

● **Contexte bibliographique**

L'hémophilie A est une affection hémorragique héréditaire transmise selon un mode récessif lié au chromosome X, et due à un déficit en facteur VIII (FVIII). Elle touche une naissance masculine sur cinq mille. La sévérité clinique dépend de l'importance du déficit, les hémophilies sévères se caractérisent par un taux résiduel de l'activité coagulante du FVIII inférieur à 1%, les hémophilies modérées entre 1 et 5 %, et les formes mineures entre 6 et 40 %. Les manifestations hémorragiques sont rarement extériorisées, il s'agit le plus souvent d'hématomes ou d'hémarthroses. A ce jour, seul un traitement médical substitutif

Existe-t'il une corrélation entre le test Bethesda et l'ELISA pour le dépistage d'anticorps anti-FVIII chez les patients hémophiles A?

Géraldine Lavigne-Lissalde^{1,2}, Christine Biron-Andreani³, Jean-François Schved³ et Sylvie Villard¹

¹CNRS-UMR 5160 Faculté de Pharmacie Montpellier, ²Laboratoire d'hématologie Hôpital universitaire Nîmes, ³Laboratoire central d'hématologie Hôpital universitaire Saint-Eloi Montpellier

épisode hémorragique aigu. Cependant, depuis quelques années, un traitement prophylactique par injections itératives de

de la prise en charge de ces patients, est l'apparition d'anticorps dirigés contre le FVIII transfusé. Ces anticorps désignés sous le nom d'inhibiteurs surviennent chez 10 à 30 % des hémophiles (1), qui deviennent alors résistants aux thérapies de substitution. Le pronostic fonctionnel est ainsi particulièrement compromis sans parler du pronostic vital; en effet il y a une dizaine d'années la présence d'un inhibiteur multipliait par cinq le risque de décès. L'apparition de ces inhibiteurs reste un défi thérapeutique majeur. Bien que les raisons de leur développement ne soient qu'incomplètement comprises, il semble que cette réponse immune soit consécutive à l'injection répétée de FVIII. Ces anticorps sont polyclonaux, de sous classe IgG qui neutralisent l'activité pro-coagulante du FVIII. L'isotype IgG4 qui ne représente normalement que 4 % de la population des IgG est ici très largement prédominant suivi par les IgG2 (2,3).

Dans les conditions physiologiques, le FVIII, co-facteur du facteur IX (FIX) dans la cascade de la coagulation sanguine, circule sous la forme d'une glycoprotéine de 2332 résidus d'acides aminés. Il est constitué de six domaines successifs A₁-a₁-A₂-a₂-B-a₃-A₃-C₁-C₂. Après activation par la thrombine (IIa), les domaines A₁ et A₂ forment la chaîne lourde et les domaines a₃-A₃-C₁-C₂ la chaîne légère (Figure 1). Dans la circulation plasmatique, le FVIII activé (FVIIIa) circule associé au facteur Von Willebrand (VWF) qui le protège de la dégradation protéolytique et prévient la dissociation des deux chaînes. Après action de la thrombine, le FVIIIa se détache du VWF et se lie au FIX activé (FIXa) et aux phospholipides (PLs), liaison indispensable pour l'activation du facteur X (FXa). Les inhibiteurs sont capables de reconnaître plusieurs épitopes situés dans les différents domaines (Figure 2). Ils sont plus fréquemment dirigés vers les domaines A₂ et C₂ du FVIIIa (4); la plupart des inhibiteurs anti-domaine C₂ empêchent la



Géraldine Lissalde-Lavigne est médecin biologiste au laboratoire d'hématologie du Groupe Hospitalo-Universitaire de Nîmes. Elle est actuellement en thèse de sciences dans l'unité CNRS-UMR 5160 du Dr Pierre Petit à Montpellier. L'objectif de son travail est d'étudier la caractérisation épitopique des anticorps anti-FVIII chez les patients hémophiles A. L'un des objectifs de son travail est la production, la caractérisation et la recherche d'un rôle potentiel des anticorps dit « non fonctionnels » et notamment les anticorps dirigés contre le domaine B du FVIII.

