

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche
scientifique Université de Blida-1



Faculté des Sciences de la Nature et de la
Vie
Département de Biologie et Physiologie
Cellulaire

Mémoire de master en biologie

Option : Biologie Moléculaire et Cellulaire

**LES ASPECTS EPIDEMIOLOGIQUES, CLINIQUES ET
THERAPEUTIQUES DE L'HEMOPHILIE**

Réalisé par:

Melle HOUARI NOUR EL HOUDA

Melle LARID RANIA

Date de soutenance: 19 septembre 2021

Devant le jury :

Mr Benyahia N

Mme Keskas S

Mr Bouamra

Mr Guetarni D

M .C.A

M .A.A

Professeur

Professeur

Président

Examineur

Promoteur

Co- promoteur

Année universitaire: 2020-2021

Remerciement

Ce travail est l'aboutissement d'un dur labeur et de beaucoup de sacrifices, nos remerciements vont d'abord au Créateur de l'univers, ALLAH, qui nous a doté d'intelligence, et nous a maintenu en santé pour mener à bien nos études.

Je tiens tout d'abord à remercier **Monsieur Bouamra** et **Monsieur Guetarni**, nos encadrants de mémoire, pour tout leur soutien, aide, ainsi que pour leur encouragement lors de la réalisation de ce travail.

Je tiens aussi à adresser mes remerciements à toute l'équipe de biologie et physiologie cellulaire, et plus précisément à **Notre chef de département** madame **Boudjema N.**

Madame SAADI Leila qui a été une mère pour nous et qui nous a toujours soutenue et poussées à continuer nos études. Ce présent travail a pu voir le jour grâce à elle.

On remercie tout les enseignants qui nous ont guidés durant les cinq années de formation surtout les enseignants de notre spécialité Biologie moléculaire et Cellulaire.

Enfin, je remercie également toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce présent travail.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à

Mes très chers et affectueux parents qui sont toujours présents dans mon cœur pour m'encourager et dont je prie dieu le tout puissant de me les protéger

Pour tous leurs sacrifices, leurs amours, leurs soutiens et leurs prières tout au long de mes études

Mes sœurs Asma et Selma

Je dédie et remercie mes copines Selma et Imane pour leur amour, et aide pendant ma réalisation de ce mémoire ainsi que durant tout mon cursus universitaire.

Merci de me remonter le moral et me motiver pour avancer.

Je remercie mon ami Said qui m'a aidé à la réalisation de ce mémoire sa patience et sa disponibilité dès que je lui demande de l'aide.

A toute ma famille sans exception .

A tous mes professeurs qui m'ont enseigné au cours de mon cursus universitaire et qui ont participé à ma formation,

Particulièrement Mme MOKRAN, Mr BENYAHIA.N et Mme AISSANI qu'ils étaient pour moi un véritable modèle.

HOUDA

Dédicaces

Le cœur plein de joie, je dédie ce travail à ma famille, particulièrement à ma chère et tendre mère, pour son amour, la confiance et l'énergie qu'elle m'a donné et son soutien inconditionnel, à mon très cher père qui a toujours été là pour moi.

Merci pour le soutien financier, moral, psychologique et matériel ainsi que pour ses encouragements.

Si je suis ici aujourd'hui, c'est grâce à vous.

*Je n'oublie surtout pas mes frères **Abdelkader Islam ; Abdelwahab** et ma sœur **Salsabil**. Ainsi que tout ma famille.*

Mes mots sont trop petits pour exprimer toute la gratitude que mon cœur contient pour vous qui êtes si attentifs, patients, compréhensifs et aimables envers moi

Je dédie et remercie mes professeures qui m'ont enseigné au cours de mon cursus universitaire et qui ont participé à ma formation.

RANIA.

Résumé

L'hémophilie est une maladie hémorragique héréditaire dont le mode de transmission est lié à l'X.

Il s'agit d'une affection relativement rare, caractérisée par un déficit en facteur VIII (hémophilie A) ou en facteur IX (hémophilie B) de la coagulation.

L'objectif de notre travail consiste, dans un premier temps à donner un aperçu sur l'hémophilie (les aspects épidémiologique, clinique et thérapeutique)

Le traitement de l'hémophilie est complexe et coûteux, et le meilleur moyen de lutte reste l'éducation sanitaire préventive des patients et des parents.

Dans un second temps d'interpréter des études ayant été faites afin de déterminer la détection et l'identification des nouvelles altérations génétiques du facteur VIII chez des patients atteints d'hémophilie A dans 4pays (Algérie, Tunisie, Jordanie et la chine)

Ces études ont montré que l'âge moyen des patients atteint d'hémophile A était entre 3 à 50ans classer selon le type d'hémophilie (sévère, mineure et modérée).

L'analyse moléculaire du facteur VIII a permis d'identifier de nouvelles mutations de ce facteur dont 2 en Algérie 8 en Tunisie 5en Jordanie et 7 en chine.

Mots clés :

Hémophilie A et B, étude épidémiologique, facteur VIII, facteur IX, Altérations génétiques

ملخص

الهيروفيليا مرض وراثي مع طريقة انتقال مرتبطة بالكر وموسوم X .
هذه حالة نادرة نسبياً تتميز بنقص العامل الثامن (الهيروفيليا أ) أو العامل التاسع (الهيروفيليا ب) في التخثر.
الهدف من عملنا، أولاً وقبل كل شيء، هو تقديم لمحة عامة عن الهيروفيليا (الجوانب الوبائية والسريرية والعلاجية)
علاج الهيروفيليا معقد ومكلف، وأفضل طريقة لمكافحته هو التثقيف الصحي الوقائي للمرضى وأولياء الأمور.
ثانياً، لتفسير الدراسات التي تم إجراؤها لتحديد اكتشاف وتحديد التغيرات الجينية الجديدة في العامل الثامن لدى مرضى الهيروفيليا A في 4 دول (الجزائر، تونس، الأردن، الصين)
أظهرت هذه الدراسات أن متوسط عمر مرضى الهيروفيليا A يتراوح بين 3 و50 سنة، مصنفة حسب نوع الهيروفيليا (شديدة، طفيفة، معتدلة).
حدد التحليل الجزيئي للعامل الثامن طفرات جديدة في هذا العامل، بما في ذلك 2 في الجزائر 8 في تونس 5 في الأردن و7 في الصين.

الكلمات الدالة:

الهيروفيليا A وB، دراسة وبائية، العامل الثامن، العامل التاسع، التغيرات الجينية

Abstract

Hemophilia is an inherited bleeding disorder with an X-linked mode of transmission.

It is a relatively rare condition characterized by a deficiency of coagulation factor VIII (hemophilia A) or factor IX (hemophilia B).

The objective of our work is, firstly, to give an overview of hemophilia (epidemiological, clinical and therapeutic aspects)

The treatment of hemophilia is complex and costly, and the best way to fight it remains preventive health education of patients and parents.

Secondly, to interpret studies that have been done to determine the detection and identification of new genetic alterations of factor VIII in patients with hemophilia A in 4 countries (Algeria, Tunisia, Jordan and China).

These studies showed that the average age of patients with hemophilia A was between 3 and 50 years classified according to the type of hemophilia (severe, minor and moderate).

Molecular analysis of factor VIII has identified new mutations of this factor including 2 in Algeria 8 in Tunisia 5 in Jordan and 7 in China.

Key words :

Hemophilia A and B, epidemiological study, factor VIII, factor IX, genetic alterations

Sommaire

Introduction

Partie bibliographique

Chapitre I : Généralités et hémostase

1. Rappel historique	03
2. Définition et types d'hémophilies.....	03
3. Epidémiologie	04
3.1. Dans le monde.....	04
3.2. En Algérie.....	05
4. Généralité sur l'hémostase.....	06
4.1. Hémostase primaire.....	06
4.2. Hémostase secondaire ou Coagulation.....	07
4.3 La fibrinolyse.....	09

Chapitre II : Génétique de l'hémophilie

1. Mode de transmission.....	11
2. Les anomalies génétiques responsables d'hémophilie.....	13
a. L'hémophilie A.....	13
b. L'hémophilie B.....	14
3. Pathologies moléculaires des gènes de l'hémophilie.....	16

Chapitre III : Troubles des mécanismes de coagulation

1. Les facteurs anti hémophiliques A et B.....	18
2. Bases moléculaires des facteurs de la coagulation.....	19
3. Physiopathologie de l'hémophilie.....	20
4. Conséquence du déficit en facteurs anti hémophiliques sur l'hémostase	22

Chapitre IV : Aspects cliniques et thérapeutiques

1. Classification.....	23
2. Signes cliniques	24
2.1 Forme majeure.....	24

Sommaire

2.2 Hémorragies caractéristiques.....	24
2.3 Hémorragies moins spécifiques.....	25
3. Symptômes.....	25
4. Diagnostique.....	26
4.1 Diagnostic moléculaire et génétique.....	26
4.2 Diagnostic anténatal.....	27
4.3 Diagnostic positif.....	28
4.4 Diagnostic phénotypique.....	29
4.5 Diagnostic génotypique.....	30
5. Prévention.....	30
6. Traitements.....	31
6.1. Dans le monde	
6.1.1 Thérapie de remplacement.....	31
6.1.2. Thérapie génique.....	35
6.1.3. Modalité thérapeutique.....	35
a) Traitement la demande.....	35
b) Traitement prophylactique.....	35
6.2. En Algérie.....	36

Partie expérimentale

1. Matériels et méthodes	40
Patients et méthodes.....	41
2. Résultats et discussion.....	42
• Caractéristiques clinique.....	42
• Inversions Intron 22 et Intron 1.....	43
• Mutations ponctuelles.....	43
• Nouvelles mutations	44
• Inhibiteurs du FVIII.....	45
3. Conclusion.....	47

Sommaire

Références bibliographiques.....	48
----------------------------------	----

Liste des figures

Figure1 : Répartition d'hémophilie entre les femmes et les hommes.....	4
Figure2 : Répartition mondiale des Hémophiles, selon le rapport annuel global de la FMH en 2014.....	5
Figure3 : Les phases de l'hémostase.....	6
Figure4 : Hémostase primaire, la réponse plaquettaire ; (Andrew J. Gale ; 2010).....	7
Figure 5 : Modèle cellulaire de coagulation sanguine (Bree Zimmerman et al ; 2013).....	9
Figure 6 : Arbre généalogique d'une famille d'hémophiles.....	12
Figure7 : Transmission de l'hémophilie selon le mode lié à l'X.....	13
Figure 8 : Structure du gène F8.....	14
Figure 9 : Structure du gène F9 et composition du facteur IXA- Schéma du gène du FIX humain B- ARNm issu de la transcription du gène du facteur IX et emplacement du cadre de lecture C- Protéine du facteur IX avant le clivage de la préproséquence D- Facteur IX activé, selon Jayandharan.....	15
Figure10 : Interactions du FVIII avec les autres composants de l'hémostase.....	18
Figure 11 : Phase d'initiation (Lebreton A et al ; 2012).....	20
Figure 12 : Phase d'amplification (Lebreton A et al ; 2012).....	21
Figure 13 : Phase de propagation (Lebreton A et al ; 2021).....	22
Figure 14 : Illustration des différents emplacements de ponction dans les méthodes de diagnostic prénatal, selon Tolédano et Metzge.....	27

Liste des tableaux

Tableau 1: Tableau regroupant les facteurs de la coagulation.....8

Tableau 2: Classification d'hémophilie selon l'importance de déficit factoriel.....24

Liste d'abréviation

FT : facteur tissulaire

FVIII : facteur VIII

FVIIIa : facteur VIII activé

FIX : facteur IX

vWF : facteur de von Willebrand

UTR: région non transcrite

Pre : prépropeptide

Pro: pro peptide

Kb: kilo base

Nt : nucléotide

EGF: epidermal growth factor

GLA : domaine acide glutamique

S-S: pont disulfure

Introduction

Introduction

L'hémophilie est l'une des plus fréquentes maladies hémorragiques graves. C'est une maladie héréditaire à transmission récessive liée au chromosome X, qui touche particulièrement le sujet de sexe masculin et dans laquelle le sexe féminin n'est que conducteur. On dit que la pathologie se transmet de mère en fils.

Il en existe deux types A et B selon le facteur de coagulation déficient. L'hémophilie est un trouble de la coagulation causé par un défaut qualitatif et/ou quantitatif en facteur VIII de la coagulation dans l'hémophilie A et en facteur IX (FIX) dans l'hémophilie B.

Le niveau de sévérité est corrélé à la gravité clinique de la maladie et à l'intensité du déficit en facteur. Cette pathologie est responsable d'une prédisposition à des hémorragies redoutables.

Les manifestations cliniques les plus rencontrées sont les hématomes et les hémarthroses dont les complications seraient à l'origine d'un handicap socio-culturel et fonctionnel invalidant

La Fédération Mondiale de l'Hémophilie (FMH) estime à environ 400 000 le nombre de personnes souffrant d'hémophilie dans le monde avec une prévalence de 1/30 000 personnes pour l'hémophile B.

Selon la FMH, 75% des personnes atteintes de troubles de la coagulation dans le monde ne bénéficient pas de soins adéquats ou en sont entièrement privées. Les patients en Côte d'Ivoire sont encore plus pénalisés

En effet, ils en sont très peu informés et l'hémophilie y est encore insuffisamment explorée puisque les prélèvements sont acheminés en France pour la réalisation des tests de l'hémostase. Cette maladie qui touche environ 400.000 enfants dans le monde. En Algérie, 2362 cas sont déjà recensés en 2017, selon, le directeur général de la prévention et de la promotion de la santé au ministère de la santé.

Objectifs

- . Décrire le profil épidémiologique.
 - . Identifier les principales manifestations cliniques
 - . Établir un lien entre les manifestations cliniques et biologiques
 - . Faire la lumière sur le profil évolutif et thérapeutique des hémophiles
- Déterminer les nouvelles mutations du gène du fac 8 en Algérie et 3autres pays (Revue bibliographique)

Rappels
bibliographiques

Chapitre I : Généralité et hémostasie

1. BREF HISTORIQUE

L'hémophilie est une maladie hémorragique découverte dans l'antiquité, d'une part dans la Grèce antique, puis en Egypte ancienne où ont été décrites les hémorragies fréquentes souvent mortelles de la maladie.

Le Talmud babylonien indique que si une femme a perdu ses deux premiers fils suite à la circoncision, elle est exemptée de l'obligation de faire circoncire le troisième fils. **(Rosendaal FR et al ; 1991)**

A partir de 1813 (Hay) et à ce jour, des progrès considérables ont contribué à une meilleure connaissance de cette maladie d'origine génétique

En 1936, Patek et Taylor, ont découvert une substance dérivée du plasma sanguin, qui peut réduire le temps de coagulation d'un hémophile et qui a porté le nom de globuline anti hémophile ouvrant ainsi la voie à l'introduction du cryoprécipité et puis des premiers concentrés de facteur de coagulation pour le traitement des hémophilies A et B. **(Lewis JH et al ; 1946)**

Ces concentrés ont été découverts vers le début des années 1970 et ils ont révolutionné le traitement de l'hémophilie.

Les facteurs recombinants VIII et IX ont été approuvés respectivement en 1992 et 1997 venant couvrir les besoins des patients non satisfaits par les facteurs plasmatiques. Depuis, des enfants nés hémophiles peuvent espérer vivre longtemps, être en bonne santé et mener une vie normale. **(Schramm W. 2014)**

2. Définition

L'hémophilie est une maladie constitutionnelle rare de la coagulation liée à un déficit en facteur VIII ou facteur IX, responsable d'un déficit du complexe tenace intrinsèque, indispensable à l'amplification de la coagulation plasmatique.

Chapitre I : Généralité et hémostasie

Le mot hémophilie vient de deux mots grecs : « Haima »qui signifie le sang

Et Phelia qui signifie « l'affection »

On a 02 types d'hémophilies

L'hémophilie A, caractérisée par un déficit en facteur VIII, représente les trois quarts des formes.

L'hémophilie B, caractérisée par un déficit en facteur IX représente le quart restant.

3. Epidémiologies

3.1 Dans le monde :

L'hémophilie touche de manière quasi exclusive les garçons, elle est estimée à environ 1 cas sur 5000 naissances de sexe masculin pour l'hémophilie A et 1 cas sur 25000 naissances de sexes masculin pour l'hémophilie B (Gitschier J et al ; 1992).

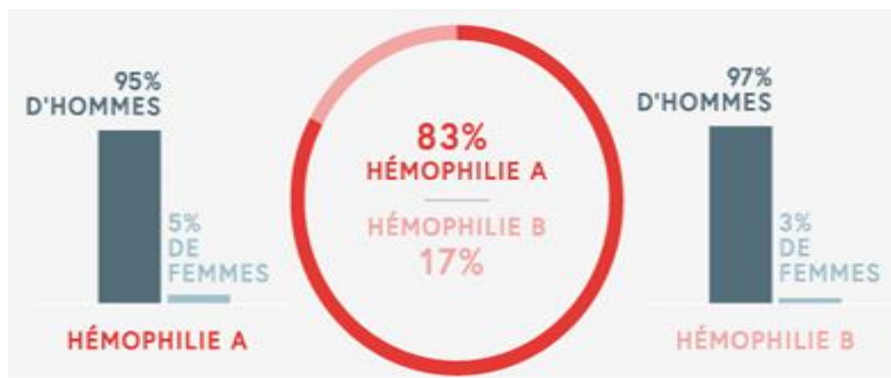


Figure1 : répartition d'hémophilie entre les femmes et les hommes (Gitschier et al : 1992)

La répartition mondiale des hémophiles .Selon l'Annuel Global Survey de 2014, en France, on dénombrait un ensemble de 6601 hémophiles dont 1201 hémophiles B, en Suisse 701 hémophiles dont 117 hémophiles B, en Belgique, 1 051 hémophiles dont 195 hémophiles B. , en Tunisie, 419 patients dont 89 hémophiles B.

