

OCTOBRE 2017

AVIS

DÉTERMINATION DE LA CONCENTRATION DU FACTEUR VIII PAR MÉTHODE CHROMOGÈNE

(RÉFÉRENCE - 2017.01.010)

Transmission au ministre : 3 août 2017

Publication officielle : 2 octobre 2017

Une production de l'Institut national
d'excellence en santé
et en services sociaux (INESSS)

DÉTERMINATION DE LA CONCENTRATION DU FACTEUR VIII PAR MÉTHODE CHROMOGÈNE (RÉFÉRENCE - 2017.01.010)

Avis d'évaluation

1 INFORMATION GÉNÉRALE

- 1.1 Demandeur : CHU Sainte-Justine
- 1.2 Date de transmission de l'avis au ministre : 3 août 2017
- 1.3 Date de publication de l'avis : 2 octobre 2017

Mise en garde

Le présent avis est fondé sur l'information fournie par les personnes en charge de l'analyse dans les laboratoires concernés ainsi que sur une recherche documentaire complémentaire selon les données disponibles au moment de l'évaluation de l'analyse par l'INESSS.

Conflit d'intérêts

Tous les membres du comité ont participé aux délibérations et aucun ne s'est retiré au moment de formuler la recommandation.

Lecture externe et accompagnement scientifique

La lecture externe et l'accompagnement scientifique sont des mécanismes utilisés par l'INESSS pour assurer la qualité de ses travaux. Les lecteurs externes et les experts accompagnateurs valident les aspects méthodologiques de l'évaluation, de même que l'exactitude du contenu, en fonction de leur domaine d'expertise respectif.

Aux fins de validation du présent avis, les experts consultés sont :

- D^r Jean Saint-Louis, (Hématologue et oncologue, Hôpital Maisonneuve-Rosemont);
- D^{re} Stéphanie Cloutier, (Hématologue, CHA Enfant-Jésus).

2 RÉSUMÉ

L'hémophilie A est une maladie génétique récessive liée au chromosome X caractérisée par un déficit congénital en facteur VIII de coagulation. Ce déficit se traduit par un temps de coagulation prolongé menant à de fréquents épisodes de saignements aux articulations (hémarthroses) et aux tissus mous.

L'analyse chromogène est une méthode de dosage en deux temps qui permet de déterminer la concentration d'un facteur VIII antihémophilique recombinant structurellement modifié lors du suivi des patients atteints d'hémophilie A traités pour un déficit en facteur VIII de coagulation.

Des études montrent que les résultats du dosage chromogène sont plus près des valeurs de référence attendues et que cette analyse détermine avec sensibilité, précision et reproductibilité la concentration plasmatique des concentrés recombinants structurellement modifiés.

L'analyse proposée consiste en une trousse commerciale homologuée. Les données fournies par le fabricant de la trousse indiquent que la répétabilité des résultats se situe entre 2,4 % et 3,0 % et que leur reproductibilité se situe entre 2,1 % et 5,9 %.

L'introduction de l'analyse au *Répertoire* selon le profil d'usage actuel des facteurs VIII se traduirait par une économie estimée à 2 400 \$ pour les trois premières années. D'autres scénarios ont été envisagés où l'introduction de l'analyse au *Répertoire* en fonction d'une augmentation faible et importante du marché des facteurs VIII à longue action pourrait engendrer des économies d'environ 164 000 \$ pour les trois premières années.

L'utilisation d'équipements de laboratoire spécifiques et la nécessité d'avoir un personnel de laboratoire qualifié pour l'exécution des analyses engendrent des coûts importants associés à l'emploi des trousses commerciales pour la détermination de la concentration plasmatique du facteur VIII.

Le MASAC (Medical and Scientific Advisory Council) du NHF (National Hemophilia Foundation), l'EMA (European Medicines Agency), ainsi que la Pharmacopée Européenne favorisent l'utilisation de la méthode chromogène pour déterminer la concentration plasmatique du facteur VIII dans un contexte de suivi de patients traités avec des concentrés antihémophiliques recombinants.

3 ANALYSE ET TECHNIQUE ÉVALUÉE

3.1 Nom et objectif de l'analyse

Détermination, par la méthode chromogène, de la concentration d'un facteur VIII antihémophilique recombinant structurellement modifié lors du suivi des patients atteints d'hémophilie A traités pour un déficit en facteur VIII de coagulation.

Les personnes atteintes d'hémophilie A traitées avec des concentrés de facteur VIII doivent faire régulièrement l'objet d'un suivi afin de veiller à ce que la concentration ciblée en facteurs de coagulation en circulation soit atteinte et apporter toute modification nécessaire au plan thérapeutique¹.

3.2 Description de la méthode

La méthode chromogène est une méthode en deux étapes qui mesure la concentration plasmatique du facteur VIII. Cette technique exploite la capacité du facteur VIII à agir comme cofacteur dans l'activation du facteur X.

Dans un premier temps, l'échantillon à tester est incubé en présence de thrombine, de phospholipides, de calcium et du facteur IX activé. Tous les composants sont alors en excès dans le milieu réactionnel, excepté le facteur VIII qui constitue l'élément limitant de la réaction. Un complexe est ensuite formé avec les facteurs VIII et IX activés et les phospholipides. Dans un second temps, ce complexe active le facteur X. Du facteur X activé est alors généré en quantité proportionnelle à la quantité du complexe FVIII-FIX-phospholipides contenu dans l'échantillon. Le facteur X activé entraîne le clivage d'un substrat chromogène et l'apparition d'une coloration induite par la libération de p-nitroaniline qui est mesurée par densité optique à la longueur d'onde de 405 nm tel que l'illustre la figure 1.

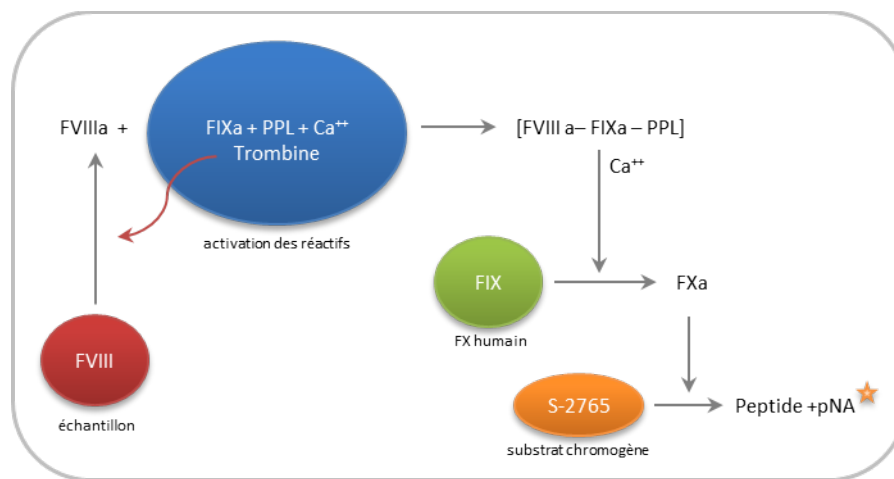


Figure 1 Principe de la méthode chromogène pour le dosage du facteur VIII

Source : Figure adaptée de Nodia BV. Biophen FIX [site Web], disponible à :

<http://www.nodia.be/site/haemostasis/biophen-factor-viii/> (consulté le 25 avril 2017).

Abréviations : FVIII : facteur VIII; FVIIIa : facteur VIII activé; FIXa : facteur IX activé; PPL : phospholipides; Ca⁺⁺ : calcium; FX : facteur X; FXa : facteur X activé; S-2765 : substrat chromogène pour le facteur X activé; pNA : p-nitroaniline.

¹ Fédération mondiale de l'hémophilie. Troubles de coagulation [site Web], disponible à : <https://www.wfh.org/fr/abd/prophylaxis/prophylaxie-suivi-des-resultats> (consulté le 25 avril 2017).

Modalité d'administration du test selon le demandeur

Les prélèvements sanguins seront effectués dans divers établissements de santé du Québec ou hors Québec. Après avoir effectué la partie préanalytique, les échantillons seront acheminés au laboratoire d'hémostase au Centre de référence québécois des inhibiteurs de la coagulation, le CHU Sainte-Justine.

La trousse Coamatic Factor VIII^{MC} de la compagnie Chromogenix utilise la méthode chromogène pour mesurer la concentration plasmatique de facteur VIII endogène humain ou issu de concentrés et préconise l'utilisation d'un mode cinétique automatisé mais permet aussi l'utilisation d'un mode point par point manuel. Le demandeur utilise la méthode chromogène automatisée dans son laboratoire.

3.3 Société ou concepteur

Chromogenix

3.4 Homologation

La trousse Coamatic Factor VIII^{MC} de la compagnie Chromogenix a été homologuée par Santé Canada le 24 août 1999 (no. 10442) ainsi que par la FDA (Food and Drug Administration) le 16 avril 1998 (no. K981038) et respecte les normes de la CE (Conformité Européenne).

3.5 Valeur pondérée : 23,14

4 CONTEXTE

4.1 Patients ciblés

Patients atteints d'hémophilie A et traités avec des concentrés recombinants structurellement modifiés pour un déficit en facteur VIII de coagulation.

4.2 Description de la maladie visée

L'hémophilie A est une maladie génétique récessive liée au chromosome X caractérisée par un déficit congénital en facteur VIII de coagulation. Sa prévalence est de moins d'une personne sur 10 000², soit 3 110 Canadiens en 2016 [World Federation of Hemophilia, 2016]. Il s'agit de l'hémophilie dite classique puisqu'elle constitue la forme la plus commune de déficit en facteurs de coagulation. Ce déficit se traduit par un temps de coagulation prolongé menant à de fréquents épisodes de saignements aux articulations (hémarthroses) et aux tissus mous [Duan et al., 2014]. Le déficit en facteur VIII est qualifié de sévère, modéré ou léger lorsque le taux plasmatique mesuré est respectivement : inférieur à 1 %, entre 1 % et 5 % et entre 6 % et 30 %, et ce, comparativement aux personnes sans trouble de la coagulation. Considérant l'ensemble des cas avec un déficit congénital en facteur VIII, 50% ont un déficit sévère, 10% à 20% un déficit modéré et 30% à 40% un déficit léger³.

La prise en charge des patients atteints d'hémophilie A sévère inclut le traitement

² Société canadienne de l'hémophilie. Hémophilie A et B [site Web], disponible à : <http://www.hemophilia.ca/fr/troubles-de-la-coagulation/hemophilie-a-et-b/hemophilie-a-et-b/> (consulté le 25 avril 2017).

³ Encyclopédie Orphanet Grand Public. L'hémophilie. Disponible à : <https://www.orpha.net/data/patho/Pub/fr/Hemophilie-FRfrPub646.pdf> (consulté le 4 mai 2017).

épisode et la prophylaxie au moyen de facteur VIII de remplacement [Srivastava *et al.*, 2013]. La demi-vie du facteur VIII est d’une heure comparativement à 12 heures lorsque 95 % du facteur VIII est lié au facteur de von Willebrand (FvW) [Pipe *et al.*, 2016; Oldenburg et Albert, 2014]. Diverses stratégies ont été développées pour accroître la durée d’action des facteurs de coagulation de remplacement, dont les concentrés de facteur VIII recombinants structurellement modifiés. De plus en plus de patients atteints d’hémophilie A sévère sont maintenant traités avec ces concentrés recombinants modifiés⁴. Les concentrés recombinants de facteur VIII présentement offerts au Québec sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 1 Liste des différents concentrés recombinants de facteur VIII offerts au Québec pour le traitement de l’hémophilie A

DISTRIBUTEUR	CONCENTRÉ RECOMBINANT	STRUCTURE
Héma-Québec	Advate ^{MC}	Facteur VIII recombinant, pleine longueur (rFVIII)
	Xyntha ^{MC} (ReFacto ^{MC} FS)	Facteur VIII recombinant, dépourvu du domaine B (BDD rFVIII)
	Eloctate ^{MC}	Facteur VIII recombinant, dépourvu du domaine B, fusionné avec le fragment Fc des immunoglobulines (BDD rFVIII-Fc)
Non distribué actuellement	Nuwiq ^{MC}	Facteur VIII recombinant, dépourvu du domaine B (BDD rFVIII)
	Afstyla ^{MC}	Facteur VIII recombinant, chaîne unique, dépourvu du domaine B (BDD rFVIII-Single Chain)
	Adynovate ^{MC}	Facteur VIII recombinant, pleine longueur, pégylé (rFVIII-PEG)

Source : données tirées du site Web d’Héma-Québec (www.hema-quebec.qc.ca) et du site Web de la Société canadienne du sang (www.blood.ca/fr) (consultés le 25 avril 2017).

