 ; 8(5) : 639-43.
2. Dawson NJ, Kembal-Cook G, Barrowcliffe TW. Assay discrepancies with highly purified factor VIII concentrates. *Haemostasis* 1989 ; 19(3) : 131-7.
3. Van den Bossche D, Peerlinck K, Jacquemin M. New challenges and best practices for the laboratory monitoring of factor VIII and factor IX replacement. *Int J Lab Hematol* 2018 ; 40(Suppl. 1) : 21-9.
4. Hubbard AR, Dodt J, Lee T, Mertens K, Seitz R, Srivastava A, *et al.* Recommendations on the potency labelling of factor VIII and factor IX concentrates. *J Thromb Haemost* 2013 ; 11(5) : 988-9.
5. Adcock DM, Strandberg K, Shima M, Marlar RA. Advantages, disadvantages and optimization of one-stage and chromogenic factor activity assays in haemophilia A and B. *Int J Lab Hematol* 2018 ; 40(6) : 621-9.
6. Martinuzzo M, Barrera L, Rodriguez M, D'Adamo MA, López MS, Otaso JC. Do PT and APTT sensitivities to factors' deficiencies calculated by the H47-A2 2008 CLSI guideline reflect the deficiencies found in plasmas from patients ? *Int J Lab Hematol* 2015 ; 37(6) : 853-60.
7. Toulon P, Eloit Y, Smahi M, Sigaud C, Jambou D, Fischer F, *et al.* In vitro sensitivity of different activated partial thromboplastin time reagents to mild clotting factor deficiencies. *Int J Lab Hematol* 2016 ; 38(4) : 389-96.
8. Barrowcliffe TW, Raut S, Sands D, Hubbard AR. Coagulation and chromogenic assays of factor VIII activity : general aspects, standardization, and recommendations. *Semin Thromb Hemost* 2002 ; 28(3) : 247-56.
9. Béné M-C, Martinez P, Lasne D, Noizat-Pirenne F. *Guide des analyses en hématologie*. In : Société Française d'Hématologie. Paris : Elsevier Masson, 2018.
10. Pickering W, Hansen M, Kjalke M, Ezban M. Factor VIII chromogenic assays can be used for potency labeling and postadministration monitoring of N8-GP. *J Thromb Haemost* 2016 ; 14(8) : 1579-87.
11. HAS commission de la transparence 2017. Disponible sur : https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/evamed/CT-16035_AFSTYLA_PIS_INS_Avis2_modifiele24072017_CT16035.pdf.
12. Mikaelsson M, Oswaldsson U. Assaying the circulating factor VIII activity in hemophilia A patients treated with recombinant factor VIII products. *Semin Thromb Hemost* 2002 ; 28(3) : 257-64.
13. Lusher JM, Hillman-Wiseman C, Hurst D. In vivo recovery with products of very high purity—assay discrepancies. *Haemophilia* 1998 ; 4(4) : 641-5.
14. Kitchen S, Jennings I, Makris M, Kitchen DP, Woods TL, Walker ID. Factor VIII assay variability in postinfusion samples containing full length and B-domain deleted FVIII. *Haemophilia* 2016 ; 22(5) : 806-12.
15. Pouplard C, Ternisien C, Desconclois C, Lasne D, Aillaud M-F, Caron C. Discrepancies between one stage assay and chromogenic substrate assay in patients treated with recombinant or plasma-derived FVIII and usefulness of a specific standard in ReFacto AF® -treated patients. *Haemophilia* 2016 ; 22(2) : e101-3.
16. Kitchen S, Beckmann H, Katterle Y, Bruns S, Tseneklidou-Stoeter D, Maas Enriquez M. BAY 81-8973, a full-length recombinant factor VIII : results from an International comparative laboratory field study. *Haemophilia* 2016 ; 22(3) : e192-9.
17. Kitchen S, Katterle Y, Beckmann H, Maas Enriquez M. Chromogenic assay for BAY 81-8973 potency assignment has no impact on clinical outcome or monitoring in patient samples. *J Thromb Haemost* 2016 ; 14(6) : 1192-9.
18. Viuff D, Barrowcliffe T, Saugstrup T, Ezban M, Lillicrap D. International comparative field study of N8 evaluating factor VIII assay performance. *Haemophilia* 2011 ; 17(4) : 695-702.
19. Turecek PL, Romeder-Finger S, Apostol C, Bauer A, Crocker-Buqué A, Burger DA, *et al.* A world-wide survey and field study in clinical haemostasis laboratories to evaluate FVIII:C activity assay variability of ADYNOVATE and OBIZUR in comparison with ADVATE. *Haemophilia* 2016 ; 22(6) : 957-65.
20. St Ledger K, Feussner A, Kalina U, Horn C, Metzner HJ, Bensen-Kennedy D, *et al.* International comparative field study evaluating the assay performance of AFSTYLA in plasma samples at clinical hemostasis laboratories. *J Thromb Haemost* 2018 ; 16(3) : 555-64.