Chapitre I : Généralité et hémostasie

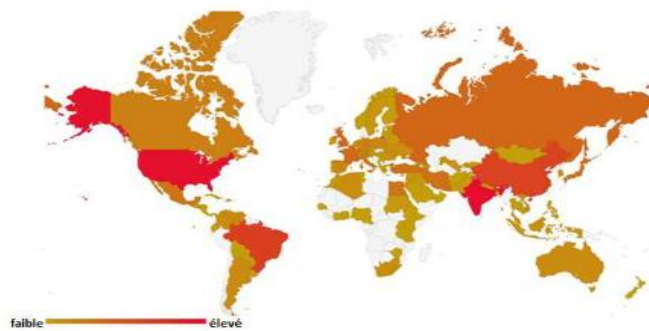


Figure2 : Répartition mondiale des Hémophiles, selon le rapport annuel global de la FMH en 2014

3.2 En Algérie :

L'effectif des hémophiles en Algérie fait état de 2448 malades. En 2017, ils étaient 2362 patients, soit une augmentation de 86 hémophiles diagnostiqués en 2018. Ces chiffres figurent dans la communication du Dr Djamilia Nadir, vice-directrice chargée des maladies non transmissibles au ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme hospitalière, présentée jeudi à Annaba, lors de la célébration de la Journée mondiale de l'hémophilie.

Selon toujours la même source, la région Est est la plus touchée, avec 835 hémophiles, contre 706 au Centre, 569 à l'Ouest et 338 au Sud. **Journée mondiale de l'hémophilie à Annaba : 86 nouveaux hémophiles diagnostiqués en 2018 23/04/2018 | El Watan | Algérie**

4. Généralité sur l'hémostasie

L'hémostasie est le processus physiologique qui arrête le saignement sur le site d'une blessure tout en maintenant un flux sanguin normal ailleurs dans la circulation. La perte de sang est stoppée par la formation d'un bouchon hémostatique (**Andrew J. Gale ; 2010**)

Classiquement, trois temps sont initiés simultanément dès que le processus d'hémostasie est enclenché:

Il s'agit de l'hémostasie primaire, l'hémostasie secondaire ou coagulation, et de la fibrinolyse [**Butenas et al. 2002**].

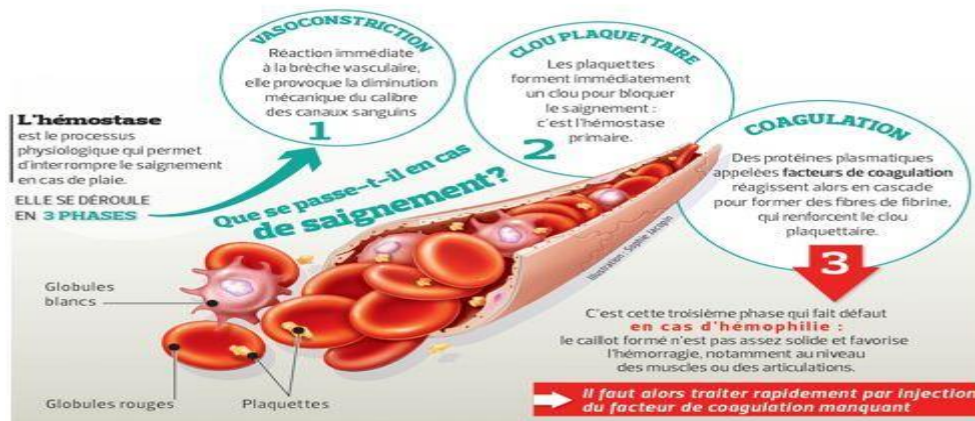


Figure3 : les phases de l'hémostasie (**Butenas ; 2002**)

4.1 Hémostasie primaire :

Fait référence à l'agrégation plaquettaire et à la formation de bouchons plaquettaires. Les plaquettes sont activées dans un processus à multiples facettes et, par conséquent, elles adhèrent au site de la blessure et les unes aux autres, colmatant la blessure.

Le processus d'hémostasie primaire se met en place dès qu'une brèche vasculaire se constitue, impliquant deux types de cellules, les cellules endothéliales vasculaires et les plaquettes, et des protéines plasmatiques que sont le facteur vonWillebrand (vWF) et le fibrinogène (Fg) [**Butenas et al. 2002**]. L'hémostasie primaire ferme la brèche vasculaire par un clou plaquettaire.

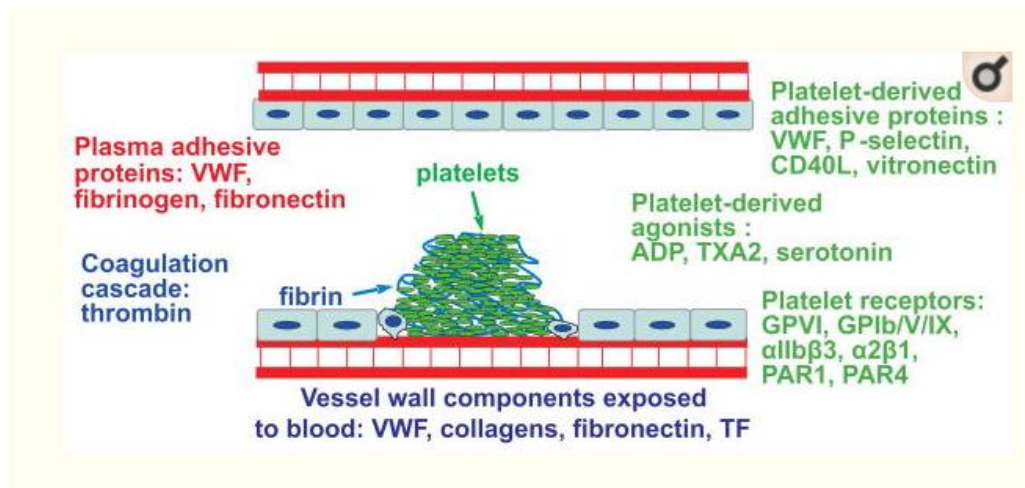


Figure 4: Hémostasie primaire, la réponse plaquettaire (Andrew J. Gale ; 2010)

4.2 Hémostasie secondaire ou coagulation

La fonction principale du système de coagulation est de maintenir l'intégrité de l'endothélium tout en préservant la perméabilité vasculaire. L'état basal du système de coagulation est non thrombogène pour 2 raisons principales: les facteurs de coagulation circulent sous leurs formes inactivées et l'endothélium est non thrombogène.

La perturbation de l'endothélium provoque une exposition du sous-endothélium thrombophile et l'initiation du mécanisme hémostatique. La voie classique de la coagulation a été remplacée par un modèle cellulaire de coagulation dans lequel le facteur tissulaire (TF), les plaquettes et la thrombine jouent des rôles clés dans l'initiation, l'amplification et la propagation de la formation de caillots.

Chapitre I : Généralité et hémostasie

Tableau 1: Tableau regroupant les facteurs de la coagulation

Facteurs*	Synonymes
I	Fibrinogène
II	Prothrombine
V	Proaccélérine
VII	Proconvertine
VIII	Facteur antihémophilique A
IX	Facteur antihémophilique B ou facteur Christmas
X	Facteur Stuart-Prower
XI	Facteur antihémophilique C ou facteur Rosenthal
XII	Facteur Hageman
XIII	Facteur de stabilisation de la fibrine ou facteur Laki-Lorand

Le mot « facteur » est représenté par la lettre « F ».

Lorsque le facteur de la coagulation est activé, il est écrit suivi de la lettre « a ».

On désigne par PPSB le complexe formé de Prothrombine, Proconvertine, facteur Stuart et facteur anti hémophilique B

L'hémostasie implique l'interaction complexe de la plaque-laisse avec la paroi du vaisseau médiée principalement par le collagène à faible cisaillement (veineux) et le VWF dans les circuits à haut cisaillement (artérioles), tous deux servant une fonction adhésive dans les plaquettes de pontage vers le sous-endothélium, où les protéines de coagulation se fixent à sites phospholipidiques à la surface des plaquettes activées, résultant en des concentrations de thrombine génératrices d'infibrine

La coagulation est généralement déclenchée après l'exposition au TF, trouvé dans le sous-endothélium, qui se lie au FVII activé en circulation.

Le complexe TF-FVIIa active zymogène FX et FIX en FXa et FIXa, respectivement. FXa convertit la prothrombine (FII) en thrombine (FIIa). Les quantités picomolaires de FIIa générées sur la surface des cellules porteuses de TF libèrent le FVIII de sa protéine porteuse VWF et l'activent en FVIIIa. La thrombine active également les plaques-laisse, exposant une surface riche en phospholipides chargée négativement capable de se lier aux

Chapitre I : Généralité et hémostasie

protéines de coagulation, y compris FIXa, précédemment générées sur la surface cellulaire portant TF.FIXa avec le cofacteur FVIIIa, le calcium et les phospholipides forment le complexe de ténase, recrutez FX sur le complexe et activez-le sur FXa. FXa avec le calcium et les phospholipides forment le complexe prothrombinase, qui à son tour convertit de grandes quantités de prothrombine en thrombine, de sorte que le fibrinogène est converti en fibrine monomères.

La thrombine active également le FXIII, qui relie les monomères de fibrine pour stabiliser le caillot, et l'inhibiteur de fibrinolyse activable par la thrombine, qui empêche la dégradation du caillot, tous deux améliorant la fermeté du caillot. (Bree Zimmerman et al ; 2013)

L'hémophilie n'est pas la seule cause de troubles de la coagulation

La coagulation est un processus complexe qui fait intervenir bien d'autres facteurs que ceux impliqués dans les hémophilies A et B. Il existe donc d'autres maladies de la coagulation qui touchent les deux sexes. C'est le cas de la maladie de Willebrand, la plus fréquente des maladies hémorragiques après l'hémophilie (prévalence mondiale de 1 %).

Elle est liée à un déficit en facteur Willebrand, une protéine impliquée dans la toute première étape de la coagulation (hémostase primaire). D'autres pathologies sont liées à des déficits en d'autres facteurs de coagulation ou à des défauts d'agrégation plaquettaire. Face à un trouble de la coagulation, le dosage des différents facteurs impliqués permet, entre autre, de réaliser un diagnostic différentiel. <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/hemophilie>

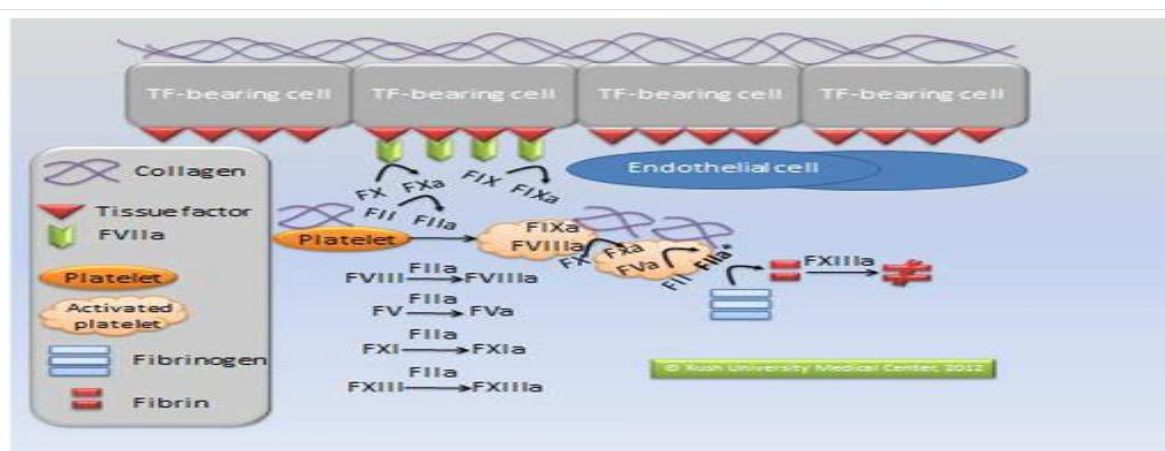


Figure 5: modèle cellulaire de coagulation sanguine (Bree Zimmerman et al ; 2013)

4.3 Fibrinolysis

Au moment même où le caillot de fibrine se forme dans l'organisme, le système fibrinolytique est activé pour le rompre. L'effecteur final du système fibrinolytique est la plasmine, qui clive la fibrine en produits de dégradation solubles.

La plasmine est produite à partir du précurseur inactif, le plasminogène, par l'action de deux activateurs du plasminogène : l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) et l'activateur du plasminogène de type tissulaire (tPA)

Les PA sont à leur tour régulés par les inhibiteurs de l'activateur du plasminogène (PAI). Le plasminogène est présent à une concentration plasmatique beaucoup plus élevée que les AP. La disponibilité des deux AP dans le plasma détermine donc généralement l'ampleur de la formation de plasmine. La libération de tPA par les cellules endothéliales est provoquée par la thrombine et l'occlusion veineuse (**Szymanski LM et al ; 1994**)

Le tPA et le plasminogène se lient tous deux au polymère de fibrine en évolution. Une fois le plasminogène activé en plasmine, il clive la fibrine au niveau de résidus spécifiques de lysine et d'arginine, ce qui entraîne la dissolution du caillot de fibrine. L'inhibiteur de la fibrinolyse activable par la thrombine (TAFI) est un zymogène qui peut être activé (TAFIa) par la thrombine ou la plasmine. (**Bajzar L et al ; 1995**)

Lorsque la fibrine est dégradée par la plasmine, les lysines C-terminales sont exposées, ce qui favorise l'activation du plasminogène supplémentaire en plasmine. Le TAFIa élimine les lysines C-terminales de la fibrine et inhibe ainsi l'activité cofactrice de la fibrine pour l'activation du plasminogène

La fibrinolyse est essentielle pour l'élimination des caillots au cours du processus de cicatrisation et pour l'élimination des caillots intravasculaires qui pourraient autrement se manifester par une thrombose. Le dépôt intravasculaire de fibrine est également associé au développement de l'athérosclérose. Un système fibrinolytique efficace tend donc à protéger contre le processus chronique de la maladie vasculaire athérosclérotique et le processus aigu de la thrombose. À l'inverse, les défauts de la fibrinolyse augmentent le risque de maladie athérotrombotique. Par exemple, des niveaux élevés d'inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1, un inhibiteur de la fibrinolyse, sont associés à un risque accru d'athérosclérose et de thrombose, (**Huber K et al ; 2001**)

Tout comme des niveaux réduits de plasminogène (**Xiao Q ; 1997**)

L'efficacité de l'hémostasie in vivo dépend non seulement des réactions pro coagulantes mais aussi du processus fibrinolytique.

1. Mode de transmission:

L'hémophilie se transmet selon le mode récessif lié au chromosome X: seuls les garçons sont atteints.

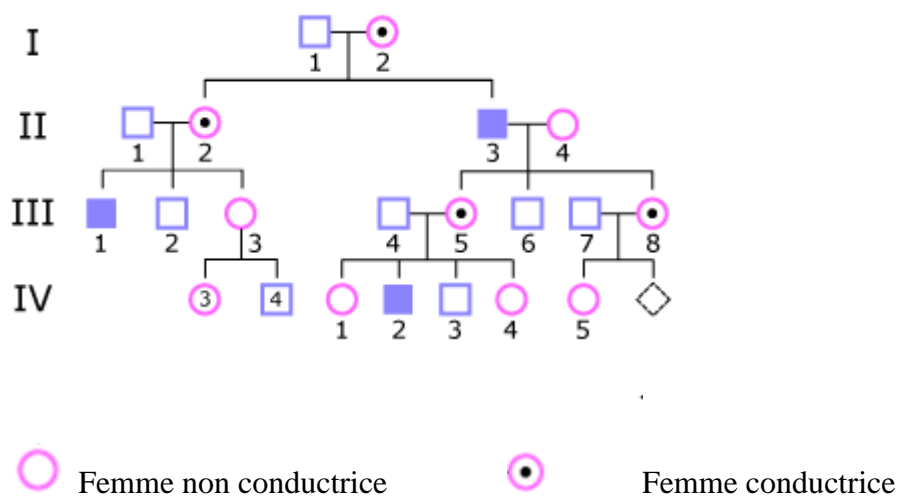
Les garçons atteints ont obligatoirement une mère porteuse de l'allèle muté (hétérozygote) dite conductrice. Car il n'existe pas dans ce cas de transmission père-fils (**Bolton-Maggs PH, Pasi KJ. 2003**).

