

# Dosage de l'activité du facteur IX chez les patients hémophiles B substitués

## Factor IX assays in treated hemophilia B patients

Claire Pouplard<sup>1</sup>  
Emmanuelle Jeanpierre<sup>2</sup>  
Dominique Lasne<sup>3</sup>  
Véronique Le Cam Duchez<sup>4</sup>  
Valérie Eschwege<sup>5</sup>  
Claire Flaujac<sup>6</sup>  
Hubert Galinat<sup>7</sup>  
Ines Harzallah<sup>8</sup>  
Valérie Proulle<sup>9</sup>  
Motalib Smahi<sup>10</sup>  
Frédéric Sobas<sup>11</sup>  
Catherine Ternisien<sup>12</sup>  
Pierre Toulon<sup>13</sup>  
Sophie Voisin<sup>14</sup>  
Christophe Nougier<sup>1</sup>  
Pour le groupe d'études  
de la biologie des maladies  
hémorragiques du Groupe  
français d'études de  
l'hémostase et la thrombose

<sup>1</sup> Service d'hématologie-hémostase,  
Hôpital Trousseau, CHU de Tours, EA  
7501 Université François Rabelais,  
Tours, France  
<claire.pouplard@univ-tours.fr>

<sup>2</sup> CHU Lille, Institut d'hématologie  
transfusion, Inserm U1011, Lille, France

<sup>3</sup> Laboratoire d'hématologie générale,  
Hôpital Necker AP-HP, Paris, Université  
Paris Sud Saclay, Inserm U1176,  
Le Kremlin-Bicêtre, France

<sup>4</sup> CHU de Rouen, UF Hémostase-  
hématologie biologique, Rouen, France

<sup>5</sup> Service d'hématologie hémostase,  
CHU de Nancy, France

<sup>6</sup> Laboratoire d'hématologie, Centre  
Hospitalier de Versailles, Le Chesnay,  
France

**Résumé.** Une surveillance biologique des hémophiles substitués est nécessaire afin d'ajuster la dose de facteurs administrés qu'ils soient d'origine plasmatique ou recombinante. La méthode de dosage de l'activité du facteur IX (FIX:C) la plus répandue est la méthode chronométrique basée sur la mesure du temps de céphaline avec activateur (TCA). Le nombre important de réactifs de TCA et les différents couples automates/réactifs expliquent les difficultés de standardisation de ces dosages. Le groupe français d'études de la biologie des maladies hémorragiques (groupe collaborateur du GFHT et de la filière MHEMO), présente une revue de la littérature et des propositions pour le suivi biologique des patients hémophiles B substitués. Une méthode chronométrique calibrée avec un standard raccordé à l'étalon international OMS est recommandée pour le suivi des patients traités par FIX plasmatiques ou recombinants. Les méthodes chromogéniques sont acceptables pour le suivi des patients traités par Rixubis® et les données sont à ce jour insuffisantes pour le Benefix®. Concernant les FIX recombinants de demi-vie allongée (rFIX-EHL), il existe de grande discordance dans les taux de FIX:C en fonction des méthodes et des réactifs. Une grande vigilance est nécessaire pour le dosage de l'activité du FIX:C par méthode chronométrique chez les patients substitués par ces nouveaux médicaments. Les méthodes chromogéniques ne sont pas équivalentes et ne sont pas validées pour l'ensemble de ces rFIX-EHL. La majorité des études présente des résultats obtenus avec des plasmas surchargés qui doivent être confirmés avec des plasmas de patients traités.

**Mots clés :** facteur IX, hémophilie B, dosages chronométriques, dosages chromogéniques

**Abstract.** Replacement therapy with plasma-derived or recombinant FIX (pdFIX or rFIX) concentrates is the standard of treatment in patients with hemophilia B. The method predominantly used for measuring factor IX (FIX:C) levels is the one-stage clotting assay (OSA) but this method depends on the activated partial thromboplastin time (APTT) reagent and the coagulation analyzer used, and wide variations in the measurements of FIX recovery have been reported with some factor concentrates. The French study group on the biology of hemorrhagic diseases (a collaborative group of the GFHT and MHEMO network), presents a review of the literature and proposals for the monitoring of FIX:C levels in treated hemophilia B patients. The use of OSA calibrated with a plasma reference tested against the current FIX WHO International Standard is recommended for the monitoring of patients treated with pdFIX or rFIX. Chromogenic substrate assays (CSA) are adequate for the monitoring of patients treated with Rixubis®, but data available for Benefix® are currently too limited. For extended half-life rFIX (EHL-rFIX), large discordances in the FIX:C levels

Tirés à part : C. Pouplard

<sup>7</sup> Laboratoire d'hématologie, Hôpital La Caval Blanche, CHU de Brest, France

<sup>8</sup> Service d'hématologie hémostase, Groupe hospitalier régional de Mulhouse et Sud Alsace, France

<sup>9</sup> Service d'hématologie-biologique, CHU Bicêtre, AP-HP, Université Paris Sud Saclay, Inserm U1176, Le Kremlin-Bicêtre, France

<sup>10</sup> Service d'hématologie-hémostase, Hôpital Simone Veil, Eaubonne, France

<sup>11</sup> Service d'hématologie hémostase, Hospices civils de Lyon, Bron, France

<sup>12</sup> Service d'hématologie hémostase, Hôtel-Dieu, CHU de Nantes, France

<sup>13</sup> Service d'hématologie biologique, Hôpital Pasteur, CHU Nice, France

<sup>14</sup> Laboratoire d'hématologie, CHU de Toulouse, France

measured were evidenced, depending on the method and reagents used. Great attention is therefore required for measuring FIX:C levels by OSA in patients substituted by EHL-rFIX. Commercial kits for CSA are not equivalent, and although potentially useful, they are not validated for all EHL-rFIX. Most of recent studies reported data obtained with spiked plasmas, which deserve to be confirmed on plasma samples collected in treated patients.

**Key words:** factor IX, hemophilia B, chronometric assays, chromogenic assays

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

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

La surveillance biologique des hémophiles substitués est nécessaire afin d'ajuster la dose de facteurs administrés qu'ils soient d'origine plasmatique ou recombinante. La méthode de dosage du facteur IX (FIX:C) la plus répandue est la méthode chronométrique basée sur la mesure du temps de céphaline avec activateur (TCA). Cependant, le nombre

important de réactifs de TCA et les différents couples automates/réactifs sont à l'origine des difficultés de standardisation de ces dosages. La variabilité entre les méthodes de dosage se révèle encore plus importante avec certains médicaments à durée de vie prolongée ayant obtenu récemment une autorisation de mise sur le marché (AMM) [1] et les conséquences en termes de surveillance biologique sont majeures chez les patients hémophiles substitués [2-4]. Le rapport de l'EMA (*European medicine agency*) de juin 2014 demande aux compagnies pharmaceutiques de mentionner l'activateur du TCA permettant une mesure optimale du produit c'est-à-dire la mieux corrélée à l'activité du produit *in vivo*.

