

SUJETS ABORDÉS

- ✓ Dosage des facteurs VIII et IX : méthodes en un temps et chromogéniques
- ✓ Dosages de facteurs sur des analyseurs dont le logiciel n'utilise qu'une dilution
- ✓ Anticorps bispécifiques
- ✓ Surveillance suivant l'injection de facteur VIII ou IX
- ✓ Thérapie génique
- ✓ Considérations biologiques pour le traitement par rééquilibrage de l'hémostase

Dosage des facteurs VIII et IX : méthodes en un temps et chromogéniques. Le diagnostic de l'hémophilie A ou B établi en laboratoire repose sur la mesure de l'activité des facteurs de la coagulation (Srivastava et al., 2020). La méthodologie la plus couramment utilisée est le dosage en un temps sur la base du TCA. Est décrit dans cette section le dosage en un temps de l'activité du facteur VIII. Celui-ci s'appuie sur la comparaison de la capacité des dilutions d'un plasma de référence et du plasma d'un patient à corriger le TCA d'un plasma totalement déficient en facteur VIII, mais contenant tous les autres facteurs nécessaires à une coagulation normale. Pour les facteurs IX, XI et XII, le dosage est essentiellement le même et réalisé en remplaçant le plasma déficient en facteur VIII par un plasma déficient dans le facteur que l'on veut doser. Dans tous les cas, il faut un plasma étalon (Baker et al., 2020). Il est impossible de procéder à un dosage en un temps du facteur VIII ou IX en présence d'anticorps bispécifiques tels que l'émicizumab (Jenkins et al., 2020).

Réactifs :

- ✓ Plasma à tester citraté pauvre en plaquettes
- ✓ Plasma étalon (de référence)

Le plasma étalon (de référence) utilisé doit être soit un pool de plasma préparé en local et conservé à une température de -70 °C au minimum, soit un plasma du commerce. Dans un cas comme dans l'autre, ce plasma doit être calibré par rapport à l'étalon de référence international pour le facteur VIII ou IX dans le plasma. Il n'est pas acceptable de présumer qu'un plasma normal poolé contient 100 UI/dl de facteur.

- ✓ Plasma de contrôle interne de qualité (CLSI, 2016)
- ✓ Plasma déficient en facteur VIII

Ce type de plasma est disponible dans le commerce ou peut être recueilli auprès d'une personne donneuse hémophile dans les conditions suivantes :

- ✓ Taux inférieur à 1 UI/dl
- ✓ Pas d'antécédents d'anticorps antifacteur VIII
- ✓ Aucun traitement pendant deux semaines, y compris par facteur à demi-vie prolongée (DVP) ou par anticorps bispécifiques
- ✓ Bilan hépatique normal

Une fonction hépatique anormale pourrait entraîner une réduction des autres facteurs de coagulation, ce qui nuit à la spécificité du dosage. Ce plasma peut être conservé en aliquotes à -20 °C au minimum

pendant un mois environ (Woodhams et al., 2001 ; Zhao et al., 2018). Il est préférable d'utiliser du plasma déficient en facteur VIII/IX produit par immunodéplétion du facteur VIII ou IX d'un plasma normal au moyen d'un anticorps monoclonal. Ce type de produit est disponible dans le commerce et présente l'avantage d'améliorer la sécurité virologique par rapport au plasma provenant de patients atteints d'hémophilie qui ont été traités avec des produits issus du plasma. Toutefois, tous les plasmas immunodéplétés n'ont pas < 1 UI/dl de facteur et il faut prendre soin de le vérifier avant utilisation. Certains experts estiment que la présence de concentrations normales de FW dans le plasma déficient en facteur VIII/IX peut être un avantage, et des preuves étaient ceci par rapport aux dosages effectués dans le cadre de la détermination des inhibiteurs (Verbruggen et al., 2001).

- ✓ Réactif pour la détermination du TCA sensible aux déficits en facteurs (CLSI, 2016)
- ✓ Solution tampon saline d'Owren (TSO ou glyoxaline ; voir la section sur les réactifs)
- ✓ CaCl_2 25 mM (à noter que le CaCl_2 Werfen fourni avec Synthasil est à 20 mM)

Méthode :

- ✓ Préparer dans des tubes en plastique des dilutions 1/10 des plasmas de référence, de CQ et du patient dans une solution tampon saline. (Commencer par une dilution 1/5 s'il est prévu que le plasma du patient aura une très faible teneur en facteur VIII.)
- ✓ En utilisant des volumes de 0,2 ml, dans des tubes en plastique, préparer dans de la solution TSO des dilutions géométriques de plasma de référence, de CQ et à tester allant de 1/10 à 1/40. (Bien mélanger chaque dilution avant de faire le transfert vers le tube suivant.) Les dilutions de plasmas doivent être analysées immédiatement après leur préparation. Si la température du laboratoire dépasse 25 °C, il peut être nécessaire de conserver les dilutions sur de la glace fondante avant de procéder à l'analyse.
- ✓ Pipeter 0,1 ml de chaque dilution du plasma de référence dans un tube en verre de 75 × 10 mm.
- ✓ Ajouter 0,1 ml de plasma déficient en facteur VIII et transférer le tube dans un bain-marie à 37 °C.
- ✓ Ajouter 0,1 ml de réactif de TCA et incuber pendant cinq minutes.
- ✓ Une fois les cinq minutes écoulées, ajouter 0,1 ml de CaCl_2 et noter le temps de coagulation.
- ✓ Un blanc doit aussi être préparé en utilisant 0,1 ml de TSO à la place du plasma à tester.

Le temps de coagulation du blanc doit être supérieur au temps correspondant à un taux de 1 % d'activité en facteur VIII de l'étalon selon le graphique de l'étalonnage. Si le temps obtenu lui est inférieur, ceci indique que le plasma déficient n'est pas entièrement déficient en facteur VIII et par conséquent ne convient pas.

Résultats : la courbe d'étalonnage doit être tracée sur du papier log/log ou du papier log/linéaire. Une valeur de 100 % est arbitrairement assignée à la dilution 1/10, une valeur de 50 % à la dilution 1/20 et une valeur de 25 % à celle de 1/40. La dilution 1/5, si elle est utilisée, a une valeur de 200 %. On doit obtenir des lignes droites, parallèles entre elles. Lire la concentration de l'échantillon à tester comme indiqué à la figure 7. Dans cet exemple, la concentration en facteur VIII dans l'échantillon à tester est de 7 % de celle de l'étalon. Si l'étalon a une concentration en facteur VIII de 85 UI/dl, l'échantillon à tester a une concentration de $85 \text{ UI/dl} \times 7\% = 6 \text{ UI/dl}$. Si les droites ne sont pas parallèles, le dosage doit être répété. Des droites non parallèles peuvent résulter d'erreurs techniques. Si l'erreur technique est exclue, il est possible que ces droites soient dues à la présence d'un inhibiteur qui peut agir spécifiquement contre le facteur VIII, ou qui peut être de « type lupique », donnant une image convergente. Des droites divergentes sont typiques d'un échantillon activé ou de la présence d'un AOD (Baker et al., 2020).

Remarques : si la concentration en facteur VIII (ou facteur IX) dans le plasma à tester est proche de zéro (c'est-à-dire que les temps de coagulation de toutes les dilutions sont semblables à celui du blanc), des droites non parallèles peuvent être obtenues. La présence d'anticoagulant de type lupique peut interférer avec les phospholipides dans les réactifs de TCA et produire des dosages de facteurs non parallèles (Ruinemans-Koerts et al., 2001). La plage normale doit être établie localement, mais a souvent une limite inférieure comprise entre 50 et 65 UI/dl pour les facteurs VIII et IX. La surveillance fiable de certains

produits à demi-vie prolongée par un dosage en un temps peut être affectée par le réactif de TCA utilisé (Gray *et al.*, 2020). Voir la partie 6 sur la demi-vie prolongée. Les dosages en un temps du facteur VIII ou IX ne peuvent pas être effectués en présence d'anticorps bispécifiques tels que l'émicizumab. Ces médicaments raccourcissent artificiellement le TCA. Un temps de coagulation court dans un dosage en un temps correspond à une forte activité des facteurs de la coagulation (Jenkins *et al.*, 2020 ; Bowyer *et al.*, 2020 ; Bowyer *et al.*, 2023). Voir la partie 6 sur les anticorps bispécifiques. Une divergence du dosage chromogénique en un temps du facteur VIII a été décrite dans l'hémophilie A mineure dans certaines régions, et rarement dans l'hémophilie B mineure (Pouplard *et al.*, 2009). Si cela est possible, un nouveau diagnostic d'hémophilie mineure devrait s'accompagner de la mesure de FVIII:C ou FIX:C par le test chromogénique (Bowyer *et al.*, 2018). Les dosages en un temps du facteur VIII peuvent servir à mesurer le traitement par facteur VIII porcin recombinant (Bowyer *et al.*, 2022). Il a été rapporté qu'une mutation du facteur IX, FIX Padoue (p.R338L), aurait une activité huit fois plus élevée que l'antigène (Simioni *et al.*, 2009).