Une femme porteuse du gène altéré (conductrice), à 50% de risque de transmettre l'allèle muté autant à ces filles qu'à ces garçons et les garçons dans ce cas seront obligatoirement hémophiles (**Bolton-Maggs PH, et al .2003, Rodrigue-Merchan E. 1995**)

L'analyse de l'arbre généalogique des femmes à risque d'être conductrices de l'hémophilie permet de les classer en deux groupes:

Les conductrices obligatoires sont : les filles d'hémophiles, les mères de deux enfants hémophiles (non jumeaux homozygotes), mère d'un enfant hémophile avec une histoire familiale évocatrice

Les conductrices potentielles sont : les femmes apparentées à des hémophiles du côté maternel (sœur, cousine et tante d'hémophile) mais qui n'ont pas données naissance à un enfant malade, les mères d'un seul hémophile sans antécédents familiaux d'hémophilie, dans ce dernier cas, il peut s'agir d'une mutation au niveau des gamètes de la mère qui n'est pas conductrice.





Homme sain



Homme malade

Figure6: Arbre généalogique d'une famille d'hémophiles

L'hémophilie apparaît aussi de façon sporadique dans environ 30 % des cas (mutation de novo). Exceptionnellement, les femmes peuvent être atteintes d'hémophilie, les causes pouvant en être [Bolton-Maggs PH, Pasi KJ. 2003]: une lyonisation extrême, un syndrome de Turner, une translocation X/autosome, un couple parental constitué d'un homme hémophile et une femme conductrice, une disomie X maternelle.

- **Risques de transmission aux enfants**

L'hémophilie se transmet selon un mode d'hérédité appelée « liée à l'X » (Figure 3). Un homme hémophile ne peut pas transmettre la maladie à un garçon, mais il va transmettre le gène altéré à toutes ses filles qui pourront le transmettre à leur tour. Une femme porteuse du gène altéré – appelée « conductrice » - pourra le transmettre, avec un risque de 50%, aussi bien à ses garçons, qui seront atteints, et à ses filles, qui seront conductrices. Dans de très rares cas, le gène altéré de la mère conductrice s'exprime (prend le pas sur le chromosome du père) s'il se produit ce qu'on appelle un défaut d'« inactivation du chromosome X ». Dans ces cas, la fille sera hémophile.

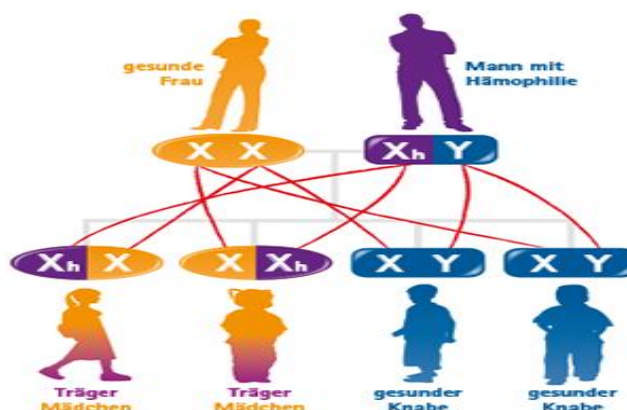


Figure 7 : Transmission de l'hémophilie selon le mode lié à l'X

2. Les anomalies génétiques responsables d'hémophilie

L'hémophilie A

Les mutations du gène du FVIII responsables d'hémophilie induisent des anomalies du FVIII qui sont d'ordre quantitatif ou qualitatif. Les anomalies quantitatives (soit la diminution ou l'absence de FVIII plasmatique) peuvent être liées à des défauts de synthèse, la production d'une protéine de FVIII tronquée ou un défaut de sécrétion (Naylor J, et al.1995) Les anomalies qualitatives, entraînent une diminution voire une perte des fonctions du FVIII.

Il peut s'agir de : l'inversion de l'intron 22, celle de l'intron 1, des mutations ponctuelles et des délétions/ insertions (Bagnall R et al ; 2002)

L'analyse de la molécule facteur VIII montre qu'elle est constituée de trois domaines distincts A, B, C. Le domaine A de 330 AA est fait de trois exemplaires A1, A2, A3. Le domaine B de 983 AA est unique. Le domaine C fait de deux segments C1, C2 de 150 AA chacun. La séquence des différents domaines à partir de l'extrémité amino-terminale est

A1-A2-B-A3-C1-C2.

Le gène responsable de la fabrication du facteur VIII qui est défectueux (mutant) dans l'hémophilie, se situe sur l'extrémité distale du bras long du chromosome X. Cela fait de l'hémophilie une maladie héréditaire liée au sexe². Il a une longueur de 186 000 paires de bases (bp), ce qui représente 0,1 % du chromosome X. Le gène codant l'ARNm de la protéine est constitué de 26 exons contenant 69 à 3 106 bp. Les 25 introns se répartissent entre 207 à 32 400 bp.

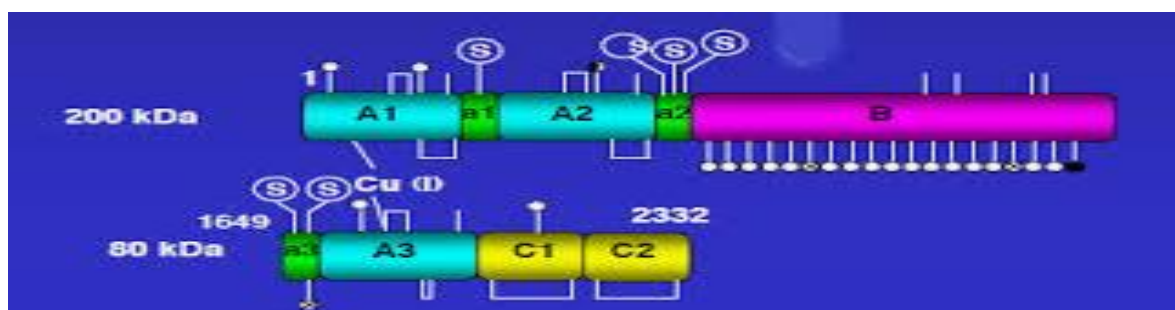


Figure 8 : Structure du gène F8

Chapitre II : Génétique de l'hémophilie

Les anomalies qualitatives, entraînent une diminution voire une perte des fonctions du FVIII (**Bagnall R, et al.2002**). Les mutations responsables d'hémophilie A peuvent être : inversion de l'intron 22, celle de l'intron 1, des mutations ponctuelles et des délétions/insertions.

De rares cas d'HA féminine ont été décrits et qui sont causés soit par l'inactivation aléatoire du chromosome X, par la présence de deux copies du gène F8 portant la mutation ou chez les filles atteintes d'un syndrome de Turner.

- **hémophilie B**

Environ 800 anomalies conduisant à une hémophilie B ont été identifiées. Il peut s'agir de délétions majeures, d'anomalies ponctuelles, des anomalies du promoteur. (**Taylor SAM et al ; 1991**)

Le facteur IX est synthétisé par un gène appelé gène F9 situé sur le bras long du chromosome X dans la région Xq27,1. Ce gène composé de 34000 paires de bases, comporte 8 exons transcrits en un acide ribonucléique messager (ARNm) de 2 803 paires de bases, qui code pour les acides aminés constituant le FIX.

Les exons sont entrecoupés de 7 introns qui sont éliminés de l'ARNm avant la traduction. L'ARNm comprend successivement en 5' une courte région non traduite de 29 nucléotides, un cadre de lecture ouvert associé à un codon stop formant un ensemble de 1383 nucléotides, et en 3' une courte région non traduite de 1390 nucléotides. La figure 6 illustre la structure du gène F9 et la composition du FIX.

Le facteur IX est une enzyme, vitamine K dépendante, synthétisée dans le foie, sous forme inactive. , Il est sécrété dans la circulation à une concentration d'environ 5µg/mL. Il est activé en FIXa pour participer à la coagulation.

Depuis le clonage du gène F9 en 1982, son étude chez différents patients a permis d'identifier de nombreuses anomalies génétiques différentes à l'origine de l'hémophilie. Parmi elles, on distingue des anomalies dites majeures telles que les grandes délétions, les mutations non-sens conduisant à un codon stop, à l'origine d'une absence de transcription et donc d'une absence de synthèse du FIX.

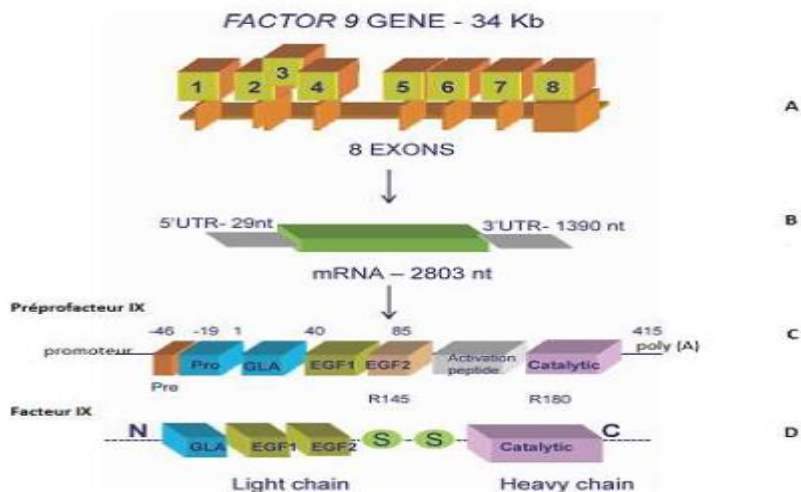


Figure 9 : Structure du gène F9 et composition du facteur IXA- Schéma du gène du FIX humain B- ARNm issu de la transcription du gène du facteur IX et emplacement du cadre de lecture C- Protéine du facteur IX avant le clivage de la préproséquence D- Facteur IX activé, selon Jayandharan

Au total, plus de 3400 patients hémophiles B et leurs mutations du gène F9 sont répertoriés dans les bases de données internationales.

Ces mutations ont été décrites dans toutes les régions du gène. Les mutations sur les exons 4 et 8 codant respectivement pour le domaine EGF-like et le domaine catalytique sont plus fréquentes parmi les mutations décrites chez les hémophiles B. 1094 mutations sont liées à un évènement moléculaire unique dont 814 soit 74% sont des mutations ponctuelles.

Un grand nombre de ces mutations ponctuelles implique des doublets CG, chez les hémophiles mineurs particulièrement. Par l'étude de l'énergie libre de Gibbs de l'ARNm sur la base de sa structure secondaire, l'analyse suggère que les mutations à l'origine d'hémophilies B sévères déstabilisent l'ARNm de façon plus importante.

Un changement de structure, de stabilité et du taux de traduction de l'ARNm pourrait donc influencer sur le degré de sévérité de l'hémophilie au même titre que le changement de propriétés physico-chimiques des acides aminés substitués.

4. les pathologies moléculaires

Le saignement dans l'hémophilie est dû à un défaut de la coagulation. L'hémostase primaire, avec formation du clou plaquettaire, se déroule normalement mais la stabilisation de

Chapitre II : Génétique de l'hémophilie

ce caillot plaquettaire par la fibrine est défectueuse à cause d'un défaut de génération de thrombine.

Comme nous l'avions décrit dans le chapitre sur les généralités, les FVIII et FIX sont centraux dans le processus de la coagulation sanguine car nécessaires pour la génération suffisante et adéquate de thrombine lors de la phase de propagation. En l'absence de FVIII ou de FIX, le saignement persiste parce que l'amplification et la génération stable de FXa sont insuffisantes pour soutenir l'hémostase.

En effet, le fonctionnement de la seule voie extrinsèque, qui initie le phénomène de coagulation, est insuffisant pour maintenir une hémostase correcte ; la voie intrinsèque générant beaucoup plus de FXa pour permettre la propagation efficace du phénomène de coagulation.

L'absence d'un complexe tenase intrinsèque fonctionnel empêche « l'explosion de thrombine » nécessaire à la phase de propagation et indispensable pour conférer une structure stable au caillot.

L'hémophilie apparaît ainsi comme un défaut de génération de thrombine à la surface des plaquettes, conduisant à la génération plus lente d'un caillot de structure altérée.

Chapitre III : Troubles des mécanismes de coagulation

1. Les facteurs anti hémophiliques A et B

a) Le facteur anti hémophilique A (facteur VIII ou FVIII)

Le facteur VIII est un polypeptide de 2351 acides aminés, présent à l'état de trace dans le plasma humain. Ce polypeptide est constitué d'un peptide signal de 19 AA, qui sera clivé lors de la sécrétion, et d'une protéine mature de 2332AA. Le poids moléculaire du FVIII mature est d'environ 330 kDa (Gitschier J, et al. 1992). La protéine de FVIII est organisée en domaines suivant le motif (Schved J-F. 2000) :

A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2

La protéine est constituée de deux chaînes : la chaîne lourde comporte les domaines A1-a1-A2-a2-B et mesure de 90 à 210 kDa approximativement en fonction de la taille du fragment de domaine B clivé par les protéases ; la chaîne légère comporte les domaines a3-A3-C1-C2 pour une taille d'environ 80 kDa (Schved J-F. 2000).

Les chaînes lourde et légère restent unies grâce à des liaisons ioniques divalentes (cuivre, calcium ou manganèse) non covalentes entre les domaines A1 et A3, formant ainsi un hétéro-dimère. La fonction et la stabilité du FVIII dépendent des ions métalliques divalents, particulièrement les ions calcium (Ca^{2+}) et les ions cuivre (Cu^{2+}) (Gitschier J, et al. 1992, Hollestelle M, et al. 2001)

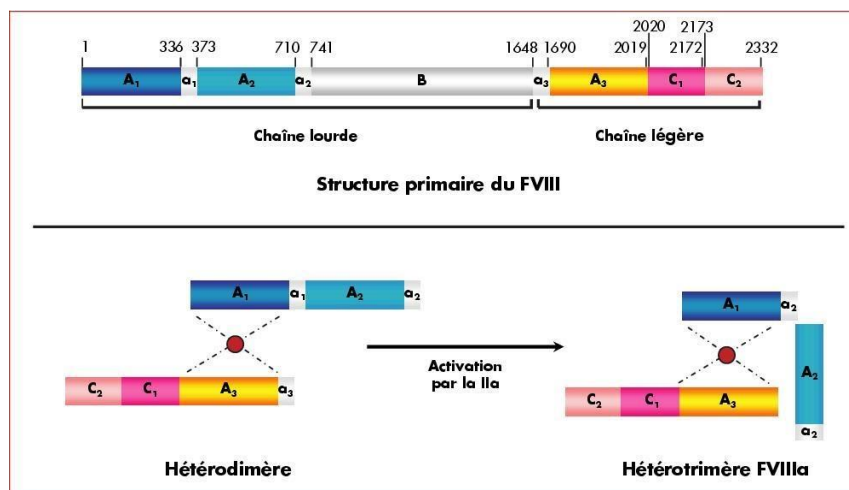


Figure 10 : Interactions du FVIII avec les autres composants de l'hémostase (Gitschier et al 2001)

Chapitre III : Troubles des mécanismes de coagulation

Une fois sécrété dans le plasma, 92 à 95% du FVIII se lie de façon non covalente au facteur von Willebrand (vWF) et 5% de FVIII circule librement. (**Hoyer L. 1981, Lenting P, et al. 2010**). La formation du complexe FVIII/vWF est cruciale pour maintenir des taux stables de FVIII dans le plasma (**Nesheim M et al. 1991, Weiss H, et al. 197**). Le clivage du FVIII par la thrombine provoque un détachement du FVIII et du vWF, associé à une conversion du FVIII dans sa forme active.

b) Le facteur anti hémophilique B (FIX)

Le FIX est une protéine monocaténaire comportant 451AA, sa masse moléculaire est de 57 kDa, sa demi-vie est de 24 heures, c'est une sérine protéase vitamine-K dépendante [**Bolton-Maggs PH, Pasi KJ. 2003**].

Modifications post-traductionnelles du facteur IX

Le facteur IX circule sous forme monocaténaire à un taux plasmatique de 3 à 5 mg/l. L'excision du peptide signal génère le FIXa, qui comporte une chaîne légère de 145 AA liée par un pont disulfure à une chaîne lourde de 234 AA [**Wion K, Kelly D, et al. 1985**]

2. Bases moléculaires des facteurs de la coagulation :

a) Le gène du FVIII

Le gène du FVIII, appelé *F8*, est situé sur le bras long du chromosome X en position Xq28. Le gène *F8* a été cloné en 1984, il s'étend sur 186 kb, et comprends 26 exons et 25 introns, représentant 0,1% du chromosome X, il est l'un des plus grands gènes du génome humain [**Gitschier J, Wood W, et al. 1992**].

La transcription de ce gène produit un ARN messager (ARNm) de 9 kb. [**Wion K, Kelly D, et al. 1985, Martinez. P. 2010**].

L'ARNm du FVIII a été retrouvé dans plusieurs tissus : il est essentiellement synthétisé au niveau du foie, par les hépatocytes et les cellules sinusoidales [**Hollestelle M, Thinnés T, et al. 2001, Jacquemin M, Neyrinck A, et al. 2006**], mais nous pouvons aussi le retrouver dans la rate, les reins, les lymphocytes ou même dans les cellules endothéliales vasculaires du poumon [**Gitschier J, Wood W, et al. 1992**].

b) Le gène du FIX

Chapitre III : Troubles des mécanismes de coagulation

Le gène du FIX humain a été isolé en 1985, il se situe sur le bras long du chromosome X (Xq27). Il est plus petit que le gène du FVIII puisque sa longueur est de 33kb et comporte 8 exons et 7 introns. Le rôle joué par les différents exons est désormais établi [Bolton-Maggs PH, Pasi KJ. 2003].