par injection de FVIII humain exogène de nature recombinante ou plasmatique est utilisé. Ses indications sont le traitement à la demande dès la survenue d'un

FVIII est possible visant à prévenir les hémorragies. Les complications infectieuses iatrogènes sont devenues exceptionnelles. La complication, devenue le problème majeur

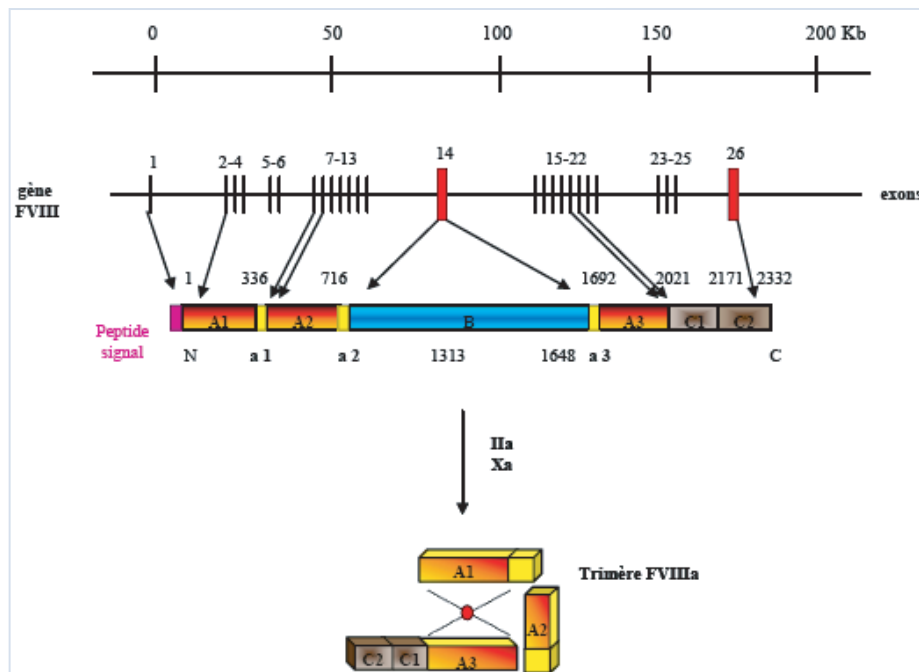


Figure 1: Le facteur VIII: du gène à la protéine Les 26 exons du gène s'étendent sur 186 kilobases (Kb) du bras long du chromosome X (région Xq28) et codent une protéine de 2 351 acides aminés structurée en domaines de trois types A (A₁, A₂ et A₃), B et C (C₁ et C₂). La libération du peptide signal, puis l'activation par différents facteurs de la coagulation aboutissent à la formation du facteur VIII activé (FVIIIa). Dans le plasma le FVIIIa circule sous forme d'un hétérodimère composé d'une chaîne lourde (A₁-a₁-A₂-a₂) et d'une chaîne légère (a₃-A₃-C₁-C₂) (22).