Les concentrés de FIX sont actuellement titrés uniquement par méthode chronométrique. Le dosage chromogénique tend à se développer mais reste peu répandu [5]. Le sous-comité scientifique et de standardisation « *FVIII, FIX and rare bleeding disorders* » de l'*International society on thrombosis and haemostasis* (ISTH) a émis des recommandations concernant le titrage de l'activité du produit dans chaque flacon de concentrés de FVIII ou FIX et préconise que cette activité puisse être évaluée par des méthodes de dosages couramment utilisées dans les laboratoires hospitaliers [6]. Cependant les résumés des caractéristiques des produits (RCP) de substitution des différents facteurs IX plasmatiques ou recombinants n'indiquent que rarement une conduite à tenir concernant la surveillance biologique. Le groupe français d'études sur la biologie des maladies hémorragiques (groupe collaborateur du GFHT (Groupe français d'études sur l'hémostase et la thrombose) et de la filière MHEMO (filiale de santé des maladies hémorragiques constitutionnelles)), présente dans ce texte une revue

de la littérature ainsi que des propositions pour le suivi biologique des patients hémophiles B substitués. Le détail des différentes méthodes de dosage ainsi que les recommandations pré-analytiques du GFHT peuvent être consultés dans le guide des analyses en hématologie récemment publié [7].

## Méthodologie utilisée pour la rédaction des propositions

La méthodologie adoptée pour élaborer et valider ces propositions a été la suivante : 3 groupes de travail ont pris en charge la rédaction des différents chapitres abordés dans ce texte. Ces textes ont ensuite été relus, discutés et modifiés par un groupe restreint puis soumis à une analyse critique de tous les membres du Groupe français d'études sur la biologie des maladies hémorragiques. Ces propositions ont finalement été validées par un vote (39 votants soit 90 % des membres), déterminant ainsi la force de chaque proposition. Pour retenir une proposition sur un critère avec un accord fort, au moins 50 % des votants devaient exprimer une note supérieure ou égale à 7 (échelle de notation comprise entre 1 et 10) et moins de 20 % des votants devaient donner une note inférieure à 4. En l'absence d'accord, les propositions devaient être reformulées et soumises à nouveau au vote.

La recherche bibliographique a été réalisée sur PubMed. Nous avons sélectionné les publications présentant les résultats et les méthodes de dosage utilisées pour déterminer les taux de FIX chez des patients substitués ou sur des échantillons surchargés. Les articles publiés depuis 1993 et jusqu'au 30 novembre 2018 dans des revues anglophones ou francophones ont été pris en considération. Pour certains chapitres, notamment celui concernant les méthodes de dosage des FIX à demi-vie prolongée, les données de la littérature étant insuffisantes, nous avons également pris en compte les travaux présentés lors de congrès (communications orales ou affichées) au cours des 3 dernières années. Les propositions ont été pondérées en fonction des données disponibles. Ainsi : les recommandations ou non recommandations reposent sur des positions des sociétés savantes. Les méthodes acceptables/non acceptables sont basées sur des données publiées dans la littérature (référence PubMed). Lorsque les résultats n'ont fait l'objet que de communications orales ou affichées, les méthodes sont considérées : acceptables – à confirmer ou non acceptables – à confirmer. Dans certaines situations les données sont discordantes selon les publications et cette notion apparaît dans les tableaux de synthèse. Certaines méthodes n'ont fait l'objet d'aucune étude publiée ou présentée et sont donc considérées comme non évaluées.

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

« NON » que le réactif n'est pas validé dans l'étude selon les critères des auteurs.

## Synthèse des réactifs disponibles pour le dosage du facteur IX

Les différents réactifs de TCA utilisés pour le dosage du FIX par méthode chronométrique ainsi que les différentes trousse de réactifs pour la méthode chromogénique sont présentés ci-dessous (*tableaux 1 et 2*).

### Facteurs IX d'origine plasmatique

#### *Les différentes molécules et leurs caractéristiques*

Il existe trois spécialités de FIX d'origine plasmatique disponibles en France : le Betafact® (LFB), le Mononine® (CSL Behring) et l'Octafix® (Octapharma).

#### *Titration des FIX plasmatiques par les industriels*

L'activité de ces 3 spécialités est déterminée par le dosage chronométrique de la Pharmacopée européenne par rapport à l'étalon international de l'Organisation mondiale de la santé (OMS). Le titrage du Betafact® et du Mononine® est réalisé avec du Pathromtin SL, alors que l'Octafix® est titré en utilisant un réactif de TCA ayant comme activateur du kaolin (Pathromtin®, non disponible en France). Ces données ont été fournies directement par les industriels.

#### *Surveillance biologique : études disponibles*

Peu d'études mentionnant les méthodes de dosage ont été publiées avec les FIX plasmatiques [8]. Une étude de pharmacocinétique, concernant le Mononine®, publiée en 1993 par Berntorp *et al.* utilise pour le dosage du FIX:C l'Automated APTT Organon (actuellement commercialisé sous le nom de TriniCLOT Automated aPTT) et montre que les taux mesurés sont très proches des valeurs attendues [9]. L'étude de Bowyer *et al.* réalisée sur des échantillons surchargés en Mononine® et dosés par 2 centres avec différents réactifs montre une excellente corrélation entre les résultats obtenus avec le Pathromtin SL et l'APTT-SP [10]. Une surestimation de plus de 150 % de la valeur basse (0,03 UI.mL<sup>-1</sup>) est observée avec les autres réactifs (SynthAFax, SynthASil, Actin, Actin FS et Actin FSL). Les trousse chromogéniques Rox FIX et Biophen FIX sont également acceptables pour la surveillance des patients traités par Mononine® [10, 11].

#### *Quelle(s) méthode(s) utiliser pour surveiller un patient traité par du FIX plasmatique ?*

L'utilisation d'une méthode chronométrique est recommandée pour la surveillance biologique des patients traités par concentrés de FIX plasmatiques (*tableau 3*). Il existe

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

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

**Tableau 2.** Liste des principales trousse de réactifs pour le dosage chromogénique FIX disponibles en France en 2019.

Nom du produit	Dénomination courte pour le texte	Origine des protéines	Fournisseur
Biophen Factor IX	Biophen F IX	Humaine	Hyphen Biomed
Rox Factor IX	Rox FIX	Bovine	Rossix

**Tableau 3.** Propositions pour le dosage du FIX après substitution par un facteur IX d'origine plasmatique.

	Betafact®	Mononine®	Octafix®
Méthode chromométrique	Recommandée	Recommandée	Recommandée
Méthode chromogénique	Non évaluée	Acceptable	Non évaluée

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

peu d'études ayant comparé différents réactifs et instruments pour le dosage de ces FIX et les résultats des dosages par méthode chromogénique sont comparables à ceux obtenus par méthode chromométriques chez des patients substitués [10, 11].