Les dernières données statistiques fournies par Héma-Québec indiquent qu’au Québec, Advate^{MC} et Xyntha^{MC} sont prescrits à 12 % et 88 % respectivement.

Les patients traités avec des concentrés de facteurs de coagulation peuvent développer des anticorps contre le facteur VIII. La prévalence est d’environ 20 % chez les patients atteints d’hémophilie A sévère [Witmer et Young, 2013; Blanco *et al.*, 2002]. Ces patients peuvent aussi présenter des immunoglobulines (IgG, IgM ou IgA), plus communément appelées anticoagulants lupiques, qui sont dirigées contre les phospholipides et interfèrent avec la réaction de coagulation [Ruinemans-Koerts *et al.*, 2010; Blanco *et al.*, 2002]. Le nombre de patients présentant à la fois des anticorps anti-facteur VIII et des anticoagulants lupiques est estimé à 1,6 %, ce qui représente 24 % des patients ayant développé des anticorps contre le facteur VIII [Blanco *et al.*, 2002]. Ces anticorps et ces inhibiteurs, bien qu’ils agissent sur des cibles différentes de la réaction de coagulation, interfèrent tous deux avec le dosage du facteur VIII par la méthode chromométrique en un temps [Ruinemans-Koerts *et al.*, 2010; Teruya *et al.*, 2007].

⁴ Héma-Québec. Faits saillants, disponible à : http://www.hema-quebec.qc.ca/userfiles/file/media/francais/publications/ra_bilan_2004.pdf (consulté le 19 mai 2017).

4.3 Nombre prévu d'analyses et de patients visés

Le demandeur estime qu'environ 400 analyses sont effectuées annuellement au Québec et que ce nombre augmentera de manière considérable dans les prochaines années avec l'arrivée sur le marché d'autres concentrés de remplacement structurellement modifiés.

4.4 Brève description de la situation actuelle

Actuellement, au Québec, la méthode chromométrique en un temps est utilisée pour établir le diagnostic et pour effectuer le suivi des patients traités. Cette analyse est inscrite au *Répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale*, ci-après nommé *Répertoire*, pour la période 2016-2017 sous le code 20087 avec une VP de 4,9.

Selon l'expérience de plusieurs instances compétentes en analyses diagnostiques (IEQAS, UK NEQAS, ECAT, RCPAQAP et CAP)⁵ [Favaloro *et al.*, 2014; Jennings *et al.*, 2009] et un sondage des pratiques courantes [Kitchen *et al.*, 2015], la majorité des laboratoires cliniques utilisent actuellement la méthode chromométrique en un temps pour le diagnostic et le suivi de l'hémophilie A.

Le dosage des facteurs de coagulation par la méthode chromométrique en un temps a été décrit pour la première fois en 1953 [Biggs et Douglas, 1953]. Cette technique mesure la capacité d'un échantillon de plasma à raccourcir l'APTT (Activated Partial Thromboplastin Time) d'un plasma déficient en facteur VIII [Mackie *et al.*, 2013; Kitchen *et al.*, 2010].

Les principaux obstacles à la méthode chromométrique en un temps résident dans l'hétérogénéité des méthodes disponibles et la variabilité intra et interlaboratoire élevée expliquée par la centaine de combinaisons possibles entre les réactifs APTT, les activateurs de la coagulation, sans parler des différents standards de calibration et appareils de détection utilisés [Kitchen *et al.*, 2017; Kitchen *et al.*, 2015; Gu *et al.*, 2014; Poret et Mourey, 2014; Barrowcliffe, 2013; Mikaelsson et Oswaldsson, 2002] et du fait que le dosage des facteurs de coagulation par cette technique est inhibé par les anticoagulants lupiques et l'héparine [Poret et Mourey, 2014; Peetz, 2007; Chandler *et al.*, 2003].

Cette variabilité du dosage chromométrique en un temps peut mener à une sous-estimation de 20 à 50 % de la concentration en facteur VIII par rapport à la méthode chromogène, alors que cette dernière donne des résultats beaucoup plus homogènes et plus près des valeurs attendues [Committee for medicinal products for human use (CHMP), 2016b; Poret et Mourey, 2014; Mikaelsson et Oswaldsson, 2002].

Malgré cette variabilité rapportée, les méthodes chromogène et chromométrique en un temps sont généralement comparables en termes de résultats en ce qui concerne le dosage du facteur VIII endogène de même que dans le plasma de patients traités avec des facteurs de coagulation dérivés du plasma. Cependant, des discordances de plus grande envergure ont été mises en évidence entre ces deux méthodes lorsqu'il s'agit

⁵ Définitions des abréviations: IEQAS (Programme international d'évaluation externe de la qualité), UK NEQAS (National External Quality Assessment Service), ECAT (External quality Control of diagnostic Assays and Tests), RCPAQAP (Royal College of Pathologists of Australasia Quality Assurance Programs), CAP (College of American Pathologists).

de déterminer la concentration plasmatique du facteur VIII chez des patients traités avec des produits de remplacement recombinants dont la structure a subi des modifications [Mikaelsson et Oswaldsson, 2002].

4.5 Données médico-administratives

L'analyse chromogène ne remplacera pas l'analyse chromométrique en un temps déjà au *Répertoire*. La base de données du ministère de la Santé et des Services sociaux (MSSS) concernant la liste des envois hors Québec a été consultée (tableau 2). Aucune mention ou statistique de production pour cette analyse en 2013-2014.

Tableau 2 Envois hors Québec de l'analyse chromogène pour les années 2014-2015 et 2015-2016

ANNÉES	NOMBRE D'ANALYSES	COÛT TOTAL	LABORATOIRE
2014-2015	4	700 \$	Kingston General Hospital (Ontario)
2015-2016	8	1 000 \$	Kingston General Hospital (Ontario)

4.6 Brève description des avantages allégués de l'analyse proposée

L'analyse chromogène viendra raffiner la méthode de dosage des concentrés recombinants structurellement modifiés spécifiquement lors des suivis de traitements. Selon le demandeur, cette nouvelle analyse répond à un besoin clinique qui n'est pas couvert actuellement. Les avantages de l'analyse proposée sont :

- Favoriser une méthode de dosage plus précise et spécifique que la méthode chromométrique en un temps actuellement utilisée pour déterminer la concentration plasmatique des concentrés recombinants structurellement modifiés de facteur VIII;
- Offrir aux patients traités avec des concentrés recombinants structurellement modifiés de facteur VIII un meilleur ajustement de leur médication;
- Cesser l'envoi de ces analyses à l'extérieur du Québec et l'offrir localement à moindre coût.

4.7 Assurance qualité

Le laboratoire du centre demandeur participe au programme de contrôle de qualité externe du NASCOLA (North American Specialized Coagulation Laboratory Association) pour cette analyse. L'organisme envoie quatre fois par année un échantillon à doser.

Le centre demandeur effectue également un contrôle de la qualité par un dosage du facteur VIII sur des plasmas témoins lyophilisés STA-System^{MC} Control N et P (normal et pathologique) à chaque analyse d'un échantillon provenant d'un patient. Les valeurs de référence des plasmas témoins sont déterminées par la compagnie et sont inscrites dans le manuel de l'utilisateur qui accompagne chacune des trousse.

5 DONNÉES PROBANTES

5.1 Valeur diagnostique

Bien que le centre demandeur ne propose pas l'analyse chromogène pour établir le diagnostic, une étude primaire a été repérée dans laquelle Bowyer et ses collaborateurs [Bowyer *et al.*, 2013] ont mesuré le facteur VIII chez 82 patients atteints d'hémophilie A modérée avec les méthodes chromogène et chromométrique en un temps. Dans cette étude, 4 % des patients testés ont obtenu un diagnostic erroné avec la méthode chromométrique en un temps. Les auteurs concluent que la méthode chromogène devrait être utilisée pour confirmer un diagnostic d'hémophilie modérée. De plus, chez certains patients, l'hémophilie A modérée causée par des mutations du gène *F8* peut engendrer des résultats erronés par la méthode chromométrique en un temps. Dans de tels cas, les résultats du dosage ne reflètent pas le phénotype clinique observé. Le groupe de travail du Nordic Hemophilia Council a émis un guide de pratique dans lequel il suggère alors d'utiliser la méthode chromogène afin de préciser le diagnostic [Armstrong *et al.*, 2015].

5.2 Valeur pronostique

Aucune étude n'a été retenue puisque l'analyse proposée par le centre demandeur n'a pas pour objectif de prévoir l'évolution de la maladie ou d'anticiper un changement futur de l'état de santé.

5.3 Valeur thérapeutique

Efficacité du traitement

La recherche documentaire a permis de retenir deux études évaluant les liens entre l'efficacité du traitement et le dosage chromogène du facteur VIII [Chandler *et al.*, 2003; Blanco *et al.*, 2002].

Blanco et ses collaborateurs [2002] ont évalué la capacité de la méthode chromogène à détecter et à mesurer le facteur VIII en présence d'anticorps anti-facteur VIII développés chez des patients souffrant d'hémophilie A ainsi qu'en présence d'anticoagulants lupiques. Trois groupes d'échantillons ont été formés, soit 6 échantillons de plasmas provenant de patients ayant développé des anticorps anti-facteur VIII, 12 échantillons de plasmas contenant des anticoagulants lupiques et 5 échantillons de plasmas contenant des anticoagulants lupiques et des anticorps contre le facteur VIII. Les analyses chromogènes ont été réalisées avec la trousse Coamatic Factor VIII^{MC}. Les résultats de dosage obtenus avec les deux méthodes étaient identiques lorsqu'il s'agissait de mesurer le facteur VIII dans du plasma contenant des anticorps contre le facteur VIII. L'analyse du plasma contenant des anticoagulants lupiques a été sous-estimée par la méthode chromométrique en un temps, soulignant l'interférence induite par ce type d'inhibiteurs. Quant au dosage des échantillons contenant simultanément des anticorps anti-facteur VIII et des anticoagulants lupiques, il s'avère faussé lorsque le facteur VIII est mesuré avec le test chromométrique en un temps (tableau 3).

Tableau 3 Comparaison du dosage du facteur VIII dans des échantillons de plasmas contenant ou non des anticorps contre le facteur VIII et des anticoagulants lupiques par les méthodes chromogène et chromométrique en un temps

COMPARAISON DES MÉTHODES*	ANTICORPS ANTI-FACTEUR VIII (n = 6)	ANTICOAGULANTS LUPIQUES (n = 12)	ANTICORPS ANTI-FACTEUR VIII ET ANTICOAGULANTS LUPIQUES (n = 5)
Méthode chromométrique en un temps (UI/dl)	0,1 (0,01-15,0)	45,1 (12,0-100,0)	1,5 (0,01-5,7)
Méthode chromogène (UI/dl)	0,1 (0,01-17,0)	129,0 (64,0-200,0)	0,1 (0,01-13,0)
Valeur de p [†]	< 0,001	0,991	< 0,001

Source : Blanco *et al.*, 2002.

Abréviations : n : nombre d'échantillons; UI : unité internationale; dl : décilitre.

* Valeur médiane (valeur minimale, valeur maximale).

† Significativité statistique entre les deux méthodes.

Cette étude montre que la méthode chromogène permet de détecter et de mesurer de manière spécifique la présence d'anticorps dirigés contre le facteur VIII en contrecarrant l'interférence induite par les anticoagulants lupiques. Les auteurs concluent que, chez des patients ayant ces deux types d'inhibiteurs, il serait plus fiable de doser le facteur VIII par la méthode chromogène.

L'étude de Chandler et ses collaborateurs [2003] avait comme but de comparer trois méthodes de dosage (chromométrique en un temps, chromogène et immunologique) du facteur VIII et d'évaluer leur précision ainsi que leur sensibilité à l'héparine, aux inhibiteurs de thrombine et aux anticoagulants lupiques. Vingt-sept échantillons de plasma contenant des anticoagulants lupiques ont été analysés. Les résultats ont montré que l'ajout au plasma de 2 U/ml d'héparine ou de 5 µg/ml de lépirudine⁶ n'affecte pas le dosage du facteur VIII par les méthodes chromogène et immunologique alors que l'ajout au plasma de doses aussi faibles que 0,7 U/ml d'héparine ou de 0,1 µg/ml de lépirudine interfère avec le dosage du facteur VIII par la méthode chromométrique en un temps. Les auteurs concluent que la méthode chromogène est optimale comparativement à la méthode chromométrique en un temps puisqu'elle est insensible à l'interférence engendrée par l'héparine, les inhibiteurs de thrombine et les anticoagulants lupiques qui peuvent se retrouver dans le plasma des patients hémophiles.