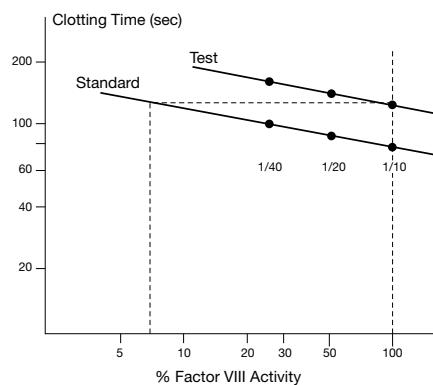


Figure 7. Graphique du dosage du facteur VIII

Les échantillons à tester doivent être analysés à l'aide de trois dilutions différentes, comme décrit ci-dessus. Il s'agit d'une recommandation systématique des lignes directrices nationales et internationales publiées, y compris celles de la FMH. Cela améliore à la fois l'exactitude et la fidélité du dosage par rapport au recours à une simple dilution de l'échantillon à tester. Les dosages des facteurs sont parfois effectués sur des analyseurs dont le logiciel est conçu pour tester une seule dilution. La section suivante décrit une méthode pouvant servir à inclure trois dilutions sur ce type d'analyseurs.

Réalisation de dosages de facteurs sur des analyseurs dont le logiciel utilise une seule dilution de l'échantillon à tester : la FMH recommande que les dosages en un temps basés sur le TCA pour les facteurs VIII et IX soient effectués à l'aide de trois dilutions différentes de l'échantillon à tester. Cela est décrit dans le document suivant :

Lignes directrices de la FMH pour la prise en charge de l'hémophilie, 3^e édition. Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, Kitchen S, Sutherland M, Pipe SW, Carcao M, Mahlangu J, Ragni MV, Windyga J, Llinás A, Goddard NJ, Mohan R, Poonnoose PM, Feldman BM, Lewis SZ, van den Berg HM, Pierce GF ; chapitre 3 : Diagnostic et contrôle en laboratoire. Steve Kitchen, Francisco de Paula Careta, Silmara A de Lima Montalvao, Emna Gouider, Radoslaw Kaczmarek, Claude T. Tagny, Pierre Toulon, Glenn F. Pierce, Alok Srivastava. Haemophilia 2020; 26 (Suppl 1): 35-48.

Le document complet est disponible en téléchargement gratuit sur le site Web de la FMH via le lien suivant :

[Lignes directrices de la FMH pour la prise en charge de l'hémophilie - Plateforme d'apprentissage en ligne \(wfh.org\)](https://www.wfh.org/learning-platform/2020-hemophilia-care-practice-standards)

Le texte suivant est repris des lignes directrices de la FMH :

Recommandation : Pour l'examen en laboratoire en raison d'une suspicion clinique d'hémophilie en utilisant des dosages de facteur VIII ou IX en un temps, la FMH recommande au moins trois dilutions différentes du plasma de référence et de l'échantillon test en cours d'analyse.

REMARQUE : les résultats des dilutions du plasma de référence et de l'échantillon test doivent être comparés par analyse parallèle. Une des façons de procéder est de calculer le coefficient de variation (CV) des trois résultats en utilisant l'équation suivante : $CV = ([\text{écart type}/\text{moyenne}] \times 100)$. Si le coefficient de variation est inférieur à 15 %, il faut alors indiquer la moyenne des trois résultats. Si le coefficient est supérieur à 15 %, il convient d'examiner minutieusement les résultats. La présence d'inhibiteurs pathologiques des facteurs de coagulation ou d'anticoagulants de type lupique peut interférer avec certains dosages de facteur VIII ou IX en un temps. Certains anticoagulants thérapeutiques peuvent également interférer. Dans tous les cas, l'activité des facteurs augmente au cours du test au fur et à mesure de la dilution du plasma. L'activité du facteur est sous-estimée lorsque le plasma est moins dilué, et un résultat d'activité plus précis est obtenu lorsque le plasma test est plus dilué.

Les principes ci-dessus doivent également être appliqués aux dosages en un temps d'autres facteurs de coagulation (c.-à-d. FII, FV, FVII, FX, FXI et FXII). Certains analyseurs sont dotés d'un logiciel qui permet plusieurs dilutions de l'échantillon à tester. Ainsi, l'échantillon à tester est présenté pour analyse et l'analyseur établit les différentes dilutions, procède à l'analyse et calcule l'activité du facteur de coagulation concerné. D'autres analyseurs disposent d'un logiciel qui ne permet qu'une seule dilution de l'échantillon. Sur ces analyseurs, il est possible d'utiliser la procédure ci-dessous afin de respecter les recommandations de la FMH et d'améliorer l'exactitude et la fidélité.

Les exemples donnés concernent les dosages du facteur VIII, mais peuvent être utilisés pour des dosages en un temps d'autres facteurs.

- ✓ Les échantillons à tester sont fournis à l'analyseur non dilués (c'est-à-dire sans aucune prédilution par l'opérateur).
- ✓ L'échantillon à tester est prédilué à 1/2 par l'opérateur, de préférence à l'aide du même tampon que celui utilisé par l'analyseur (tampon d'Owen la plupart du temps).
- ✓ Cela peut être fait dans n'importe quel tube ou flacon en plastique qui peut être utilisé dans l'analyseur et qui ne provoque pas l'activation de l'échantillon à tester.
- ✓ L'échantillon à tester est prédilué à 1/4 à l'aide du même tampon que celui utilisé par l'analyseur (voir les points 2 et 3 ci-dessus).
- ✓ Cela signifie que l'analyseur reçoit trois matériaux différents dérivés du même échantillon.
- ✓ L'analyseur est ensuite programmé pour exécuter un dosage du facteur VIII sur chacun de ces trois matériaux (c.-à-d. échantillon à tester non dilué, prédilué à 1/2 et prédilué à 1/4).
- ✓ On obtient un résultat de facteur VIII sur l'échantillon à tester non dilué.
- ✓ Un autre résultat est obtenu sur l'échantillon prédilué à 1/2. Il doit être multiplié par 2 pour corriger la prédilution.
- ✓ Un autre résultat est obtenu sur l'échantillon prédilué à 1/4. Il doit être multiplié par 4 pour corriger la prédilution.
- ✓ Les trois chiffres sont ensuite comparés par l'opérateur.
- ✓ De manière générale, les trois chiffres sont très proches les uns des autres. Si tel est le cas, l'opérateur peut calculer et communiquer la moyenne des trois chiffres comme étant l'activité du facteur VIII de l'échantillon à tester.
- ✓ Parfois, les trois chiffres sont divergents. Cela peut se produire si l'échantillon contient des substances interférentes ou si la coagulation a été activée dans l'échantillon (peut-être en raison de difficultés lors du prélèvement).
- ✓ Il revient à l'opérateur de décider s'il est sûr d'utiliser la moyenne des trois réponses différentes obtenues.

- ✓ La FMH recommande d'utiliser une simple évaluation mathématique pour décider.
- ✓ Il faut pour cela calculer le CV des trois résultats différents.
- ✓ La moyenne de ces trois résultats peut être utilisée en toute sécurité si le CV est < 15 %.
- ✓ Le fait d'utiliser la moyenne de cette manière améliore la fidélité du test.
- ✓ Si le CV est supérieur à 15 %, l'opérateur a plus de décisions à prendre.
- ✓ Lorsque le taux de facteur est compris entre 10 et 15 UI/dl, le CV des trois dilutions est plus élevé que lorsque l'activité du facteur est à des taux supérieurs. Dans ces échantillons, un CV de 20 % est acceptable.
- ✓ Lorsque le taux de facteur est inférieur à 5 UI/dl, une prédilution de 1/4 peut réduire l'activité du facteur en dessous de la limite inférieure de quantification, en fonction des réactifs. Dans ces échantillons, il est acceptable de tester uniquement l'échantillon non dilué et l'échantillon prédilué à 1/2. Dans ces circonstances, le laboratoire doit communiquer la moyenne des deux résultats (après avoir multiplié par deux le résultat de l'analyseur pour la dilution 1/2), sans calculer le CV.
- ✓ Pour les échantillons dont le facteur VIII est > 15 UI/dl, si le CV est > 15 % et que le résultat sur le plasma non dilué est inférieur aux résultats de la troisième dilution, cela indique qu'il pourrait y avoir une substance interférente dans l'échantillon à tester. Dans ce cas, le résultat obtenu pour la dilution 1/4 (après multiplication du résultat de l'analyseur par quatre pour corriger la prédilution) sera le plus exact (cf. exemples ci-après).
- ✓ Des exemples de substances interférentes à l'origine de ce résultat faussement faible dans les échantillons non dilués sont les inhibiteurs tels que l'anticoagulant de type lupique, l'HNF, les IDT ou les inhibiteurs directs du facteur Xa.
- ✓ L'utilisation d'une seule dilution peut entraîner des résultats faussement faibles et des dosages excessivement inexacts.

Quelques exemples sont donnés ci-dessous.

Tableau 12. Exemple 1 - Dosage du facteur VIII avec prédilution manuelle

	Activité du FVIII enregistrée par l'analyseur	Activité du FVIII après correction pour prédilution	Commentaires
Échantillons à tester sans prédilution	25 UI/dl (%)	25 UI/dl (%)	Pas de prédilution par l'opérateur, donc le résultat ne change pas
Échantillons dilués à 1/2 avant l'analyse	13,5 UI/dl (%)	27 UI/dl (%)	Résultat de l'analyseur multiplié par 2
Échantillons dilués à 1/4 avant l'analyse	6 UI/dl	24 UI/dl (%)	Résultat de l'analyseur multiplié par 4

- ✓ La moyenne de trois résultats est de 25,3 UI/dl (%).
- ✓ L'écart type des trois résultats est de 1,53.
- ✓ Le CV des trois résultats est de 6,0 %.
- ✓ Le CV est < 15 %, donc le résultat rapporté est de **25,3 UI/dl (%)**.