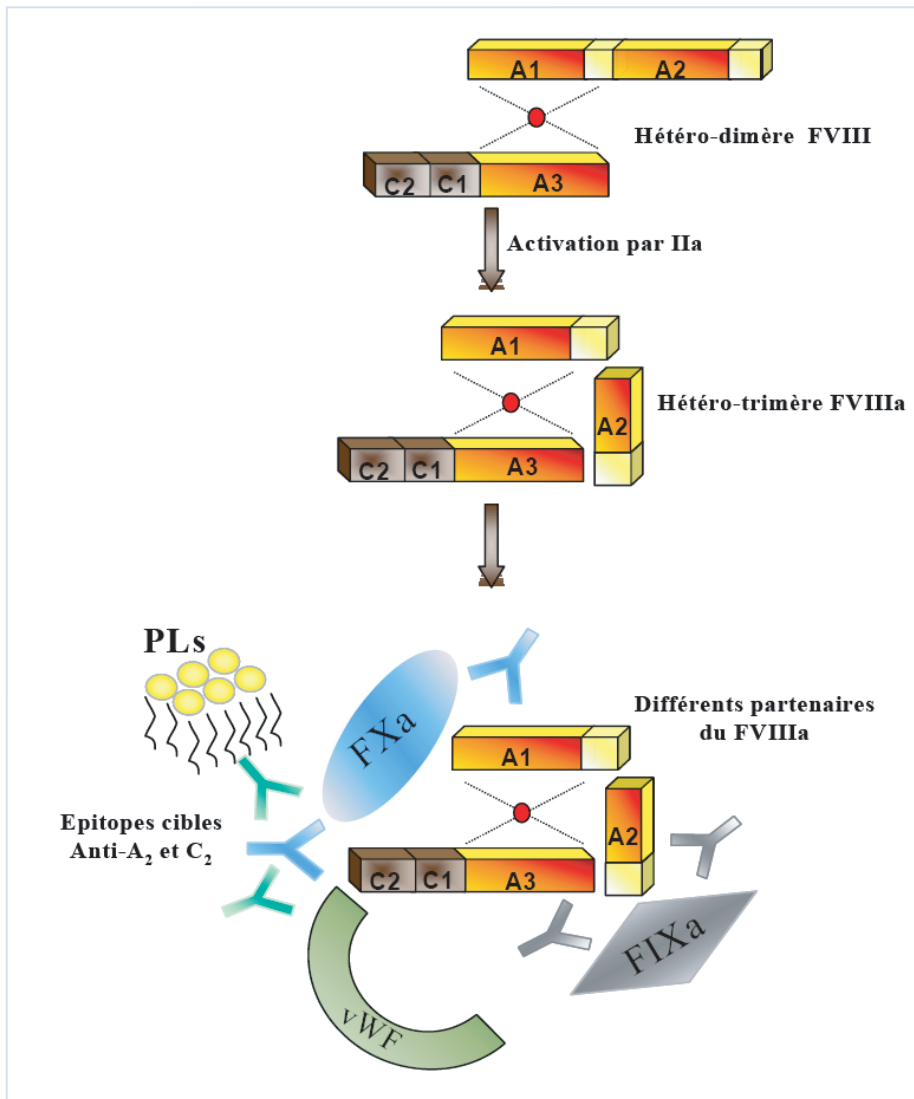


Figure 2: Récapitulatif des différents partenaires du FVIII (4, 24-25) Le FVIII circule dans le plasma sous forme d'hétéro-dimères, avec la chaîne lourde (A₁-A₂-B) et la chaîne légère (A₃-C₁-C₂). Le domaine B est fortement glycosylé, sensible à la protéolyse, il est absent de la molécule de FVIII activé par la thrombine (IIa). FXa: facteur X activé ; FIXa: facteur IX activé; VWF: facteur de Von Willebrand; PLs: phospholipides.

liaison du FVIIIa au VWF et aux PLs d'où une instabilité du FVIIIa dans le premier cas, et une activation insuffisante du FX dans le second (5). Les inhibiteurs anti-A₂ se comportent comme des inhibiteurs du complexe FVIIIa/FIXa/PLs (6). Il existe cependant des anticorps qui n'ont pas d'activité inhibitrice. Ces anticorps peuvent être dirigés contre des épitopes dit « non fonctionnels », par exemple contre les domaines A₁, C₁ et B qui pourraient réduire la stabilité du FVIII (3,7,8). La présence de tels anticorps pourrait expliquer la demi-vie réduite du FVIII transfusé observée après administration à certains patients hémophiles chez lesquels les inhibiteurs sont pourtant indétectables (7). D'autre part, en 1980, Kazatchkine *et al* ont démontré la formation de complexes immuns avec les molécules de FVIII augmentant ainsi sa clairance (9).