5.4 Validité analytique

Suivi du traitement

La recherche documentaire a permis de retenir deux études portant sur la capacité de faire un suivi avec la méthode chromogène [Klukowska *et al.*, 2015; Powell *et al.*, 2012].

⁶ La lépirudine est un anticoagulant inhibiteur direct et hautement spécifique de la thrombine mis au point par recombinaison génétique à partir de l'hirudine.

Une étude de phase I/II réalisée par Powell et ses collaborateurs [2012] a comparé la pharmacocinétique d'Advate^{MC} et d'Eloctate^{MC} mesurée soit avec la méthode chromogène, soit avec la méthode chronométrique en un temps, chez 16 patients âgés de 12 ans et plus, atteints d'hémophilie A sévère, et ayant à leur actif plus de 100 jours d'exposition à un traitement de remplacement. Les participants ont été scindés en deux cohortes. Six patients ont reçu une faible dose (25 UI/kg) d'Advate^{MC}, puis 3 à 4 jours plus tard d'Eloctate^{MC}. Les dix autres patients ont reçu le même type de traitement mais à une plus forte dose (65 UI/kg). Ces deux doses représentent des concentrations administrées de routine aux patients traités. La pharmacocinétique des concentrés a été déterminée par dosage des échantillons plasmatiques avec la méthode chronométrique en un temps ainsi qu'avec la trousse chromogène Biophen FVIII:C^{MC} (annexe A). Une étroite corrélation entre les résultats obtenus avec la méthode chromogène et la méthode chronométrique en un temps a été observée avec des coefficients de corrélation (R^2 de Pearson) de 0,94 et 0,95 pour le dosage d'Advate^{MC} et d'Eloctate^{MC} respectivement. Les auteurs concluent que le concentré Eloctate^{MC} peut être dosé de manière fiable tant par la méthode chronométrique en un temps que par la méthode chromogène.

Une étude de phase III réalisée par Klukowska et ses collaborateurs [2015] a comparé la pharmacocinétique de Nuwiq^{MC} avec les deux méthodes de dosage. Aucune mention n'est faite au sujet des réactifs ni de la trousse utilisés. Cinquante-neuf patients âgés entre 2 ans et 12 ans, atteints d'hémophilie A sévère et sous traitement prophylactique avec Nuwiq^{MC} depuis plus de 50 jours ont été recrutés. Cette étude est divisée en deux volets, mais le premier seulement sera abordé. Ce volet comprend deux cohortes : 13 enfants de 2 ans à 5 ans et 13 enfants de 6 ans à 12 ans auxquels on a administré Nuwiq^{MC} à une dose de 50 UI/kg. La pharmacocinétique du concentré a été suivie par dosage avec les méthodes chromogène et chronométrique en un temps (annexe B). Les auteurs concluent que les paramètres pharmacocinétiques analysés pour Nuwiq^{MC} par ces deux méthodes sont comparables, comme en témoigne l'aire sous la courbe.

Dosages comparatifs des différents produits de remplacement

Plusieurs études ont évalué la variabilité intra et inter-essai des dosages chromogène et chronométrique en un temps pour les différents produits de remplacement recombinants modifiés structurellement. Sept études primaires comparant les deux méthodes de dosage des concentrés recombinants présentant différentes modifications structurelles ont été retenues. Ces études sont résumées dans l'annexe C. Parmi les études retenues, quatre d'entre elles se penchent sur le dosage des concentrés recombinants dépourvus de domaine B [Kitchen *et al.*, 2016b; Pouplard *et al.*, 2016; Cauchie *et al.*, 2013; Pouplard *et al.*, 2011], deux concernent les concentrés recombinants dépourvus du domaine B et qui sont fusionnés avec le fragment Fc des immunoglobulines [Sommer *et al.*, 2014; Powell *et al.*, 2012] et une concerne un concentré recombinant pégylé [Turecek *et al.*, 2016].

Concentrés recombinants dépourvus de domaine B

Les quatre études présentées ci-après portent en particulier sur le concentré Xyntha^{MC} et se penchent sur l'évaluation de la performance des deux méthodes de dosage d'intérêt et sur l'impact des standards utilisés, soit un mélange de plasmas ou le standard RAFLS (pour *ReFacto AF Laboratory Standard*^{MC}).

En 2011, Pouplard et ses collaborateurs [2011] ont mené une étude multicentrique visant l'analyse d'échantillons de plasmas enrichis de quatre concentrations connues de Xyntha^{MC}. La trousse chromogène Biophen FVIII:C^{MC} a été utilisée par tous les laboratoires. Des variations interlaboratoires allant de 2,5 % à 10,6 % ont été observées entre les deux méthodes. Selon les auteurs, la méthode chromogène est toutefois plus reproductible avec 5,1 % à 7,2 % de coefficient de variation (tableau 4).

Tableau 4 Reproductibilité du dosage du facteur VIII par les méthodes chromogène et chromométrique en un temps avec différents standards

REPRODUCTIBILITÉ DES MÉTHODES	MÉTHODE CHRONO EN UN TEMPS/PLASMA (n = 6)				MÉTHODE CHRONO EN UN TEMPS/RAFLS (n = 6)				MÉTHODE CHROMOGÈNE/PLASMA (n = 6)			
Concentration connue (UI/dl)	92	64	36	16	92	64	36	16	92	64	36	16
Dosage* (UI/dl)	73 ± 4,7	51 ± 3,0	27 ± 2,3	14 ± 1,4	91 ± 3,3	64 ± 1,6	33 ± 1,7	18 ± 1,9	101 ± 5,5	71 ± 3,6	38 ± 2,1	20 ± 1,4
% CV	6,5	5,8	8,5	9,2	3,7	2,5	5,0	10,6	5,4	5,1	5,6	7,2

Source : Pouplard *et al.*, 2011.

Abréviations : n : nombre de laboratoires; RAFLS : *ReFacto AF Laboratory Standard*^{MC}; UI : unité internationale; dl : décilitre; CV : coefficient de variation.

* Dosage moyen ± écart-type.

Des variations interlaboratoires ont également été observées avec un coefficient de variation de l'ordre de 0,5 % à 17,1 %. Les auteurs concluent que le dosage chromogène est plus précis, comme le témoigne un coefficient de variation allant de 1,2 % à 9,5 % (tableau 5).

Tableau 5 Répétabilité du dosage du facteur VIII par les méthodes chromogène et chromométrique en un temps avec différents standards

RÉPÉTABILITÉ DE LA MÉTHODE	MÉTHODE CHRONO EN UN TEMPS/PLASMA				MÉTHODE CHRONO EN UN TEMPS/RAFLS				MÉTHODE CHROMOGÈNE/PLASMA			
Concentration connue (UI/dl)	92	64	36	16	92	64	36	16	92	64	36	16
% CV*	2,1- 9,4	3,4- 12,3	4,1- 17,1	3,2- 11,2	2,1- 9,8	0,5- 15,0	2,4- 13,3	3,2- 13,9	1,2- 7,9	2,6- 7,7	2,7- 9,5	2,7- 8,5
Écart-type* (%)	1,4- 8,7	1,7- 6,3	1,1- 4,7	0,5- 1,7	1,8- 8,8	0,2- 9,8	0,8- 4,2	0,6- 2,6	2,1- 7,8	2,6- 7,7	1,0- 3,4	0,6- 1,7

Source : Pouplard *et al.*, 2011.

Abréviations : RAFLS : *ReFacto AF Laboratory Standard*^{MC}; UI : unité internationale; dl : décilitre; CV : coefficient de variation.

* Gamme des valeurs.

Cauchie et ses collaborateurs [2013] ont également réalisé une étude afin de comparer les deux méthodes de dosage du Xyntha^{MC}. Ils ont utilisé la trousse chromogène Biophen FVIII:C^{MC}. L'équipe de Cauchie a fait les analyses sur des échantillons de plasmas provenant de patients traités avec Xyntha^{MC} qui avaient fait l'objet d'une étude antérieure. Lorsque les dosages étaient effectués en utilisant un mélange de plasmas en guise de standard, la différence observée entre les deux méthodes grimpait jusqu'à 58 % alors que lorsque le standard RAFLS était utilisé, la différence observée entre les deux méthodes était de 26 % (tableau 6).

Tableau 6 Variabilité du dosage du Xyntha^{MC} et d'Advate^{MC} par les méthodes chromogène et chronométrique en un temps avec différents standards

FACTEUR VIII	PRÉLÈVEMENT-PATIENT	LOT DE RÉACTIF CHRONO EN UN TEMPS/CHROMOGÈNE	% DIFFÉRENCE MÉTHODE CHRONO EN UN TEMPS (RAFLS) CONTRE MÉTHODE CHROMOGÈNE (PLASMA)	% DIFFÉRENCE MÉTHODE CHRONO EN UN TEMPS (PLASMA) CONTRE MÉTHODE CHROMOGÈNE (PLASMA)
Xyntha^{MC} (domaine B)	S1-P1	1/1	-1,5	-38,5
	S2-P1	1/1	-0,5	-34,6
	S3-P1	1/1	-3,8	-39,3
	S4-P1	1/1	-12,2	-50,4
	S5-P1	2/1	-25,9	-57,6
	S6-P1	2/1	-18,6	-47,4
	S7-P1	2/1	-20,3	-47,5
Advate^{MC}	S25-P18	2/1	s.o	-27,1
	S26-P18	2/1	s.o	-34,1
	S27-P19	2/1	s.o	-48,6
	S28-P19	2/1	s.o	-46,5
	S29-P20	3/2	s.o	-26,5
	S30-P20	3/2	s.o	-30,4
	S31-P20	3/2	s.o	-32,4

Source : Cauchie *et al.*, 2013.

Abréviations : RAFLS : *ReFacto AF Laboratory Standard*^{MC}; s.o. : sans objet.

Les auteurs arrivent à la conclusion que l'utilisation du standard RAFLS contribue à réduire les discordances observées entre les deux méthodes.

Pouplard et son équipe [2016] ont refait une autre étude multicentrique quelques années plus tard. Le but de l'étude était le même qu'en 2011, soit évaluer la performance du standard RAFLS pour les deux méthodes d'analyse du facteur VIII. Toutefois, dans cette deuxième étude, ils ont également comparé les résultats du dosage de plasmas de patients souffrant d'hémophilie A modérée à sévère traités au Xyntha^{MC}, avec d'autres concentrés recombinants pleine longueur tels que Helixate^{MC}/Kogenate^{MC} et Advate^{MC} pour un total de 78 échantillons analysés. Tous les laboratoires ont utilisé le standard RAFLS ainsi que le même lot de plasma standard. Par contre, plusieurs réactifs différents ont été employés pour le dosage avec la méthode chronométrique en un temps. La trousse chromogène Biophen FVIII:C^{MC} a été utilisée. Cette étude démontre que les différences des niveaux de facteur VIII mesurés avec les méthodes chromogène et chronométrique en un temps chez les patients traités par Xyntha^{MC}, sont réduites lorsque le standard RAFLS est employé (tableau 7).

Tableau 7 Variabilité du dosage de Xyntha^{MC}, Helixate^{MC}/Kogenate^{MC} et Advate^{MC} par les méthodes chromogène et chromométrique en un temps avec différents standards

FACTEUR VIII	% DIFFÉRENCE MÉTHODE CHRONO EN UN TEMPS (RAFLS) CONTRE MÉTHODE CHROMOGÈNE	% DIFFÉRENCE MÉTHODE CHRONO EN UN TEMPS (PLASMA) CONTRE MÉTHODE CHROMOGÈNE
Xyntha ^{MC} (domaine B)	-8,4	-22,3
Advate ^{MC}	s.o.	-9,2
Helixate ^{MC} /Kogenate ^{MC}	s.o.	-17,8

Source : Pouplard *et al.*, 2016

Abréviations : RAFLS : *ReFacto AF Laboratory Standard*^{MC}; s.o. : sans objet.

Au même moment, Kitchen et ses collaborateurs [2016b] ont réalisé une étude multicentrique poursuivant le même objectif que Pouplard et ses collègues [2016]. Ils ont procédé à l'analyse de trois échantillons de plasmas de patients atteints d'hémophilie A traités avec Xyntha^{MC}, pour les comparer à ceux d'autres patients sous traitement avec Helixate^{MC}/Kogenate^{MC} ou Advate^{MC}. Tous les laboratoires ont utilisé le même lot de plasma standard ainsi que le standard RAFLS. Par contre, plusieurs réactifs différents pour le dosage avec la méthode chromométrique en un temps ont été employés. Différentes trousses chromogènes ont été utilisées (Coamatic Factor VIII^{MC}, Biophen FVIII:C^{MC}, Electrachrome^{MC}, Technochrom^{MC}, FVIII Chromogenic^{MC}). La variabilité interlaboratoire observée oscillait entre un coefficient de variation de 12 % à 26 % pour les deux méthodes de dosage (tableau 8).