3. Physiopathologie de l'hémophilie

Physiologie de la coagulation

La coagulation plasmatique est un processus physiologique qui permet grâce à un ensemble de réactions enzymatiques la génération de grande quantité de thrombines permettant la transformation du fibrinogène en fibrine dont la polymérisation permet la consolidation du thrombus plaquettaire formé lors de l'étape d'hémostase primaire.

Deux voies indépendantes (intrinsèque et extrinsèque) caractérisée par trois phases : initiation, amplification et propagation.

1- Etape d'initiation

Le facteur tissulaire (FT) provenant de la cellule endothéliale lésée lors de la brèche vasculaire, se lie au facteur VII activé (FVIIa). Le complexe ainsi formé (FT – FVIIa) permet l'activation des facteurs X (FX) et IX (FIX) en FX activé (FXa) et FIX activé (FIXa) respectivement. L'activation de ces facteurs permet ensuite la génération de quelques traces de thrombine en présence de calcium et des phospholipides représentés par la surface plaquettaire.

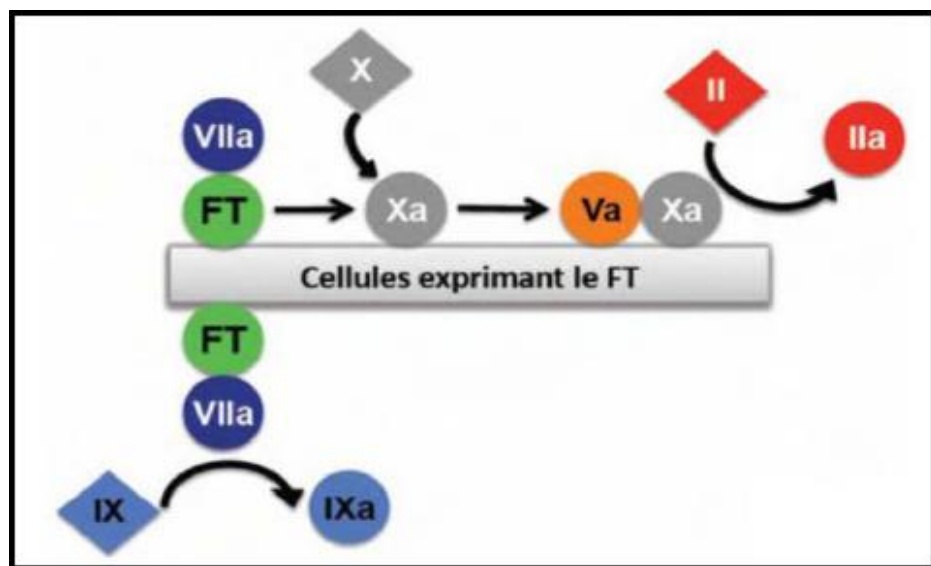


Figure 11 : phase d'initiation (Lebreton A et al ; 2012)

2- Etape d'amplification

Les traces de thrombine générées à la surface des cellules exprimant le FT vont permettre d'activer le facteur VIII (FVIII), le facteur XI (FXI) et le facteur V (FV), qui se retrouvent concentrés à la surface des plaquettes activées A la fin de cette étape

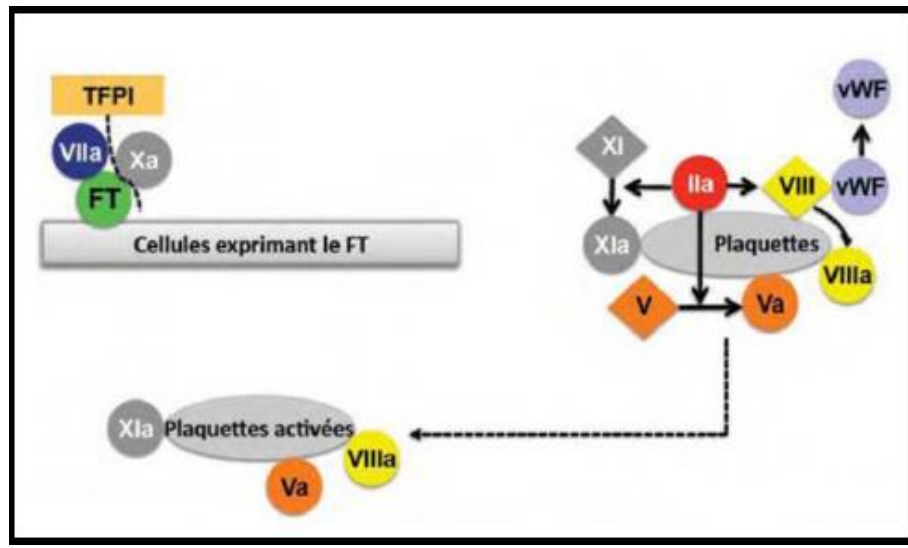


Figure 12 : phase d'amplification (Lebreton A et al ; 2012)

3-Etape de propagation

La surface des plaquettes activées se retrouve concentrée par le FXI activé (FXIa) qui va permettre l'activation du FIX. Le FIXa va ainsi former avec son cofacteur FVIII, le calcium et les phospholipides le complexe ténase. La présence du FVIIIa permet de catalyser la transformation du FX en FXa par le FIXa d'un facteur 10P5P.

La quantité importante de FXa générée par le complexe ténase permet, - en présence de son cofacteur FVa, le calcium et les phospholipides (complexe nommé prothrombinase) -, la transformation d'une quantité importante de prothrombine en thrombine. C'est ce pic de

Chapitre III : Troubles des mécanismes de coagulation

thrombine ou « thrombinburst » qui permet une transformation massive du fibrinogène en monomères de fibrine. La polymérisation et la stabilisation de ces monomères de fibrine par le facteur XIII activé (FXIIIa) sont la base du thrombus fibrinocruorique (Lebreton A et al ; 2012)

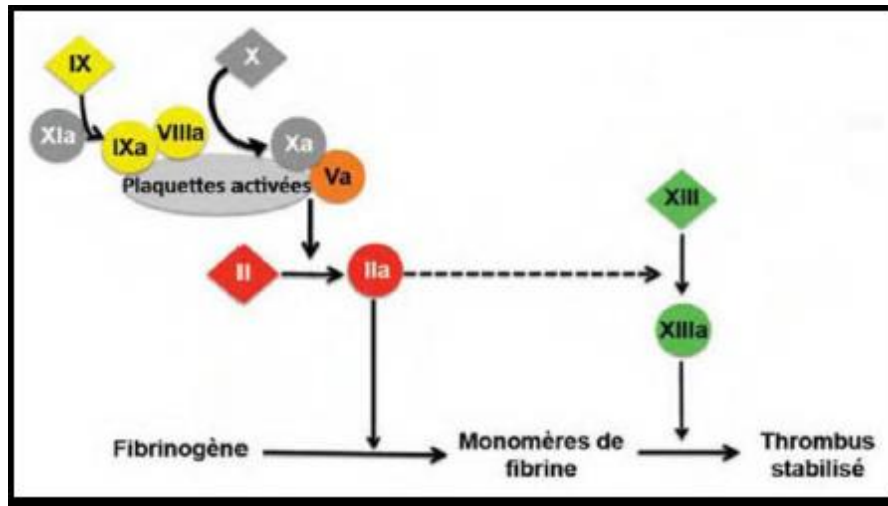


Figure 13 : phase de propagation (Lebreton A et al ; 2012)

4. Conséquence du déficit en facteurs anti hémophiliques sur l'hémostase :

En l'absence d'une ténase intrinsèque fonctionnelle, due soit au d'un déficit de l'enzyme FIXa, soit à un déficit du cofacteur FVIIIa, ne permettant pas une activation importante du FX à la surface des plaquettes. Il ne peut pas y avoir cette « explosion de thrombine » nécessaire à la phase de propagation et indispensable pour conférer une structure stable au caillot. L'hémophilie apparaît ainsi essentiellement comme un défaut de la génération de thrombine à la surface des plaquettes, conduisant à la génération plus lente d'un caillot de structure altérée, qui va être responsable d'un syndrome hémorragique dont l'importance dépend de la quantité résiduelle de facteur anti hémophilique (J.-F. Schved ; 2008)

1. Classification

Il existe une bonne corrélation entre la sévérité de la maladie et le taux de facteur VIII circulant dans le sang du malade mais dans un pourcentage non négligeable de cas, cela diffère d'un point de vue clinique.

En effet, certains hémophiles avec un taux de FVIII bas ne souffrent jamais d'hémorragies graves, tandis que d'autres, dont le déficit peut être considéré comme modéré ont des problèmes fréquents. Ces discordances entre la clinique et la biologie apparaissent surtout quand il s'agit de distinguer les formes sévères des moins graves des formes modérées

(Villar A et al ; 2006)

Quel que soit le type d'hémophilie concerné, les manifestations sont identiques, et seule leur importance varie en fonction du taux sanguin du facteur de coagulation déficitaire.

Il s'agit toujours d'accidents hémorragiques, on a trois types d'hémophilie :

a) Hémophilie sévère

Elle représente 50 % des cas. Le taux plasmatique VIII est inférieur à 1 U/dl. Les patients vont présenter des hémorragies très tôt : vers 6-8 mois, quand l'enfant devient plus actif.

L'hémophilie sévère est caractérisée par des saignements spontanés des articulations et parfois même des tissus mous : un traumatisme léger peut entraîner une hémorragie mettant en péril la vie du patient.

b) Hémophilie modérée

Elle représente 10 % à 20 % des cas. Le taux de facteurs est compris entre 1 et 5 U/dl. Les accidents hémorragiques surviennent lors de traumatismes importants ou en cas d'intervention chirurgicale mais se manifestent moins souvent par des hématomes musculaires ou des hémarthroses.

c) Hémophilie mineure

Elle représente 30 à 40 % des hémophiles. Le taux de facteurs est compris entre 5 et 30 U/dl. Plus le taux est élevé, plus la symptomatologie est frustre. Les accidents sont beaucoup plus rares, voire inexistants et la découverte peut être tardive. En effet, la symptomatologie peut rester latente jusqu'à ce que le patient subisse une intervention chirurgicale ou une avulsion dentaire. Souvent, l'intervention se passe sans encombre mais l'hémorragie apparaît plusieurs heures après, infiltrant les tissus avoisinants et pouvant constituer un hématome diffus au pharynx et au rétro pharynx, constituant une véritable

Chapitre IV : Aspects cliniques et thérapeutiques

urgence chirurgicale

Tableau 2 : classification d'hémophilie selon l'importance de déficit factoriel

Tableau I. Classification de l'hémophilie selon l'importance du déficit factoriel.

	Activité coagulante	FIX:C (%)		Fréquence des hémarthroses
		FVIII:C (%)		
Hémophilie A	Sévère	< 1	> 50	+++
	Modérée	1 – 5	> 50	+
	Mineure	5 – 35	> 50	(+)
Hémophilie B	Sévère	50 – 100	< 1	+++
	Modérée	50 – 100	1 – 5	+
	Mineure	50 – 100	5 – 35	(+)

2. Singes cliniques

Le tableau clinique est identique dans les deux types d'Hémophilie A ou B.

La fréquence des manifestations hémorragiques et leur intensité dépendent de la Sévérité du déficit biologique.

Les hémorragies sont habituellement provoquées et surviennent par poussées avec des périodes d'accalmie.

2.1. La forme majeure

Les premières manifestations hémorragiques apparaissent le plus souvent à la suite de traumatismes minimes, dans la première année de vie, le nouveau-né ne saignant habituellement pas.

- **Hémorragies caractéristiques**

Les hémarthroses atteignent les articulations soumises à des pressions importantes (chevilles, genoux, hanches) ou peu protégées (poignets, coudes).

Elles réalisent un tableau d'arthrite aiguë avec articulation chaude, gonflée, douloureuse et impotence fonctionnelle.

Les hématomes peuvent être superficiels et s'accompagnent d'ecchymoses; ils se résorbent spontanément plus ou moins vite. Plus dangereux sont les hématomes profonds, en particulier

- ✚ les hématomes comprimant un tronc nerveux (médian et cubital à la loge antérieure de l'avant-bras, sciatique à la fesse ou au creux poplité).

- ✚ Les hématomes entraînant une réaction tendineuse, syndrome de VOLKMANN (consécutif à un hématome de la loge de l'avant-bras) ou équin (après un hématome du mollet).

- ✚ les hématomes du plancher de la bouche (risque d'asphyxie).

Chapitre IV : Aspects cliniques et thérapeutiques

- ✚ les hématomes rétro-orbitaires (risque de cécité)
- ✚ les hématomes difficiles à diagnostiquer du fait de leur topographie (psoas, espace rétro-péritonéal).
- ✚ Les hématuries, spontanées et récidivantes sont moins fréquentes mais peuvent poser des problèmes de traitement et se compliquer de coliques néphrétiques.
 - **Hémorragies moins spécifiques**
 - ✚ Les hémorragies provoquées, cutanées par coupure, buccales par morsure de langue, postopératoires même pour des gestes minimes (avulsion dentaire).
 - ✚ Les hémorragies viscérales sont moins fréquentes.
 - ✚ Les formes digestives doivent faire rechercher une lésion préexistante.
 - ✚ Les localisations intracrâniennes post-traumatiques doivent être diagnostiquées traitées en urgence, une de leurs complications est la survenue d'une épilepsie

2.2 formes modérées ou mineures

Le diagnostic de la maladie peut donc être fait à l'âge adulte, voire dans le cadre d'un bilan systématique préopératoire

3. Symptomatologie

Les patients hémophiles saignent dans leurs tissus. Les saignements peuvent être immédiats ou se produire lentement, suivant l'ampleur du traumatisme et la concentration plasmatique en facteur VIII ou IX. La douleur apparaît souvent au début du saignement, parfois même avant que tout symptôme hémorragique ne soit objectivable. Les hémarthroses chroniques ou récidivantes peuvent conduire à l'apparition d'une inflammation de la synoviale et d'une arthropathie. Tout traumatisme au niveau de la tête, même banal, peut déclencher une hémorragie intracrânienne. Les hémorragies de la base de la langue peuvent entraîner une obstruction des voies respiratoires engageant le pronostic vital. **(R, Bucher P. 1998)**

- ❖ **L'hémophilie mineure** (taux de facteur de 5 à 25% de la normale), on peut observer un saignement excessif après une chirurgie ou une extraction dentaire.
- ❖ **L'hémophilie modérée** (taux de facteur de 1 à 5% de la normale) se traduit habituellement par l'apparition de manifestations hémorragiques après des traumatismes minimes.
- ❖ **L'hémophilie sévère** (taux de facteur VIII ou IX < 1% de la normale) se manifeste par des hémorragies graves tout au long de la vie. Elles débutent habituellement peu après la naissance (p. ex., hématome du cuir chevelu après

accouchement ou hémorragies post-circoncision).

4. Diagnostic

4.1 Le diagnostic moléculaire et génétique

Suite au diagnostic d'hémophilie, il convient de :

- Dresser l'arbre généalogique.
- Réaliser l'enquête familiale (interrogatoire ; bilan d'hémostase avec dosage du F VIII et F IX).
- Faire le diagnostic des conductrices et le diagnostic anténatal pour la descendance des conductrices.

➤ **Détection des hétérozygotes**

Il s'agit de repérer les femmes conductrices du gène pathogène dans les familles atteintes ou bien dans le cas contraire de confirmer le caractère sporadique et donc la néo mutation dans les hémophilies isolées.

Le corollaire étant de montrer que certaines femmes sont non conductrices et donc de pouvoir indiquer qu'elles n'ont pas de risque et ne doivent pas entreprendre de diagnostic anténatal.

➤ **Formes familiales**

Dans l'hémophilie A :

L'analyse phénotypique (dosage de F VIIIc coagulant, dosage de facteur von Villebrandt, étude du rapport F VIII c / vW Ag) permet la détection de 75% des conductrices.

-Si le rapport est inférieur à 0,8 – 0,9 la femme est conductrice. Dans 15% des cas, les dosages normaux ne permettant pas d'exclure le statut de conductrice.

-L'analyse génotypique doit être effectuée à partir de prélèvements de sang de toute la famille dont les sujets atteints, les femmes à tester conductrices potentielles.

Elle comprend :

- La recherche de l'inversion par acentrique

Chapitre IV : Aspects cliniques et thérapeutiques

- L'étude directe de la mutation exceptionnelle.

Dans l'hémophilie B

L'analyse phénotypique (dosage du facteur IXc et du facteur IXag et étude du rapport FIXc/FIX ag.) indique une conductrice si le rapport est inférieur à 0,7.

Soixante pour cent des conductrices peuvent être diagnostiquées par ce test.

L'analyse génotypique fait appel à des techniques de biologie moléculaire.

Les cas sporadiques.

Lorsqu'il n'existe aucune atteinte familiale et qu'un seul sujet masculin est atteint on peut envisager l'existence d'une néo mutation survenue dans la gamétogenèse de la mère.

Il convient alors de pouvoir étudier la mutation chez le proposant et de définir la lésion génétique en cause. L'utilisation de polymérase chaine réaction (PCR) dans

Les zones fonctionnellement importantes du gène, associée à un séquençage des produits d'amplification peuvent parfois permettre de définir la mutation en cause.