### Proposition 1

Il est recommandé d'utiliser une méthode chromométrique pour le dosage du FIX d'origine plasmatique. Accord fort.

## Facteurs IX recombinants conventionnels

### Les différentes molécules et leurs caractéristiques

Deux concentrés de FIX recombinants (rFIX) conventionnels ont une AMM en France : le Benefix® (Pfizer), nonacoag alfa, chaîne glycoprotéique de 55 kDa, produite sur une lignée CHO et le Rixubis® (Shire), nonacoag gamma, chaîne glycoprotéique de 68 kDa, produite également sur une lignée CHO.

### Titration des FIX recombinants par les industriels

Les monographies de la Pharmacopée européenne et les directives de l'European medicines agency (EMA) préconisent la méthode chromométrique pour le titrage des concentrés de FIX et le dosage du facteur IX chez l'hémophile B substitué [12]. Cependant, cette méthode révèle de nombreuses discordances selon le réactif activateur du TCA utilisé (tableau 1) et le FIX recombinant dosé. Le titrage des flacons de Rixubis®, effectué en méthode chromométrique, utilise comme réactif de TCA, le Dapttin. Ce réactif n'est pas commercialisé en France. Le titrage des flacons de Benefix® est réalisé par méthode coagulante avec le réactif Automated aPTT (tableau 1).

### Surveillance biologique : études disponibles

À ce jour le dosage du FIX:C par méthode chromogénique n'est pas aussi développé que celui du FVIII:C. Des différences de résultats entre les méthodes chromogéniques et chromométriques sont rapportées avec les FIX recombinants [10-14].

### Rixubis®

Dans le travail de Turecek *et al.* [13], réalisé avec du plasma d'HB (hémophilie B) sévères surchargé à une concentration non définie de Rixubis®, les résultats des dosages chromogéniques (Rox FIX ou Biophen FIX) ou chromométrique (Dapttin) sont très comparables. Kershaw *et al.* [15] ont comparé la méthode chromométrique (aPTT SP, SynthAFax et Actin) à la méthode chromogénique (Rox FIX ou Biophen FIX), sur des plasmas surchargés à des concentrations variant de 0,5 à 1,2 UI.mL<sup>-1</sup>. Seule la méthode chromogénique Rox FIX permet d'obtenir des taux de FIX proches des valeurs cibles. Par méthode chromométrique, l'échantillon à 0,5 UI.mL<sup>-1</sup> est surestimé à plus de 125 % quel que soit le réactif de TCA utilisé. Les résultats les plus proches des valeurs cibles sont obtenus avec le SynthAFax alors que l'Actin et l'aPTT SP surestiment davantage les taux de FIX.

Gritsch *et al.*, dans une étude présentée en 2014 à la World federation of hemophilia (WFH) [16], ont comparé le dosage du FIX:C par méthode chromométrique avec 12 réactifs de TCA et par méthode chromogénique (Rox FIX et Biophen FIX) sur des plasmas surchargés en Rixubis®. Sur des échantillons titrés à 1 UI.mL<sup>-1</sup>, les auteurs montrent que le dosage du Rixubis® peut être réalisé avec les réactifs Dapttin et Pathromtin SL. Une surestimation, pouvant aller jusqu'à 40 %, est observée avec les autres réactifs (principalement avec Actin FS, Actin FSL, SynthASil, Cephén). Les deux trousse chromogéniques sont acceptables pour la surveillance du Rixubis.

### Benefix®

Deux études majeures ont évalué l'impact de plus de 10 réactifs de TCA sur le dosage du FIX en utilisant des échantillons surchargés par ce FIX recombinant [10, 17]. Selon l'étude de Sommer *et al.* [17], une légère sous-estimation des taux de FIX est observée avec une méthode chromogénique « maison » (- 0,05 UI.mL<sup>-1</sup> pour les valeurs cibles à 0,8 et 0,2 UI.mL<sup>-1</sup>). À l'inverse, les taux de FIX sont surestimés par méthode chromométrique lorsque l'acide ellagique est utilisé comme activateur quelle que soit la concentration de Benefix®. Les taux mesurés les plus proches des valeurs cibles sont obtenus avec le kaolin. La silice permet d'obtenir des résultats intermédiaires. Il est important de souligner qu'il existe dans cette étude une grande variabilité interlaboratoire des résultats, avec des CV pour un même réactif allant de 12 % pour les valeurs élevées (0,8 UI.mL<sup>-1</sup>) à 30 % pour des valeurs plus basses (0,3 UI.mL<sup>-1</sup>). Une étude publiée récemment et réalisée sur des échantillons surchargés en Benefix®, montre que la méthode chromogénique avec la trousse Rox permet d'obtenir des valeurs très proches des valeurs cibles (concentrations allant de 0,05 à 1,2 UI.mL<sup>-1</sup>) [15]. L'utilisation de la trousse Biophen FIX sous-estime les taux de FIX:C et cette observation est plus marquée pour les taux inférieurs ou égaux à 0,2 UI.mL<sup>-1</sup> avec des résultats inférieurs à 75 % de la valeur cible. La même observation est faite sur des échantillons de patients traités [15].

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

L'utilisation d'une méthode chromométrique est recommandée pour la surveillance biologique des patients traités par concentrés de FIX recombinants conventionnels (tableau 4).

#### Proposition 2

La méthode chromométrique calibrée avec un standard raccordé à l'étalon international OMS est recommandée pour le suivi des patients traités par FIX recombinants. Les méthodes chromogéniques sont acceptables pour le suivi des patients traités par Rixubis® et les données sont à ce jour insuffisantes pour le suivi des patients traités par Benefix®. Accord fort.