Tableau 8 Reproductibilité de Xyntha^{MC}, Helixate^{MC}/Kogenate^{MC} et Advate^{MC} par les méthodes chromogène et chromométrique en un temps avec différents standards

REPRODUCTIBILITÉ DE LA MÉTHODE	FACTEUR VIII*	XYNTHA ^{MC} (domaine B)		HELIXATE ^{MC} / KOGENATE ^{MC}	ADVATE ^{MC}
	STANDARD	PLASMA	RAFLS	PLASMA	PLASMA
Méthode chromométrique en un temps (46 laboratoires)	Dosage [†] (UI/dl)	58,3 (40,0-73,9)	62,6 (36,5-97,6)	52,0 [‡] (42,2-72,0)	43,0 [§] (31,6-63,6)
	% CV	17	19	12	17 [§]
Méthode chromogène (10 laboratoires)	Dosage [†] (UI/dl)	64,9 (37,9-77,0)	55,0 (29,2-86,5)	68,6 [‡] (44,0-78,0)	41,6 (23,2-49,0)
	% CV	22	26	15	19

Source : Kitchen *et al.*, 2016b.

Abréviations : RAFLS : *ReFacto AF Laboratory Standard*^{MC}; UI : unité internationale; dl : décilitre.

* Les valeurs attendues de la concentration en facteur VIII ne sont pas mentionnées dans l'article.

† Valeur médiane (valeur minimale, valeur maximale).

‡ Valeur significative avec un p < 0,0001.

§ Un laboratoire a été exclu des calculs pour Advate^{MC} parce que les valeurs rapportées étaient < 1 UI/dl.

Tout comme les études de Pouplard [Pouplard *et al.*, 2016; Pouplard *et al.*, 2011], Cauchie [2013] et Kitchen [2016b] l'ont montré, le standard RAFLS offre une alternative au dosage chromométrique en un temps puisqu'il contribue à réduire l'écart des variations entre les deux méthodes. Les auteurs soutiennent donc l'importance d'utiliser un standard approprié dépendamment du concentré à doser. Cependant, étant donné qu'il peut devenir laborieux, du point de vue d'un laboratoire clinique, de mettre au point et d'utiliser de routine un standard spécifique pour chacun des concentrés à doser, les auteurs des études présentées s'accordent pour conclure que le test chromogène s'avère la meilleure option pour un dosage fiable des concentrés recombinants structurellement modifiés.

Concentrés recombinants dépourvus de domaine B, fusionnés avec le fragment Fc des immunoglobulines

Deux études traitant des concentrés dépourvus de domaine B et fusionnés avec le fragment Fc des immunoglobulines ont été retenues [Sommer *et al.*, 2014; Powell *et al.*, 2012].

Powell et ses collaborateurs [2012] ont mené une étude multicentrique clinique de phase I/II portant sur la sécurité d'administration et la pharmacocinétique du concentré Eloctate^{MC}. Dans le cadre de cette étude, des dosages avec les deux méthodes d'intérêt ont été effectués sur des échantillons de plasmas provenant de patients souffrant d'hémophilie A sévère traités avec Eloctate^{MC} et comparés avec ceux sous traitement avec Advate^{MC}. Pour les analyses chromogènes, la trousse Biophen FVIII:C^{MC} a été utilisée et concernant les analyses chromométriques en un temps, les mêmes réactifs ont été employés par tous les laboratoires. Pour toutes les analyses, le 5^e standard de l'OMS⁷ a été utilisé. Bien que les résultats des deux méthodes soient étroitement corrélés, les valeurs obtenues avec la méthode chromogène sont légèrement plus élevées de 32 % et de 21 % pour Advate^{MC} et Eloctate^{MC} respectivement, quoique non statistiquement significatives.

L'étude de Sommer et ses collaborateurs [2014] porte également sur le concentré Eloctate^{MC}. Il s'agit d'une étude multicentrique ayant comme objectif d'évaluer la performance des deux méthodes de dosage utilisées de routine dans chacun des laboratoires impliqués. Les échantillons testés consistaient en du plasma de patients atteints d'hémophilie A auquel trois concentrations connues d'Eloctate^{MC} ou d'Advate^{MC} ont été ajoutées. Une grande diversité de standards et de réactifs pour le test chromométrique en un temps ainsi que plusieurs trousse chromogènes (Coamatic Factor VIII^{MC}, Biophen FVIII:C^{MC}, Coatest^{MC}, Electrachrome^{MC}, Technochrom^{MC}, FVIII Chromogenic^{MC}) ont été employés dans cette étude. La variabilité intralaboratoire avec des coefficients de variation de 2,9 % à 12,5 % et interlaboratoire avec des coefficients de 10 % à 38 % étaient similaires pour les deux techniques, et ce, à toutes les concentrations testées. Les valeurs de dosage obtenues avec les deux méthodes étaient elles aussi comparables, quoique légèrement plus élevées avec la méthode chromogène (tableau 9).

⁷ Lot de l'étalon international de concentré de facteur VIII distribué par l'Organisation mondiale de la Santé (OMS).

Tableau 9 Répétabilité et reproductibilité du dosage d'Advate^{MC} et d'Eloctate^{MC} par les méthodes chromogène et chronométrique en un temps

RÉPÉTABILITÉ ET REPRODUCTIBILITÉ	FACTEUR VIII	VALEUR ATTENDUE (UI/dl)	% VALEUR ATTENDUE	% CV INTRA LABORATOIRE	% CV INTER LABORATOIRE
Méthode chronométrique en un temps (30 laboratoires)	Advate^{MC}	80	96,7	6,3	10
		20	110,2	7,8	19
		5	118,1	7,4	34
	Eloctate^{MC} (domaine B, protéine de fusion)	80	94,6	6,0	16
		20	106,0	8,7	17
		5,4	115,7	10,3	31
Méthode chromogène (10 laboratoires)	Advate^{MC}	80	108,1	4,4	18
		20	112,4	11,7	26
		5	101,8	12,5	38
	Eloctate^{MC} (domaine B, protéine de fusion)	80	119,0	2,9	19
		20	133,4	7,0	23
		5,4	120,2	8,3	31

Source : Sommer *et al.*, 2014.

Abréviations : UI : unité internationale; dl : décilitre; CV : coefficient de variation, n : nombre d'échantillons.

Les auteurs des études de Powell [2012] et Sommer [2014] arrivent à la conclusion que le concentré Eloctate^{MC}, bien qu'il soit dépourvu de son domaine B et fusionné avec le fragment Fc des immunoglobulines, peut être dosé de manière adéquate autant avec la méthode chronométrique en un temps qu'avec la méthode chromogène.

Concentrés recombinants pleine longueur, pégylés

L'étude de Turecek et ses collaborateurs [Turecek *et al.*, 2016] est la seule qui a été retenue pour la comparaison des méthodes chromogène et chronométrique en un temps pour les concentrés recombinants pégylés. Ils ont réalisé une étude ayant pour but de comparer les deux méthodes employées dans la pratique courante. Des mélanges de plasmas commercialement disponibles issus de patients atteints d'hémophilie A ont été enrichis avec trois concentrations déterminées des concentrés Adynovate^{MC}, Advate^{MC} et Obizur^{MC} (concentré recombinant dépourvu du domaine B). Une grande variété de standards, de réactifs et de trousses chromogènes (Coamatic Factor VIII^{MC}, FVIII Chromogenic^{MC}, Berichrom FVIII^{MC}, Electrachrome^{MC}) ont été utilisés. Les variations intra et interlaboratoires passent d'un coefficient de variation de 6,8 % à 17,3 % et de 9,0 % à 33,7 % respectivement pour les deux méthodes à toutes les concentrations d'Advate^{MC} et d'Adynovate^{MC}. Toutefois, les deux méthodes ont tendance à être plus variables aux concentrations les plus faibles, en particulier pour le concentré Obizur^{MC} avec des variations intra et interlaboratoires allant jusqu'à 29,5 % et 46,8 % respectivement. Les résultats montrent également que la méthode chromogène sous-estime le dosage du concentré Obizur^{MC} (tableau 10).

Tableau 10 Répétabilité et reproductibilité du dosage d'Advate^{MC}, Obizur^{MC} et Adynovate^{MC} par les méthodes chromogène et chronométrique en un temps

RÉPÉTABILITÉ ET REPRODUCTIBILITÉ	FACTEUR VIII	VALEUR ATTENDUE (UI/dl)	% VALEUR ATTENDUE*	% CV INTRA LABORATOIRE	% CV INTER LABORATOIRE
Méthode chronométrique en un temps (35 laboratoires)	Advate^{MC}	80	91,2	6,8	10,9
		20	26,0	8,8	13,0
		5	6,9	12,9	16,1
	Obizur^{MC} (domaine B)	80	91,5	8,9	15,8
		20	23,9	12,3	16,1
		5	6,3	15,4	21,6
	Adynovate^{MC} (pégylé)	80	80,8	7,4	14,7
		20	22,6	9,5	17,8
		5	6,2	12,4	17,5
Méthode chromogène (11 laboratoires)†	Advate^{MC}	80	103,2	7,7	9,0
		20	25,5	4,8	13,9
		5	4,6	15,1	32,5
	Obizur^{MC} (domaine B)	80	48,7	9,3	13,2
		20	11,0	12,0	28,8
		5	2,2	29,5	46,8
	Adynovate^{MC} (pégylé)	80	99,2	7,6	10,1
		20	24,7	5,4	15,9
		5	4,8	17,3	33,7

Source : Turecek *et al.*, 2016.

Abréviations : UI : unité internationale; dl : décilitre; CV : coefficient de variation.

* Exprimée en moyenne géométrique.

† Deux des onze laboratoires n'ont pas été en mesure de doser le concentré Obizur^{MC} à la plus faible concentration.

Les auteurs de cette étude concluent que les méthodes chromogène et chronométrique en un temps peuvent adéquatement mesurer la concentration plasmatique des concentrés Adynovate^{MC} et Advate^{MC} sans égards pour le type d'instrument de détection, les réactifs ou les standards utilisés.

Comparaison des trousses

Deux études comparant la variabilité, la sensibilité et la reproductibilité des trousses commerciales disponibles sur le marché permettant la détermination de la concentration plasmatique du facteur VIII sont présentées dans cette section [Pickering *et al.*, 2016; Rodgers *et al.*, 2009].

Rodgers et ses collaborateurs [2009] ont comparé trois trousses chromogènes commerciales (Coamatic Factor VIII^{MC}, Biophen FVIII:C^{MC}, Dade-Behring^{MC}). Les analyses ont été réalisées avec le plasma de sept patients atteints d'hémophilie A dont le dosage du facteur VIII était connu pour donner des valeurs discordantes et quatre patients connus pour des résultats de dosage équivalents avec les méthodes chromogène et chronométrique en un temps. Chacune des trousses a fait preuve d'une très bonne reproductibilité pour les trois essais effectués comme le montrent les coefficients de variation de 4,1 % pour Coamatic Factor VIII^{MC}, 2,4 % pour Biophen FVIII:C^{MC} et 7,4 % pour Dade-Behring^{MC}. La trousse Dade-Behring^{MC} a été classée parmi

les moins souhaitables pour le dosage du facteur VIII. La sensibilité des trousses Coamatic Factor VIII^{MC} et Biophen FVIII:C^{MC} a été jugée adéquate mais elle l'est davantage lorsque les temps d'incubation recommandés par les manufacturiers sont prolongés (passant de 300 secondes à 500 secondes). Les auteurs recommandent donc l'utilisation des trousses Biophen FVIII:C^{MC} et Coamatic Factor VIII^{MC}.

L'étude de Pickering et ses collaborateurs [2016] consistait à comparer différentes trousses (annexe D) pour le dosage chromogène des concentrés N8-GP^{MC} (recombinant, pleine longueur, pégylé) et Zonovate^{MC} (concentré recombinant dépourvu du domaine B) dans du plasma de patients atteints d'hémophilie A sévère auquel des quantités déterminées de concentrés ont été ajoutées. Deux types de standards ont également fait l'objet d'une comparaison dans cette étude, il s'agit du 8^e standard de l'OMS et d'un plasma humain standard (SHP, Siemens) (tableau 11).