21. Sommer JM, Moore N, McGuffie-Valentine B, Bardan S, Buyue Y, Kamphaus GD, *et al.* Comparative field study evaluating the activity of recombinant factor VIII Fc fusion protein in plasma samples at clinical haemostasis laboratories. *Haemophilia* 2014 ; 20(2) : 294-300.
22. Pouplard C, Caron C, Aillaud MF, Ternisien C, Desconclois C, Dubanchet A, *et al.* The use of the new ReFacto AF Laboratory Standard allows reliable measurement of FVIII:C levels in ReFacto AF mock plasma samples by a one-stage clotting assay. *Haemophilia* 2011 ; 17(5) : e958-962.
23. Cauchie M, Toelen J, Peerlinck K, Jacquemin M. Practical and cost-effective measurement of B-domain deleted and full-length recombinant FVIII in the routine haemostasis laboratory. *Haemophilia* 2013 ; 19(3) : e133-138.
24. Klukowska A, Szczepański T, Vdovin V, Knaub S, Jansen M, Liesner R. Novel, human cell line-derived recombinant factor VIII (Human-cl rhFVIII, Nuwiq®) in children with severe haemophilia A : efficacy, safety and pharmacokinetics. *Haemophilia* 2016 ; 22(2) : 232-9.
25. Mahlangu J, Powell JS, Ragni MV, Chowdary P, Josephson NC, Pabinger I, *et al.* Phase 3 study of recombinant factor VIII Fc fusion protein in severe hemophilia A. *Blood* 2014 ; 123(3) : 317-25.
26. Powell JS, Josephson NC, Quon D, Ragni MV, Cheng G, Li E, *et al.* Safety and prolonged activity of recombinant factor VIII Fc fusion protein in hemophilia A patients. *Blood* 2012 ; 119(13) : 3031-7.

27. Young G, Mahlangu J, Kulkarni R, Nolan B, Liesner R, Pasi J, *et al.* Recombinant factor VIII Fc fusion protein for the prevention and treatment of bleeding in children with severe hemophilia A. *J Thromb Haemost* 2015 ; 13(6) : 967-77.
28. Pouplard C, Caron C, Kitchen S, Wikén M, Falk A, Ferrante F, *et al.* High agreement rate between ellagic acid-based one stage and chromogenic clotting assays for rFVIII-Fc post infusion samples in the A-LONG Study. 64th annual meeting of the scientific standardization committee of the International society on thrombosis and haemostasis, May 25-28, 2016 ; 14(1) : abstracts.
29. Perrier-Cornet A, Philippe A, De Boissieu P, Lambert T, D'Oiron R, Rafowicz A, *et al.* Extended half-life Factor VIII : from biology to patients' management optimization. 65th annual meeting of the scientific standardization committee of the International society on thrombosis and haemostasis. *Res Pract Thromb Haemost* 2018 ; 2(Suppl. 1) : 1-368 (abstracts).
30. Pouplard C, Sattler L, Ryman A, Eschwege V, De Maistre E, Flaujac C, *et al.* Multicenter pharmacokinetic evaluation of rFVIII-Fc (Elocta) in a real life comparison with non-extended half-life FVIII concentrates. *ASH* 2018. *Blood* 2018 ; 132 (Suppl. 1).
31. Bowyer A, Key N, Dalton D, Kitchen S, Makris M. The coagulation laboratory monitoring of Afstyla single-chain FVIII concentrate. *Haemophilia* 2017 ; 23(5) : e469-70.
32. Bulla O, Poncet A, Alberio L, Asmis LM, Gähler A, Graf L, *et al.* Impact of a product-specific reference standard for the measurement of a PEGylated rFVIII activity : the Swiss Multicentre Field Study. *Haemophilia* 2017 ; 23(4) : e335-9.
33. Gu J-M, Ramsey P, Evans V, Tang L, Apeler H, Leong L, *et al.* Evaluation of the activated partial thromboplastin time assay for clinical monitoring of PEGylated recombinant factor VIII (BAY 94-9027) for haemophilia A. *Haemophilia* 2014 ; 20(4) : 593-600.
34. Church N, Leong L, Katterle Y, Ulbrich H-F, Noerenberg I, Kitchen S, *et al.* Factor VIII activity of BAY 94-9027 is accurately measured with most commonly used assays : Results from an international laboratory study. *Haemophilia* 2018 ; 24 : 823-32.
35. Hillarp A, Bowyer A, Ezban M, Persson P, Kitchen S. Measuring FVIII activity of glycopegylated recombinant factor VIII, N8-GP, with commercially available one-stage clotting and chromogenic assay kits: a two-centre study. *Haemophilia* 2017 ; 23(3) : 458-65.