### Facteurs IX recombinants à demi-vie prolongée ou *extended half life* (rFIX-EHL)

#### Les différentes molécules et leurs caractéristiques

Les stratégies utilisées pour mettre au point des FIX recombinants à demi-vie prolongée ou EHL reposent

**Tableau 4.** Propositions pour le dosage du FIX après substitution par un rFIX.

	Rixubis®	Benefix®
Méthode chronométrique	Recommandée	Recommandée
Méthode chromogénique	Acceptable	Données insuffisantes

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

**Tableau 5.** Liste des différents FIX recombinants à demi-vie prolongée.

Dénomination	Molécules	industriel	Substance active	Caractéristiques	Commentaire
Alprolix®	rFIX-Fc	SOBI	Eftrenonacog	Fusion fragment Fc de l'IgG1 sur rFIX produit sur HEK	1 seule molécule de FIX recombinant fusionné de façon covalente au fragment Fc d'une IgG1 humaine
Idelvion®	rFIX-Alb	CSL-Behring	Albutrepenonacog	Fusion albumine sur rFIX produit sur lignée CHO	Glycopeptide monocaténaire de 1 018 acides aminés : poids moléculaire environ 125 kDa Liaison du rFIX à l'albumine par un linker clivable
Refixia®	N9-GP	Novo Nordisk	Nonacog beta pegol	GlycoPEGylation d'un rFIX produit sur lignée CHO	Liaison d'une 1/2 molécule de PEG de 40 kDa sur 1 ou 2 des N-glycans présents au sein du peptide d'activation du rFIX Il existe 2 sites de PEGylation possible : 95 % du produit final est mono-PEGylé et 5 % Bi-PEGylé

sur le développement de protéine de fusion (fragment d'immunoglobulines, albumine) ou sur la modification chimique du FIX (couplage de polymères de type polyéthylène glycol (PEG)). Trois molécules à demi-vie prolongée ont récemment été développées (tableau 5).

### Titration des rFIX-EHL par les industriels

Les flacons d'Alprolix® sont titrés par méthode chronométrique avec l'Actin. Les flacons d'Idelvion® sont titrés par méthode chronométrique avec le Pathromtin SL. Les résultats obtenus sont comparables aux taux mesurés par une méthode antigénique. Le Refixia® est titré par méthode chronométrique avec le SynthAFax et un calibrant d'origine humaine. Alors que ce médicament a obtenu une autorisation de mise sur le marché par l'EMA, un avis défavorable a été prononcé par l'ANSM (Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé) en janvier 2018 et il n'est donc à ce jour pas disponible en France.

### Surveillance biologique : études disponibles

#### Alprolix®

Les résultats des études disponibles concernant l'Alprolix® sont résumés dans le tableau 6.

L'étude multicentrique de Sommer *et al.* réalisée sur des plasmas déficients en FIX surchargés en Alprolix® à 0,05

- 0,20 et 0,80 UI.mL<sup>-1</sup> et distribués dans 30 laboratoires montre que les dosages du FIX:C effectués avec le kaolin sous-estiment de 50 % les valeurs attendues qui ont été mesurées avec l'Actin [17]. Les taux moyens mesurés avec des réactifs contenant de l'acide ellagique sont très proches des valeurs cibles. Avec les réactifs à base de silice, les résultats sont très variables d'un réactif à l'autre. Le Pathromtin SL, le SynthASil et l'Automated aPTT permettent un dosage acceptable du FIX:C avec des différences de moins de 15 % par rapport à la valeur cible. À l'inverse, avec le PTT-A, les différences observées sont très variables d'un centre à l'autre et peuvent atteindre plus de 30 % dans certains cas.

Les résultats d'un programme britannique d'évaluation externe de la qualité (EEQ de la UK NEQAS exercice 2016) présentés au congrès de la WFH par Kitchen (Glasgow 2018) et obtenus à partir de plasmas déficients en FIX surchargés en Alprolix® à 0,6 UI.mL<sup>-1</sup> (taux de référence mesuré avec l'Actin FS et l'Actin FSL) montrent que le SynthASil permet d'obtenir des taux très proches des valeurs attendues alors que le CK Prest, le Pathromtin SL et le PTT-A sous-estiment les valeurs respectivement de 20, 21 et 33 %. Lors de cet exercice, 2 trousseaux chromogéniques (Biophen FIX et Rox FIX) ont été également utilisés et permettraient d'obtenir des résultats très proches de la valeur cible avec un biais de ± 6 %.

**Tableau 6.** Alprolix®, conclusion des différentes études pour le dosage du FIX:C.

	Sommer <i>et al.</i> [17]	Kitchen <i>et al.</i> (WFH 2018)	Willemze <i>et al.</i> [19]	Boywer <i>et al.</i> [21]	Deriquebourg <i>et al.</i> [18]	Persson <i>et al.</i> [20]
<b>Méthode chromométrique</b>						
Actin	Oui			Oui		
Actin FS	Oui	Non	Non	Non		Non
Actin FSL	Oui	Non		Non		Non
Pathromtin SL	Oui	Non	Non	Non		
PTT-A	Non	Non	Non			Oui
Cephascreen	Oui		Non			
CK Prest	Non	Non	Non			
APTT-SP	Oui			Non		
SynthASil	Oui	Oui	Oui		Oui	
SynthAFax	Oui			Oui		
Automated aPTT	Oui					
aPTT HS			Non			
Platelin L	Oui					
<b>Méthode chromogénique</b>						
Biophen FIX	Oui	Oui		Non	Oui	Oui
Rox FIX		Oui		Oui	Oui	Oui

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

Ces résultats sont confirmés par l'étude de Deriquebourg *et al.* présentée au congrès de l'*European association for haemophilia and allied disorders* (EAHAD) [18] réalisée sur plasmas surchargés et dosés par méthode chromogénique (Biophen FIX et Rox FIX) qui montre une excellente concordance des résultats entre ces deux réactifs et avec la méthode chromométrique utilisant le SynthASil.

Une étude européenne présentée par Willemze lors de ce même congrès et réalisée sous l'égide de Sobi, a été menée dans 59 centres avec une forte participation des centres français [19]. Ainsi, 9 réactifs de TCA ont été testés sur 5 automates différents. Comme attendu, le CK Prest (utilisé par 23 centres et uniquement sur automate Diagnostica-Stago®) sous-estime les taux de FIX:C pour les valeurs cibles 0,20 et 0,80 UI.mL<sup>-1</sup> respectivement de 20,5 % et de 27,5 %, mais avec une grande variabilité d'un centre à l'autre (valeurs extrêmes : 12,5 à 43 %). L'Actin FS utilisé par 14 centres sur automate Sysmex® surestime les taux respectivement de 18 % et 25 %. Le SynthASil utilisé par 10 centres permet d'obtenir des taux très proches des valeurs cibles. Les performances de certains réactifs semblent cependant dépendantes du couple réactif/automate. Ainsi le Pathromtin SL utilisé sur un automate Siemens® surestime les résultats de plus de 25 % mais cet effet n'est pas observé si ce réactif est utilisé sur un automate Sysmex® (4 utilisateurs) ou sur automate Diagnostica-Stago® (1 utilisateur).