Tableau 13. Exemple 2 - Dosage du facteur VIII avec prédilution manuelle

	Activité du FVIII enregistrée par l'analyseur	Activité du FVIII après correction pour prédilution	Commentaires
Échantillons à tester sans prédilution	62 UI/dl (%)	62 UI/dl (%)	Pas de prédilution par l'opérateur, donc le résultat ne change pas
Échantillons dilués à 1/2 avant l'analyse	33 UI/dl (%)	66 UI/dl (%)	Résultat de l'analyseur multiplié par 2
Échantillons dilués à 1/4 avant l'analyse	13 UI/dl	52 UI/dl (%)	Résultat de l'analyseur multiplié par 4

- ✓ La moyenne de trois résultats est de 60,0 UI/dl (%).
- ✓ L'écart type des trois résultats est de 7,2.
- ✓ Le CV des trois résultats est de 12,0 %.
- ✓ Le CV est < 15 %.
- ✓ Le résultat rapporté est de **60,0 UI/dl (%)**.

Tableau 14. Exemple 3 - Dosage du facteur VIII avec prédilution manuelle

	Activité du FVIII enregistrée par l'analyseur	Activité du FVIII après correction pour prédilution	Commentaires
Échantillons à tester sans prédilution	7,0 UI/dl (%)	7,0 UI/dl (%)	Pas de prédilution par l'opérateur, donc le résultat ne change pas
Échantillons dilués à 1/2 avant l'analyse	3,0 UI/dl (%)	6,0 UI/dl (%)	Résultat de l'analyseur multiplié par 2
Échantillons dilués à 1/4 avant l'analyse	2,1 UI/dl	8,4 UI/dl (%)	Résultat de l'analyseur multiplié par 4

- ✓ La moyenne de trois résultats est de 7,1 UI/dl (%).
- ✓ L'écart type des trois résultats est de 7,1.
- ✓ Le CV des trois résultats est de 16,9 %.
- ✓ Le CV est < 20 %.
- ✓ Le résultat rapporté est de **7,1 UI/dl (%)**.

Tableau 15. Exemples de substances interférentes présentes, les résultats du dosage du FVIII sont en UI/dl (%)

Interférence	Sans prédilution	Prédilution 1/2		Prédilution 1/4		Résultats utilisés pour calculer le CV	CV
		Résultat de l'analyseur	Résultat corrigé par l'opérateur	Résultat de l'analyseur	Résultat corrigé par l'opérateur		
Inhibiteur direct de la thrombine	46,5	34,0	68,0	18,5	74,0	46,5, 68,0, 74,0	23,0 %
Rivaroxaban	64,0	45,2	90,4	29,1	116,4	64,0, 90,4, 116,4	29,0 %
Anticoagulant lu-pique	25,3	19,3	38,6	16,2	64,8	25,3, 38,6, 64,8	46,8 %

- ✓ À noter que des schémas similaires se produisent dans d'autres dosages en un temps, du facteur IX entre autres.
- ✓ Les trois ont un CV > 15 %.
- ✓ Les effets de ces substances interférentes sont généralement moins marqués dans la dilution 1/4 que dans l'échantillon non dilué ou dans l'échantillon prédilué à 1/2.
- ✓ Il est possible que le résultat pour l'échantillon 1/4 soit encore sous-estimé, mais il est le plus proche d'un résultat exact des trois tests effectués. Dans de tels cas, il peut également être utile d'ajouter une prédilution 1/8 comme quatrième test.
- ✓ Les résultats à communiquer à partir des exemples du tableau pourraient être > 74 UI/dl (%), > 116,4 UI/dl (%) ou > 64,8 UI/dl (%).

Les trois échantillons analysés dans cet exemple ont tous une activité du facteur VIII qui n'est pas en dessous de la plage normale. La simple confirmation que l'activité n'est pas réduite suffit parfois à une prise en charge sûre du patient.

Dosages chromogéniques de FVIII:C et FIX : le diagnostic de l'hémophilie A ou B établi en laboratoire repose sur la mesure de l'activité des facteurs de la coagulation (Srivastava *et al.*, 2020). La méthodologie la plus couramment utilisée est le dosage en un temps sur la base du TCA. Le dosage en un temps comporte des limites, notamment les interférences en présence d'anticoagulants de type lupique, d'anticoagulants oraux directs (AOD) ou de traitements de l'hémophilie à demi-vie prolongée, y compris des anticorps bispécifiques (Gray *et al.*, 2020 ; Jenkins *et al.*, 2020 ; Bowyer *et al.*, 2021 ; Moser *et al.*, 2021 ; Ruinemans-Koerts *et al.*, 2010). Plus important encore, l'hémophilie A mineure n'est pas exclue par la constatation d'un FVIII:C (et rarement FIX:C) normal dans dosage en un temps (Pouplard *et al.*, 2009). Plusieurs groupes ont signalé qu'un sous-ensemble de patients atteints d'hémophilie A mineure présentait des divergences dans l'activité du facteur VIII quand elle était mesurée par différents types de tests (Pavlova *et al.*, 2014). Plus de 20 % des patients atteints d'hémophilie A mineure sont associés à un écart dans lequel l'activité chromogénique est deux fois (voire plus) plus faible que le dosage en un temps et le phénotype hémorragique est proportionnel au dosage utilisant un substrat chromogénique (Bowyer *et al.*, 2018). Une forme inverse d'écart de dosage peut également se produire avec un FVIII:C deux fois plus faible (voire plus) par le dosage en un temps que par le dosage utilisant un substrat chromogénique. Les rapports de saignements sont beaucoup moins nombreux chez ces patients (Bowyer *et al.*, 2018 ; Bowyer *et al.*, 2011). Des résultats de ces patients sont fournis en exemple au tableau 16.

Tableau 16. Exemples de patients atteints d'hémophilie A mineure confirmée génétiquement et de divergences de dosage

Cas	Dosage en un temps (UI/dl)	Dosage chromogénique (UI/dl)
A	101	13
B	88	28
C	15	69
D	55	40
E	58	33
F	72	36
G	84	45

Au vu de ces résultats, il est souhaitable que tous les centres d'hémophilie aient à disposition un dosage chromogénique du facteur VIII. Celui-ci doit être pratiqué chez des sujets dont le TCA et l'activité du facteur VIII dosée en un temps sont normaux en présence d'antécédents personnels ou familiaux qui correspondent à une hémophilie mineure. Les dosages chromogéniques du facteur VIII ont été introduits pour la première fois au début des années 1980 (Rosen *et al.*, 1984), et de nombreux fabricants vendent des trousse commerciales à cet effet. La plupart de ces trousse conviennent pour le diagnostic de l'hémophilie A lorsque l'activité du facteur VIII est normale avec le dosage en un temps. Un petit nombre de dosages chromogéniques du facteur IX sont disponibles depuis le milieu des années 2010 et se limitent principalement à la recherche ou à des laboratoires spécialisés en hémostase (Kershaw *et al.*, 2018). Une divergence du dosage chromogénique en un temps du facteur IX a été décrite dans l'hémophilie B mineure, mais la divergence semble compromettre la classification de la sévérité, entre hémophilie B modérée et mineure (Pouplard *et al.*, 2009 ; Truedsson *et al.*, 2020).

Principe de l'analyse pour le dosage utilisant un substrat chromogénique du facteur VIII : de nombreux coagulomètres automatisés ont la capacité d'effectuer le dosage chromogénique, mais comme ces dosages étaient initialement réalisés manuellement à l'aide de plaques de microtitration, il est toujours possible d'utiliser une méthode manuelle. Dans certains dosages chromogéniques (mais pas tous), la totalité du facteur VIII présent dans l'échantillon est activé par la thrombine. Le facteur VIII activé accélère alors la conversion de facteur X en facteur Xa en présence de facteur IX activé, de phospholipides et d'ions calcium. L'activité du facteur Xa est évaluée par hydrolyse d'un substrat spécifique au facteur Xa contenant de la p-nitroaniline. La vitesse initiale de libération de p-nitroaniline (couleur jaune) mesurée à 405 nm est proportionnelle à l'activité du facteur Xa, et donc à l'activité du facteur VIII dans l'échantillon.

Les résultats du plasma du patient et de l'échantillon de contrôle qualité sont comparés au plasma de référence (étalon) pour quantifier le dosage chromogénique en utilisant les mêmes principes que le dosage en un temps (Baker et al., 2020). Les protéines utilisées dans les trousse de dosage chromogénique du facteur VIII peuvent être d'origine humaine ou bovine. Pour la mesure de FVIII:C endogène, ou le traitement par facteur VIII à demi-vie standard ou prolongée, la source de protéines n'affecte pas le dosage chromogénique. Elle est importante lorsque des anticorps bispécifiques sont présents dans le plasma (voir la partie 6 sur les anticorps bispécifiques).

Principe de l'analyse pour le dosage utilisant un substrat chromogénique du facteur IX : dans certains dosages chromogéniques du facteur IX (mais pas tous), la totalité du facteur IX présent dans l'échantillon est activé par le facteur Xla. Le facteur IX activé accélère alors la conversion de facteur X en facteur Xa en présence de facteur VIII activé, de phospholipides et d'ions calcium. L'activité du facteur Xa est évaluée par hydrolyse d'un substrat spécifique au facteur Xa contenant de la p-nitroaniline. La vitesse initiale de libération de p-nitroaniline (couleur jaune) mesurée à 405 nm est proportionnelle à l'activité du facteur Xa, et donc à l'activité du facteur IX dans l'échantillon, comme décrit ci-dessus.