Tableau 11 Comparaison du dosage de N8-GP^{MC} et de Zonovate^{MC} avec quatre trousses chromogènes et deux standards

TROUSSE	FACTEUR VIII	CONCENTRATION CONNUE (UI/dl)	PLASMA STANDARD SHP		8 ^e STANDARD DE L'OMS	
			DOSAGE* (UI/dl)	% CV	DOSAGE* (UI/dl)	% CV
Coamatic Factor FVIII ^{MC}	N8-GP ^{MC} (pégylé)	90	112,5 ± 3,9	3,5	89,2 ± 3,9	4,3
		60	71,8 ± 4,6	6,4	58,4 ± 2,4	4,2
		20	21,7 ± 1,1	4,9	16,6 ± 1,8	10,9
	Zonovate ^{MC} (domaine B)	90	120,2 ± 7,4	6,1	93,8 ± 4,2	4,5
		60	72,1 ± 6,6	9,2	58,8 ± 3,5	5,9
		20	20,6 ± 0,9	4,5	15,9 ± 1,7	10,4
Biophen FVIII:C ^{MC}	N8-GP ^{MC} (pégylé)	90	105,8 ± 5,2	4,9	95,3 ± 4,0	4,2
		60	75,1 ± 5,6	7,4	66,9 ± 2,0	3,0
		20	31,6 ± 1,7	5,4	26,1 ± 2,2	8,4
	Zonovate ^{MC} (domaine B)	90	121,5 ± 7,6	6,2	111,3 ± 5,3	4,7
		60	76,5 ± 7,1	9,4	71,9 ± 9,6	13,4
		20	31,8 ± 2,2	6,9	27,0 ± 1,1	4,1
Coatest ^{MC}	N8-GP ^{MC} (pégylé)	90	99,3 ± 1,4	1,4	86,5 ± 4,5	5,2
		60	63,8 ± 3,2	4,9	57,0 ± 4,6	8,1
		20	19,9 ± 0,2	0,8	19,0 ± 2,0	10,5
	Zonovate ^{MC} (domaine B)	90	108,2 ± 5,9	5,5	93,8 ± 8,1	8,7
		60	66,5 ± 5,9	5,5	59,3 ± 5,8	9,8
		20	20,6 ± 0,8	4,9	19,6 ± 1,5	7,6
FVIII Chromogenic ^{MC}	N8-GP ^{MC} (pégylé)	90	101,9 ± 14,8	14,6	77,7 ± 2,3	2,9
		60	70,3 ± 7,7	10,9	53,8 ± 4,0	7,5
		20	23,1 ± 3,0	12,9	17,6 ± 1,6	8,8
	Zonovate ^{MC} (domaine B)	90	112,0 ± 17,5	15,7	85,4 ± 1,3	1,6
		60	69,5 ± 11,4	16,4	52,9 ± 1,1	2,0
		20	24,1 ± 2,5	10,8	18,4 ± 2,0	10,8

Source : Pickering *et al.*, 2016.

Abréviation : UI : unité internationale; dl : décilitre; SHP : Plasma standard humain de la compagnie Siemens; OMS : Organisation mondiale de la Santé; CV : coefficient de variation.

* Moyenne des dosages de trois expériences indépendantes ± écart-type.

Les résultats générés avec le standard de l'OMS étaient plus près des valeurs attendues qu'avec le plasma standard SHP. Les trousse employées ont démontré un niveau de précision approprié avec un coefficient de variation en deçà de 20 %. L'étude permet aux auteurs de conclure que la composition pourtant différente des trousse chromogènes utilisées n'a pas un impact notable sur le dosage du facteur VIII. Les résultats de dosage de chaque trousse étaient à ± 10 % des valeurs moyennes de toutes les trousse, ce qui confirme qu'elles sont robustes et fiables pour le dosage du facteur VIII.

Conclusion générale

Les études présentées dans cette section ont permis de constater que le dosage plasmatique du facteur VIII avec la méthode chromométrique en un temps et la méthode chromogène donne des résultats comparables même si on ne peut nier la variabilité qui subsiste dans certaines conditions. Cette variabilité peut s'accroître selon le type de modification structurale des concentrés recombinants. De façon générale, la méthode chromogène surestime, la plupart du temps de manière non significative, la concentration du facteur VIII comparativement à la méthode chromométrique en un temps. Toutefois, la majorité des études démontrent que les résultats du dosage chromogène sont plus près des valeurs attendues. Les variations entre les deux méthodes sont vraisemblablement reliées à la grande diversité des réactifs APTT disponibles, pour le test chromométrique en un temps. Plusieurs études préconisent l'utilisation de standards spécifiques à chaque concentré dosé, ce qui implique des étapes supplémentaires de mise au point. Dans l'ensemble, la capacité de la méthode chromogène à mesurer avec davantage de sensibilité, de précision et de reproductibilité la concentration plasmatique des concentrés recombinants structurellement modifiés fait de cette technique une méthode fiable pour le suivi du traitement des patients atteints d'hémophilie A.

Informations de la trousse Coamatic Factor VIII^{MC} de la compagnie Chromogenix

Sensibilité : La limite de détection de la trousse se situe à 5 UI/dl pour le spectre de concentrations plasmatiques normales⁸ (allant de 5 UI/dl à 150 UI/dl) et à 0,5 UI/dl pour le spectre de concentrations faibles (0,5 UI/dl à 5 UI/dl).

Précision : La répétabilité de la trousse a été évaluée par le dosage de 42 échantillons pour chacune des trois concentrations de plasma. Cette variabilité intra-essai montrait un coefficient de variation allant de 2,4 % à 3,0 %. La reproductibilité de la trousse a été évaluée par le dosage de six échantillons de plasma de chacune des trois concentrations, et ce, à sept reprises, c'est-à-dire lors de sept expériences réalisées de manière distincte (différentes journées, différents techniciens)⁹. Cette variabilité inter-essai se situe entre 2,1 % et 5,9 % de coefficient de variation selon la concentration des échantillons analysés (tableau 12).

⁸ Les concentrations de facteur VIII mesuré chez 61 sujets sains (28 hommes et 33 femmes âgés de 21 ans à 55 ans) se situaient dans la fourchette de 50 UI/dl à 200 UI/dl avec une médiane à 113 UI/dl et un écart-type de 39 UI/dl, où 100 UI/dl est équivalent à un taux de facteur VIII de 100 % [Chromogenix, 2013].

⁹ Les précisions quant au nombre d'échantillons et d'expériences distinctes effectuées ont été confirmées lors d'un échange de courriels avec le fournisseur de la trousse, Diapharma Group Inc. le 15 juin 2017.

Tableau 12 Données de précision de la trousse Coamatic Factor VIII^{MC}

ÉCHANTILLON FVIII	n	% CV INTRA-ESSAI	SÉRIES	n	% CV INTER-ESSAI
100 UI/dl	42	2,4	7	6	2,1
25 UI/dl	42	2,6	7	6	5,9
3 UI/dl	42	3,0	7	6	3,9

Source : Source : Tableau adapté du manuel de l'utilisateur fourni par Chromogenix [2013].

Abréviations : FVIII : facteur VIII; n : nombre de réplicats dans chaque série; CV : coefficient de variation; UI : unité internationale; dl : décilitre.

Ces données concernant les limites de détection ainsi que celles ayant trait à la précision sont présentées à titre informatif uniquement puisque la courbe d'étalonnage doit être réalisée à chaque analyse afin d'établir les valeurs appropriées à chaque dosage. Les performances analytiques de la trousse sont rapportées plus en détail dans le manuel de l'utilisateur fourni par le manufacturier [Chromogenix, 2013].

5.5 Données fournies par le demandeur

Le demandeur a effectué la validation de l'analyse chromogène avec la trousse Coamatic Factor VIII^{MC} de la compagnie Chromogenix en utilisant un plasma humain standard (Siemens lot #503253) dont la valeur attendue déterminée par l'OMS est 100 UI/dl et trois échantillons de plasmas humains commercialement disponibles à des concentrations déterminées de 26 UI/dl, 30 UI/dl et 88 UI/dl (Siemens lots #509996B, lot #509998A et lot #507731, respectivement). La variabilité intra-essai a été évaluée en dosant deux plasmas humains à 30 UI/dl et 88 UI/dl avec la trousse Coamatic Factor VIII^{MC} (lot #N0177165) et la répétabilité varie avec des coefficients de variation de 9,1 % et 7,3 %, respectivement pour ces deux concentrations. La variabilité inter-essai a quant à elle été évaluée en dosant trois plasmas humains à 26 UI/dl, 30 UI/dl et 88 UI/dl avec la trousse Coamatic Factor VIII^{MC} (lot #N0965025) et la reproductibilité varie avec des coefficients de variation de 8,7 %, 7,2 % et 6,3 %, respectivement pour ces trois concentrations. Les données de validation fournies par le demandeur sont présentées plus en détail à l'annexe E.

6 IMPACTS BUDGÉTAIRES

L'analyse d'impact budgétaire considère les coûts liés à l'ajout au *Répertoire* de l'analyse permettant de déterminer la concentration du facteur VIII par méthode chromogène. Trois scénarios sont présentés. Le premier considère l'usage du test en fonction du profil d'utilisation actuel des facteurs VIII qualifiés de courte et de longue action (par exemple, associé à une protéine de fusion ou pégylé) par les experts consultés pour le traitement de l'hémophilie A sévère. Le second scénario considère une éventuelle prise de marché plus importante des agents à longue action. Le dernier scénario considère une utilisation presque exclusive des facteurs VIII à longue action au terme d'un horizon temporel de 3 ans. Les coûts sont projetés selon la perspective du ministère de la Santé et des Services sociaux (MSSS). L'analyse repose sur des données épidémiologiques ainsi que sur des hypothèses appuyées par des études cliniques et l'opinion d'experts. L'évaluation des coûts est présentée au tableau 13. Les principales hypothèses émises pour les fins de l'analyse sont les suivantes :

- L'analyse proposée par le demandeur cible des patients atteints d'hémophilie A sévère recevant un facteur VIII à action prolongée seulement.

- Selon la base de données du registre canadien de l'hémophilie de l'Université McMaster, il est anticipé que 190, 192 et 193 patients¹⁰ seront atteints d'hémophilie A sévère au Québec au cours des trois prochaines années, respectivement.
- L'analyse serait effectuée pour assurer le suivi des concentrations du facteur VIII à raison d'une à deux fois par année et plus fréquemment lors d'accidents ou de chirurgies majeures.
- L'analyse proposée a fait l'objet de 8 envois hors Québec au cours de l'année 2015-2016 pour un coût moyen de 125 \$ par analyse. Le rapatriement de l'ensemble de ces tests est prévu dès la première année suivant l'ajout de l'analyse au *Répertoire*.
- La valeur pondérée proposée par le demandeur est de 23,14.
- Les coûts liés à une modification de la prise en charge des patients, notamment en ajustement posologique, à la suite de cette analyse n'ont pas été considérés par manque de données scientifiques.

Scénario 1 : ajout de la méthode chromogène au Répertoire selon le profil d'usage actuel des facteurs VIII

- Selon les données du MSSS, le traitement des patients atteints d'hémophilie A sévère au Québec est presque exclusivement réalisé à l'aide d'agents à courte action, dont le dosage est effectué par analyse chronométrique en un temps. L'usage des produits à longue action est actuellement marginal (< 1 %).
- Dans ce contexte, il est anticipé que 8 analyses, correspondant à celles envoyées hors Québec, seraient réalisées annuellement au cours des trois prochaines années.

Scénario 2 : ajout de la méthode chromogène au Répertoire en fonction d'une augmentation du marché des facteurs VIII à longue action (5 %, 10 % et 15 % du marché des FVIII)

- Advenant une utilisation plus importante de facteurs VIII à action prolongée, il est anticipé que ceux-ci pourraient représenter 5 %, 10 % et 15 % des parts de marchés de l'ensemble des facteurs VIII au cours des trois prochaines années, respectivement.
- Ainsi, il est anticipé que 40, 76 et 116 analyses seraient réalisées au cours des trois prochaines années, respectivement.

Scénario 3 : ajout de la méthode chromogène au Répertoire en fonction d'une augmentation importante du marché des facteurs VIII à longue action (50 %, 70 % et 90 % du marché des FVIII)

- Advenant une utilisation presque exclusive des facteurs VIII à longue action au terme de l'horizon temporel projeté, il est anticipé que ceux-ci pourraient

¹⁰ Cela tient compte d'une augmentation du nombre de patients équivalente au taux de croissance de la population québécoise en 2015, soit de 0,61 %. Ceci étant basé sur la plus récente mise à jour de l'Institut de la statistique du Québec.

représenter 50 %, 70 % et 90 % des parts de marchés de l'ensemble des facteurs VIII au cours des trois prochaines années, respectivement.

- Ainsi, il est anticipé que 380, 536 et 696 analyses seraient réalisées au cours des trois prochaines années, respectivement.