Celle-ci peut ensuite être recherchée chez la mère du sujet. Si elle est retrouvée, la mère est en fait conductrice, la mutation s'est produite lors de la gamétogenèse de l'un des parents.

4.2 Le diagnostic anténatal

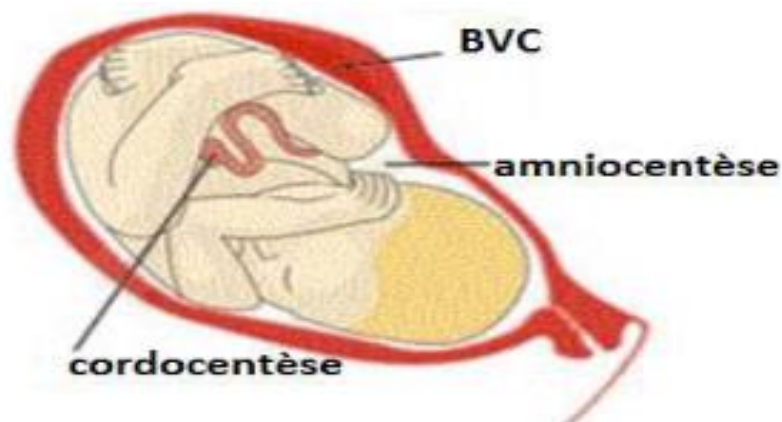


Figure 13 : Illustration des différents emplacements de ponction dans les méthodes de diagnostic prénatal, selon Tolédano et Metzge

Chapitre IV : Aspects cliniques et thérapeutiques

L'hémophilie sévère (F VIII ou F IX < 1%) est souvent invalidante, ceci amène les couples à demander un diagnostic anténatal.

Ce diagnostic n'est envisagé qu'en cas de forme sévère et après confirmation du statut de conductrice.

Il comportera deux temps : un diagnostic de sexe puis un diagnostic d'atteinte d'un éventuel fœtus masculin. On peut y proposer :

- Biopsie de trophoblaste à 11 SA
- Diagnostic de sexe par caryotype fœtal sur le trophoblaste ou (si consultation tardive) par échographie à 17 SA
- Diagnostic d'atteinte si embryon masculin par étude de l'Adénosine
- Désoxyribonucléique (ADN) recherche de la mutation sur trophoblaste,
- Contrôle sur sang fœtal à 18-20 SA (caryotype masculin et dosage des facteurs FVIII ou IX) prélevé du cordon sous échographie dès la 22^{ème} semaine.

4.3 Le diagnostic positif

Le bilan de coagulation standard est caractérisé par un allongement isolé du temps de céphaline activée (TCA ou TCK), sans allongement du temps de Quick, du temps de thrombine, du temps de saignement (TS). Le diagnostic de l'hémophilie A et du degré de sévérité ne peut être apporté que par le dosage spécifique du FVIII.

Dosage de l'activité coagulante du FVIII : Deux techniques sont employées pour déterminer la concentration plasmatique en FVIII. Ce sont des techniques basées sur la mesure de l'activité pro-coagulante du FVIII (FVIII:C) c'est-à-dire sa fonctionnalité. (Villar A, Windyga J.2006)

Ces deux techniques sont :

-**Une méthode coagulométrique**_(la plus utilisée)

Chapitre IV : Aspects cliniques et thérapeutiques

Le FVIII coagulant (FVIII : C) est dosé habituellement en un temps, sur le principe de la correction du temps de coagulation d'un plasma dépourvu de FVIII sous l'effet de l'apport de FVIII par le plasma du patient.

Une méthode chromo génique : peut également être utilisée.

Enfin l'antigène FVIII (FVIII : Ag) peut être dosé en radio-immunologie ou en Elisa avec des taux habituellement proche des taux de FVIII c : les patients chez lesquels le dosage antigénique retrouve, même à l'état de traces, la présence du facteur anti hémophiliques sont dits aussi « CRM+ ».

Le risque de développer un inhibiteur est probablement plus faible chez ces patients que chez les sujets CRM-.

4.4 Diagnostic phénotypique

Le taux de FVIII, qui varie chez les sujets normaux de 50 à 200 %, est en théorie, de 50 chez les conductrices d'hémophilie A. En réalité de grandes variations sont observées selon le degré de lyonisation c'est-à-dire d'inactivation au hasard de l'un des deux chromosomes X dans les cellules somatiques synthétisant le FVIIIc.

La synthèse du vWF étant normale chez l'hémophile, c'est en fait le rapport FVIII/vWF qui est pris en compte.

Le dosage du FVIII :

Ag apparaît même plus discriminant que celui du FVIII : C. L'interprétation de ce rapport doit tenir compte de l'âge (le FVIII et le vWF sont plus élevés aux âges extrêmes de la vie), du groupe sanguin ABO (les sujets O ont des taux de FVIII et de vWF plus faibles que les sujets des autres groupes) et de la reproductibilité de la méthode.

Chaque laboratoire doit ainsi établir ses propres normes. Un rapport FVIII : C/vWF : Ag inférieur à 0,7 retrouvé à plusieurs reprises, en dehors de toute grossesse, est cependant assez évocateur du statut de conductrice. Néanmoins une petite proportion de conductrices (15 à 20 %) reste dans les strictes limites de la normale

Il est donc impossible d'éliminer le statut de conductrice au vu de l'analyse phénotypique.

4.5 Diagnostic génotypique

Le diagnostic génotypique utilise deux approches :

- **une approche directe** par mise en évidence directe du défaut génétique responsable de l'anomalie.

- **une approche indirecte** par étude de l'association entre le défaut causal et des marqueurs polymorphes situés à proximité ou au sein du gène ; cette approche est plus lourde car elle impose l'étude de plusieurs membres de la famille.

Cependant, un variant de maladie de Willebrand (variant « Normandie », ou II-N) peut prêter à confusion avec une hémophilie A modérée ou mineure. Il s'agit d'une anomalie moléculaire du facteur Willebrand, dont l'affinité pour le facteur VIII est très diminuée. Dans ces conditions, le facteur VIII n'est pas transporté par le facteur von Willebrand dans le sang et sa demi-vie plasmatique est raccourcie. Son taux s'abaisse. Le diagnostic différentiel est établi en laboratoire spécialisé par l'étude de la liaison du facteur Willebrand du patient et du facteur VIII normal. **(Deplas A. 2002)**

Enfin, les hémophilies A diagnostiquées chez l'adulte ne doivent pas être confondues avec des auto anticorps anti-facteur VIII neutralisants (« anticoagulants circulants »), qui peuvent survenir dans le cadre de désordres auto-immuns. Le diagnostic différentiel est établi en recherchant la présence de ces anticorps inhibiteurs par des examens spécifiques.

5. Prévention

Les membres de la famille porteurs doivent être identifiés de manière à pouvoir bénéficier d'un conseil génétique. **(Astermark J et al ; 2007)**

Pour prévenir les saignements, le patient hémophile doit éviter l'aspirine et les AINS qui altèrent tous deux les fonctions plaquettaires. Un suivi régulier de l'état dentaire est nécessaire afin d'éviter les extractions ou autres interventions invasives. Les médicaments doivent être administrés po ou IV; les injections IM sont contre-indiquées car génératrices d'hématomes. Le patient hémophile doit être vacciné contre l'hépatite B.

6. Traitement et thérapie

Le traitement de l'hémophilie est une en charge globale du patient et de sa famille dès le plus jeune âge dans un centre de référence spécialisé (Centres régionaux de l'Hémophilie). Le traitement à domicile et, dès qu'il est possible, l'auto traitement sont les meilleures options.

Lorsque le traitement par la desmopressine n'est pas possible, la base du traitement consiste à la substitution du déficit en facteurs de la coagulation.

Le traitement qui était le plus souvent un traitement à la demande (lors d'épisodes hémorragiques ou de situations à risque), est de plus en plus souvent un traitement prophylactique, que l'on adapte à la sévérité de l'expression clinique et au mode de vie du patient (**Boneu B et al ; 1997**)

Une information complète sur les caractères de la maladie, les soins à prodiguer lors de blessures ou de traumatismes légers, est régulièrement enseignée ; de même que les activités à éviter ou à développer.

Tous les épisodes de la vie courante doivent être accompagnés par le centre :

Avulsions dentaires, amygdalectomies vaccination

6.1 Thérapie de remplacement

Le traitement de base qui permet d'enrayer ou de prévenir les saignements chez les personnes atteintes d'hémophilie A est le traitement par facteurs de remplacement. Il s'agit d'une perfusion de concentré de facteur VIII administrée pour empêcher ou maîtriser l'hémorragie.

Ces concentrés proviennent de deux sources :

- Du plasma humain,
- D'une lignée cellulaire obtenue par génie génétique par le biais de la technologie de recombinaison de l'ADN.

Dans les deux cas, la protéine de facteur VIII est presque identique à celle qui fait défaut dans le sang des hémophiles. Après une perfusion de concentré, toutes les protéines requises pour la coagulation sont en place.

Chapitre IV : Aspects cliniques et thérapeutiques

Le sang de l'hémophile devient « normal », du moins pendant quelques heures. Cela permet au caillot de se former là où le vaisseau sanguin est endommagé.

Malheureusement, les facteurs de coagulation remplacés ne persistent pas dans la circulation sanguine des hémophiles. En effet, la moitié de l'activité du facteur de coagulation qui a été perfusé est éliminé par l'organisme dans les 24 heures. Le sang de l'hémophile redevient incapable de coaguler normalement.

Les produits utilisés sont soumis à la réglementation des médicaments et non à celle des produits transfusionnels.

Facteur VIII obtenu par génie génétique (artificiel)

Le facteur VIII obtenu par génie génétique ne provient pas du plasma humain. Il est fabriqué comme suit :

le gène du facteur VIII humain est isolé par génie génétique on opère une transfection du gène dans des cellules non humaines, par exemple des cellules de reins de nouveaux nés hamsters ou des cellules ovariennes de hamsters chinois puis ces cellules sont mises en culture, le facteur VIII est séparé de la culture cellulaire et purifié, de l'albumine humaine ou de la saccharose sont ensuite ajoutées pour stabiliser le produit facteur VIII final, le facteur de la coagulation est transformé en poudre lyophilisé et placé dans des flacons. **(Dimichele DM .1998)**

Exemples de concentrés de facteurs VIII obtenus par génie génétique :

- Kogenate Bayer ®: Octocog alpha (Bayer)

- Refacto ®:

Moroctocog alph(Wyeth)

- Advate ®:

Moroctocog alph(Baxter)

Facteur VIII dérivé du plasma

Les facteurs VIII dérivés du plasma sont obtenus à partir de plasma humain. Le plasma est séparé en ses différentes composantes. C'est ce que l'on appelle le fractionnement. Les principaux produits dérivés du plasma sont :

-L'albumine (qui sert de traitement des brûlures),

Chapitre IV : Aspects cliniques et thérapeutiques

-Les immunoglobulines (qui servent à traiter les problèmes immunitaires),

-Le facteur VIII (pour traiter l'hémophilie A),

-Le facteur IX (pour traiter l'hémophilie B).

Pour assurer l'innocuité des produits sanguins dérivés du plasma, on leur fait franchir quatre étapes :

Sélection des donneurs: si la personne présente un facteur de risque, on ne l'autorise pas à donner son sang.

Chaque don de sang est soumis à des tests pour y déceler la présence d'anticorps dirigés contre les virus connus VIH, hépatite B (VHB), hépatite C (VHC)

(Test Elisa au centre de transfusion puis de nouveau au Laboratoire Français de fractionnement et de biotechnologie).

Si les résultats des tests effectués sur un don de sang sont positifs, le sang n'est pas utilisé et le donneur ne peut plus donner son sang.

Après sa fabrication, le produit final subit un procédé d'inactivation virale afin de détruire les virus qui pourraient se trouver encore dans le produit sanguin. Les méthodes d'inactivation virale sont les suivantes :

- Chauffage du concentré de facteur (par une chaleur sèche ou humide) qui est destiné aux virus thermosensibles (exemple : VIH, VHB)
- Traitement du concentré de facteur au moyen de solvants-détergents, destiné aux virus à enveloppe lipidique (exemple : VIH, VHB, VHC).
- Filtration sur des filtres de très fin calibre (15 nm) qui retiennent les particules virales en fonction de leur taille.

Actuellement, tous les produits doivent appliquer une combinaison de deux étapes d'inactivation virale fondées sur des procédés différents (par exemple : traitement solvant-détergent puis filtration).

Le produit final est à nouveau soumis à des tests pour y vérifier la présence de bactéries ou de virus.

Exemples de facteurs VIII de la coagulation dérivés du plasma :

Factane® (LFB)

Octanate® (Octapharma)

➤ **Risque de survenue d'inhibiteurs au cours du traitement substitutif**

Certains patients développent des anticorps inhibiteurs des facteurs transfusés, après un nombre variable de jours de traitement (habituellement, dans les 50 premières expositions) : 30 % des patients présentant une hémophilie sévère développent ce problème contre 5 à 10% dans les cas modérés et mineurs.

La présence de l'inhibiteur peut gêner l'accès aux traitements prophylactiques et aggraver le pronostic fonctionnel à long terme. **(Broze GJ, Jr. 1995)**

Certains de ces inhibiteurs sont transitoires et disparaissent lorsque le traitement est poursuivi. Ils correspondent à l'apparition d'une tolérance immune spontanée. D'autres persistent et une tentative de mise en tolérance immune thérapeutique est nécessaire, en administrant de fortes doses du facteur très régulièrement pendant une période de plusieurs mois ou années. Lorsque l'inhibiteur est à faible concentration, il peut être saturé en augmentant la dose de FVIII. Au-delà d'un certain seuil, l'inhibiteur devient non saturable car les quantités de FVIII à injecter seraient trop importantes. Le patient sera alors traité par des concentrés dits « activés », car ils contiennent des formes activées des facteurs de coagulation (complexe prothrombiniques activés FEIBA®, Baxter) ou FVII activé recombinant (NovoSeven®, NovoNordisk) capables de « court circuiter » le rôle des FVIII dans l'activation de la coagulation.

Pour le Facteur VIII la perfusion d'1 UI/kg augmente le taux circulant de FVIII de 2%, la demi-vie du FVIII dans les concentrés étant de 8h, 3 perfusions par jours sont nécessaires. La dose à injecter est de : poids X augmentation souhaitée (en %). **(GI, Norris KM 1976)**

Agents anti-fibrinolytiques

Les deux médicaments les plus utilisés sont l'acide ϵ -aminocaproïque (EACA, Caproamin®, non disponible en France) et l'acide tranexamique (AMCHA, Amchafibrin®).

Chapitre IV : Aspects cliniques et thérapeutiques

Ces médicaments se lient au site de liaison du plasminogène, en résulte une inhibition de la fibrinolyse

L'administration peut se faire par voies orale, intraveineuse ou topique.

Ils sont très utiles pour contrôler les saignements peu importants, en particulier après une avulsion dentaire. (Van Mourik JA, Mertens K, 1999)

6.2 Thérapie génique

L'hémophilie est, en théorie, un bon candidat pour les procédés de thérapie génique. En effet, il s'agit d'une maladie mono factorielle dont les gènes sont connus. De plus, de nombreuses cellules, après modification génétique, sont capables de produire des facteurs de coagulation.

De grands espoirs sont nés d'essais cliniques positifs chez les patients atteints d'hémophilie B.

➤ Les modalités thérapeutiques

1. Traitement à la demande :

Consiste à injecter le FAH dès la survenue d'un accident hémorragique, doit se faire au plus tôt possible, au premier gêne, douleur ou picotement.

Ce traitement ne prévient pas l'arthropathie hémophilique.

2. Traitement prophylactique

La prophylaxie est largement utilisée depuis plus de trente ans, elle a pour but de maintenir constant dans l'organisme un taux minime du FAH déficient afin d'éviter l'arthropathie hémophilique, source d'handicap majeur, elle est classée en deux types principaux :

A- la prophylaxie primaire : est instaurée dès le plus jeune âge à la suite de la première hémarthrose , de préférence avant l'âge de deux ans et avant le deuxième épisode de saignement , plus la mise en place du traitement prophylactique est retardée

Chapitre IV : Aspects cliniques et thérapeutiques

après le premier épisode de saignement et plus grand est le risque de développer une arthropathie. (Van Leeuwen J, 1983)

B- la prophylaxie secondaire : est instaurée plus tardivement lorsqu'il y a eu plus de deux manifestations hémorragiques voire de complications articulaires avérés, avant un risque hémorragique tel qu'une intervention chirurgicale, après un traumatisme pour éviter le risque de saignement ou en fin de façon périodique lors d'hémarthroses répétés notamment au niveau d'une articulation cible.

La prophylaxie (I aire ou II aire) est conduite selon le même schéma. (Alcalay M, Deplas A, 2002).

Traitement en Algérie

L'Algérie a consacré, pour l'acquisition des médicaments, une enveloppe financière estimée, en 2016, à 7 milliards de dinars. Celle-ci était de 760 millions de dinars en 2010.

L'introduction de la prophylaxie chez les hémophiles et à son adaptation avec les experts nationaux à notre contexte national.