Remarques : si la concentration en facteur VIII (ou facteur IX) dans le plasma à tester est proche de zéro (c'est-à-dire que la densité optique de toutes les dilutions est semblable à celle du blanc), des droites non parallèles peuvent être obtenues. La plage normale doit être établie localement, mais a souvent une limite inférieure comprise entre 50 et 65 UI/dl pour les facteurs VIII et IX. Le dosage chromogénique du facteur IX peut ne pas mesurer avec exactitude la récupération de certains produits de facteur IX à demi-vie prolongée (Gray et al., 2020 ; Bowyer et al., 2022). Les dosages chromogéniques peuvent être utilisés pour mesurer l'effet mimétique dans le plasma contenant des anticorps bispécifiques (Jenkins et al., 2020 ; Bowyer et al., 2020 ; Bowyer et al., 2023). Le dosage chromogénique du facteur VIII contenant du facteur X bovin peut servir à mesurer le traitement par facteur VIII recombinant dans le plasma contenant également des anticorps bispécifiques. Si cela est possible, un nouveau diagnostic d'hémophilie A ou B mineure devrait s'accompagner de la mesure de FVIII:C ou FIX:C par le test chromogénique (Bowyer et al., 2018). Il convient de faire preuve de prudence lors de l'utilisation d'un dosage chromogénique pour mesurer le facteur VIII porcin recombinant, car une sous-estimation est possible (Bowyer et al., 2022). Le dosage chromogénique du facteur IX peut sous-estimer les traitements par facteur IX recombinant à demi-vie standard (Nederlof et al., 2020).

Mesure des molécules de facteur VIII et IX à demi-vie prolongée : des modifications ont été apportées au facteur VIII ou IX recombinant pour allonger la demi-vie *in vivo* du traitement en agissant sur la conformation de la molécule. L'extension peut être réalisée par ajout de fractions de polyéthylène glycol (PEG), liaison covalente des chaînes lourdes et légères du facteur VIII, fusion à l'albumine ou fusion covalente à la partie Fc (fragment cristallisable) de l'IgG1 humaine. La surveillance suivant l'injection de concentrés de facteur VIII ou IX recombinant à demi-vie prolongée est indispensable pour la prise en charge clinique du patient atteint d'hémophilie. Une réponse plus faible que prévue ou une demi-vie réduite peut indiquer la nécessité d'un traitement supplémentaire ou le développement possible d'anticorps antimédicaments. Les études de laboratoire menées au cours des essais pharmaceutiques de chaque facteur à demi-vie prolongée ont mis en évidence des problèmes liés à l'exactitude de mesure de certaines molécules. Une surestimation ou une sous-estimation a été signalée avec certains facteurs VIII ou IX à demi-vie prolongée, mais cela dépendait de la méthodologie ou du TCA utilisé dans le dosage en un temps. La méthode de modification des molécules n'est pas prédictive de la réponse du dosage des facteurs, de sorte qu'une surveillance étroite des trois molécules de FVIII PEGylées peut ne pas être possible avec les mêmes réactifs du TCA. Pour les molécules de FVIII à demi-vie prolongée actuellement autorisées, les dosages chromogéniques de l'activité du facteur VIII sont tous considérés comme appropriés pour une surveillance fiable. Toutefois, pour le dosage en un temps, cela peut dépendre du réactif. Pour les molécules de FIX à demi-vie prolongée, il n'existe pas de méthodologie ou de réactif unique permettant de mesurer avec exactitude les trois concentrés actuellement autorisés. Un concentré à très longue demi-vie, rFVIII-FC-VWF-XTEN, éfanésoctocog alfa (Altuviiio/Altuvoc), a reçu l'autorisation réglementaire en 2023 pour

les États-Unis et en 2024 pour l'Europe. Une surveillance est recommandée, par le dosage en un temps du facteur VIII à l'aide d'un réactif du TCA particulier, Siemens Actin FSL. Les réactifs de TCA courants, Siemens Actin FS et Werfen Synthasil, ont respectivement surestimé et sous-estimé l'éfanésoctocog alfa. Les dosages chromogéniques du facteur VIII surestiment de deux à trois fois l'activité attendue (Pipe, 2009). Il est donc nécessaire de soigneusement évaluer si les dosages disponibles dans chaque laboratoire d'hémostase sont appropriés pour une surveillance fiable de chaque produit à demi-vie prolongée utilisé comme traitement avec facteur de remplacement dans leur centre. Les tableaux 17 et 18 donnent des exemples de concentrés de rFVIII et rFIX à demi-vie prolongée, et indiquent comment la puissance du produit a été attribuée et si le dosage en un temps ou le dosage utilisant un substrat chromogénique est acceptable pour la surveillance post-injection.

Tableau 17. Molécules de facteur VIII à demi-vie prolongée

Nom	Société	Molécule	Attribution de la puissance	En un temps	Chromogénique	Références
Adynovi/ Adynovate rurioctocog alfa pégal	Takeda	FVIII 2 × 10 kDa PEG	Chromogénique	Divers résultats	Oui	Turecek <i>et al.</i> , 2016 Bulla <i>et al.</i> , 2017
Afstyla ionoctocog alfa	CSL Behring	FVIII délégué du domaine B à chaîne unique	Chromogénique	Les résultats sont d'environ la moitié du dosage chromogénique	Chromogénique	Bowyer <i>et al.</i> , 2017 St Ledger <i>et al.</i> , 2018
Elocta/ Eloctate efmoroctocog	Sobi	FVIII fusionné au Fc	Chromogénique	Oui	Oui	Sommer <i>et al.</i> , 2014 Powell <i>et al.</i> , 2012 Pouplard <i>et al.</i> , 2020
Esperoct turoctocog alpha pégal	Novo Nordisk	rFVIII à domaine B tronqué 40 kDa PEG	Chromogénique	Divers résultats	Oui	Pickering <i>et al.</i> , 2016 Hillarp <i>et al.</i> , 2017
Jivi damoctocog alfa pégal	Bayer	rFVIII délégué du domaine B 60 kDa PEG	Chromogénique	Pas de réactifs du TCA à base de silice ou de kaolin	Oui	Gu <i>et al.</i> , 2014 Church <i>et al.</i> , 2018
Altvocet/ Altvio éfanésoctocog alfa	Sanofi	rFVIII FC- VWF-XTEN	En un temps	Actin FSL recommandé	Surestimation fois 2 ou 3	Pipi <i>et al.</i> , 2024

Tableau 18. Molécules de facteur IX à demi-vie prolongée

Nom	Société	Molécule	Attribution de la puissance	En un temps	Chromogénique	Références
Alprolix eftrénacog	Sobi	rFIX fusionné au Fc	En un temps	Pas certains réactifs du TCA à base de silice ou de kaolin	Oui	Sommer <i>et al.</i> , 2014 Bowyer <i>et al.</i> , 2019 Persson <i>et al.</i> , 2018
Idelvion albutrépénacog	CSL Behring	rFIX fusionné à l'albumine	En un temps	Divers résultats	Non	Persson <i>et al.</i> , 2018 St Ledger <i>et al.</i> , 2016 Kitchen <i>et al.</i> , 2017 Horn <i>et al.</i> , 2019 Pouplard <i>et al.</i> , 2019
Refixia/Rebinyn nonacog bêta pégol	Novo Nordisk	rFIX 40 kDa PEG	En un temps	Cephascreen et Synthafax vali-dés uniquement	Oui	Bowyer <i>et al.</i> , 2016 Tiefenbacher <i>et al.</i> , 2017 Young <i>et al.</i> , 2016

Anticorps bispécifiques

Mesure des anticorps bispécifiques : les anticorps bispécifiques sont une classe de traitement sans facteur de remplacement de l'hémophilie A. Ils agissent comme un lien entre le facteur IXa et le facteur X humains, en l'absence de facteur VIII, pour promouvoir l'activation du facteur X. Les anticorps bispécifiques diffèrent du facteur VIII natif par un certain nombre d'aspects intrinsèques, dont un manque de mécanismes de régulation, ce qui a un impact sur les bilans d'hémostase (Lenting *et al.*, 2017). Les futures générations d'anticorps bispécifiques, plus puissantes, pourraient avoir un impact plus important sur les bilans d'hémostase (Bowyer *et al.*, 2023).

Temps de céphaline activée et anticorps bispécifiques : les anticorps bispécifiques ne nécessitent pas d'activation pour participer à l'activation du facteur X. En présence d'anticorps bispécifiques, le TCA est considérablement raccourci, souvent en dessous de la limite inférieure de la plage de référence (Bowyer *et al.*, 2020 ; Bowyer *et al.*, 2023). Le TCA n'est pas suffisamment sensible aux variations de la concentration des anticorps bispécifiques pour être utilisé dans le suivi de ces traitements, mais un allongement du TCA chez un patient où il était précédemment court peut indiquer une perte d'efficacité ou d'observance (Druzgal *et al.*, 2020 ; Valsecchi *et al.*, 2021).

Dosage en un temps et anticorps bispécifiques : en présence d'anticorps bispécifiques, les dosages à base de TCA calibrés selon un standard relatif aux produits plasmatiques, y compris les facteurs VIII, IX, XI et XII, la protéine C, la protéine S et le temps de coagulation activé, surestiment la quantité de facteur de coagulation ou d'inhibiteur naturel, et leur utilisation n'est donc pas adaptée (Bowyer *et al.*, 2023 ; EMA, 2018).