Tableau 13 Coûts liés à l'introduction au *Répertoire* de l'analyse permettant de déterminer la concentration du facteur VIII par méthode chromogène

SCÉNARIOS	AN 1	AN 2	AN 3	TOTAL
Scénario de base : sans l'ajout de l'analyse par méthode chromogène au <i>Répertoire</i>				
Analyses hors Québec	8	8	8	24
Coûts	1 000 \$	1 000 \$	1 000 \$	3 000 \$
Scénario 1: ajout de la méthode chromogène au <i>Répertoire</i> selon le profil d'usage actuel des facteurs VIII				
Analyses par méthode chromogène	8	8	8	24
Coûts	185 \$	185 \$	185 \$	555 \$
Impact net	-815 \$	-815 \$	-815 \$	-2 445 \$
Scénario 2: ajout de la méthode chromogène au <i>Répertoire</i> en fonction d'une augmentation du marché des facteurs VIII à longue action (5 %, 10 % et 15 % du marché des FVIII)				
Analyses	40	76	116	232
Coûts hors Québec	5 000 \$	9 500 \$	14 500 \$	29 000 \$
Coûts par méthode chromogène	926 \$	1 759 \$	2 684 \$	5 369 \$
Impact net	-4 074 \$	-7 741 \$	-11 816 \$	-23 631 \$
Scénario 3: ajout de la méthode chromogène au <i>Répertoire</i> en fonction d'une augmentation du marché des facteurs VIII à longue action (50 %, 70 % et 90 % du marché des FVIII)				
Analyses	380	536	696	1 612
Coûts hors Québec	47 500 \$	67 000 \$	87 000 \$	201 500 \$
Coûts par méthode chromogène	8 793 \$	12 403 \$	16 105 \$	37 301 \$
Impact net	-38 707 \$	-54 597 \$	-70 895 \$	-164 199 \$

Ainsi, en considérant l'usage actuel des facteurs VIII, l'ajout de l'analyse permettant de déterminer la concentration du facteur VIII par méthode chromogène pourrait générer une réduction de coûts d'environ 2 400 \$ pour le total des trois premières années. Toutefois, en considérant un usage futur plus important des facteurs VIII à action prolongée, une réduction de coûts plus importante, soit d'environ 164 000 \$, serait réalisée pour le total des trois premières années. Par ailleurs, advenant que la méthode chromogène puisse permettre un dosage plus adéquat, le nombre d'unités de concentré de facteur utilisé pourrait être optimisé et cela pourrait influencer les coûts de traitement.

7 ENJEUX ORGANISATIONNELS, ÉTHIQUES, SOCIAUX ET JURIDIQUES

Présentement, les trousses commerciales standardisées et homologuées à des fins de diagnostic disponibles pour la détermination de la concentration plasmatique du facteur VIII sont dispendieuses et nécessitent un appareillage particulier ainsi que du personnel de laboratoire qualifié pour effectuer ce type d'analyses [Kitchen *et al.*, 2016a]. Les enjeux organisationnels dépendent donc du déploiement des nouveaux produits de remplacement structurellement modifiés à venir.

8 POSITIONS OU ORIENTATIONS D'ORGANISATIONS D'INTÉRÊT CONCERNANT L'ANALYSE ÉVALUÉE

L'EMA (European Medicines Agency) a émis un guide de pratique concernant le dosage des concentrés de facteur VIII [Committee for medicinal products for human use (CHMP), 2016b]. L'EMA préconise l'utilisation de la méthode chromogène pour déterminer la concentration du facteur VIII dans un contexte de suivi de patients traités avec des produits de remplacement afin d'échapper à la fois à la variabilité observée avec la méthode chronométrique en un temps qui est induite par la grande quantité de standards et de réactifs différents utilisés [Committee for medicinal products for human use (CHMP), 2016a; Human Medicines Development and Evaluation, 2014; Hubbard *et al.*, 2013] mais aussi à la vulnérabilité de ce test aux anticoagulants lupiques et à l'héparine [Poret et Mourey, 2014; Peetz, 2007].

Le MASAC (Medical and Scientific Advisory Council) du NHF (National Hemophilia Foundation) recommande que les laboratoires qui effectuent de routine des analyses pour déterminer la concentration plasmatique de facteurs de coagulation à partir de plasmas de patients atteints d'hémophilie A et B considèrent l'application de la méthode chromogène lorsqu'elle est disponible et approuvée par les autorités locales [Kitchen *et al.*, 2016a; Medical and scientific advisory council, 2014].

La Pharmacopée Européenne suggère l'utilisation de la méthode chromogène pour la détermination de la concentration plasmatique du facteur VIII étant donné le nombre croissant de produits de remplacement structurellement modifiés maintenant disponibles pour le traitement des patients atteints d'hémophilie A [Dodt *et al.*, 2015; Kitchen *et al.*, 2014; Concil of Europe, 2005].

9 RECOMMANDATION DE L'INESSS

Détermination de la concentration du facteur VIII par méthode chromogène

La recommandation de l'INESSS

- ☒ Introduction de l'analyse dans le *Répertoire*
- ☐ Refus d'introduction de l'analyse dans le *Répertoire*

ANNEXE A : Pharmacocinétique d'Advate^{MC} et d'Eloctate^{MC} suivant l'administration d'une dose de 25 UI/kg à des patients atteints d'hémophilie A âgés de 12 ans et plus

PARAMÈTRES PHARMACOCINÉTIQUES*	ADVATE ^{MC} (n = 6)		ELOCTATE ^{MC} (n = 6) (domaine B, protéine de fusion)	
	MÉTHODE CHRONO EN UN TEMPS	MÉTHODE CHROMOGÈNE	MÉTHODE CHRONO EN UN TEMPS	MÉTHODE CHROMOGÈNE
C _{max} (UI/dl)	63,6 (59,1-68,3)	75,5 (65,5-87,1)	60,5 (53,1-69,0)	76,5 (64,9-90,1)
ASC _{inf} (h x UI/dl)	994 (723-1370)	1060 (822-1360)	1480 (1160-1880)	1660 (1300-2120)
Demi-vie (h)	12,2 (9,1-16,3)	10,5 (8,5-12,9)	18,8 (14,8-23,8)	16,7 (13,8-20,1)
TRM (h)	17,5 (13,1-23,4)	15,0 (12,2-18,6)	27,0 (21,3-34,2)	23,9 (19,8-28,9)
CL (ml/h/kg)	2,49 (1,80-3,45)	2,35 (1,80-3,06)	1,68 (1,31-2,15)	1,49 (1,16-1,92)
V _{eq} (ml/kg)	43,9 (39,3-49,0)	35,5 (30,5-41,3)	45,4 (39,3-52,5)	35,9 (30,4-42,3)
RP (UI/dl par UI/kg)	2,56 (2,36-2,78)	3,05 (2,62-3,54)	2,44 (2,12-2,81)	3,09 (2,61-3,66)

Source : [Powell *et al.*, 2012].

Abréviations : n : nombre d'échantillons; C_{max} : concentration maximale; UI : unité internationale; dl : décilitre; ASC_{inf} : aire sous la courbe en fonction du temps zéro extrapolé à l'infini; h : heure; TRM : temps de résidence moyen; CL : clairance pondérée en fonction du poids corporel; ml : millilitre; kg : kilogramme; V_{eq} : volume de distribution à l'état d'équilibre; RP : récupération progressive.

* Les paramètres pharmacocinétiques sont exprimés en moyenne géométrique (intervalle de confiance à 95 %).

Pharmacocinétique d'Advate^{MC} et d'Eloctate^{MC} suivant l'administration d'une dose de 65 UI/kg à des patients atteints d'hémophilie A âgés de 12 ans et plus

PARAMÈTRES PHARMACOCINÉTIQUES*	ADVATE ^{MC} (n = 9)†		ELOCTATE ^{MC} (n = 9)† (domaine B, protéine de fusion)	
	MÉTHODE CHRONO EN UN TEMPS	MÉTHODE CHROMOGÈNE	MÉTHODE CHRONO EN UN TEMPS	MÉTHODE CHROMOGÈNE
C _{max} (UI/dl)	133 (105-168)	175 (143-215)	119 (103-136)	182 (146-227)
ASC _{inf} (h x UI/dl)	1800 (1350-2400)	227 (1670-3070)	2800 (1980-3970)	4280 (2960-6190)
Demi-vie (h)	11,0 (8,8-13,9)	10,8 (8,2-14,2)	18,8 (14,3-24,5)	19,8 (14,3-27,5)
TRM (h)	15,8 (12,6-19,9)	15,4 (11,7-20,4)	27,0 (20,6-35,3)	28,5 (20,5-39,6)
CL (ml/h/kg)	3,61 (2,71-4,83)	2,87 (2,12-3,89)	2,32 (1,64-3,29)	1,52 (1,05-2,20)
V _{eq} (ml/kg)	57,4 (487,3-68,3)	44,5 (36,7-54,1)	32,8 (55,2-71,5)	43,4 (38,2-49,4)
RP (UI/dl par UI/kg)	2,04 (1,61-2,59)	2,70 (2,20-3,31)	1,83 (1,59-2,10)	2,80 (2,24-3,50)

Source : Powell *et al.*, 2012.

Abréviations : n : nombre d'échantillons; C_{max} : concentration maximale; UI : unité internationale; dl : décilitre; ASC_{inf} : aire sous la courbe en fonction du temps zéro extrapolé à l'infini; h : heure; TRM : temps de résidence moyen; CL : clairance pondérée en fonction du poids corporel; ml : millilitre; kg : kilogramme; V_{eq} : volume de distribution à l'état d'équilibre; RP : récupération progressive.

* Les paramètres pharmacocinétiques sont exprimés en moyenne géométrique (intervalle de confiance à 95 %).

† Des dix patients initialement inclus, un patient a été exclu parce qu'il n'a pas respecté les consignes pendant la période d'élimination.

ANNEXE B : Pharmacocinétique de Nuwiq^{MC} suivant l'administration d'une dose de 50 UI/kg à des patients atteints d'hémophilie A âgés de 2 ans à 12 ans

PARAMÈTRES PHARMACOCINÉTIQUES*†	NUWIQ ^{MC} (domaine B)			
	2-5 ANS (n = 13)		6-12 ANS (n = 13)	
	MÉTHODE EN UN TEMPS	MÉTHODE CHROMOGÈNE	MÉTHODE EN UN TEMPS	MÉTHODE CHROMOGÈNE
Demi-vie (h)	11,91 (5,36)	9,49 (3,32)	13,08 (2,59)	9,99 (1,88)
ASC _{norm} (h x UI/dl par UI/kg)	22 (10)	22 (10)	26 (6)	25 (6)
C _{max norm} (UI/dl par UI/kg)	2,0 (0,2)	2,0 (0,3)	2,0 (0,4)	2,0 (0,4)
RI (% par UI/kg)	1,57 (0,17)	1,87 (0,27)	1,64 (0,38)	1,88 (0,44)
TRM (h)	15,11 (7,35)	11,92 (4,93)	16,53 (2,87)	12,74 (2,34)
CL (ml/h/kg)	5,41 (2,32)	5,40 (2,37)	4,05 (0,92)	4,33 (1,21)
V _{eq} (ml/kg)	68,29 (10,42)	55,32 (7,07)	66,07 (15,99)	54,45 (14,80)

Source : Klukowska *et al.*, 2015.

Abréviations : n : nombre d'échantillons; h : heure; ASC_{norm} : aire sous la courbe en fonction du temps normalisée à la dose administrée; UI : unité internationale; dl : décilitre; kg : kilogramme; C_{max norm} : concentration maximale normalisée à la dose administrée; RI : récupération *in vivo*; TRM : temps de résidence moyen; CL : clairance pondérée en fonction du poids corporel; ml : millilitre; V_{eq} : volume de distribution à l'état d'équilibre.

* Les paramètres pharmacocinétiques sont exprimés en moyenne (écart-type).

† Suivant l'injection de 0,5, 2, 5, 10, 24 et 48 heures.