Une étude réalisée sur échantillons surchargés en Alprolix® et présentée aux *Scientific standardization committee of the International society on thrombosis and haemostasis* (SSC-ISTH) à Dublin en 2018, montre une surestimation des taux

de FIX:C encore plus importante avec l'Actin FS et l'Actin FSL (> 30 %) [20]. Cependant, contrairement aux études précédemment citées, le réactif PTT-A semble acceptable. Une seule étude présentée à l'EAHAD en 2018 par Bowyer *et al.* [21] a été réalisée sur des échantillons provenant de 5 patients traités par Alprolix®. Sur 22 échantillons, en prenant comme valeur de référence les taux mesurés avec l'Actin, les auteurs montrent une sous-estimation des taux d'environ 20 % avec l'Actin FS, l'Actin FSL, le SynthASil et le SynthAFax. Des différences de plus de 20 % sont observées avec le Pathromtin SL et l'APTT-SP (respectivement 25 et 28 %). En méthode chromogénique, le réactif Biophen FIX entraîne une sous-estimation de 32,2 % alors que les taux mesurés avec le réactif Rox FIX sont très proches des valeurs cibles.

#### Quelle méthode utiliser chez un patient traité par Alprolix® ?

Un grand nombre de réactifs de TCA sont validés pour le dosage du FIX:C lors de la surveillance biologique des traitements par Alprolix®. Concernant le dosage chromogénique, la trousse Rox FIX semble mieux adaptée chez les patients substitués par ce produit.

Le CK Prest, le PTT-A et le Pathromtin SL induisent une sous-estimation des taux de FIX mais avec des différences variables d'un laboratoire à l'autre.

Il est donc nécessaire en cas d'utilisation de l'un de ces 3 réactifs d'avoir au préalable comparé les taux de FIX mesurés avec une méthode validée.

**Tableau 7.** Idelvion<sup>®</sup>, conclusions des différentes études sur le dosage du FIX :C.

	St Ledger <i>et al.</i> [22]	Bowyer <i>et al.</i> [21]	Groupe d'études de la biologie des maladies hémorragiques 2018	Kitchen UK WFH Glasgow 2018	Vangenechten <i>et al.</i> [25]	Persson <i>et al.</i> [20]	Florin <i>et al.</i> [24]
<b>Méthode chromométrique</b>							
Actin		Oui					
Actin FS	Non	Non		Non	Non	Oui	
Actin FSL		Non		Oui		Oui	
Pathromtin SL	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui		
PTT-A				Oui	Oui	Oui	Oui
Cephascreen							
CK Prest	Non		Non	Non	Non		Non
APTT-SP	Oui	Oui					
SynthASil		Oui		Oui			
SynthAFax		Non			Non		
aPTT HS	Oui						
Platelin LS	Oui						
<b>Méthode chromogénique</b>							
Biophen FIX		Non	Non	Non	Non	Non	Non
Rox FIX		Non	Non	Non		Non	

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

## Idelvion<sup>®</sup>

Les résultats des études disponibles concernant l'Idelvion<sup>®</sup> sont résumés dans le *tableau 7*.

St Ledger *et al.* ont présenté au congrès de la WFH (Orlando 2016) [22] les résultats de deux études *ex vivo* réalisées sur des plasmas déficients en FIX surchargés en Idelvion<sup>®</sup>. Ces échantillons étaient dosés par le laboratoire central de CSL avec du Pathromtin SL. Les valeurs cibles de l'étude de phase I/II étaient de 0,25 - 0,5 et 0,9 UI.mL<sup>-1</sup> et de 0,1 - 0,25 et 0,625 UI.mL<sup>-1</sup> dans la deuxième étude (Phase II/III). Les laboratoires participants ont utilisé leur propre réactif de TCA : Pathromtin SL, aPTT HS, Platelin LS, APTT-SP et CK Prest (*tableau 1*). La majorité des réactifs de TCA utilisés donnait des résultats dont la différence n'excédait pas 20 % par rapport à ceux obtenus dans le laboratoire central. En revanche, une sous-estimation de l'ordre de 50 % était observée, quel que soit le domaine de mesure, avec l'Actin FS et le CK Prest.

Des résultats identiques ont été présentés au SSC ISTH (Montpellier 2016) par Buyue *et al.* [23]. Une sous-estimation de plus de 50 % était observée avec le CK Prest et de l'ordre de 30 % avec Actin FSL (-36 %), le SynthASil (-30 %) et le PTT-A (-30 %). Le Pathromtin SL, réactif utilisé par le laboratoire central de CSL Behring, donne sans surprise, les taux attendus.

Des résultats du programme d'EEQ britannique (UK NEQAS exercice 2016), présentés au congrès de la WFH par S Kitchen (Glasgow 2018), obtenus à partir de plas-

mas déficients en FIX et surchargés en Idelvion<sup>®</sup> à 0,6 UI.mL<sup>-1</sup> (taux de référence mesuré avec Pathromtin SL) montrent une sous-estimation des taux de 50 % avec le CK Prest et l'Actin FS. Les résultats les plus proches de la valeur cible sont obtenus avec le SynthASil et le Pathromtin SL. L'Actin FSL et le PTT-A donnent des taux proches de 0,5 UI.mL<sup>-1</sup>. Lors de cet exercice deux trousses chromogéniques (Rox FIX et Biophen FIX) ont été évaluées et ces deux réactifs surestiment de façon importante les taux de FIX (respectivement de +93 % et +65 %).

Une étude du Groupe français d'études sur la biologie des maladies hémorragiques (article soumis) a évalué des plasmas surchargés en Idelvion<sup>®</sup> et titrés en Pathromtin SL (0,05 - 0,3 et 0,8 UI.mL<sup>-1</sup>) dans 20 centres. En dehors du Pathromtin SL avec lequel les valeurs attendues ont été retrouvées, une sous-estimation systématique de 50 % a été obtenue avec le CK Prest sur les échantillons à 0,3 et 0,8 UI.mL<sup>-1</sup>. Une plus grande variabilité des résultats a été observée sur l'échantillon titré à 0,05 UI.mL<sup>-1</sup> avec des concentrations mesurées comprises entre 0,02 et 0,06 UI.mL<sup>-1</sup>. Trois études [20, 24, 25], présentées aux SSC-ISTH en 2018, montraient une surestimation des taux de FIX:C de plus de 35 % par les méthodes chromogéniques (Biophen FIX et Rox FIX). Le Pathromtin SL a été validé par 2 équipes. Cependant, des résultats contradictoires ont été obtenus pour l'Actin FS et le PTT-A.