Dosage en un temps modifié du facteur VIII et anticorps bispécifiques : un étalon (référence) commercial spécifique au produit et des plasmas de contrôle qualité sont disponibles pour la première génération

d'anticorps bispécifiques. Le dosage du facteur VIII en un temps peut être modifié à l'aide de ces étalons spécifiques au produit parallèlement à une dilution accrue du plasma (dilutions de 1/40 ou 1/80 au lieu de 1/10) pour mesurer la concentration médicamenteuse de l'anticorps bispécifique en µg/ml. Ce dosage modifié mesurera aussi tout facteur VIII endogène ou de remplacement présent dans le plasma (Bowyer et al., 2020).

Dosage chromogénique du facteur VIII et anticorps bispécifiques : les dosages chromogéniques du facteur VIII qui contiennent des facteurs X et IXa humains sont sensibles à la présence d'anticorps bispécifiques et mesurent une certaine activité « mimétique ou de substitution » ressemblant à celle du facteur VIII (Bowyer et al., 2020 ; Bowyer et al., 2023). Le dosage chromogénique humain peut être utilisé comme marqueur de la présence d'anticorps bispécifiques chez les patients sous prophylaxie. Cela n'est pas interchangeable avec la concentration médicamenteuse détaillée ci-dessus. Le dosage chromogénique humain mesurera également tout facteur VIII endogène ou de remplacement présent dans le plasma (Bowyer et al., 2020). Les dosages chromogéniques du facteur VIII qui contiennent du facteur X bovin ou du facteur IXa humain ou bovin sont insensibles à la présence d'anticorps bispécifiques de première génération, mais peuvent montrer une certaine sensibilité aux anticorps bispécifiques de nouvelle génération (Bowyer et al., 2020 ; Bowyer et al., 2023). Le dosage chromogénique du facteur X bovin doit être utilisé pour mesurer tout facteur VIII endogène ou traitement par remplacement du facteur VIII et pour mesurer le facteur VIII résiduel dans le dosage des inhibiteurs selon la méthode de Bethesda comme détaillé ci-dessous.

Dosage des inhibiteurs selon la méthode de Bethesda et anticorps bispécifiques : la mesure du facteur VIII résiduel après incubation dans les dosages des inhibiteurs selon la méthode de Bethesda s'appuie généralement sur le dosage en un temps (Verbruggen B, 1995), bien que les mesures chromogéniques et fluorogéniques aient été validées (Miller et al., 2021). En présence d'anticorps bispécifiques, le dosage en un temps ne peut pas être utilisé, contrairement au dosage utilisant un substrat chromogénique. Il est important que la trousse chromogénique utilisée contienne du facteur X bovin et du facteur IXa humain ou bovin pour exclure l'effet de l'anticorps bispécifique, sinon le titrage d'inhibiteur sera sous-estimé (Bowyer et al., 2021 ; Miller et al., 2021).

Surveillance suivant l'injection de facteur VIII et IX : la surveillance suivant l'injection de concentrés de facteur VIII ou IX dérivé du plasma ou recombinant à demi-vie standard est indispensable pour la prise en charge clinique du patient atteint d'hémophilie. Une réponse plus faible que prévue ou une demi-vie réduite peut indiquer la nécessité d'un traitement supplémentaire ou le développement possible d'inhibiteurs. La mesure du traitement avec facteur de remplacement doit idéalement être effectuée au moyen de la même méthode de dosage et des mêmes réactifs que ceux utilisés à l'origine pour attribuer la puissance au produit. Si cela n'est pas possible, un autre dosage validé doit être utilisé. En Europe, l'étiquetage de la puissance repose sur un dosage chromogénique pour les concentrés de facteur VIII (Barrowcliffe et al., 2002) et sur le dosage en un temps pour les concentrés de facteur IX (Kitchen et al., 2016). La Food and Drug Administration des États-Unis (FDA, 2020) recommande de recourir au dosage en un temps pour les concentrés de facteur IX. Cependant, certains concentrés de facteur VIII ont une puissance attribuée par le dosage en un temps et d'autres par le dosage chromogénique. La FMH recommande l'emploi d'un dosage du facteur VIII ou IX validé pour une utilisation avec le concentré spécifique ayant servi au traitement et calibré selon un standard relatif aux produits plasmatiques conforme à un étalon international validé par l'OMS (Srivastava et al., 2020). D'autres lignes directrices suggèrent d'utiliser le dosage en un temps ou chromogénique calibré selon des standards relatifs aux produits plasmatiques pour la surveillance de concentrés de facteur VIII dérivé du plasma (sauf preuve du contraire), et d'utiliser un dosage en un temps pour les concentrés de facteur IX (Gray et al., 2020). Les tableaux 19 et 20 donnent des exemples de concentrés de FVIII et FIX recombinant et dérivé du plasma à demi-vie standard couramment disponibles, et indiquent comment la puissance du produit a été attribuée et si le dosage en un temps ou le dosage utilisant un substrat chromogénique est acceptable pour la surveillance post-injection.

Tableau 19. Exemples de concentrés dérivés du plasma

Concentré	Factor	Potency assignment	CSA	OSA	References
Concentré	Facteur	Attribution de la puissance	Chromogénique	En un temps	Références
Factane	VIII	Chromogénique	Oui	Oui	Adcock <i>et al.</i> , 2018
Octanate	VIII	Chromogénique	Oui	Oui	
FVIII 8Y	VIII	Chromogénique	Oui	Oui	
Haemoctin	VIII	Chromogénique	Oui	Oui	
Octaplex	VIII	Chromogénique	Oui	Oui	
Recombinate	VIII	Chromogénique	Oui	Oui	Jennings <i>et al.</i> , 2007
Fanhdi	VIII	Chromogénique	Oui	Oui	Peyvandi <i>et al.</i> , 2016
Hemofil M	VIII	Chromogénique	Oui	Oui	Peyvandi <i>et al.</i> , 2016
Emoclot	VIII	Chromogénique	Oui	Oui	Peyvandi <i>et al.</i> , 2016
Replenine	IX	En un temps		Oui	
Betafact	IX	Pathromtin SL (silice) en un temps	Probablement acceptable	Oui	Adcock <i>et al.</i> , 2018
Mononine	IX	Pathromtin SL (silice) en un temps	Oui	Oui	Bowyer <i>et al.</i> , 2016 Wilmot <i>et al.</i> , 2014
Octafix	IX	Pathromtin (kao-lin) en un temps	Pas de données	Oui	
Alphanine	IX	En un temps		Oui	Aznar <i>et al.</i> , 2009

Tableau 20. Exemples de concentrés à demi-vie standard recombinants

Concentré	Facteur	Attribution de la puissance	Chromogénique	En un temps	Références
Advate	FVIII de pleine longueur	Chromogénique	Oui	Oui	Kitchen <i>et al.</i> , 2016 Kitchen <i>et al.</i> , 2019
Refacto AF	FVIII à domaine B délégué	Chromogénique	Oui	Oui, standard labo. Refacto	Kitchen <i>et al.</i> , 2016 Morfini <i>et al.</i> , 2003 Ingerslev <i>et al.</i> , 2004
Novo8	FVIII à domaine B délégué	Chromogénique	Oui	Oui, mais une certaine surestimation au niveau des taux résiduels	EMA, 2021 Viuff <i>et al.</i> , 2011
Nuwiq	FVIII à domaine B délégué	Chromogénique	Oui	Oui	Lissitchkov <i>et al.</i> , 2016 EMA, 2022 Klukowska <i>et al.</i> , 2016 Tiefenbacher <i>et al.</i> , 2019
Xyntha	FVIII à domaine B délégué	En un temps	Pas de surestimation	Oui	FDA, 2020
Kovaltry	FVIII	Chromogénique	Oui	Oui	Mahlangu <i>et al.</i> , 2018 Kitchen <i>et al.</i> , 2016
Benefix	IX	En un temps	Données insuffisantes	Oui	Bowyer <i>et al.</i> , 2016 Kershaw <i>et al.</i> , 2018 Sommer <i>et al.</i> , 2014
Rixubis	IX	Pathromtin SL en un temps validé	Oui	Oui	Kershaw <i>et al.</i> , 2018 Gritsch <i>et al.</i> , 2014

Thérapie génique : l'hémophilie A et l'hémophilie B sont des anomalies monogéniques et donc des candidates idéales pour la manipulation génétique. Depuis le début des années 2000, une grande variété de stratégies de thérapie génique, dont l'édition du génome, sont étudiées chez l'être humain pour ces deux anomalies (De Wolf et al., 2023). Au milieu des années 2020, l'utilisation limitée de produits de thérapie génique a bénéficié d'une autorisation réglementaire dans certains pays pour le traitement des personnes atteintes d'hémophilie A ou B. La mesure de l'expression du transgène du facteur VIII ou IX est essentielle pour déterminer la durée de la réponse et si des thérapies supplémentaires sont nécessaires pour parvenir à l'hémostase. Afin de minimiser la variabilité inter-laboratoires, il est judicieux de restreindre la surveillance de routine à un nombre limité de laboratoires spécialisés dans l'hémostase dans chaque pays. Les essais cliniques portant sur plusieurs thérapies géniques ont rapporté une variabilité des dosages chromogéniques de l'activité des facteurs VIII et IX 1,5 à 3,0 fois inférieure à celle des dosages en un temps. Au sein d'une même méthode, des différences entre les réactifs ont été signalées. En raison des contraintes liées à un volume plasmatique adéquat, il est difficile de mener des études comparatives multicentriques en laboratoire sur des échantillons de patients ayant reçu une thérapie génique. Il existe cependant des données limitées concernant la mesure des molécules de facteur VIII ou IX candidates à l'aide d'une gamme de méthodes ou de réactifs. Dans la mesure du possible, pour réduire la variabilité au minimum, les laboratoires doivent avoir recours aux réactifs et aux méthodes employés dans les essais cliniques pharmaceutiques pour la surveillance de l'expression après la thérapie génique (tableau 21).