Le traitement prophylactique consiste en l'injection régulière de concentrés de facteurs de coagulation en vue de prévenir le risque de saignement. 370 patients sont soumis à ce type de traitement en 2017. Le nombre ne dépassait pas 51 en 2013,



Selon les chiffres du ministère de la santé, la prévalence de l'hémophilie est passée de 3.25/100000 habitants

Chapitre IV : Aspects cliniques et thérapeutiques

En 2000 à 3.76/habitants en 2006 puis à 4.1/habitants en 2009.

En 2008, dans le but de hiérarchiser les actes de chirurgie orthopédique, une autre étude rétrospective nationale a été faite.

Elle a permis de recenser 656 hémophiles parmi lesquels 49,6% présentait une indication à la chirurgie orthopédique. Pour le ministère de la Santé, le défi est surtout permettre aux hémophiles de vivre une vie normale et plus épanouie en évitant qu'ils deviennent des personnes handicapées.

Depuis une année en évoque une démarche du ministère dans la mise en place du registre des patients qui jusque-là a fait défaut et de l'intérêt pour des expériences internationales. <http://www.santenews-dz.com/consulter> le 23.04.2021

Ce qui permettra d'éviter à ces enfants des événements hémorragiques et arthrosiques », a souligné Dr Djamilia Nadir, sous-directrice à la direction de la prévention, chargée des maladies non transmissibles lors d'une journée de formation au profit des journalistes sur l'hémophilie, organisée conjointement par le ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme hospitalière et les laboratoires Novo Nordisk. La prophylaxie secondaire et tertiaire est également préconisée par cette nouvelle directive respectivement chez les enfants hémophiles qui ont eu au moins deux hémorragies des grosses articulations, mais avant l'apparition d'une maladie articulaire et après l'apparition d'une maladie articulaire, en vue de prévenir d'autres lésions, a-t-elle précisé. Cette nouvelle directive préconise également un accompagnement des parents et des enfants atteints de la maladie par l'éducation thérapeutique.

« Ce qui permettra aux parents d'atteindre une autonomie dans la prise en charge de leurs enfants et surtout améliorer la qualité de vie de patients », a-t-elle indiqué. « A travers cette mesure qui sera effective à partir du 17 avril dans tous les centres hospitaliers qui assurent la prise en charge des hémophiles, on pourra planifier les besoins estimés par les experts en tenant compte du nombre d'enfants et assurer la disponibilité des facteurs de façon continue », a-t-elle ajouté, d'autant que cette prophylaxie a été déjà introduite depuis des années. Pour le docteur Berkouk, du service d'hématologie au CHU de Beni Messous, ce traitement prophylactique est un moyen d'éliminer les risques fonctionnels et d'assurer aux patients une vie normale. « Il faut savoir qu'il n'y a pas de traitement de l'hémophilie, mais il y a des moyens de prévention des accidents hémorragiques. En fait, c'est transformer un hémophile de la forme sévère à la forme modérée », a-t-il noté.

Chapitre IV : Aspects cliniques et thérapeutiques

La prophylaxie est déjà utilisée depuis une dizaine années dans certains services. « Un traitement qui a permis à des enfants de jouer au ballon, alors qu'il était proscrit pour eux. La situation des hémophiles s'est nettement améliorée depuis, sachant que l'hémophile avait peu de chances de devenir un sujet âgé. Ainsi, en introduisant la prophylaxie secondaire et tertiaire, cela permettra l'allongement de l'espérance de vie de ces patients », a indiqué Dr Berkouk.

Pour rappel, l'hémophilie est un trouble de saignement et les personnes atteintes ne saignent pas plus vite que la normale, mais elles saignent plus longtemps, parce que leur sang ne contient pas assez de facteur de coagulation. Le facteur de coagulation est une protéine présente dans le sang, qui a pour fonction de maîtriser les hémorragies. L'hémophilie est une maladie rare, seulement environ une personne sur 10 000 naît hémophile. Le type d'hémophilie le plus commun s'appelle hémophilie A. Le sang d'une personne qui en est atteinte ne contient pas assez de facteurs de coagulation VIII (facteur huit).

L'hémophilie B est un type d'hémophilie moins commun. Dans ce cas, le sang de la personne affectée ne contient pas assez de facteurs de coagulation IX (facteur neuf) (**El Watan , Algérie 2017**)

Partie

Expérimentale

Notre projet de fin d'étude concerne une analyse entre 4 articles scientifiques en

Algérie, (Abdi, M et al ; 2014)

Tunisie, (Elmahmoudi H et al;2012)

Jordanie (A. Awidi et al;2009)

Chine. (Liang Y et al ; 2001)

Qui parlent sur la détection et l'identification des nouvelles altérations génétiques du facteur VIII chez des patients atteints d'hémophilie A. vu les conditions sanitaires de la pandémie on n'a pas pu faire notre propre partie expérimentale. Cependant, L'analyse moléculaire de ce facteur sera détaillée théoriquement dans ce manuscrit.

1. Matériel et Méthode

Patients et méthodes

Patients

En Algérie, 26 patients atteints d'HA (21 familles non apparentées) âgés entre 4 et 46 ans ont été recrutés entre 2011 et 2012 au sein du centre de traitement d'AH d'Oran dans l'Ouest algérien

En Tunisie, 28 patients atteints d'hémophilie A provenant de 22 familles non apparentées, leur âge variait entre 4 et 38 ans

En Jordanie, 175 patients atteints d'HA issus de 42 familles non apparentées. Leur âge moyen était entre 3 à 50 ans

En Chine, Cent cinquante-huit patients non apparentés atteints d'HA

Méthode

Tous les patients ont bénéficié le même protocole

1. Extraction d'ADN : l'ADN génomique a été isolé à partir de 5 ml d'échantillons de cellules sanguines périphériques à l'aide d'un kit d'extraction d'ADN commercial selon les instructions du fabricant (Stratagene DNA Isolation Kit ; Agilent, Canada).

2. Tests de coagulation : L'activité coagulante du facteur VIII (FVIII:C) a été mesurée en utilisant le test de coagulation en une étape selon la technique standard.

Les inhibiteurs du FVIII ont été déterminés selon la méthode standard de Bethesda (**Awidi AS et al ; 1984**)

2. Une amplification par PCR a été réalisée pour les patients atteints d'hémophilie A légère, modérée et sévère pour dépister les inversions de l'intron 22 en utilisant une amplification en chaîne par polymérase (PCR) à longue distance Ou de l'intron 1 qui a été évaluée par PCR multiplex (**Liang Y et al ; 2001**)

3. Les produits de PCR ont été purifiés et séquencés en utilisant un BigDye[®] terminaison v3.1 cycle séquençage kit (Applied Biosystems, USA). Le séquençage a été effectué dans un séquenceur d'ADN ABI PRISM™ 377XL (Applied Biosystems). Le logiciel Variant Reporter a été utilisé pour la détection des mutations (Chromas 2.23 et Vector NTI Advance 10.0).

Tous les changements de séquence ont été confirmés sur les deux brins et les mutations détectées ont été vérifiées à l'aide d'un deuxième amplicon. La nomenclature des nucléotides et des acides aminés est conforme aux normes proposées par le groupe de travail sur la nomenclature. (**Antonarakis SE. 1998**)

4. Modélisation moléculaire : Les résidus mutés ont été modélisés en utilisant la structure cristalline du FVIII recombinant activé. (Shen BW et al ; 2008) images structurelles ont été générées à l'aide de PyMOL (DeLano Scientific, USA).

5. analyses statistiques : Les facteurs de risque de développement d'inhibiteurs du FVIII ont été analysés à l'aide du test exact de Fisher. Une valeur *p* inférieure à 0,05 a été considérée comme statistiquement significative. SPSS 13.0 (USA) a été utilisé pour l'analyse statistique.

2. Résultats et discussion

Caractéristiques clinique

Les caractéristiques de base des patients atteints d'HA des différents pays ont montré ses résultats :

En Algérie, 19 familles avec une HA sévère et 2 avec une HA modérée.

8 mutations différentes, dont l'inversion de l'intron 22, l'inversion de l'intron 1 et 6 mutations ponctuelles différentes. Aucune délétion, insertion ou autre réarrangement génique important n'a été détecté chez nos patients atteints d'HA.

En Tunisie, 19 patients avaient une forme sévère, 5 une forme modérée et 4 une forme légère d'hémophilie A

23 mutations différentes, dont 5 inversions de l'intron 22, 8 substitutions, 6 insertions et 4 délétions identifiées chez 4 patients atteints d'hémophilie A sévère

En Jordanie, 117 patients, soit (issus de 34 familles), présentaient une forme sévère de l'HA, 13 patients (issus de trois familles), présentaient une forme modérée de l'HA et 45 patients, (issus de cinq familles), présentaient une forme légère de la maladie.

19 mutations différentes ont été identifiées pour 108 patients d'HA (issus de 19 familles) 15 mutations faux-sens et 4 mutations de décalage de cadre

En Chine, 11 patients avaient une HA sévère, 5 une HA modérée et 1 avec une HA légère. 5 ont été examinés et se sont avérés avoir un faible titre d'inhibiteur positif.

18 mutations différentes ont été identifiées chez ces 18 patients, et 7 n'avaient pas été décrites auparavant dans la base de données HAMSTeRS

8 patients ont présenté une petite délétion, 7 étaient non-sens et 1 était faux-sens

Inversions Intron 22 et Intron 1

En Algérie, L'inversion de l'intron 22 a été détectée dans 11 des 19 familles non apparentées atteintes d'une forme sévère d'HA. L'inversion de l'intron 1 n'a été trouvée que chez 1 patient du sous-groupe d'inversion négative de l'intron 22

En Tunisie, Parmi les 19 patients atteints d'hémophilie A sévère, une inversion de l'intron 22 a été identifiée chez 7 patients (36,84%) appartenant à cinq familles différentes,

alors qu'aucune famille ne présentait d'inversion de l'intron 1 (0%) (**Mantilla -Capacho JM et al ; 2007**)

En Jordanie, l'inversion dans l'intron22 a été détectée chez 66 patients appartenant à 22 familles et tous présentaient une MH sévère. L'inversion de l'intron-1 n'a été trouvée que chez un seul patient (cas sporadique).

Mutations ponctuelles

En Algérie, 6 mutations ponctuelles différentes (2 non-sens, 1 site d'épissage et 3 mutations faux-sens) et 1 polymorphisme ont été identifiés. Les 2 mutations non-sens sont (c.322A > T, p.Lys108* ; c.5953C>T, p.Arg1985*)

Une seule mutation du site donneur d'épissage (c.5219 + 1G > T) a été détectée chez un patient atteint d'AH sévère et consiste en une transversion G > T au niveau du premier nucléotide de l'intron 14

3 mutations faux-sens ont été identifiées dans 3 familles non apparentées, 1 avec une HA modérée et les autres familles avec une forme sévère de la maladie

Parmi les 4 substitutions détectées, la mutation c.200A > C (p.Lys67Thr) est localisée dans le deuxième exon du gène *F8*. Cette mutation consiste en une transversion A > C et provoque un changement de la deuxième base du codon AAG (lysine) en ACG (thréonine) à la position 67 du domaine A1 FVIII

En Tunisie, 7 mutations par décalage de cadre et 3 substitutions dans 3 familles non apparentées atteintes d'hémophilie A sévère.

En Jordanie, 19 mutations différentes ont été identifiées : 15 mutations faux-sens et 4 mutations de décalage de cadre

En chine, 8 mutations ponctuelles différentes dans les exons et le site d'épissage ont été identifiées. 5 étaient des mutations faux-sens et 3 étaient des mutations non-sens. Une nouvelle mutation ponctuelle était associée à une HA modérée. Le patient avait une transition 5567 A→C provoquant le changement Y1837S dans le domaine A3.

Nouvelles mutations

En Algérie, 2 nouvelles mutations c.2189G > A (p.Cys711Tyr) et c.5219+1G>T sont nouvelles

En Tunisie, 8 mutations nouvelles. Parmi ces nouvelles mutations, 6 apparaissent chez des patients atteints d'hémophilie A sévère (del exons 1-13, inversion de l'intron 22 (18 kb, 15,5 kb et 14 kb), p.1595(1614) DfsX40, p.12(31) LfsX11, p.C179(198) R et p.N784 (803) N) et 2 apparaissent chez des patients atteints d'hémophilie A modérée (p.727(746) SfsX7 et p.G520(539) R).

En Jordanie, 5 nouvelles mutations, qui comprennent un décalage de cadre et quatre mutations faux-sens (mutation faux-sens p.G1981D, p.K1732E (c.1964A>G) et (c.5251A>G) et la mutation par décalage de cadre p.I1194fs))

En Chine, 7 nouvelles mutations, 5 étaient de petites délétions de 1 Pb à 9 Pb, 1 petite insertion (2 Pb) et 1 mutation ponctuelle (**Bogdanova N ; 2002**)

4 patients avec de nouvelles petites délétions avaient une HA sévère, les 3 patients restants (une délétion, une insertion et une mutation ponctuelle) étaient modérés

(Substitution Y1837S et M680L avec différents changements de nucléotides, ATG en GTG, ACG ou TTG. changement de nucléotide différent à 2095 ATG → CTG 2 délétion (4Nt manquants dans le domaine A1 qui étaient localisés dans le codon 297-298 et 2Pb insérées (A aux deux codons 183 et 189) étaient également situées dans le domaine A1.) (**Liles DK et al ; 1997**)

Inhibiteurs du FVIII

En Algérie, les inhibiteurs n'ont été détectés que chez 12,5% (3 sur 24) des patients atteints d'AH sévère. Ce pourcentage est faible par rapport aux rapports précédents, où le développement d'inhibiteurs était prédit chez jusqu'à 30 % des patients atteints d'AH sévère.

2 patients sévères avec HA ont développé des inhibiteurs à des niveaux faibles (<5 BU), l'un avait la mutation non-sens (c.322A > T) et l'autre avait la variation (c.3780C > G).

En Tunisie, Le type et la localisation de la mutation du gène F8 est un déterminant important du développement d'inhibiteurs chez les patients atteints d'hémophilie A sévère.

Les mutations non-sens et les grandes délétions étaient associées à un risque plus élevé de développement d'inhibiteurs que l'inversion de l'intron 22, les petites délétions

Aucun des patients présentant des insertions/petites délétions ou des mutations mis-sens n'a développé d'inhibiteurs. La faible incidence du développement d'inhibiteurs dans notre cohorte (1/28) et (6/143) au total pour tous les patients suivis dans le centre de traitement de l'hémophilie/insertions et les mutations faux-sens (**Gouw SC et al ; 2002**)

En Jordanie, 17 patients ont développé des inhibiteurs du FVIII, dont 12 étaient des répondeurs élevés (titre d'inhibiteur \geq 5 UB) et 5 des répondeurs faibles (<5 UB).

En ce qui concerne le développement d'inhibiteurs, il est maintenant bien établi que la nature de la mutation F8 est un facteur prédisposant majeur, car les mutations qui ont la capacité de fermer l'expression de F8 semblent particulièrement importantes

En Chine, Le développement d'inhibiteurs du FVIII a été observé comme la complication la plus grave du traitement par HA, affectant environ 20 à 30 % des patients. Le type de mutation, la gravité de la maladie, la race et l'origine ethnique sont des facteurs de risque courants.

5 patients avaient développé un inhibiteur anti-FVIII. Ils étaient tous faiblement répondeurs (titre d'inhibiteur < 5 UB). Chez ces patients, les réarrangements bruts (inversions de l'intron 22 et de l'intron 1) ont été exclus. Une mutation non-sens était associée à l'inhibiteur, qui a déjà été décrite dans le registre HAMSTeRS. Trois des quatre autres mutations étaient localisées dans les exons 14

Patient avec une erreur de site d'épissage de l'intron 12 a développé un inhibiteur alors que cette mutation n'était pas associée au développement d'inhibiteur selon la base de données

Conclusion

Conclusion

Les centres de prise en charge de l'hémophilie au niveau national sont désormais soumis aux nouvelles directives nationales, conformément à un référentiel national sur la prophylaxie chez l'enfant hémophile qui a été élaboré, suivant les recommandations de la fédération mondiale de l'hémophilie, par des experts nationaux et internationaux sous l'égide du ministère de la santé, de la population et de la réforme hospitalière

Le traitement et l'accès aux soins ne devraient pas varier en fonction de l'endroit où se trouve le patient atteint d'un trouble de la coagulation.

Un Traitement pour tous consiste à dire qu'un jour, toute personne atteinte d'un trouble de la coagulation, où qu'elle se trouve, pourra mener une existence de façon pleine et entière. La mission de la FMH est d'améliorer et de garantir l'offre de soins dont bénéficient les personnes atteintes d'un trouble de la coagulation dans le monde.

L'hémophilie ne se guérit pas, mais elle se contrôle relativement bien grâce aux traitements qui est complexe et coûteux malheureusement pour prévenir l'apparition de saignements et le meilleur moyen de lutte reste l'éducation sanitaire préventive des patients et des parents.

La mise en place d'un traitement à domicile et d'un traitement prophylactique qui a nettement réduit le nombre des saignements annuels notamment les hémarthroses, aussi bien chez les jeunes enfants que chez les adultes.

Ces études ont montré que l'âge moyen des patients atteint d'hémophile A était entre 3 à 50ans classer selon le type d'hémophilie (sévère, mineure et modérée).

