



<http://portaildoc.univ-lyon1.fr>

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1
INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES
FACULTE DE PHARMACIE DE LYON

Année 2022

THESE n°01

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le 11 janvier 2022 par

Gautier DIDIER

Né le 8 novembre 1996, à Essey-Lès-Nancy (Meurthe-et-Moselle)

**Fractionnement du plasma et purification d'une
protéine thérapeutique, le fibrinogène**

JURY

Présidente : Mme Christine VINCIGUERRA, Professeur Universitaire – Praticien Hospitalier

Directrice : Mme Valérie CHAMOULARD, Praticien Hospitalier

Membres : M Michel HANSS, Praticien Hospitalier

M Ludovic BURLLOT, Directeur du Développement Biopharmaceutique, LFB

Novembre 2020

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

- Président de l'Université M Frédéric FLEURY
- Présidence du Conseil Académique M Hamda BEN HADID
- Vice-Président du Conseil d'Administration M Didier REVEL
- Vice-Président de la Commission Recherche M Fabrice VALLEE
- Vice-Président de la Formation et de la Vie Universitaire M Philippe CHEVALIER

Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon

SANTE

- UFR de Médecine Lyon Est Directeur : M Gilles RODE
- UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux Directrice : Mme Carole BURILLON
- Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA
- UFR d'Odontologie Directrice : Mme Dominique SEUX
- Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation (ISTR) Directeur : M Xavier PERROT
- Département de formation et centre de recherche en biologie humaine Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT

SCIENCES ET TECHNOLOGIES

- UFR Fédération Sciences (Chimie, Mathématique, Physique) Directeur : M Bruno ANDRIOLETTI
- UFR Biosciences Directrice : Mme Kathrin GIESELER
- Département composante Informatique Directeur : M Behzad SHARIAT
- Département composante Génie Electrique et des procédés (GEP) Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
- Département composante Mécanique Directeur : M Marc BUFFAT
- UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS) Directeur : M Yannick VANPOULLE
- Polytech Lyon Directeur : M Emmanuel PERRIN
- I.U.T. LYON 1 Directeur : M Christophe VITON
- Institut des Sciences Financières et d'Assurance (ISFA) Directeur : M Nicolas LEBOISNE

ISPB - Faculté de Pharmacie Lyon

LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUE ET PHARMACIE GALENIQUE

- **CHIMIE ANALYTIQUE, GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE**

Monsieur Raphaël TERREUX (PR)
Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)
Madame Anne DENUZIERE (MCU)
Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (MCU-HDR)
Madame Christelle MACHON (MCU-PH)
Monsieur Waël ZEINYEH (MCU)

- **PHARMACIE GALENIQUE -COSMETOLOGIE**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (PR)
Madame Stéphanie BRIANCON (PR)
Monsieur Fabrice PIROT (PU-PH)
Monsieur Eyad AL MOUAZEN (MCU)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Danielle CAMPIOL ARRUDA (MCU)
Madame Ghania HAMDI-DEGOBERT (MCU-HDR)
Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)
Madame Giovanna LOLLO (MCU)
Madame Jacqueline RESENDE DE AZEVEDO (MCU)
Monsieur Damien SALMON (MCU-PH)
Madame Eloïse THOMAS (MCU)

- **BIOPHYSIQUE**

Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (PR)
Madame Laurence HEINRICH (MCU)
Monsieur David KRYZA (MCU-PH-HDR)
Madame Sophie LANCELOT (MCU-PH)
Madame Elise LEVIGOUREUX (MCU-PH)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE

- **DROIT DE LA SANTE**

Madame Valérie SIRANYAN (PR)
Madame Maud CINTRAT (MCU)

- **ECONOMIE DE LA SANTE**

Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (MCU-HDR)
Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU-HDR)

- **INFORMATION ET DOCUMENTATION**

Monsieur Pascal BADOR (MCU-HDR)

- **INGENIERIE APPLIQUEE A LA SANTE ET DISPOSITIFS MEDICAUX**

Monsieur Xavier ARMOIRY (PU-PH)
Madame Claire GAILLARD (MCU)