Une seule étude réalisée sur des échantillons provenant de 3 patients (18 échantillons) traités par Idelvion<sup>®</sup> a été

**Tableau 8.** Refixia®: conclusion des différentes études pour le dosage du FIX:C.

	Boywer <i>et al.</i> [10]	Tiefenbacher <i>et al.</i> [29]	Young <i>et al.</i> [28]
<b>Méthode chromométrique</b>			
Actin	Non		
Actin FS	Non		
Actin FSL	Non		
Pathromtin SL	Non		
Cephascreen		Oui	
APTT-SP	Non		
SynthASil	Non		
SynthAFax	Oui		Oui
DG Synth	Oui		
<b>Méthode chromogénique</b>			
Biophen FIX	Oui	Oui	Oui
Rox FIX	Oui	Oui	

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

présentée à l'EAHAD (Madrid 2018) par Bowyer *et al.* [21]. Si l'on compare les résultats obtenus avec le Pathromtin SL, des différences inférieures à 10 % sont observées avec l'Actin, l'APTT-SP et le SynthASil. En revanche, une sous-estimation de plus de 30 % est observée avec l'Actin FS et l'Actin FSL. Une surestimation de près de 50 % est observée avec le SynthAFax et avec les deux trousse chromogéniques (Biophen FIX et Rox FIX).

Tout récemment, une étude multicentrique de Horn *et al.*, réalisée sur des échantillons surchargés, a comparé différents réactifs d'APTT. Une sous-estimation proche de 50 % des taux de FIX:C avec l'Actin FS et le CK Prest a été retrouvée [26].

#### Quelle méthode utiliser chez un patient traité par Idelvion ?

Dans l'état actuel des connaissances, les 2 trousse chromogéniques (Biophen FIX et Rox FIX) ne sont pas acceptables pour le dosage du rFIX-FP.

Seules des méthodes chromométriques peuvent être utilisées et un grand nombre de réactifs de TCA sont à ce jour validés : Actin, Pathromtin SL, APTT-SP, SynthASil, Platelin LS.

Lorsque ces réactifs ne sont pas disponibles dans le laboratoire, il est important de bien prendre en compte la sous-estimation de l'ordre de 50 % des taux de FIX:C mesurés avec le CK Prest et l'Actin FS. Dans l'étude française réalisée avec le CK Prest, la variabilité des résultats, observés surtout pour le taux bas, ne permet pas de valider de façon systématique un facteur de correction.

#### Refixia®

Les résultats des études disponibles concernant le Refixia® sont résumés dans le *tableau 8*.

Dans une étude publiée en 2016 par Boywer *et al.* réalisée dans deux centres, les auteurs montrent que sur des plasmas déficients surchargés avec du N9 GP (valeurs cibles de 0,03 à 0,90 UI.mL<sup>-1</sup>), les méthodes chromogéniques (Rox FIX et Biophen FIX) donnent des résultats satisfaisants pour toutes les concentrations de N9-GP avec un pourcentage de recouvrement compris entre 74 et 126 % (valeurs extrêmes pour le taux bas, moyenne à 100 %) [10]. Les méthodes chromométriques permettent d'obtenir des résultats proches des valeurs cibles uniquement avec le SynthAFax et le DG Synth. Avec le SynthASil, l'Actin, l'Actin FS et l'Actin FSL les résultats sont sous-estimés de 50 à 70 %.

À l'inverse, le Pathromtin SL et l'APTT-SP qui contiennent tous deux de la silice comme activateur, induisent une surestimation du FIX:C de plus de 500 % quelle que soit la valeur cible. Cette observation est expliquée par le travail de Rosén qui montre que le N9-GP en présence de plasma déficient en IX est prématurément converti en FIXa durant la phase d'activation des tests chromométriques lorsque les réactifs contiennent de la silice. Le groupement PEG rend possible la co-localisation du N9-GP avec ses activateurs (FXIa et Prékallicroïne) à la surface de la silice, facilitant ainsi sa conversion précoce en FIXa durant la phase d'activation [27].

Un travail de Young *et al.* réalisé sur des plasmas de patients traités montre que les taux de FIX :C mesurés par méthode chromométrique avec le SynthAFax sont comparables à ceux obtenus par méthode chromogénique (Biophen FIX) [28].

**Tableau 9.** Propositions pour le dosage du FIX après substitution par un rFIX-EHL.

	<b>Alprolix®</b>	<b>Idelvion®</b>	<b>N9-GP®</b>
<b>Méthode chromométrique</b>			
Actin	Acceptable	Acceptable	Non acceptable
Actin FS	Acceptable	Non acceptable (*)	Non acceptable
Actin FSL	Acceptable	Non acceptable	Non acceptable
SynthAFax	Acceptable	Acceptable	Acceptable
DG Synth	Non évalué	Non évalué	Acceptable
PTT-A	Acceptable	Non acceptable	Non évalué
APTT-SP	Acceptable	Acceptable	Non acceptable
SynthASil	Acceptable	Acceptable	Non acceptable
aPTT HS	Acceptable	Acceptable	Non évalué
Platelin L	Acceptable	Acceptable	Non évalué
APTT-SP	Non évalué	Non acceptable	Non évalué
Pathromtin SL	Résultats discordants	Acceptable	Non acceptable
Cephascreen	Acceptable	Non acceptable	Acceptable
CK Prest	Non acceptable	Non acceptable (*)	Non évalué
<b>Méthode chromogénique</b>			
Biophen FIX	Non acceptable – à confirmer (**)	Non acceptable	Acceptable
Rox FIX	Acceptable – à confirmer	Non acceptable	Acceptable

Recommandé/non recommandé : position des sociétés savantes ; acceptable/non acceptable : données publiées dans la littérature ; acceptable – à confirmer/non acceptable – à confirmer : résultats n'ayant fait l'objet que de communications orales ou affichées ; non évalué : absence d'étude. \*Sous-estimation de l'ordre de 50 %. \*\*Les résultats de Boywer et des résultats préliminaires obtenus par notre groupe sur des échantillons de patients traités ne valident pas ce réactif.

Sur des plasmas surchargés à des concentrations de N9-GP comprises entre 0,05 et 2,50 UI.mL<sup>-1</sup>, Tiefenbacher *et al.* valident l'utilisation du Cephascreen et des deux tests chromogéniques [29]. Seuls ces 3 réactifs sont recommandés par NovoNordisk dans le dossier de la *Food and drug administration* (FDA) de Refixia®.