L'analyse moléculaire du facteur VIII a permis d'identifier de nouvelles mutations de ce facteur dont 2 en Algérie 8 en Tunisie 5en Jordanie et 7 en chine

Références Bibliographiques

A

Aalberse RC, Dieges PH, Knul-Bretlova V, Vooren P, Aalbers M, van Leeuwen J (1983) IgG4 as a blocking antibody. *Clinical reviews in allergy* **1**: 289-302

Abdi, M., Zemani-Fodil, F., Fodil, M., Aberkane, M. S., Touhami, H., Saidi-Mehtar, N., ... & Boudjema, A. (2014). First molecular analysis of F8 gene in Algeria: identification of two novel mutations. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 20(7), 741-748.

Albanez S, Ruiz-Saez A, Boadas A, de Bosch N, Porco A (2011) Identification of factor VIII gene mutations in patients with severe haemophilia A in Venezuela: identification of seven novel mutations. *Hemophilia: the official journal of the World Federation of Hemophilia*.

Alcalay M (2009) [Muscular complications of hemophilia]. *Archives de pediatrie : organe Officiel de la Société française de pediatrie* **16**: 196-200

Alcalay M, Deplas A (2002) Rheumatological management of patients with hemophilia. Part 1: joint manifestations. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme* **69**: 442-449

Aledort LM, Dimichele DM (1998) Inhibitors occur more frequently in African-American and Latino haemophiliacs. *Haemophilia: the official journal of the World Federation of Hemophilia* **4**: 68

Aly AM, Aledort LM, Lee TD, Hoyer LW (1990) Histocompatibility antigen patterns in haemophilic patients with factor VIII antibodies. *Br J Haematol* **76**: 238-241

Andre S, Meslier Y, Dimitrov JD, Repesse Y, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S, Dasgupta S (2009) A cellular viewpoint of anti-FVIII immune response in haemophilia A. *Clinical reviews in allergy & immunology* **37**: 105-113

Andrikovics H, Klein I, Bors A, Nemes L, Marosi A, Varadi A, Tordai A (2003) Analysis of large structural changes of the factor VIII gene, involving intron 1 and 22, in severe haemophilia A. *Haematologica* **88**: 778-784

Astermark J (2010) Inhibitor development: patient-determined risk factors. *Haemophilia: the Official journal of the World Federation of Haemophilia* **16**: 66-70

Astermark J, Berntorp E, White GC, Kroner BL (2001) The Malmo International Brother Study (MIBS): further support for genetic predisposition to inhibitor development in haemophilia patients. *Hemophilia: the official journal of the World Federation of Haemophilia* **7**: 267-272

Astermark J, Oldenburg J, Carlson J, Pavlova A, Kavakli K, Berntorp E, Lefvert AK (2006b) Polymorphisms in the TNFA gene and the risk of inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood* **108**: 3739-3745

Astermark J, Oldenburg J, Pavlova A, Berntorp E, Lefvert AK (2006c) Polymorphisms in the IL10 but not in the IL1beta and IL4 genes are associated with inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood* **107**: 3167-3172

Références Bibliographiques

Astermark J, Wang X, Oldenburg J, Berntorp E, Lefvert AK (2007) Polymorphisms in the CTLA-4 gene and inhibitor development in patients with severe haemophilia A. *J Thromb Haemost* **5**: 263-26

A. Awidi,* M. Ramahi, † D. Alhattab,* R. Mefleh,* M. Dweiri, † N. Bsoul,*

A. Magablah,* E. Arafat, † M. Bargawi, † M. Bishtawi, † E. Haddadeen, ‡

M. Falah, B. Tarawne H,* S. Swaidan§ et S. Fauori† 2009 Étude des mutations

Chez les patients jordaniens atteints d'' hémophilie A: identification de cinq nouvelles mutations.

B

Bajaj SP, Schmidt AE, Mathur A, Padmanabhan K, Zhong D, Mastri M, Fay PJ (2001) Factor IXa: factor VIIIa interaction. helix 330-338 of factor IXa interacts with residues 558-565 and spatially adjacent regions of the $\alpha 2$ subunit of factor VIIIa. *The Journal of biological chemistry* **276**: 16302-1630

Bajzar L, Manuel R, Nesheim ME (1995) Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *The Journal of biological chemistry* **270**: 14477-14484

Baker KE, Parker R (2004) Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene Expression. *Current opinion in cell biology* **16**: 293-299

Bovenschen N, Boertjes RC, van Stempvoort G, Voorberg J, Lenting PJ, Meijer AB, Mertens K (2003) Low density lipoprotein receptor-related protein and factor IXa share structural requirements for binding to the A3 domain of coagulation factor VIII. *The Journal of biological chemistry* **278**: 9370-9377

Bovenschen N, Mertens K, Hu L, Havekes LM, van Vlijmen BJ (2005a) LDL receptor cooperates with LDL receptor-related protein in regulating plasma levels of coagulation factor VIII in vivo. *Blood* **106**: 906-912

Bowen DJ (2002a) Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. *Molecular Pathology: MP* **55**: 1-18

C

Carpenter SL, Michael Soucie J, Sterner S, Presley R (2012) Increased prevalence of inhibitors in Hispanic patients with severe haemophilia A enrolled in the Universal Data Collection database. *Haemophilia: the official journal of the World Federation of Hemophilia* **18**: e260-265

Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR (2003) ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic acids research* **31**: 3568-3571

Références Bibliographiques

Casana P, Cabrera N, Cid AR, Haya S, Beneyto M, Espinos C, Cortina V, Dasi MA, Aznar JA (2008) Severe and moderate hemophilia A: identification of 38 new genetic alterations. *Haematologica* **93**: 1091-1094

Castaman G, Giacomelli SH, Mancuso ME, Sanna S, Santagostino E, Rodeghiero F (2010) F8 mRNA studies in haemophilia A patients with different splice site mutations. *Haemophilia: the official journal of the World Federation of Hemophilia* **16**: 786-790

Celie PH, Van Stempvoort G, Jorieux S, Mazurier C, Van Mourik JA, Mertens K (1999) Substitution of Arg527 and Arg531 in factor VIII associated with mild haemophilia A: characterization in terms of subunit interaction and cofactor function. *Br J Haematol* **106**: 792-800

Clemetson KJ (2012) Platelets and primary haemostasis. *Thrombosis research* **129**: 220-224

Conti E, Izaurralde E (2005) Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species. *Current opinion in cell biology* **17**: 316-325

Cotton RG, Scriver CR (1998) Proof of "disease causing" mutation. *Human mutation* **12**: 1-3

Cunningham MA, Pipe SW, Zhang B, Hauri HP, Ginsburg D, Kaufman RJ (2003) LMAN1 is a molecular chaperone for the secretion of coagulation factor VIII. *J Thromb Haemost* **1**: 2360-2367

D

Darby SC, Keeling DM, Spooner RJ, Wan Kan S, Giangrande PL, Collins PW, Hill FG, Hay CR (2004) The incidence of factor VIII and factor IX inhibitors in the hemophilia population of the UK and their effect on subsequent mortality, 1977-99. *J Thromb Haemost* **2**: 1047-1054

Davie EW, Ratnoff OD (1964) Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting. *Science* **145**: 1310-1312

Davies PA, Gray G (2002) Long-range PCR. *Methods Mol Biol* **187**: 51-55

De Brasi CD, Bowen DJ (2008) Molecular characteristics of the intron 22 homologs of the coagulation factor VIII gene: an update. *J Thromb Haemost* **6**: 1822-1824

Djamila Kourta. Nouveau protocole consensuel Algérien pour les hémophiles. Journée mondiale de l'hémophilie. Article du journal quotidien El Watan. Mardi 18 avril 2017.

E

Eaton D, Rodriguez H, Vehar GA (1986) Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity. *Biochemistry* **25**: 505-512

Elmahmoudi H, Khodjet-el-khil H, Wigren E, Jlizi A, Zahra K, Pellechia D, Vinciguerra C, Meddeb B, Elggaaied AB, Gouider E (2012) First report of molecular diagnosis of Tunisian hemophiliacs A: identification of 8 novel causative mutations. *Diagnostic pathology* **7**: 93

Références Bibliographiques

F

Fackenthal DL, Chen PX, Das S (2005) Denaturing high-performance liquid chromatography for mutation detection and genotyping. *Methods Mol Biol* **311**: 73-96

Fay PJ (1988) Reconstitution of human factor VIII from isolated subunits. *Archives of biochemistry and biophysics* **262**: 525-531

Fay PJ, Beattie TL, Regan LM, O'Brien LM, Kaufman RJ (1996) Model for the factor VIIIa-dependent decay of the intrinsic factor Xase. Role of subunit dissociation and factor IXa-catalyzed proteolysis. *The Journal of biological chemistry* **271**: 6027-6032

Foster PA, Fulcher CA, Houghten RA, de Graaf Mahoney S, Zimmerman TS (1990a) A murine monoclonal anti-factor VIII inhibitory antibody and two human factor VIII inhibitors bind to different areas within a twenty amino acid segment of the acidic region of factor VIII heavy chain. *Blood coagulation & fibrinolysis: an international journal in haemostasis and thrombosis* **1**: 9-15

Foster PA, Fulcher CA, Houghten RA, Zimmerman TS (1988) An immunogenic region within residues Val1670-Glu1684 of the factor VIII light chain induces antibodies which inhibit binding of factor VIII to von Willebrand factor. *The Journal of biological chemistry*

263: 5230-5234

Foster PA, Fulcher CA, Houghten RA, Zimmerman TS (1990b) Synthetic factor VIII peptides with amino acid sequences contained within the C2 domain of factor VIII inhibit factor VIII binding to phosphatidylserine. *Blood* **75**: 1999-2004

Fowler WE, Fay PJ, Arvan DS, Marder VJ (1990) Electron microscopy of human factor V and factor VIII: correlation of morphology with domain structure and localization of factor V activation fragments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 7648-7652

Franchini M, Frattini F, Crestani S, Bonfanti C (2013) Alloantibodies in previously untreated hemophilia A patients: the role of environmental factors. *Hematology* **18**: 183-190

Freije D, Helms C, Watson MS, Donis-Keller H (1992) Identification of a second pseudoautosomal region near the Xq and Yq telomeres. *Science* **258**: 1784-1787

Frommel D, Allain JP, Saint-Paul E, Bosser C, Noel B, Mannucci PM, Pannicucci F, Blomback M, Prou-Wartelle O, Muller JY (1981) HLA antigens and factor VIII antibody in classic hemophilia. European study group of factor VIII antibody. *Thrombosis and haemostasis* **46**: 687-689

Fuentes-Prior P, Fujikawa K, Pratt KP (2002) new insights into binding interfaces of coagulation factors V and VIII and their homologues lessons from high resolution crystal structures. *Current protein & peptide science* **3**: 313-339

G

Gailani D, Broze GJ, Jr. (1991) Factor XI activation in a revised model of blood coagulation. *Science* **253**: 909-912

Références Bibliographiques

- Ganguly A, Rock MJ, Prockop DJ** (1993) Conformation-sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single-base differences in double-stranded PCR products and DNA fragments: evidence for solvent-induced bends in DNA heteroduplexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 10325-10329
- Ghosh K, Shetty S** (2009) Immune response to FVIII in hemophilia A: an overview of risk factors. *Clinical reviews in allergy & immunology* **37**: 58-66
- Gilbert GE, Kaufman RJ, Arena AA, Miao H, Pipe SW** (2002) Four hydrophobic amino acids of the factor VIII C2 domain are constituents of both the membrane-binding and von Willebrand factor-binding motifs. *The Journal of biological chemistry* **277**: 6374-6381
- Gill FM** (1984) The natural history of factor VIII inhibitors in patients with hemophilia A. *Progress in clinical and biological research* **150**: 19-29
- Gilles JG, Arnout J, Vermeylen J, Saint-Remy JM** (1993) Anti-factor VIII antibodies of hemophiliac patients are frequently directed towards nonfunctional determinants and do not exhibit isotypic restriction. *Blood* **82**: 2452-2461
- Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, Vehar GA, Capon DJ, Lawn RM** (1984) Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* **312**: 326-330
- Gitschier J, Wood WI, Tuddenham EG, Shuman MA, Goralka TM, Chen EY, Lawn RM** (1985) Detection and sequence of mutations in the factor VIII gene of haemophiliacs. *Nature* **315**: 427-430
- Goudemand J, Rothschild C, Demiguel V, Vinciguerrat C, Lambert T, Chambost H, Borel-Derlon A, Claeysens S, Laurian Y, Calvez T** (2006) Influence of the type of factor VIII concentrate on the incidence of factor VIII inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A. *Blood* **107**: 46-51
- Gouw SC, Van Der Bom JG, Van Den Berg HM, Zewald RA, Ploos Van Amstel JK, Mauser-Bunschoten EP** (2011) Influence of the type of F8 gene mutation on inhibitor development in a single centre cohort of severe haemophilia A patients. *Haemophilia: the official journal of the World Federation of Hemophilia* **17**: 275-281
- Graveley BR** (2000) Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA* **6**: 1197-1211
- Graves JA, Wakefield MJ, Toder R** (1998) The origin and evolution of the pseudoautosomal regions of human sex chromosomes. *Hum Mol Genet* **7**: 1991-1996
- Graw J, Brackmann HH, Oldenburg J, Schneppenheim R, Spannagl M, Schwaab R** (2005) Haemophilia A: from mutation analysis to new therapies. *Nature reviews Genetics* **6**: 488-501
- Green PM, Bagnall RD, Waseem NH, Giannelli F** (2008) Haemophilia A mutations in the UK: results of screening one-third of the population. *Br J Haematol* **143**: 115-128
- Gringeri A, Mantovani LG, Scalone L, Mannucci PM** (2003) Cost of care and quality of life for patients with hemophilia complicated by inhibitors: the COCIS Study Group. *Blood* **102**: 2358-2363

Références Bibliographiques

H

Hejer Elmahmoudi1*, **Houssein Khodjet-el-khil1**, **Edvard Wigren2**, **Asma Jlizi1**, **Kaouther Zahra3**, **Dorothé Pellechia4**, **Christine Vinciguerra4**, **Balkis Meddeb3**, **Amel Ben Ammar Elggaied1** et **Emna Gouider3**.2012. Premier rapport de diagnostic moléculaire des hémophiles tunisiens A: identification de 8 nouvelles mutations causales.

Higuchi M, Kochhan L, Olek K (1988) A somatic mosaic for haemophilia A detected at the DNA level. *Molecular biology & medicine* **5**: 23-27

Hoffman M (2003) Remodeling the blood coagulation cascade. *Journal of thrombosis and thrombolysis* **16**: 17-20

Hoffman M, Monroe DM (2007) Coagulation 2006: a modern view of hemostasis. *Hematology/oncology clinics of North America* **21**: 1-11

Hoyer LW (1994) Hemophilia A. *The New England journal of medicine* **330**: 38-47

Hsu TC, Pratt KP, Thompson AR (2008) the factor VIII C1 domain contributes to platelet binding. *Blood* **111**: 200-208

HUA, Bao-lai; YAN, Zhen-yu; LIANG, Yan; YAN, Mei; FAN, Lian-kai; LI, Kui-xing; XIAO, Bai; LIU, Jing-zhong; ZHAO, Yong-qiang Identification of seven novel mutations in the factor VIII gene in 18 unrelated Chinese patients with hemophilia A, *Chinese Medical Journal*: February 2010 - Volume 123 - Issue 3 - p 305-310

Hwang SH, Kim MJ, Lim JA, Kim HC, Kim HS (2009) Profiling of factor VIII mutations in Korean haemophilia A. *Haemophilia: the official journal of the World Federation of Hemophilia* **15**: 1311-1317

I

Inaba H, Koyama T, Shinozawa K, Amano K, Fukutake K (2013) Identification and characterization of an adenine to guanine transition within intron 10 of the factor VIII gene as a causative mutation in a patient with mild haemophilia A. *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia* **19**: 100-105

Ingram GI, Norris KM (1976) The history of haemophilia. *J Clin Pathol* **29**: 469-479

J

Jacquemin M, Lavend'homme R, Benhida A, Vanzielegem B, d'Oiron R, Lavergne JM, Brackmann HH, Schwaab R, VandenDriessche T, Chuah MK, Hoylaerts M, Gilles JG, Peerlinck K, Vermeylen J, Saint-Remy JM (2000) A novel cause of mild/moderate hemophilia

Jayandharan GR, Shaji RV, Baidya S, Nair SC, Chandy M, Srivastava A (2005) Identification of factor VIII gene mutations in 101 patients with haemophilia A: mutation analysis by inversion screening and multiplex PCR and CSGE and molecular modelling of 10 novel missense substitutions. *Haemophilia: the official journal of the World Federation of Hemophilia* **11**: 481-491

Jayandharan GR, Srivastava A (2012) Role of molecular genetics in hemophilia: from diagnosis to therapy. *Seminars in thrombosis and hemostasis* **38**: 64-78

Références Bibliographiques

Jenkins PV, Freas J, Schmidt KM, Zhou Q, Fay PJ (2002) Mutations associated with hemophilia A in the 558-565 loop of the factor VIIIa A2 subunit alter the catalytic activity of the factor Xase complex. *Blood* **100**: 501-508

Joshi M, Deshpande J (2011) Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles and Application. *International Journal of Biomedical Research* **2**: 81-97