Tableau 21. Thérapie génique pour l'hémophilie A et B

	Laboratoire pharmaceutique	Nom commercial	Méthode de dosage	Réactifs
Hémophilie A				
Valoctocogène roxaparvovec	Biomarin	Roctavian	Chromogénique	Coatest SP4
Hémophilie B				
Étranacogène dezaparvovec	CSL Behring	Hemgenix	En un temps	Synthasil
Fidanacogène élaparvovec	Pfizer	Beqvez	En un temps	Synthasil

Thérapie génique pour l'hémophilie A : pour l'hémophilie A, toutes les approches ont fait appel à des vecteurs de virus adénoassocié (AAV) et au facteur VIII recombinant à domaine B délété. Les essais de phase I à III de Roctavian (AAV5-FVIII-SQ, valoctocogène roxaparvovec, Biomarin) ont mesuré le transgène de FVIII:C avec un dosage chromogénique et un dosage en un temps Coatest SP4 à l'aide du réactif du TCA Actin FSL de Siemens sur l'analyseur Siemens BCS XP (Rangarajan et al., 2017). Le FVIII:C du dosage chromogénique représentait environ la moitié du FVIII:C du dosage en un temps (Mahlangu et al., 2023). Rosen et al. ont rapporté des résultats comparables entre les dosages chromogéniques Coatest SP4 et Hyphen Biomed lors de la mesure de l'AAV5-FVIII-SQ (4). Une comparaison entre deux centres du FVIII:C mesuré par dosage en un temps ou dosage chromogénique dans le plasma de patients après traitement par Roctavian a rapporté une différence d'environ 1,65 fois. Des résultats de FVIII:C similaires ont été obtenus avec le dosage chromogénique Hyphen Biomed et deux autres dosages chromogéniques (Platton et al., 2024). Les auteurs ont conclu que le dosage en un temps n'était pas approprié pour mesurer le facteur VIII après une thérapie génique avec Roctavian et que seul le dosage chromogénique devait être utilisé.

Thérapie génique pour l'hémophilie B : les deux produits actuellement approuvés dans l'hémophilie B, Hemgenix (étranacogène dezaparvovec, CSL Behring) et Beqver (fidanacogène élaparvovec, Pfizer), font tous deux appel à une variante de facteur IX très active d'origine naturelle, FIX Padoue (R338L) (Simioni et al., 2009). Dans ses rapports, le programme pharmaceutique n'a fait état que de dosages en un temps pour l'activité du facteur IX. A été mentionnée une variabilité entre les réactifs et les méthodologies lors de la mesure du FIX Padoue à la suite de l'expression génique et dans le plasma surchargé en molécule du FIX Padoue. Une étude de terrain mondiale sur le plasma surchargé en molécule R338L recombinante

(FLT180a, verbrinacogène setparvovec, par Freeline Therapeutics, actuellement en pause à la fin des tests de phase I/II) a rapporté une différence de l'ordre de trois dans l'activité du facteur IX entre 15 dosages en un temps et chromogéniques différents. Une variation de 1,8 fois a été observée sur 13 réactifs de TCA dans le dosage en un temps, tandis que les résultats des deux dosages chromogéniques étaient environ la moitié de l'activité attendue mesurée par le dosage en un temps de Synthasil (Foley et al., 2023). La mesure de l'activité du transgène du FIX Padoue de Beqver a mis en évidence des différences entre cinq réactifs du TCA dans le dosage en un temps, et entre le dosage en un temps et le dosage chromogénique (Robinson et al., 2021). Dans une étude de terrain mondiale portant sur le plasma des participants à l'essai de thérapie génique de phase I/IIa, le FIX:C était plus élevé avec le réactif de TCA activé par la silice, Synthasil, dans le dosage en un temps qu'avec les réactifs du TCA activés par l'acide ellagique, Actin FS et Actin FSL, ou que le dosage chromogénique (Pittman et al., 2024). Peu de données biologiques sont disponibles pour la mesure de l'activité du facteur IX après une thérapie génique par Hemgenix. Le résumé des caractéristiques du produit indique que les résultats des tests d'activité du facteur IX sont plus faibles s'ils sont mesurés avec un dosage utilisant un substrat chromogénique par rapport à un dosage en un temps (EMA, 2024). Les essais cliniques de phase I à III portant sur le facteur IX ont utilisé le réactif de TCA Synthasil dans le dosage en un temps et un dosage chromogénique non divulgué ; les activités du facteur IX dans le dosage en un temps étaient au moins deux fois plus élevées qu'avec le dosage chromogénique (Pipe et al., 2023 ; Miesbach et al., 2018).

Considérations biologiques pour le traitement par rééquilibrage de l'hémostase : les traitements sans facteur de remplacement pour l'hémophilie A ou B visent à promouvoir la coagulation et à rééquilibrer l'hémostase en ciblant les anticoagulants naturels ou les inhibiteurs de la coagulation, notamment l'antithrombine, l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI), la protéine C ou la protéine S (Nogami et Shima, 2023). Une partie de ces traitements a été approuvée pour certains groupes de patients, d'autres font actuellement l'objet d'essais pharmaceutiques.

Molécules qui ciblent l'antithrombine : l'antithrombine activée par l'héparine exerce des actions inhibitrices sur la thrombine et les facteurs Xa, IXa, Xla et XIIa (Rezaie et al., 2020). Le fitusiran, un petit ARN interférant ciblant la synthèse de l'antithrombine dans les hépatocytes, a été développé pour améliorer la génération de thrombine (Young et al., 2023). Dans les essais cliniques, une réduction de 82 à 87 % de l'antithrombine a été associée à une augmentation de la génération de thrombine (Pasi et al., 2021). Les taux cibles d'activité de l'antithrombine sont compris entre 15 et 35 UI/dl. Les dosages d'antithrombine sont bien établis dans le cadre du dépistage de la thrombophilie, mais il est rare de mesurer des activités d'antithrombine aussi faibles. Une étude comparative mondiale menée en laboratoire évaluant la mesure d'une gamme d'activités de l'antithrombine (9 à 100 UI/dl) a conclu que certains dosages ne devaient pas être utilisés pour la surveillance de l'antithrombine sous traitement par fitusiran (Chhabra et al., 2024).

Molécules qui ciblent l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire : les anticorps anti-TFPI ciblent le domaine Kunitz 2 du TFPI et empêchent la liaison au facteur X activé, permettant ainsi à la génération de facteur Xa de continuer (Mast et al., 2022). L'utilisation du premier anticorps monoclonal anti-TFPI (concizumab, Novo Nordisk, Danemark) a été approuvée en 2023 chez des patients canadiens atteints d'hémophilie B avec inhibiteurs. Un autre anticorps anti-TFPI, le marstacimab (Pfizer, États-Unis), est en cours d'approbation aux États-Unis et en Europe pour les personnes atteintes d'hémophilie A ou B sans inhibiteurs (Matino et al., 2023). Les dosages du TFPI sont disponibles dans certains laboratoires de recherche ou spécialisés, mais l'utilité clinique de la mesure n'est pas claire.

Molécules ciblant la protéine C activée (PCa) : la PCa, conjointement avec le cofacteur protéine S, inactive les facteurs Va et VIIa pour empêcher la génération de thrombine. Le facteur V de Leiden est une mutation p.Arg506Gln (c.1691G>A) au niveau du site de clivage primaire de la PCa dans le facteur V activé. La présence de facteur V de Leiden ralentit l'inactivation du facteur Va par la PCa et constitue la cause la plus fréquente de thrombophilie chez l'être humain (Van Cott et al., 2016). D'autres approches pour cibler la PCa font l'objet d'essais cliniques. Il a été rapporté qu'un anticorps monoclonal humanisé inhibant la protéine C activée rétablissait l'hémostase chez les souris hémophiles (Jiang et al., 2023) et des essais

cliniques ont commencé chez l'être humain pour un inhibiteur de la sérine protéase (serpine) qui ne cible que la PCa, et non la protéine C précurseur (Baglin *et al.*, 2023). Les dosages de la protéine C et de la PCa sont disponibles en routine dans de nombreux laboratoires d'hémostase de troisième niveau si une mesure est nécessaire pour la surveillance médicamenteuse.

Molécules qui ciblent la protéine S : la protéine S est un cofacteur pour le TFPI et la PCa dont l'action limite la production de thrombine. Il a été rapporté que le ciblage de la protéine S à l'aide d'un petit ARN interférent améliorait l'hémostase chez les souris hémophiles (Prince *et al.*, 2020) et qu'un anticorps anti-protéine S était utilisé pour améliorer le traitement avec facteur IX de remplacement dans la génération de thrombine chez les patients atteints d'hémophilie B (Wilson *et al.*, 2024). La protéine S libre et la protéine S totale, mesurant aussi la protéine S qui forme un complexe avec le régulateur du complément, la protéine de liaison à C4b, sont disponibles en routine dans de nombreux laboratoires d'hémostase de troisième niveau si une mesure est nécessaire pour la surveillance médicamenteuse.