Le dépistage d'un inhibiteur se

fait en mesurant le Temps de Céphaline Activé (TCA) d'un mélange plasma malade/témoin incubé 2 h à 37°C. Le titrage de cet inhibiteur est réalisé selon la méthode Bethesda (méthode de référence) où 1 unité Bethesda (UB) est définie comme la quantité d'inhibiteur qui neutralise 50 % du FVIII contenu dans 1 ml de plasma normal (10). Pour pallier le manque de spécificité et de sensibilité de cette méthode pour les anticorps faibles, la méthode Nijmegen a été introduite en 1995 (11): les modifications comportent, d'une part le pH qui est maintenu à 7,4 pour éviter la consommation du FVIII pendant l'incubation; d'autre part, pour l'amélioration du contrôle, en ajoutant un plasma déficient en FVIII qui remplace le tampon. Le seuil de positivité est de 0,6 UB, les inhibiteurs sont classés en faibles répondeurs (≤ 5 UB) et en forts répondeurs (> 5 UB). Les inhibiteurs neutralisent l'activité coagulante du FVIII selon une

cinétique qui dépend à la fois du temps et de la température. A ce jour, les anticorps qui n'ont pas d'action sur les propriétés pro-coagulantes du FVIII, ne sont pas dépistés par la technique Bethesda (7). En revanche, des techniques telles que l'ELISA qui mettent en évidence la liaison des inhibiteurs au FVIII permettent de dépister et de quantifier ces anticorps « non neutralisants » (12-16). Par conséquent une méthode de dépistage à la fois des anticorps inhibiteurs et de ces derniers pourrait apporter des informations supplémentaires pour la prise en charge des patients (15).

● Méthode pour la mesure d'anticorps anti-FVIII « non fonctionnels »

Nous avons mis au point une technique de dosage des anticorps en ELISA pour étudier une plasmathèque de 42 patients hémophiles A avec inhibiteurs suivis au Centre Régional de Traitement des Hémophiles de Montpellier pour lesquels nous disposons d'une recherche d'inhibiteurs avec titrage en Unités Bethesda. Trois groupes ont été constitués: 0,6 à 5 UB; de 5 à 100 UB et de 100 à 2000 UB. Les premiers résultats montrant une trop forte positivité en ELISA pour les forts titres et une difficulté pour mettre en évidence les titres faibles, nous avons choisi différentes dilutions dans ces trois groupes prédéfinis. Cinq dilutions ont été réalisées: 1/50^{ème}, 1/100^{ème}, 1/200^{ème}, 1/500^{ème} et 1/1000^{ème} dans le groupe 1, 1/100^{ème}, 1/200^{ème}, 1/500^{ème}, 1/1000^{ème} et 1/5000^{ème} dans le groupe 2 et 1/500^{ème}, 1/1000^{ème}, 1/5000^{ème}, 1/10000^{ème} et 1/50000^{ème} dans le dernier groupe. Notre analyse rapporte une bonne corrélation ($r^2 = 0,63$ faibles répondeurs $n = 18$; $r^2 = 0,70$ forts répondeurs $n = 23$) entre la technique Bethesda de référence et la technique ELISA (Figure 3). Tous les patients testés ont présenté à la fois une activité inhibitrice (de 0,6 à 2000 UB) et une positivité en ELISA. Ces résultats sont concordants avec les études retrouvées dans la littérature (13,15,16). Toutefois, si l'ELISA semble peu informatif pour les forts titres ≥ 10 UB il peut être intéressant pour les titres < 10 UB. En effet, notre attention s'est portée sur deux plasmas présentant une faible activité inhibitrice (< 1 UB) mais qui présentaient une densité optique (DO) supérieure à 1 (dilution 1/200^{ème}) en ELISA, et pour deux autres plasmas (5-10UB) de fortes DO supérieures à 2 (dilution 1/200^{ème}), qui nous ont fait suspecter la présence d'anticorps « non neutralisants ». Dans notre plasmathèque 9 % des patients présentent des anticorps « non neutralisants ». De plus, nous avons testé 51 plasmas de patients