K

Kavanagh ML, Wood CN, Davidson JF (1981) The immunological characterization of human antibodies to factor VIII isolated by immuno-affinity chromatography. *Thrombosis and haemostasis* **45**: 60-64

Kazatchkine MD, Sultan Y, Burton-Kee EJ, Mowbray JF (1980) Circulating immune complexes containing anti-VIII antibodies in multi-transfused patients with haemophilia A. *Clinical and experimental immunology* **39**: 315-320

Keeney S (2011) Long-PCR amplification of human genomic DNA. *Methods Mol Biol* **688**: 67-74

Koschinsky ML, Funk WD, van Oost BA, MacGillivray RT (1986) Complete cDNA sequence of human preceruloplasmin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**: 5086-5090

L

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

Lapan KA, Fay PJ (1997) Localization of a factor X interactive site in the A1 subunit of factor VIIIa. *The Journal of biological chemistry* **272**: 2082-2088

Laprise SL, Mak EK, Killoran KA, Layman LC, Gray MR (1998) Use of denaturing gradient gel blots to screen for point mutations in the factor VIII gene. *Human mutation* **12**: 393-402

Laurie AD, Sheen CR, Hanrahan V, Smith MP, George PM (2007) the molecular aetiology of haemophilia A in a New Zealand patient group. *Haemophilia: the official journal of the World Federation of Hemophilia* **13**: 420-427

Lenting PJ, Christophe OD, Gueguen P (2010).The disappearing act of factor VIII. *Haemophilia: the official journal of the World Federation of Hemophilia* **16**: 6-15

Lenting PJ, van de Loo JW, Donath MJ, van Mourik JA, Mertens K (1996).The sequence Glu1811-Lys1818 of human blood coagulation factor VIII comprises a binding site for activated factor IX. *The Journal of biological chemistry* **271**: 1935-1940

Lenting PJ, van Mourik JA, Mertens K (1998).The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. *Blood* **92**: 3983-3996

Leuer M, Oldenburg J, Lavergne JM, Ludwig M, Fregin A, Eigel A, Ljung R, Goodeve A, Peake I, Olek K (2001) Somatic mosaicism in hemophilia A: a fairly common event. *American journal of human genetics* **69**: 75-87

Références Bibliographiques

Levinson B, Kenwrick S, Gamel P, Fisher K, Gitschier J (1992) Evidence for a third transcript from the human factor VIII gene. *Genomics* **14**: 585-589

Levinson B, Kenwrick S, Lakich D, Hammonds G, Jr., Gitschier J (1990) A transcribed gene in an intron of the human factor VIII gene. *Genomics* **7**: 1-11

Lu J, Pipe SW, Miao H, Jacquemin M, Gilbert GE (2011) A membrane-interactive surface on the factor VIII C1 domain cooperates with the C2 domain for cofactor function. *Blood* **117**: 3181-3189

Lubahn BC, Ware J, Stafford DW, Reisner HM (1989) Identification of a F.VIII epitope recognized by a human hemophilic inhibitor. *Blood* **73**: 497-499

M

MacArthur JM, Bishop JR, Stanford KI, Wang L, Bensadoun A, Witztum JL, Esko JD (2007) Liver heparan sulfate proteoglycans mediate clearance of triglyceride-rich lipoproteins independently of LDL receptor family members. *The Journal of clinical investigation* **117**: 153-164

Mayr WR, Lechner K, Niessner H, Pabinger-Fasching I (1984) HLA-DR and Factor VIII antibodies in hemophilia A. *Thrombosis and haemostasis* **51**: 293

Miller CH, Benson J, Ellingsen D, Driggers J, Payne A, Kelly FM, Soucie JM, Craig Hooper W (2012) F8 and F9 mutations in US haemophilia patients: correlation with history of inhibitor and race/ethnicity. *Haemophilia: the official journal of the World Federation of Hemophilia* **18**: 375-382

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research* **16**: 1215

Monroe DM, Hoffman M (2006) what does it take to make the perfect clot? *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **26**: 41-48

Monroe DM, Key NS (2007) the tissue factor-factor VIIa complex: procoagulant activity, Regulation, and multitasking. *J Thromb Haemost* **5**: 1097-1105

Mosesson MW (1992).The roles of fibrinogen and fibrin in hemostasis and thrombosis. *Seminars in hematology* **29**: 177-188

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **51 Pt 1**: 263-273

Mulvany MJ, Aalkjaer C (1990) Structure and function of small arteries. *Physiological reviews* **70**: 921-961

N

Naski MC, Lorand L, Shafer JA (1991) Characterization of the kinetic pathway for fibrin promotion of alpha-thrombin-catalyzed activation of plasma factor XIII. *Biochemistry* **30**: 934-941

Références Bibliographiques

Nogami K, Ogiwara K, Matsumoto T, Nishiya K, Takeyama M, Shima M (2011) Mechanisms of human neutrophil elastase-catalysed inactivation of factor VIII(a). *Thrombosis and haemostasis* **105**: 968-980

Nogami K, Shima M, Hosokawa K, Suzuki T, Koide T, Saenko EL, Scandella D, Shibata M, Kamisue S, Tanaka I, Yoshioka A (1999) Role of factor VIII C2 domain in factor VIII binding to factor Xa. *The Journal of biological chemistry* **274**: 31000-31007

Nogami K, Shima M, Matsumoto T, Nishiya K, Tanaka I, Yoshioka A (2007) Mechanisms of plasmin-catalyzed inactivation of factor VIII: a crucial role for proteolytic cleavage at Arg336 responsible for plasmin-catalyzed factor VIII inactivation. *The Journal of biological chemistry* **282**: 5287-5295

Nogami K, Wakabayashi H, Fay PJ (2003) Mechanisms of factor Xa-catalyzed cleavage of the factor VIIIa A1 subunit resulting in cofactor inactivation. *The Journal of biological chemistry* **278**: 16502-16509

O

O'Brien LM, Medved LV, Fay PJ (1995) Localization of factor IXa and factor VIIIa interactive sites. *The Journal of biological chemistry* **270**: 27087-27092

Oldenburg J (2001) Mutation profiling in haemophilia A. *Thrombosis and haemostasis* **85**: 577-579

Oldenburg J, El-Maarri O (2006) new insight into the molecular basis of hemophilia A. *International journal of hematology* **83**: 96-102

Oldenburg J, Ivaskevicius V, Rost S, Fregin A, White K, Holinski-Feder E, Muller CR, Weber BH (2001) Evaluation of DHPLC in the analysis of hemophilia A. *Journal of biochemical and biophysical methods* **47**: 39-51

Otto JC (1996) an account of a hemorrhagic disposition existing in certain families. *Clin Orthop Relat Res*: 4-6

P

Pan Y, DeFay T, Gitschier J, Cohen FE (1995) Proposed structure of the A domains of factor VIII by homology modelling. *Nature structural biology* **2**: 740-744

Papasteriades C, Varla M, Economidou J, Marcacis K, Mitsouli C, Louisou K, Mandalaki T, Roumeliotou A, Papaevangelou G (1986) High frequency of HLA-DR5 in Greek patients with haemophilia A and haemophilia B. *Tissue antigens* **28**: 84-87

Parker ET, Lollar P (2007) Contribution of A1 subunit residue Q316 in thrombin-activated factor VIII to A2 subunit dissociation. *Biochemistry* **46**: 9737-9742

Patek AJ, Taylor FH (1937) Hemophilia. ii. Some Properties of a Substance Obtained from Normal Human Plasma Effective in Accelerating the Coagulation of Hemophilic Blood. *The Journal of clinical investigation* **16**: 113-124

Références Bibliographiques

- Pavlova A, Brondke H, Musebeck J, Pollmann H, Srivastava A, Oldenburg J** (2009a) Molecular mechanisms underlying hemophilia A phenotype in seven females. *J Thromb Haemost* **7**: 976-982
- Pavlova A, Delev D, Lacroix-Desmazes S, Schwaab R, Mende M, Fimmers R, Astermark J, Oldenburg J** (2009b) Impact of polymorphisms of the major histocompatibility complex class II, interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 genes on inhibitor development in severe hemophilia A. *J Thromb Haemost* **7**: 2006-2015
- Payne AB, Miller CH, Kelly FM, Michael Soucie J, Craig Hooper W** (2013) The CDC Hemophilia A Mutation Project (CHAMP) mutation list: a new online resource. *Human mutation* **34**: E2382-2391
- Pemberton S, Lindley P, Zaitsev V, Card G, Tuddenham EG, Kemball-Cook G** (1997) A molecular model for the triplicated A domains of human factor VIII based on the crystal structure of human ceruloplasmin. *Blood* **89**: 2413-2421
- Peters MF, Ross CA** (2001) Isolation of a 40-kDa Huntingtin-associated protein. *The Journal of biological chemistry* **276**: 3188-3194
- Pezeshkpoor B, Pavlova A, Oldenburg J, El-Maarri O** (2014) F8 genetic analysis strategies when standard approaches fail. *Hamostaseologie* **34**: 167-173
- Pipe SW** (2009) Functional roles of the factor VIII B domain. *Haemophilia: the official Journal of the World Federation of Hemophilia* **15**: 1187-1196
- Pipe SW, Morris JA, Shah J, Kaufman RJ** (1998) Differential interaction of coagulation factor VIII and factor V with protein chaperones calnexin and calreticulin. *The Journal of biological chemistry* **273**: 8537-8544
- R**
- Rafati M, Ravanbod S, Hoseini A, Rassoulzadegan M, Jazebi M, Enayat MS, Ala FA, Ghaffari SR** (2011) Identification of ten large deletions and one duplication in the F8 gene of eleven unrelated Iranian severe haemophilia A families using the multiplex ligation-dependent probe amplification technique. *Haemophilia: the official journal of the World Federation of Hemophilia* **17**: 705-707
- Ragni MV, Ojeifo O, Feng J, Yan J, Hill KA, Sommer SS, Trucco MN, Brambilla DJ** (2009) Risk factors for inhibitor formation in haemophilia: a prevalent case-control study. *Haemophilia: the official journal of the World Federation of Hemophilia* **15**: 1074-1082
- Rappold GA** (1993). The pseudoautosomal regions of the human sex chromosomes. *Human genetics* **92**: 315-324
- Rawala-Sheikh R, Ahmad SS, Ashby B, Walsh PN** (1990) Kinetics of coagulation factor X activation by platelet-bound factor IXa. *Biochemistry* **29**: 2606-2611
- Read A, Donnai D, Sznajder Y, Verloes A** (2008) *Génétique médicale: De la biologie à la Pratique clinique: De Boeck Supérieur.*

Références Bibliographiques

Repesse Y, Slaoui M, Ferrandiz D, Gautier P, Costa C, Costa JM, Lavergne JM, Borel-Derlon A (2007) Factor VIII (FVIII) gene mutations in 120 patients with hemophilia A: detection of 26 novel mutations and correlation with FVIII inhibitor development. *J Thromb Haemost* **5**:1469-1476

S

Saenko EL, Scandella D (1997) The acidic region of the factor VIII light chain and the C2 domain together form the high affinity binding site for von willebrand factor. *The Journal of biological chemistry* **272**: 18007-18014

Sherwood L, Lockhart A, Molotchnikoff S (2006) *Physiologie humaine: A Human Perspective*: De Boeck Supérieur.

Shevach EM (2004) Regulatory/suppressor T cells in health and disease. *Arthritis and rheumatism* **50**: 2721-2724

Sixma JJ, van den Berg A (1984) The haemostatic plug in haemophilia A: a morphological study of haemostatic plug formation in bleeding time skin wounds of patients with severe haemophilia A. *Br J Haematol* **58**: 741-753

Skinner MW (2012) WFH: closing the global gap--achieving optimal care. *Haemophilia: the official journal of the World Federation of Hemophilia* **18 Suppl 4**: 1-12

Soeda T, Nogami K, Matsumoto T, Ogiwara K, Shima M (2010) Mechanisms of factor VIIa-catalyzed activation of factor VIII. *J Thromb Haemost* **8**: 2494-2503

Soeda T, Nogami K, Nishiya K, Takeyama M, Ogiwara K, Sakata Y, Yoshioka A, Shima M, Stoilova-McPhie S, Villoutreix BO, Mertens K, Kembell-Cook G, Holzenburg A (2002) 3-Dimensional structure of membrane-bound coagulation factor VIII: modeling of the factor VIII heterodimer within a 3-dimensional density map derived by electron crystallography. *Blood* **99**: 1215-1223

Sudhakar K, Fay PJ (1998) Effects of copper on the structure and function of factor VIII subunits: evidence for an auxiliary role for copper ions in cofactor activity. *Biochemistry* **37**: 6874-6882

Sunyaev S, Ramensky V, Bork P (2000) towards a structural basis of human non-synonymous single nucleotide polymorphisms. *Trends in genetics: TIG* **16**: 198-200

T

Tagliavacca L, Moon N, Dunham WR, Kaufman RJ (1997) Identification and functional requirement of Cu(I) and its ligands within coagulation factor VIII. *The Journal of biological chemistry* **272**: 27428-27434

Takeyama M, Wakabayashi H, Fay PJ (2012) Factor VIII light chain contains a binding site for factor X that contributes to the catalytic efficiency of factor Xase. *Biochemistry* **51**: 820-828

Références Bibliographiques

Tavtigian SV, Byrnes GB, Goldgar DE, Thomas A (2008) Classification of rare missense substitutions, using risk surfaces, with genetic- and molecular-epidemiology applications. *Human mutation* **29**: 1342-1354

Turpie AG, Esmon C (2011) Venous and arterial thrombosis--pathogenesis and the rationale for anticoagulation. *Thrombosis and haemostasis* **105**: 586-596

V

Van Dieijen G, Tans G, Rosing J, Hemker HC (1981).The role of phospholipid and factor VIIIa in the activation of bovine factor X. *The Journal of biological chemistry* **256**: 3433-3442

Varfaj F, Wakabayashi H, Fay PJ (2007) Residues surrounding Arg336 and Arg562 contribute to the disparate rates of proteolysis of factor VIIIa catalyzed by activated protein C. *The Journal of biological chemistry* **282**: 20264-20272

Vehar GA, Keyt B, Eaton D, Rodriguez H, O'Brien DP, Rotblat F, Oppermann H, Keck R, Wood WI, Harkins RN, Tuddenham EG, Lawn RM, Capon DJ (1984) Structure of human factor VIII. *Nature* **312**: 337-342

Verbruggen B, Novakova I, Wessels H, Boezeman J, van den Berg M, Mauser-Bunschoten E

(1995) The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: improved specificity and reliability. *Thrombosis and haemostasis* **73**: 247-251

Vidal F, Farssac E, Altisent C, Puig L, Gallardo D (2001) Rapid hemophilia A molecular diagnosis by a simple DNA sequencing procedure: identification of 14 novel mutations. *Thrombosis and haemostasis* **85**: 580-583

Vinciguerra C, Zawadzki C, Dargaud Y, Pernod G, Berger C, Nougier C, Negrier C (2006) Characterisation of 96 mutations in 128 unrelated severe haemophilia A patients from France. Description of 62 novel mutations. *Thrombosis and haemostasis* **95**: 593-599

Von dem Borne PA, Bajzar L, Meijers JC, Nesheim ME, Bouma BN (1997) Thrombin-mediated activation of factor XI results in a thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor-dependent inhibition of fibrinolysis. *The Journal of clinical investigation* **99**: 2323-2327

W

Waggoner D (2007) Mechanisms of disease: epigenesis. *Seminars in pediatric neurology* **14**: 7-14

Wakabayashi H, Fay PJ (2008) Identification of residues contributing to A2 domain-dependent structural stability in factor VIII and factor VIIIa. *The Journal of biological chemistry* **283**: 11645-11651

Wakabayashi H, Freas J, Zhou Q, Fay PJ (2004) Residues 110-126 in the A1 domain of factor VIII contain a Ca²⁺ binding site required for cofactor activity. *The Journal of biological chemistry* **279**: 12677-12684

Références Bibliographiques

Wakabayashi H, Varfaj F, Deangelis J, Fay PJ (2008) Generation of enhanced stability factor VIII variants by replacement of charged residues at the A2 domain interface. *Blood* **112**: 2761-2769

Wang XB, Zhao X, Giscoombe R, Lefvert AK (2002) A CTLA-4 gene polymorphism at position -318 in the promoter region affects the expression of protein. *Genes and immunity* **3**: 233-234

Z

Zhong D, Saenko EL, Shima M, Felch M, Scandella D (1998) Some human inhibitor antibodies interfere with factor VIII binding to factor IX. *Blood* **92**: 136-142

Zimmermann MA, Gehrig A, Oldenburg J, Muller CR, Rost S (2013a) Analysis of F8 mRNA in haemophilia A patients with silent mutations or presumptive splice site mutations. *Haemophilia: the official journal of the World Federation of Hemophilia* **19**: 310-317

Zimmermann MA, Hansmann T, Haaf T, Oldenburg J, Muller CR, Rost S (2013b) Methylation analysis of the promoter region and intron 1 of the factor VIII gene in haemophilia A patients. *Hamostaseologie* **33 Suppl 1**: S46-49

Zimmermann MA, Oldenburg J, Muller CR, Rost S (2010) Characterization of duplication breakpoints in the factor VIII gene. *J Thromb Haemost* **8**:2696