ANNEXE C : Tableau de comparaison des méthodes de dosage chromogène et chronométrique en un temps des différents concentrés de facteur VIII offerts au Québec

AUTEUR	ÉTUDE ET OBJECTIF	ÉCHANTILLONS	CONCENTRÉ (STRUCTURE)	TEST CHROMOGÈNE	TEST CHRONO EN UN TEMPS	VARIABILITÉ INTRA-LABORATOIRE (% CV)		VARIABILITÉ INTER-LABORATOIRE (% CV)		CONCLUSION
						Chromogène	Chrono en un temps	Chromogène	Chrono en un temps	
Facteur VIII recombinant, dépourvu du domaine B (BDD rFVIII)										
Pouplard <i>et al.</i> , 2011	Étude multicentrique (6 sites) portant sur l'évaluation de l'efficacité du standard RAFLS pour diminuer les discordances entre les deux méthodes	Plasma déficitaire en facteur VIII enrichi de 4 concentrations connues de Xyntha ^{MC}	Xyntha ^{MC} (BDD rFVIII)	Standard RAFLS Trousse Biophen FVIII:C ^{MC} Chaque laboratoire utilise son propre plasma déficitaire en facteur VIII et ses instruments de détection	Standard RAFLS Chaque laboratoire utilise son propre plasma déficient en facteur VIII, ses réactifs d'APTT et ses instruments de détection	0,5-4 % pour les deux méthodes à toutes les concentrations		2-10 % pour les deux méthodes à toutes les concentrations		L'utilisation du standard RAFLS lors du dosage chronométrique en un temps contribue à réduire les discordances avec la méthode chromogène et de doser le Xyntha ^{MC} de manière précise et adéquate.
Cauchie <i>et al.</i> , 2013	Étude monocentrique avec objectif secondaire d'évaluer la relation entre le dosage et les standards utilisés	Plasmas de patients traités avec Xyntha ^{MC} (utilisés dans une autre étude)	Xyntha ^{MC} (BDD rFVIII) Advate ^{MC} (rFVIII) Helixate ^{MC} / Kogenate ^{MC} (rFVIII)	Standard RAFLS et mélange de plasmas Trousse Biophen FVIII:C ^{MC} Instrument : ACL-TOP analyser	Standard RAFLS et mélange de plasmas Réactifs APTT : HemosIL SynthASil aPTT Instrument : ACL-TOP analyser	0,5-26 % entre les deux méthodes lorsque le standard RAFLS est utilisé 7-58 % entre les deux méthodes lorsqu'un mélange de plasmas est utilisé comme standard		s.o.		La méthode chronométrique en un temps sous-estime le dosage d'Advate ^{MC} et de Helixate ^{MC} /Kogenate ^{MC} de 6-49 % peu importe le standard utilisé. L'utilisation du standard RAFLS contribue à réduire les discordances entre les deux méthodes.
Pouplard <i>et al.</i> , 2016	Étude multicentrique (6 sites en France) pour évaluer la performance du standard RAFLS lors du dosage par les deux méthodes dans la pratique clinique courante	Plasmas provenant de patients atteints d'hémophilie A modérée/sévère traités avec Xyntha ^{MC} (n = 21), Advate ^{MC} (n = 26), Helixate ^{MC} / Kogenate ^{MC} (n = 16), Factane ^{MC} (n = 15)	Xyntha ^{MC} (BDD rFVIII) Advate ^{MC} (rFVIII) Helixate ^{MC} / Kogenate ^{MC} (rFVIII) Factane ^{MC} (dérivé du plasma)	Mêmes lots de plasma standard et standard RAFLS Trousse Biophen FVIII:C ^{MC} Différents instruments de détection	Mêmes lots de plasma standard et standard RAFLS Réactifs APTT : CK Prest ^{MC} , APTT SP ^{MC} , SynthASil aPTT, Triniclot APTT HS ^{MC} Différents instruments de détection	s.o.		s.o.		Le test chronométrique en un temps avec le standard RAFLS offre une alternative au test chromogène pour le dosage du Xyntha ^{MC} car il réduit les différences entre les deux méthodes.

AUTEUR	ÉTUDE ET OBJECTIF	ÉCHANTILLONS	CONCENTRÉ (STRUCTURE)	TEST CHROMOGÈNE	TEST CHRONO EN UN TEMPS	VARIABILITÉ INTRA-LABORATOIRE (% CV)		VARIABILITÉ INTER-LABORATOIRE (% CV)		CONCLUSION
						Chromogène	Chrono en un temps	Chromogène	Chrono en un temps	
Kitchen <i>et al.</i> , 2016b	Étude multicentrique (52 sites, Royaume-Uni) pour évaluer l'impact du standard RAFLS sur le dosage du facteur VIII avec les deux méthodes dans une grande cohorte	3 échantillons de plasmas de patients atteints d'hémophilie A traités avec Xyntha ^{MC} , Helixate ^{MC} /Kogenate ^{MC} ou Advate ^{MC} provenant des sites où sont effectués les tests	Xyntha ^{MC} (BDD rFVIII) Helixate ^{MC} / Kogenate ^{MC} (rFVIII) Advate ^{MC} (rFVIII)	Standard RAFLS et plasma standard Trousses différentes à travers les 10 laboratoires : Biophen FVIII ^{MC} , Coamatic Factor VIII ^{MC} , Coatest ^{MC} , Electrachrome ^{MC} , Technochrom ^{MC} , FVIII Chromogenic	Standard RAFLS et plasma standard Réactifs APTT : SynthASIL aPTT, Actin FS APTT	s.o.	s.o.	15-26 %	12-19%	La méthode chromogène donne des résultats plus élevés pour Helixate ^{MC} /Kogenate ^{MC} . Advate ^{MC} et Xyntha ^{MC} donnent des résultats similaires avec les deux méthodes et la variabilité serait due aux différents réactifs utilisés (activateurs des réactifs APTT : acide ellagique ou silice).
Facteur VIII recombinant, dépourvu du domaine B, lié au domaine FC d'une immunoglobuline (BDD rFVIII-Fc)										
Powell <i>et al.</i> , 2012	Étude multicentrique clinique de phase I/II portant sur la sécurité d'administration et la pharmacocinétique	Patients atteints d'hémophilie A sévère traités avec Elocate ^{MC} ou Advate ^{MC}	Elocate ^{MC} (BDD rFVIII-Fc)	5 ^e standard de l'OMS Trousse Biophen FVIII ^{MC}	5 ^e standard de l'OMS Réactifs APTT Dade Actin FSL	s.o.		s.o.		Les résultats des deux méthodes sont étroitement corrélés, cependant, les valeurs obtenues avec le dosage chromogène sont légèrement plus élevées mais non significativement différentes (21 % pour Advate ^{MC} et 32 % pour Elocate ^{MC}).
Sommer <i>et al.</i> , 2014	Étude multicentrique (30 sites, 7 pays) globale évaluant la performance des deux méthodes de dosage utilisées de routine par les laboratoires	Plasmas de patients atteints d'hémophilie A enrichis avec 3 concentrations d'Elocate ^{MC} ou Advate ^{MC}	Elocate ^{MC} (BDD rFVIII-Fc)	Standards différents selon les laboratoires Diverses trousses dont Biophen FVIII ^{MC} , FVIII Chromogenic, Technochrom ^{MC} , Coatest ^{MC} , Coamatic Factor VIII ^{MC}	Standards différents selon les laboratoires Différents réactifs APTT utilisés	3 % à la concentration la plus élevée et jusqu'à 7-8 % pour les concentrations basses/moyennes	6-8 % aux concentrations moyennes/élevées et jusqu'à 10 % à la plus basse concentration	19-23 % aux concentrations moyennes/élevées et jusqu'à 31 % à la plus basse concentration	16-17 % aux concentrations moyennes/élevées et jusqu'à 31 % à la plus basse concentration	Le dosage d'Elocate ^{MC} chronométrique en un temps est comparable à Advate ^{MC} alors que des résultats plus élevés ont été observés avec la méthode chromogène. Somme toute, le concentré Elocate ^{MC} peut être adéquatement dosé par les deux méthodes.

AUTEUR	ÉTUDE ET OBJECTIF	ÉCHANTILLONS	CONCENTRÉ (STRUCTURE)	TEST CHROMOGÈNE	TEST CHRONO EN UN TEMPS	VARIABILITÉ INTRA-LABORATOIRE (% CV)		VARIABILITÉ INTER-LABORATOIRE (% CV)		CONCLUSION
						Chromogène	Chrono en un temps	Chromogène	Chrono en un temps	
Facteur VIII recombinant, pleine longueur, pegylé (rFVIII-PEG)										
Turecek <i>et al.</i> , 2016	Étude collaborative internationale (35 sites, 25 pays) pour comparer les deux méthodes dans la pratique clinique courante	Mélange de plasmas commercialement disponibles issus de patients atteints d'hémophilie A enrichis avec 3 concentrations d'Adynovate ^{MC} , Advate ^{MC} ou Obizur ^{MC}	Adynovate ^{MC} (rFVIII peg) Advate ^{MC} (rFVIII) Obizur ^{MC} (BDD rFVIII)	Standards différents selon les laboratoires Diverses troussees dont FVIII Chromogenic, Berichrom FVIII, Coamatic Factor VIII ^{MC} , Electrachrome ^{MC}	Standards différents selon les laboratoires Différents réactifs APTT utilisés	5-30 % pour toutes les concentrations Tendance à une plus grande variabilité avec les deux méthodes aux concentrations les plus faibles pour tous les concentrés, en particulier Obizur ^{MC}	7-15 % pour toutes les concentrations	9-47 % pour toutes les concentrations Tendance à une plus grande variabilité avec les deux méthodes aux concentrations les plus faibles pour tous les concentrés, en particulier Obizur ^{MC}	11-22 % pour toutes les concentrations	Adynovate ^{MC} et Advate ^{MC} peuvent être dosés avec les deux méthodes sans égard aux réactifs, instruments ou standards. Le dosage chromogène sous-estime la concentration d'Obizur ^{MC} . Les concentrés sans modification du domaine B peuvent être dosés adéquatement par les deux méthodes.

Abréviations : CV : coefficient de variation; BDD rFVIII : facteur VIII recombinant dépourvu du domaine B; RAFLS : *ReFacto AF Laboratory Standard*^{MC}; APTT : *Activated Partial Thromboplastin Time*; s.o. : sans objet; n : nombre d'échantillons; rFVIII : facteur VIII recombinant; BDD rFVIII-Fc : facteur VIII recombinant dépourvu du domaine B et lié au domaine FC d'une immunoglobuline; OMS : Organisation mondiale de la Santé; rFVIII-PEG : facteur VIII recombinant pleine longueur pegylé.

ANNEXE D : Description du contenu des troussees chromogènes de l'étude de Pickering et collègues [2016]

Kit name*	Coamatic® Factor VIII	Coatest® SP FVIII	Biophen FVIII:C	Technochrom® FVIII:C	DG-chrom FVIII	Factor VIII chromogenic
Vendor	Chromogenix	Chromogenix	Hyphen BioMed	Technoclone	Grifols	Siemens
Intended use	Plasma samples and concentrates	Plasma samples and concentrates	Plasma samples and concentrates	Plasma samples	Plasma samples	Plasma samples
Protein origin:						
1.FX	Bovine	Bovine	Human	Not specified	Not specified	Bovine
2.FIX	Bovine	Bovine	Human	Not specified	Not specified	Bovine
3.Thrombin	Bovine	Not specified	Human	Not specified	Not specified	Bovine
Dilution buffer	25 mM Tris, 1%BSA, pH 7.9	50 mM Tris, 10mg/l Ciprofloxacin, 1%BSA, pH 7.3	Tris-BSA (1%)	3.4g/l Imidazole, 5.85g/l NaCl, 0.2% BSA, pH7.4	3.4g/l Imidazole, 5.85g/l NaCl, 0.2% BSA	0.9% NaCl
FVIII activation	Thrombin 1 NIH-U	Prothrombin (not specified in the package insert)	Thrombin	Thrombin	Thrombin	Thrombin (0.6 nmol)
Phospholipids	Not specified	Highly purified with 10mg/l Ciprofloxacin	Synthetic	Not specified	Not specified	Not specified
Plasma sample dilution (microtiter plate)	81-fold	121-fold (20-150%) 81-fold (1-20%)	40-fold (20-200%) 10-fold (0-25%)	41-fold 10-fold (0-20%)	41-fold 10-fold (0-20%)	01:31
Incubation time:						
1.Sample	3-4 min;	4-5 min	N/A	N/A	N/A	N/A
2.Factor reagent and CaCl ₂	2 min	5 min (<20%, 10 min)	5 min	5 min	5 min	1.5 min
3.Substrate	2 min	5 min (<20%, 10 min)	5 min	3 min	3 min	1 min
FXa substrate and thrombin inhibitor	S-2765: N-a-Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA I-2581 (synthetic)	S-2765: N-a-Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA I-2581 (synthetic)	SXa-11 (pNA) Thombin inhibitor	FXa-1 (pNA) α-NAPAP	FXa-1 (pNA) α-NAPAP	CH ₃ OCO-D-CHG-Gly-Arg-pNA.AcOH; α-NAPAP

* Des six troussees prévues à l'étude dont le contenu est décrit dans ce tableau, quatre seulement ont été utilisées pour fins d'analyse, les deux autres (Technochrom^{MC}, DG-chrom^{MC}) étant soit non disponible au moment de l'étude, soit non compatible avec l'appareil de détection en place.