Dosages de la génération de thrombine : il s'agit de dosages généraux pouvant évaluer le potentiel hémostatique global et mettre en évidence l'hyper ou l'hypocoagulabilité dans le plasma (Ninivaggi *et al.*, 2021). Plusieurs dosages chromogéniques ou fluorogéniques, développés en interne ou disponibles dans le commerce, déclenchent généralement la génération de thrombine au moyen du facteur tissulaire, Xla, ou du facteur IXa. En raison du manque de standardisation, leur corrélation est faible (Devreese *et al.*, 2007). Malgré ces problèmes, les dosages de la génération de thrombine sont souvent utilisés dans les essais pharmaceutiques pour évaluer l'effet de nouvelles molécules sur l'hémostase.

Références

- 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): 621-629.
- Aznar JA, Cabrera N, Matysiak M, Zawilska K, Gercheva L, Antonov A, Montañés M, Páez AM, Lissitchkov T. Pharmacokinetic study of a high-purity factor IX concentrate (factor IX Grifols) with a 6-month follow up in previously treated patients with severe haemophilia b. *Haemophilia* 2009; 15(6): 1243-1248.
- Baglin T, Huntington JA, Koch A, Mocanu I, Makhaldiani L. Serpin-PC in persons with severe hemophilia (PwH): Updated results from a multicenter multi-part, first-in-human study. *Blood* 2023; 142(Supplement 1) :2619.
- Baker P, Plutton S, Gibson C, Gray E, Jennings I, Murphy P, Laffan M. Guidelines on the laboratory aspects of assays used in haemostasis and thrombosis. *Br J Haematol* 2020; 191(3): 347-362.
- 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): 247-256.
- Bowyer A, Gray E, Lowe A, Murphy P, Plutton S, Riddell A, Chowdary P, Lester W, Jenkins PV. Laboratory coagulation tests and recombinant porcine factor VIII: A United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation guideline. *Haemophilia* 2022; 28(3): 515-519.
- Bowyer A, Kitchen S, Maclean R. Effects of emicizumab on APTT, one-stage and chromogenic assays of factor VIII in artificially spiked plasma and in samples from haemophilia A patients with inhibitors. *Haemophilia* 2020; 26(3): 536-542.
- Bowyer A, Kitchen S, Maclean R. Measurement of antifactor VIII antibody titre in the presence of emicizumab; Use of chromogenic Bethesda assays. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(4): O204-O206.
- Bowyer AE, Duncan EM, Antovic JP. Role of chromogenic assays in haemophilia A and B diagnosis. *Haemophilia* 2018; 24(4): 578-583.
- Bowyer AE, Ezban M, Kitchen S. Measuring the FVIII mimetic activity of the new bispecific antibody, Mim8, in severe haemophilia A plasma using APTT and one-stage FVIII assays. *Res Pract Thromb Haemost* 2021; 5: Abstract PB0680.
- Bowyer AE, Goodeve AC, Liesner R, Mumford AD, Kitchen S, Makris M. p.Tyr365Cys change in factor VIII: haemophilia A, but not as we know it. *Br J Haem* 2011; 154(5): 618-625.

Bowyer AE, Gosselin RC. Factor VIII and factor IX activity measurements for hemophilia diagnosis and related treatments. *Semin Thromb Hemost* 2022; 49(06): 609-620.

Bowyer AE, Hillarp A, Ezban M, Persson P, Kitchen S. Measuring factor IX activity of nonacog beta pegol with commercially available one-stage clotting and chromogenic assay kits: A two-center study. *J Thromb Haemost* 2016; 14(7): 1428-1435.

Bowyer AE, Kitchen S, Ezban M. The effect of a next generation factor VIII mimetic bispecific antibody (Mim8) on assays of factor VIII activity and thrombin generation. *J Thromb Haemost* 2023; 21(3): 480-487.

Bowyer AE, Kitchen S, Maclean RM. Effects of emicizumab on APTT, one-stage and chromogenic assays of factor VIII in artificially spiked plasma and in samples from haemophilia A patients with inhibitors. *Haemophilia* 2020; 26(3): 536-542.

Chhabra ES, Sadeghi-Khomami A, Liu M, Young G, Pipe SW, Ozelo MC, Le-Camus C, Toh M, Lima-Montalvo SA, Demissie M. Global comparative antithrombin (AT) field study: Impact of laboratory assay variability on the assessment of AT activity measurement (abstract PP-072). *Haemophilia* 2024; 30: 3-223.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Determination of coagulation factor activities using the one-stage clotting assay, 2nd edition. CLSI standard H48. 2016. <https://clsi.org/standards/products/hematology/documents/h48/>.

De Wolf D, Singh K, Chuah MK, VandenDriessche T. Hemophilia gene therapy: The end of the beginning? *Hum Gene Ther* 2023; 34(17-18): 782-792.

Devreese K, Wijns W, Combes I, Van kerckhoven S, Hoylaerts MF. Thrombin generation in plasma of healthy adults and children: chromogenic versus fluorogenic thrombogram analysis. *Thromb Haemost* 2007; 98(3): 600-613.

Druzgal CH, Kizilocak H, Brown J, Sennett M, Young G. Neutralizing antidrug antibody to emicizumab in a patient with severe hemophilia A with inhibitors: New case with detailed laboratory evaluation. *J Thromb Haemost* 2020; 18(9): 2205-2208.

European Medicines Agency (EMA). Hemlibra (emicizumab) Summary of Product Characteristics. 2018. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/hemlibra-epar-product-information_en.pdf.

European Medicines Agency (EMA). NovoEight (turoctocog alfa) Summary of Product Characteristics. 2021. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/novoeight-epar-product-information_en.pdf.

European Medicines Agency (EMA). Hemgenix (etranacogene dezaparvovec) Summary of Product Characteristics. 2024. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/hemgenix-epar-product-information_en.pdf.

European Medicines Agency (EMA). Nuwiq (simoctocog alfa) Summary of Product Characteristics. 2022. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/nuwiq-epar-product-information_en.pdf.

Foley JH, Shehu E, Riddell A, Gray E, Goodale A, Yu IM et al. Differences in wild-type- and R338L-tenase complex formation are at the root of R338L-factor IX assay discrepancies. *Blood Adv* 2023; 7(3): 458-467.

Food and Drug Administration (FDA). Xyntha (antihemophilic factor [recombinant]) Prescribing Information. 2020. <https://www.fda.gov/media/70399/download>.

Gray E, Kitchen S, Bowyer AE, Chowdary P, Jenkins PV, Murphy P et al. Laboratory measurement of factor replacement therapies in the treatment of congenital haemophilia: A United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation guideline. *Haemophilia* 2020; 26(1): 6-16.

Gritsch H, Romeda-Finger S, Scheiflinger F, Turecek PL. Potency assignment and measurement of recombinant FIX activity in human plasma – impact of aPTT reagents on the 1-stage clotting assay. *Haemophilia* 2014; 20(s3): 37 (abstract).

Ingerslev J, Jankowski MA, Weston SB, Charles LA. Collaborative field study on the utility of a BDD factor VIII concentrate standard in the estimation of BDDr factor VIII:C activity in hemophilic plasma using one-stage clotting assays. *J Thromb Haemost* 2004; 2(4): 623-628.

Jenkins PV, Bowyer AE, Burgess C, Gray E, Kitchen S, Murphy P et al. Laboratory coagulation tests and emicizumab treatment A United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation guideline. *Haemophilia* 2020; 26: 151-155.

Jennings I, Kitchen DP, Woods TA, Kitchen S, Walker ID. Emerging technologies and quality assurance: the United Kingdom National External Quality Assessment Scheme perspective. *Semin Thromb Hemost* 2007; 33(3): 243-249.

Jiang M, Yang F, Jiang Y, Cheng L, Han J, Yi J et al. Safety and efficacy of an anti-human APC antibody for prophylaxis of congenital factor deficiencies in preclinical models. *Blood* 2023; 142(12): 1071-1081.

Kershaw GW, Dissanayake K, Chen VM, Khoo T. Evaluation of chromogenic FIX assays by automated protocols. *Haemophilia* 2018; 24(3): 492-501.

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-e199.

Kitchen S, Jennings I, Makris M, Kitchen DP, Woods TAL, Walker ID. Clotting and chromogenic factor VIII assay variability in post-infusion and spiked samples containing full-length recombinant FVIII or recombinant factor VIII Fc fusion protein (rFVIIIFc). *Int J Lab Hematol* 2019; 41(2): 176-183.

Kitchen S, Jennings I, Makris M, Kitchen DP, Woods TAL, Walker ID. Factor VIII assay variability in postinfusion samples containing full length and B-domain deleted FVIII. *Haemophilia* 2016; 22(5): 806-812.

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): 1192-1199.

Kitchen S, Kershaw GW, Tiefenbacher S. Recombinant to modified factor VIII and factor IX – chromogenic and one-stage assay issues. *Haemophilia* 2016; 22: 72-77.

Kukowska 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): 232-239.

Lenting PJ, Denis CV, Christophe OD. Emicizumab, a bispecific antibody recognising coagulation factors IX and X: how does it actually compare to factor VIII? *Blood* 2017; 130: 2463-2468.

Lissitchkov T, Hampton K, von Depka M, Hay C, Rangarajan S, Tuddenham E et al. Novel, human cell line-derived recombinant factor VIII (human-cl rhFVIII; Nuwiq®) in adults with severe haemophilia A: efficacy and safety. *Haemophilia* 2016; 22(2): 225-231.