### Quelle méthode utiliser chez un patient traité par Refixia® ?

Il existe à l'heure actuelle peu de réactifs de TCA validés pour le dosage du Refixia®, parmi ceux-ci seuls 2 sont commercialisés en France et peuvent être utilisés : Cephascreen et SynthAFax. En cas d'utilisation d'un autre réactif, il est nécessaire d'avoir au préalable comparé les taux de FIX mesurés avec une méthode validée. Les méthodes chromogéniques semblent également être validées.

### Quelle(s) méthode(s) utiliser pour surveiller un patient traité par du rFIX EHL ?

Une synthèse des résultats obtenus avec les rFIX-EHL est présentée dans le *tableau 9*.

### Proposition 3

Il existe une très grande hétérogénéité de comportement des différents réactifs de TCA avec les rFIX-EHL. Une grande vigilance doit être apportée lors du dosage par méthode chromométrique de ces produits de substitutions. La majorité des résultats des études a été obtenue avec des plasmas surchargés et des résultats différents pourraient être observés sur les plasmas de patients traités. Les méthodes chromogéniques ne sont pas validées pour l'ensemble de ces rFIX-EHL. Accord fort.

### Conclusion

L'apparition de nouveaux facteurs anti-hémophiliques à demi-vie prolongée est une avancée pour la prise en charge des patients hémophiles mais constitue un réel challenge pour les laboratoires, car la modification des molécules a mis en exergue des différences entre les résultats obtenus selon les méthodes de dosage et les réactifs utilisés. Les trousse de dosages chromogéniques sont apparues plus récemment pour le dosage du FIX:C que pour le dosage du FVIII:C et le dosage par méthode chromométrique reste encore très largement répandu. Alors que la méthode chromogénique est recommandée quelle que soit la trousse de

réactif pour le dosage des patients substitués en facteur VIII, les données actuellement disponibles montrent que toutes les troupes de réactifs de dosages chromogéniques du FIX:C ne sont pas équivalentes. De plus, de nouveaux kits sont actuellement en développement et leur validation sur un nombre d'échantillons suffisant et avec chacune des molécules rFIX-EHL devra être réalisée avant toute utilisation dans nos laboratoires pour le suivi des patients.

Ces observations imposent aux biologistes une très grande vigilance lors de la surveillance des hémophiles substitués. Le comportement des nouvelles molécules vis-à-vis des méthodes de dosages chronométriques et chromogéniques n'est malheureusement pas bien caractérisé avant leur mise sur le marché et ce malgré les recommandations internationales. Les facteurs de correction pouvant être proposés ne s'avèrent pas toujours applicables de façon systématique en raison de facteurs de variabilité interlaboratoire. De plus, un même facteur de correction est rarement applicable sur tout le domaine de mesure. Un grand nombre d'études citées dans ce document et plus particulièrement pour les rFIX-EHL ont été réalisées sur des échantillons de plasma surchargé en médicaments et les résultats doivent être confirmés sur des échantillons de patients substitués. Compte tenu de l'importance de la composition du réactif de TCA lors du dosage du FIX:C [9], une vigilance particulière doit être apportée lors d'un changement de réactif. L'impact de l'activateur et des phospholipides sur le dosage du FIX a déjà été rapportée [30] et les comparaisons de méthodes lors d'un changement de réactif doivent idéalement intégrer des échantillons de patients substitués.

Dans certaines situations liées à l'urgence de la prise en charge du patient, si un test recommandé n'est pas disponible 24h/24, les laboratoires pourront être amenés à réaliser une méthode considérée comme « non acceptable » dans nos propositions, seulement si le biologiste a comparé sa méthode avec une technique recommandée ou acceptable. Se pose alors la question de transmettre un résultat souvent sous-estimé aux cliniciens sur le compte rendu d'examen. L'ensemble des rédacteurs de ce texte s'accorde sur le fait que les résultats biologiques ne doivent en aucun cas être modifiés par un quelconque facteur de correction avant d'être transmis. Une interprétation du résultat final, faisant état des différences observées par rapport à une méthode acceptable ou recommandée, devra impérativement figurer sur le compte rendu biologique. Cette attitude implique que le biologiste ait connaissance du traitement anti-hémophilique administré au patient, afin d'interpréter correctement le résultat.

En conclusion, ces propositions ont pour but d'aider les biologistes à mieux connaître les performances et limites des différentes méthodes de dosage utilisables pour la surveillance des médicaments susceptibles d'être administrés chez les patients. Mais les données de la littérature et les

tests biologiques disponibles sont toutefois susceptibles d'évoluer, remettant en cause certaines de nos propositions. L'évolution de la prise en charge des patients hémophiles à l'aide de nouvelles molécules nécessite une adaptation des outils biologiques afin d'assurer une surveillance biologique la mieux adaptée. Si peu de discordances au sein des dosages chronométriques ont été observées avec les molécules plasmatiques, celles-ci sont clairement apparues avec certains facteurs VIII ou IX recombinants. Ces discordances s'expliquent en partie par le fait que les techniques de dosages chronométriques traditionnelles sont calibrées avec des plasmas standards issus de molécules FVIII ou FIX non recombinantes. Une des solutions proposées pour pallier ces discordances a été alors d'utiliser des standards spécifiques aux molécules, mais ils ne sont disponibles que pour un nombre limité de molécules.

Enfin, de nouveaux traitements non substitutifs sont déjà commercialisés ou en fin de développement (emicizumab, fitusiran, anti-TFPI...). Une fois encore les techniques chronométriques traditionnelles ne constituent pas un outil adapté pour la surveillance des patients traités et le développement ou l'adaptation de nouveaux tests pour la surveillance biologique (dosage spécifique, tests globaux) devient un nouveau challenge pour le biologiste.

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

## Références

1. Van den Bossche D, Peerlinck K, Jacquemin M. New challenges and best practices for the laboratory monitoring of factor VIII and factor IX replacement. *Int J Lab Hematol* 2018 ; 40(Suppl. 1) : 21-9.
2. Adcock DM, Strandberg K, Shima M, Marlar RA. Advantages, disadvantages and optimization of one-stage and chromogenic factor activity assays in haemophilia A and B. *Int J Lab Hematol* 2018 ; 40(6) : 621-9.
3. Martinuzzo M, Barrera L, Rodriguez M, D'Adamo MA, López MS, Otaso JC. Do PT and APTT sensitivities to factors' deficiencies calculated by the H47-A2 2008 CLSI guideline reflect the deficiencies found in plasmas from patients ? *Int J Lab Hematol* 2015 ; 37(6) : 853-60.
4. Toulon P, Eloit Y, Smahi M, Sigaud C, Jambou D, Fischer F, *et al.* In vitro sensitivity of different activated partial thromboplastin time reagents to mild clotting factor deficiencies. *Int J Lab Hematol* 2016 ; 38(4) : 389-96.
5. 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.