ANNEXE E : Données de répétabilité de la trousse Coamatic Factor VIII^{MC} (lot #N0177165)

VALIDATION INTRA-ESSAI	CONTRÔLE Plasma humain normal Siemens lot #507731 (n = 10)	CONTRÔLE Plasma humain pathologique Siemens lot #509998A (n = 10)
Échantillons	88	30
	88	30
	92	34
	86	25
	86	29
	100	32
	86	28
	79	28
	88	29
	100	26
Valeur attendue (UI/dl)	88	30
Variation acceptée (UI/dl)	70-106	22-38
Moyenne	89,3	29,1
Écart-type	6,5	2,6
% CV	7,3	9,1

Abréviations : n : nombre d'échantillon; UI : unité internationale; dl : décilitre; CV : coefficient de variation.

DONNÉES DE REPRODUCTIBILITÉ DE LA TROUSSE COAMATIC FACTOR VIII^{MC} (LOT #N0965025)

VALIDATION INTER-ESSAI	STANDARD Plasma humain Siemens lot #503253 (n = 10)	CONTRÔLE Plasma humain normal Siemens lot #507731 (n = 9)	CONTRÔLE Plasma humain pathologique Siemens lot #509996B (n = 6)	CONTRÔLE Plasma humain pathologique Siemens lot #509998A (n = 3)
Échantillons	105	78	22	29
	104	82	20	28
	094	76	24	28
	100	77	21	
	98	83	21	
	99	91	25	
	100	82		
	95	89		
	101	86		
99				
Valeur attendue (U/dl)	100	88	26	30
Variation acceptée (U/dl)		70-106	19-33	22-38
Moyenne	99,5	82,7	22,2	28,3
Écart-type	3,4	5,2	1,9	0,6
% CV	3,5	6,3	8,8	2,0

Abréviations : n : nombre d'échantillon; UI : unité internationale; dl : décilitre; CV : coefficient de variation.

RÉFÉRENCES

- Armstrong E, Astermark J, Baghaei F, Berntorp E, Brodin E, Clausen N, et al. Nordic hemophilia guidelines. Nordic Hemophilia Council; 2015.
- Barrowcliffe TW. Laboratory testing and standardisation. *Haemophilia* 2013;19(6):799-804.
- Biggs R et Douglas AS. The thromboplastin generation test. *J Clin Pathol* 1953;6(1):23-9.
- Blanco AN, Peirano AA, Grosso SH, Gennari LC, Perez Bianco R, Lazzari MA. A chromogenic substrate method for detecting and titrating anti-factor VIII antibodies in the presence of lupus anticoagulant. *Haematologica* 2002;87(3):271-8.
- Bowyer AE, Van Veen JJ, Goodeve AC, Kitchen S, Makris M. Specific and global coagulation assays in the diagnosis of discrepant mild hemophilia A. *Haematologica* 2013;98(12):1980-7.
- Cauchie M, Toelen J, Peerlinck K, Jacquemin M. Practical and cost-effective measurement of B-domain deleted and full-length recombinant FVIII in the routine haemostasis laboratory. *Haemophilia* 2013;19(3):e133-8.
- Chandler WL, Ferrell C, Lee J, Tun T, Kha H. Comparison of three methods for measuring factor VIII levels in plasma. *Am J Clin Pathol* 2003;120(1):34-9.
- Chromogenix. Coamatic^{MC} Factor VIII - 82 2585 63. Français - Révision de la notice 03/2013. Milan, Italie : Instrumentation Laboratory SpA; 2013. Disponible à : http://diapharma.com/wp-content/uploads/2015/07/K822585_302143R4_chromogenix_coamatic_fviii_insert.pdf (consulté le 14 juin 2017).
- Committee for medicinal products for human use (CHMP). Guideline on core SmPC for human plasma-derived and recombinant coagulation factor VIII products. EMA/CHMP/BPWP/1619/1999 rev.2. Londres, Angleterre : European Medicines Agency (EMA); 2016a. Disponible à : http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2016/02/WC500201771.pdf (consulté le 3 mai 2017).
- Committee for medicinal products for human use (CHMP). Guideline on the clinical investigation of recombinant and human plasma-derived factor VIII products. EMA/CHMP/BPWP/144533/2009 rev.1. Londres, Angleterre : European Medicines Agency (EMA); 2016b. Disponible à : http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2016/02/WC500201773.pdf (consulté le 3 mai 2017).
- Council of Europe. 2.7.4. Assay of human coagulation factor VIII. Dans : *European Pharmacopoeia*. 5^e éd. Strasbourg, France : European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM), Council of Europe; 2005 : 194-5. Disponible à : http://library.njucm.edu.cn/yaodian/ep/EP5.0/02_methods_of_analysis/2.7.__biological_assays/2.7.4.%20Assay%20of%20human%20coagulation%20factor%20VIII.pdf (consulté le 3 mai 2017).

- Dodt J, Hubbard AR, Wicks SJ, Gray E, Neugebauer B, Charton E, Silvester G. Potency determination of factor VIII and factor IX for new product labelling and postinfusion testing: Challenges for caregivers and regulators. *Haemophilia* 2015;21(4):543-9.
- Duan X, Tang M, Zhang J, Yu H, Xu R. Promising coagulation factor VIII bypassing strategies for patients with haemophilia A. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2014;25(6):539-52.
- Favaloro EJ, Verbruggen B, Miller CH. Laboratory testing for factor inhibitors. *Haemophilia* 2014;20(Suppl 4):94-8.
- Gu JM, Ramsey P, Evans V, Tang L, Apeler H, Leong L, et al. Evaluation of the activated partial thromboplastin time assay for clinical monitoring of PEGylated recombinant factor VIII (BAY 94-9027) for haemophilia A. *Haemophilia* 2014;20(4):593-600.
- Hubbard AR, Dodt J, Lee T, Mertens K, Seitz R, Srivastava A, Weinstein M. Recommendations on the potency labelling of factor VIII and factor IX concentrates. *J Thromb Haemost* 2013;11(5):988-9.
- Human Medicines Development and Evaluation. Workshop report: Characterisation of new clotting factor concentrates (FVIII, FIX) with respect to potency assays used for labelling and testing of post infusion samples. EMA/135928/2014. Londres, Angleterre : European Medicines Agency (EMA); 2014. Disponible à : http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2014/07/WC500169760.pdf (consulté le 3 mai 2017).
- Jennings I, Kitchen DP, Woods TA, Kitchen S, Walker ID, Preston FE. Laboratory performance in the World Federation of Hemophilia EQA programme, 2003-2008. *Haemophilia* 2009;15(2):571-7.
- Kitchen S, Tiefenbacher S, Gosselin R. Factor activity assays for monitoring extended half-life FVIII and Factor IX replacement therapies. *Semin Thromb Hemost* 2017;43(3):331-7.
- Kitchen S, Blakemore J, Friedman KD, Hart DP, Ko RH, Perry D, et al. A computer-based model to assess costs associated with the use of factor VIII and factor IX one-stage and chromogenic activity assays. *J Thromb Haemost* 2016a;14(4):757-64.
- Kitchen S, Jennings I, Makris M, Kitchen DP, Woods TAL, Walker ID. Factor VIII assay variability in postinfusion samples containing full length and B-domain deleted FVIII. *Haemophilia* 2016b;22(5):806-12.
- Kitchen S, Signer-Romero K, Key NS. Current laboratory practices in the diagnosis and management of haemophilia: A global assessment. *Haemophilia* 2015;21(4):550-7.
- Kitchen S, Gray E, Mertens K. Monitoring of modified factor VIII and IX products. *Haemophilia* 2014;20(Suppl 4):36-42.
- Kitchen S, McCraw A, Echenagucia M. Le diagnostic de l'hémophilie et des autres troubles de coagulation – Manuel de laboratoire. Deuxième édition. Montréal, Qc : Fédération mondiale de l'hémophilie (FMH); 2010. Disponible à : <http://www1.wfh.org/publication/files/pdf-1285.pdf> (consulté le 3 mai 2017).
- Klukowska A, Szczepanski T, Vdovin V, Knaub S, Jansen M, Liesner R. Novel, human cell line-derived recombinant factor VIII (Human-cl rhFVIII, Nuwiq®) in children with

- severe haemophilia A: Efficacy, safety and pharmacokinetics. *Haemophilia* 2016a;22(2):232-9.
- Mackie I, Cooper P, Lawrie A, Kitchen S, Gray E, Laffan M. Guidelines on the laboratory aspects of assays used in haemostasis and thrombosis. *Int J Lab Hematol* 2013;35(1):1-13.
- Mikaelsson M et Oswaldsson U. Assaying the circulating factor VIII activity in hemophilia A patients treated with recombinant factor VIII products. *Semin Thromb Hemost* 2002;28(3):257-64.
- National Hemophilia Foundation (NHF). MASAC statement regarding use of various clotting factor assays to monitor factor replacement therapy. MASAC Document #228. New York, NY : NHF; 2014. Disponible à : <https://www.hemophilia.org/sites/default/files/document/files/masac-228.pdf> (consulté le 3 mai 2017).
- Oldenburg J et Albert T. Novel products for haemostasis – current status. *Haemophilia* 2014;20(Suppl 4):23-8.
- Peetz D. Factor VIII methods: Which assay principle for which indication? Dans : Scharrer I et Schramm W, réd. 36th Hemophilia Symposium Hamburg 2005. Berlin, Allemagne : Springer; 2007 : 71-4.
- Pickering W, Hansen M, Kjalke M, Ezban M. Factor VIII chromogenic assays can be used for potency labeling and postadministration monitoring of N8-GP. *J Thromb Haemost* 2016;14(8):1579-87.
- Pipe SW, Montgomery RR, Pratt KP, Lenting PJ, Lillicrap D. Life in the shadow of a dominant partner: The FVIII-VWF association and its clinical implications for hemophilia A. *Blood* 2016;128(16):2007-16.
- Poret E et Mourey G. Mise en place de la mesure de l'activité du facteur VIII par méthode chromogénique au laboratoire d'hémostase de l'Etablissement Français du Sang de Besançon. Comparaison avec la méthode chromométrique en un temps. *Spectra Biologie* 2014;(208):63-71.
- Pouplard C, Ternisien C, Desconclois C, Lasne D, Aillaud MF, Caron C. Discrepancies between one stage assay and chromogenic substrate assay in patients treated with recombinant or plasma-derived FVIII and usefulness of a specific standard in ReFacto AF® -treated patients. *Haemophilia* 2016;22(2):e101-3.
- Pouplard C, Caron C, Aillaud MF, Ternisien C, Desconclois C, Dubanchet A, Sobas F. The use of the new ReFacto AF Laboratory Standard allows reliable measurement of FVIII:C levels in ReFacto AF mock plasma samples by a one-stage clotting assay. *Haemophilia* 2011;17(5):e958-62.
- Powell JS, Josephson NC, Quon D, Ragni MV, Cheng G, Li E, et al. Safety and prolonged activity of recombinant factor VIII Fc fusion protein in hemophilia A patients. *Blood* 2012;119(13):3031-7.
- Rodgers SE, Duncan EM, Sobieraj-Teague M, Lloyd JV. Evaluation of three automated chromogenic FVIII kits for the diagnosis of mild discrepant haemophilia A. *Int J Lab Hematol* 2009;31(2):180-8.

- Ruinemans-Koerts J, Peterse-Stienissen I, Verbruggen B. Non-parallelism in the one-stage coagulation factor assay is a phenomenon of lupus anticoagulants and not of individual factor inhibitors. *Thromb Haemost* 2010;104(5):1080-2.
- Sommer JM, Buyue Y, Bardan S, Peters RT, Jiang H, Kamphaus GD, et al. Comparative field study: Impact of laboratory assay variability on the assessment of recombinant factor IX Fc fusion protein (rFIXFc) activity. *Thromb Haemost* 2014;112(5):932-40.
- Srivastava A, Brewer AK, Mauser-Bunschoten EP, Key NS, Kitchen S, Llinas A, et al. Guidelines for the management of hemophilia. *Haemophilia* 2013;19(1):e1-47.
- Teruya J, West AG, Suell MN. Lupus anticoagulant assays: Questions answered and to be answered. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131(6):885-9.
- Turecek PL, Romeder-Finger S, Apostol C, Bauer A, Crocker-Buque A, Burger DA, et al. A world-wide survey and field study in clinical haemostasis laboratories to evaluate FVIII:C activity assay variability of Adynovate and Obizur in comparison with Advate. *Haemophilia* 2016;22(6):957-65.
- Witmer C et Young G. Factor VIII inhibitors in hemophilia A: Rationale and latest evidence. *Ther Adv Hematol* 2013;4(1):59-72.
- World Federation of Hemophilia. Report on the annual global survey 2015. Montréal, Qc : World Federation of Hemophilia; 2016. Disponible à : <http://www1.wfh.org/publication/files/pdf-1669.pdf> (consulté le 3 mai 2017).