Mahlangu J, Kaczmarek R, von Drygalski A, Shapiro S, Chou S, Ozelo MC et al. Two-year outcomes of valoctocogene roxaparvovec therapy for hemophilia A. *New Eng J Med* 2023; 388(8): 694-705.

Mahlangu JN, Ahuja SP, Windyga J, Church N, Shah A, Schwartz L. BAY 81-8973, a full-length recombinant factor VIII for the treatment of hemophilia A: product review. *Ther Adv Hematol* 2018; 9(7): 191-205.

Mast AE, Ruf W. Regulation of coagulation by tissue factor pathway inhibitor: Implications for hemophilia therapy. *J Thromb Haemost* 2022; 20(6): 1290-1300.

Matino D, Acharya S, Palladino A, Hwang E, McDonald R, Taylor CT et al. Efficacy and safety of the anti-tissue factor pathway inhibitor marstacimab in participants with severe hemophilia without inhibitors: Results from the phase 3 Basis trial. *Blood* 2023; 142(Supplement 1): 285.

Miesbach W, Meijer K, Coppens M, Kampmann P, Klamroth R, Schutgens R et al. Gene therapy with adeno-associated virus vector 5-human factor IX in adults with hemophilia B. *Blood* 2018; 131(9):1022-31.

Miller CH, Boylan B, Payne AB, Driggers J, Bean CJ. Validation of the chromogenic Bethesda assay for factor VIII inhibitors in hemophilia A patients receiving Emicizumab. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(2): e84-e86.

Miller CH, Rice AS, Boylan B, Shapiro AD, Lentz SR, Wicklund BM et al. Comparison of clot-based, chromogenic, and fluorescence assays for measurement of factor VIII inhibitors in the U.S. Hemophilia Inhibitor Research Study. *J Thromb Haemost* 2013; 11(7): 1300-1309.

Morfini M, Cinotti S, Bellatreccia A, Paladino E, Gringeri A, Mannucci PM. A multicenter pharmacokinetic study of the B-domain deleted recombinant factor VIII concentrate using different assays and standards. *J Thromb Haemost* 2003; 1(11): 2283-2289.

Moser KA, Smock KJ. Direct oral anticoagulant (DOAC) interference in hemostasis assays. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2021; 2021(1): 129-133.

Nederlof A, Kitchen S, Meijer P, Clossen MH, Ali Pour N, Kershaw GW et al. Performance of factor IX extended half-life product measurements in external quality control assessment programs. *J Thromb Haemost* 2020; 18: 1874-1883.

Ninivaggi M, de Laat-Kremers R, Tripodi A, Wahl D, Zuily S, Dargaud Y et al. Recommendations for the measurement of thrombin generation: Communication from the ISTH SSC Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibodies. *J Thromb Haemost* 2021; 19(5): 1372-1378.

Nogami K, Shima M. Current and future therapies for haemophilia—Beyond factor replacement therapies. *Br J Haematol* 2023; 200(1): 23-34.

Pasi KJ, Lissitchkov T, Mamonov V, Mant T, Timofeeva M, Bagot C et al. Targeting of antithrombin in hemophilia A or B with investigational siRNA therapeutic fitusiran-Results of the phase 1 inhibitor cohort. *J Thromb Haemost* 2021; 19(6): 1436-1446.

Pavlova A, Delev D, Pezeshkpoor B, Muller J, Oldenburg J. Haemophilia A mutations in patients with non-severe phenotype associated with a discrepancy between one-stage and chromogenic factor VIII activity assays. *Thromb Haemost* 2014; 111(5): 851-861.

Peyvandi F, Oldenburg J, Friedman KD. A critical appraisal of one-stage and chromogenic assays of factor VIII activity. *J Thromb Haemost* 2016; 14(2): 248-261.

Pipe SW, Leebeek FW, Recht M, Key NS, Castaman G, Miesbach W et al. Gene therapy with etranacogene dezaparvovec for hemophilia B. *New Engl J Med* 2023; 388(8): 706-718.

Pipe SW, Sadeghi-Khomami A, Konkle BA, Kitchen S, Negrier C, Liu M, et al. A global comparative field study to evaluate the factor VIII activity of efanesoctocog alfa by one-stage clotting and chromogenic substrate assays at clinical haemostasis laboratories. *Haemophilia*. 2024;30(1):214-23.

Pittman DD, Carrieri C, Soares H, McKay J, Tan CY, Liang JZ et al. Field study and correlative studies of factor IX variant FIX-R338L in participants treated with fidanacogene elaparvovec. *Thromb Haemost* 2024; 124(10): 912-921.

Platton S, Raheja P, Dale C, Guy S, Yartey N, Bowyer A. Evaluation of one-stage and chromogenic assays for the laboratory measurement of factor VIII activity following valoctocogene roxaparvovec infusion. *Haemophilia* 2024; 30(5): 1221-1224.

Pouplard C, Trossaert M, A LEQ, Delahousse B, Giraudeau B, Gruel Y. Influence of source of phospholipids for APTT-based factor IX assays and potential consequences for the diagnosis of mild haemophilia B. *Haemophilia* 2009; 15(1): 365-368.

Prince RE, Schaeper U, Dames S, Calzavarini S, Quarroz C, Reina Caro MD et al. Targeting protein S using small interfering RNA is well tolerated and protects mice with hemophilia A from acute hemarthrosis. *Blood* 2020; 136(Supplement 1): 20-21.

Rangarajan S, Walsh L, Lester W, Perry DJ, Madan B, Laffan M. AAV5-factor VIII gene transfer in severe hemophilia A. *N Engl J Med* 2017; 377(26): 2519-2530.

Rezaie AR, Giri H. Anticoagulant and signaling functions of antithrombin. *J Thromb Haemost* 2020; 18(12): 3142-3153.

Robinson M, George L, Carr ME, Samuelson-Jones BJ, Arruda VR, Murphy JE et al. Factor IX assay discrepancies in the setting of liver gene therapy using a hyperfunctional variant factor IX-Padua. *J Thromb Haemost* 2021; 19(5):1212-1218.

Rosen S, Tiefenbacher S, Robinson M, Huang M, Srimani J, Mackenzie D et al. Activity of transgene-produced B-domain-deleted factor VIII in human plasma following AAV5 gene therapy. *Blood* 2020; 136(22): 2524-2534.

Rosen S. Assay of factor VIII:C with a chromogenic substrate. *Scand J Haematol* 1984; 33(suppl 40): 139-145.

Ruinemans-Koerts J, Peterse-Stienissen I, Verbruggen B. Non-parallelism in the one-stage coagulation factor assay is a phenomenon of lupus anticoagulants and not of individual factor inhibitors. *Thromb Haemost* 2010; 104(5): 1080-1082

Simioni P, Tormene D, Tognin G, Gavasso S, Bulato C, Iacobelli NP et al. X-linked thrombophilia with a mutant factor IX (factor IX Padua). *N Engl J Med* 2009; 361: 1671-1675.

Sommer JM, Buyue Y, Bardan S, Peters RT, Jiang H, Kamphaus GD et al. Comparative field study: impact of laboratory assay variability on the assessment of recombinant factor IX Fc fusion protein (rFIXFc) activity. *Thromb Haemost* 2014; 112(5): 932-940.

Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, Kitchen S, Sutherland M, Pipe SW et al. WFH Guidelines for the Management of Hemophilia, 3rd edition. *Haemophilia* 2020; 26(supple 6): 1-158.

Tiefenbacher S, Clausen WHO, Hansen M, Lutzhof R, Ezban M. A field study evaluating the activity of N8-GP in spiked plasma samples at clinical haemostasis laboratories. *Haemophilia* 2019; 25: 893-901.

Truedsson Å, Schmidt DE, Strålfors A, Soutari N, Norberg E, Letelier A et al. One-stage versus chromogenic factor IX activity in hemophilia B [abstract]. *Res Pract Thromb Haemost* 2020;4.

Valsecchi C, Gobbi M, Beeg M, Adams T, Castaman G, Schiavone L et al. Characterization of the neutralizing anti-emicizumab antibody in a patient with hemophilia A and inhibitor. *J Thromb Haemost* 2021; 19(3): 711-718.

Van Cott EM, Khor B, Zehnder JL. Factor V Leiden. *Am J Hematol* 2016; 91(1): 46-49.

Verbruggen B, Giles AR, 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. *Throm Haemost* 2001; 86: 1435-1439.

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. *Throm Haemost* 1995; 72(2): 247-251.

Viuff D, Barrowcliffe TW, Saugstrup T, Ezban M, Lillicrap D, 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.

Wilmot HV, Hogwood J, Gray E. Recombinant factor IX: discrepancies between one-stage clotting and chromogenic assays. *Haemophilia* 2014; 20(6): 981-987.

Wilson HP, Pierre A, Paysse AL, Kumar N, Cooley BC, Rudra P et al. Protein S antibody as an adjunct therapy for hemophilia B. *Blood Advances* 2024; 8(2): 441-452.

Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Colesse G, Gourmelin Y. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001; 12(4): 229-236.

Young G, Lenting PJ, Croteau SE, Nolan B, Srivastava A. Antithrombin lowering in hemophilia: a closer look at fitusiran. *Res Pract Thromb Haemost* 2023; 7(4): 100179.

Zhao Y, Feng G, Feng L. Effects of pre-analytical storage time, temperature, and freeze-thaw times on coagulation factors activities in citrate-anticoagulated plasma. *Ann Transl Med* 2018; 6(23): 456.