6. Hubbard AR, Dodt J, Lee T, Mertens K, Seitz R, Srivastava A, *et al*. Recommendations on the potency labelling of factor VIII and factor IX concentrates. *J Thromb Haemost* 2013 ; 11(5) : 988-9.
7. Béné M-C, Martinez P, Lasne D, Noizat-Pirenne F. *Guide des analyses en hématologie. Société française d'hématologie*. Paris : Elsevier Masson, 2018.
8. Aznar JA, Cabrera N, Matysiak M, Zawilska K, Gercheva L, Antonov A, *et al*. Pharmacokinetic study of a high-purity factor IX concentrate (Factor IX Grifols) with a 6-month follow up in previously treated patients with severe haemophilia B. *Haemophilia* 2009 ; 15(6) : 1243-8.
9. Berntorp E, Björkman S, Carlsson M, Lethagen S, Nilsson IM. Biochemical and in vivo properties of high purity factor IX concentrates. *Thromb Haemost* 1993 ; 70(5) : 768-73.
10. Bowyer AE, Hillarp A, Ezban M, Persson P, Kitchen S. Measuring factor IX activity of nonacog beta pegol with commercially available one-stage clotting and chromogenic assay kits : a two-center study. *J Thromb Haemost* 2016 ; 14(7) : 1428-35.
11. Wilmot HV, Hogwood J, Gray E. Recombinant factor IX : discrepancies between one-stage clotting and chromogenic assays. *Haemophilia* 2014 ; 20(6) : 891-7.
12. Dodt J, Hubbard AR, Wicks SJ, Gray E, Neugebauer B, Charton E, *et al*. 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.
13. Turecek PL, Abbühl B, Tangada SD, Chapman M, Gritsch H, Rotensteiner H, *et al*. Nonacog gamma, a novel recombinant factor IX with low factor IXa content for treatment and prophylaxis of bleeding episodes. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2015 ; 8(2) : 163-77.
14. Kitchen S, Gray E, Mertens K. Monitoring of modified factor VIII and IX products. *Haemophilia* 2014 ; 20(Suppl. 4) : 36-42.
15. Kershaw GW, Dissanayake K, Chen VM, Khoo T-L. Evaluation of chromogenic factor IX assays by automated protocols. *Haemophilia* 2018 ; 24(3) : 492-501.
16. Gritsch H, Romeder-Finger S, Scheiflinger F, Turecek PL. Potency assignment and measurement of recombinant FIX activity in human plasma impact of reagents on the 1-stage clotting assay. *Haemophilia* 2014 ; (Suppl. 3) : 37.
17. 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.
18. Dericquebourg A, Jourdy Y, Negrier C, Nougier C. Comparison of three assays for measuring factor IX. *Haemophilia* 2018 ; 24(Suppl.1) : 51.
19. Willemze A, Sadeghi-Khomami A, Sörskog L, Wikén M, Lethagen S. Assessment of clotting activity of recombinant fix FC fusion protein in European hemophilia treatment centers. *Haemophilia* 2018 ; 24(Suppl. 1) : 55.
20. Persson A, Mahmoud Hourani Soutari N, Norberg E-M, Antovic J. One stage and chromogenic assays discrepancy in the estimation of factor IX (FIX) recovery. What is it that a single hemophilia center can and cannot do ? Replacement Therapy. 64th Annual meeting of the scientific standardization committee of the International society on thrombosis and haemostasis, July 18-21, 2018. *Res Pract Thromb Haemost* 2019 ; 17 : 138-148.
21. Bowyer A, Sampson B, Shepherd F, Jones R, Kitchen S, Makris M. The FIX C assessment of extended half- life recombinant factor IX products in clinical practice. *Haemophilia* 2018 ; 24(Suppl. 1) : 56.
22. St Ledger K, Fuessner A, Kalina U, Metzner HJ, Horn C, Stowers A, *et al*. Performance of a recombinant fusion protein linking coagulation factor IX with albumin (rIX-FP) in the one-stage assay. *Haemophilia* 2016 ; 22(Suppl. 4) : 59.
23. Buyue Y, Rabinovich D, Bardan S, Hong V, Ismail A, Sommer J, *et al*. Product-specific calibration standards do not correct one-stage clotting assay discrepancies for modified recombinant FIX molecules with reagents that significantly over- or under-recover labeled potency. *Annual Meeting of the Scientific Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis* 2016 ; 14(Suppl.1) : 52.
24. Florin L, Devreese KMJ. Comparison of two one-stage clotting assays and one chromogenic FIX assay for monitoring of Idelvion® replacement therapy. 64th Annual meeting of the scientific standardization committee of the International society on thrombosis and haemostasis. July 18-21, 2018. *Res Pract Thromb Haemost* 2018 ; 2(Suppl. 1) : 120.
25. Vangenechten M, Maes M, Maes MB, Gadisseur A. Differences in activity of plasma spiked with IDELVION® generated with one-stage clotting assay using different commercial APTT reagents compared with chromogenic method. 64th Annual meeting of the scientific standardization committee of the International society on thrombosis and haemostasis. July 18-21, 2018. *Res Pract Thromb Haemost* 2019 ; 17 : 138-48.
26. Horn C, Négrier C, Kalina U, Seifert W, Friedman KD. Performance of a recombinant fusion protein linking coagulation factor IX with recombinant albumin in one-stage clotting assays. *J Thromb Haemost* 2019 ; 17 : 138-48.
27. Rosén P, Rosén S, Ezban M, Persson E. Overestimation of N-glycoPEGylated factor IX activity in a one-stage factor IX clotting assay owing to silica-mediated premature conversion to activated factor IX. *J Thromb Haemost* 2016 ; 14(7) : 1420-7.
28. Young G, Ezban M, Clausen WHO, Negrier C, Oldenburg J, Shima M. Chromogenic analysis of FIX activity in haemophilia B patients treated with nonacog beta pegol. *Haemophilia* 2017 ; 23(6) : e528-30.
29. Tiefenbacher S, Bohra R, Amiral J, Bowyer A, Kitchen S, Lochu A, *et al*. Qualification of a select one-stage activated partial thromboplastin time-based clotting assay and two chromogenic assays for the post-administration monitoring of nonacog beta pegol. *J Thromb Haemost* 2017 ; 15(10) : 1901-12.
30. Pouplard C, Trossaert M, Le Querrec A, Delahousse B, Giraudeau B, Gruel Y. Influence of source of phospholipids for APTT-based factor IX assays and potential consequences for the diagnosis of mild haemophilia B. *Haemophilia* 2009 ; 15(1) : 365-8.