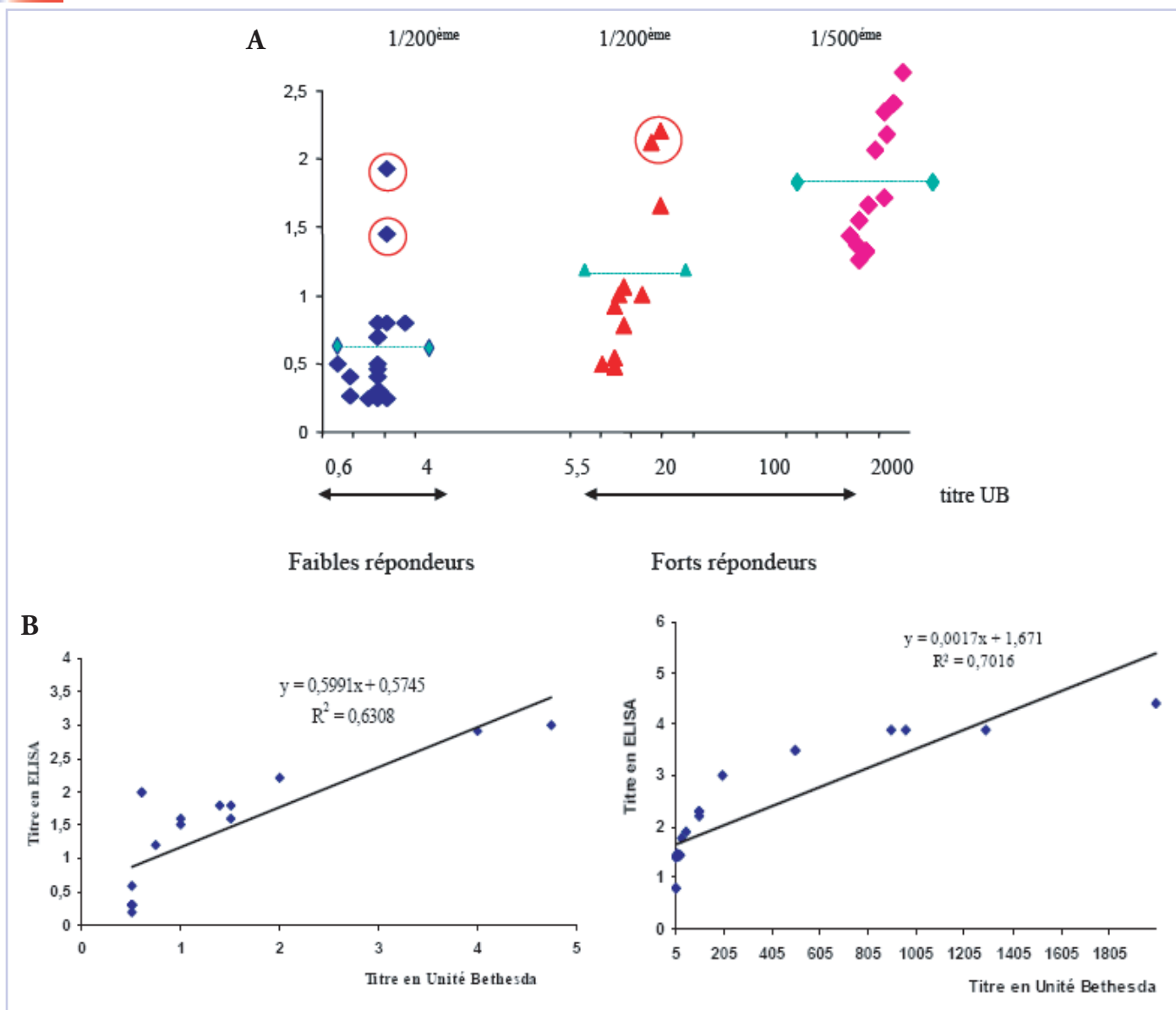


Figure 3: Corrélation ELISA/Bethesda Nous avons constitué un plasmathèque de 42 patients hémophiles A préalablement traités par du FVIII humain d'origine plasmatique ou recombinant au Centre Régional de Traitement des Hémophiles de Montpellier. Il a été réalisé selon la méthode de référence un test Bethesda de titrage des inhibiteurs. En parallèle a été réalisée une recherche d'anticorps anti-FVIII en ELISA (A). Tous les tests ont été réalisés en double, les résultats sont exprimés sur la moyenne des deux tests. Les DO enregistrées en présence de l'anticorps secondaire seul ont été utilisées pour calculer l'attache spécifique. ($r^2 = 0,63$ faibles répondeurs $n = 18$; $r^2 = 0,70$ forts répondeurs $n = 23$). B: En abscisses, les titres en Unité Bethesda; en ordonnées, les titres en ELISA.

hémophiles sans inhibiteurs, et là encore nous retrouvons 8 % d'anticorps anti-FVIII en ELISA, ce qui pourrait évoquer la présence d'anticorps « non neutralisants » chez ces 4 patients. Nos résultats sont concordants avec ceux de l'équipe Ling *et al*, qui ont démontré une faible proportion d'anticorps « non neutralisants » sur une population de 52 patients (13). Parmi ces anticorps nous avons cherché des anticorps dirigés contre le domaine B, en immobilisant sur plaque différentes concentrations (5 et 10 UI/ml) de FVIII délété du domaine B (Refacto donné par Wyeth France). Pour chacun de ces patients nous avons totalement perdu leur positivité en ELISA sur les deux concentrations de Refacto utilisées, alors que la réactivité est conservée

sur un FVIII présentant le domaine B.

Dans notre étude, grâce à l'ELISA, nous proposons de reclasser nos patients en plusieurs sous-groupes: les patients sans inhibiteurs et sans anticorps « non neutralisants »; ceux avec activité inhibitrice et avec des anticorps « non neutralisants », ceux sans activité inhibitrice et avec des anticorps « non neutralisants » et enfin, les patients avec inhibiteurs forts. Dans les deux groupes de patients avec anticorps « non neutralisants », l'ELISA pourrait être utilisé comme outil discriminatif pour différencier ces mêmes anticorps (21). Ainsi on peut se poser la question de l'utilisation préférentielle d'un produit recombinant délété du domaine B en présence d'anticorps dirigés contre ce domaine.

● **REFERENCES**

1. Ehrenforth S et al. Lancet 339, 594, 1992
2. Hoyer LW et al. Clin Biol Res 150, 73, 1984
3. Fulcher CA et al. Blood 69, 1475, 1987
4. Scandella D et al. Vox Sang 77 Suppl S1, 17, 1999
5. Arai M et al. J Clin Invest 83, 1978, 1989
6. Lollar P et al. J Clin Invest 93, 2497, 1994
7. Gilles JG et al. Blood 82, 2452, 1993
8. Jacquemin M et al. Blood 96, 958, 2000
9. Kazatchkine MD et al. Clin Exp Immunol 39, 315, 1980
10. Kasper CK et al. Thromb Diath Haemorrh 34, 875, 1975
11. Verbruggen B et al. Thromb and Hemost 73, 247, 1995
12. Martin PG et al. Clin Lab Haematol 21, 125, 1999
13. Ling M et al. J Thromb and Haemost 1, 2548, 2003
14. Dazzi F et al. Br. J Hematol 93, 688, 1996
15. Mondorf W et al. Vox Sang 66, 8, 1994
16. Towfighi F et al. Haematologica 114, 84, 2005
17. Lenting PJ et al. J Biol Chem 274, 23734, 1999
18. Saenko EL et al. J Biol Chem 274, 37685, 1999
19. Bovenschen N et al. J Biol Chem 278, 9370, 2003
20. Bovenschen N et al. J Thromb and Haemost 3, 1257, 2005
21. Shetty S et al. Acta Haematologica 9, 654, 2003
22. Lenting PJ et al. Blood 92, 3983, 1998
23. Saenko EL et al. J Biol Chem 269, 11601, 1994
24. Saenko EL et al. J Biol Chem 272, 18007, 1997
25. Saenko EL et al. J Biol Chem 271, 27424, 1996