- **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE**
Madame Alexandra CLAYER-MONTEMBAULT (MCU)
Monsieur Vincent GROS (MCU-enseignant contractuel temps partiel)
Madame Audrey JANOLY-DUMENIL (MCU-PH)
Madame Pascale PREYNAT (MCU-enseignant contractuel temps partiel)
- **MATHEMATIQUES – STATISTIQUES**
Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU-PH-HDR)
Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)
Madame Marie-Paule GUSTIN (MCU-HDR)
- **SANTE PUBLIQUE**
Monsieur Claude DUSSART (PU-PH)
Madame Delphine HOEGY (AHU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT

- **CHIMIE ORGANIQUE**
Monsieur Pascal NEBOIS (PR)
Madame Nadia WALCHSHOFER (PR)
Monsieur Zouhair BOUAZIZ (MCU-HDR)
Madame Christelle MARMINON (MCU)
Madame Sylvie RADIX (MCU-HDR)
Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU-HDR)
- **CHIMIE THERAPEUTIQUE**
Monsieur Marc LEBORGNE (PR)
Monsieur Thierry LOMBERGET (PR)
Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU-HDR)
Monsieur François HALLE (MCU)
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
- **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**
Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (PR)
Madame Anne-Emmanuelle HAY DE BETTIGNIES (MCU)
Madame Isabelle KERZAON (MCU)
Monsieur Serge MICHALET (MCU)
- **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT**
Madame Roselyne BOULIEU (PU-PH)
Madame Christelle CHAUDRAY-MOUCHOUX (PU-PH)
Madame Catherine RIOUFOL (PU-PH)
Madame Magali BOLON-LARGER (MCU-PH)
Monsieur Teddy NOVAIS (MCU-PH)
Madame Céline PRUNET-SPANO (MCU)
Madame Florence RANCHON (MCU-PH)
Madame Camille LEONCE (ATER)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

- **TOXICOLOGIE**
Monsieur Jérôme GUITTON (PU-PH)
Madame Léa PAYEN (PU-PH)
Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)
- **PHYSIOLOGIE**
Monsieur Christian BARRES (PR)
Madame Kiao Ling LIU (MCU)
Monsieur Ming LO (MCU-HDR)
- **PHARMACOLOGIE**
Monsieur Sylvain GOUTELLE (PU-PH)
Monsieur Michel TOD (PU-PH)
Monsieur Luc ZIMMER (PU-PH)
Monsieur Roger BESANCON (MCU)
Monsieur Laurent BOURGUIGNON (MCU-PH)
Madame Evelyne CHANUT (MCU)
Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)
Madame Dominique MARCEL CHATELAIN (MCU-HDR)
- **COMMUNICATION**
Monsieur Ronald GUILLOUX (MCU)
- **ENSEIGNANTS CONTRACTUELS TEMPS PARTIEL**
Madame Aline INIGO PILLET (MCU-enseignant contractuel temps partiel)
Madame Pauline LOUBERT (MCU-enseignant contractuel temps partiel)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A

- **IMMUNOLOGIE**
Monsieur Guillaume MONNERET (PU-PH)
Madame Morgane GOSSEZ (MCU-PH)
Monsieur Sébastien VIEL (MCU-PH)
- **HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE**
Madame Christine VINCIGUERRA (PU-PH)
Madame Sarah HUET (MCU-PH)
Monsieur Yohann JOURDY (MCU-PH)
- **MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE AUX BIOTECHNOLOGIES INDUSTRIELLES**
Monsieur Frédéric LAURENT (PU-PH)
Madame Florence MORFIN (PU-PH)
Madame Veronica RODRIGUEZ-NAVA (PR)
Monsieur Didier BLAHA (MCU-HDR)
Madame Ghislaine DESCOURS (MCU-PH)
Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU-PH-HDR)
Madame Emilie FROBERT (MCU-PH)
Monsieur Jérôme JOSSE (MCU)

- **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE**
Monsieur Philippe LAWTON (PR)
Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)
Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU-HDR)
Madame Amy DERICQUEBOURG (AHU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B

- **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE - BIOTECHNOLOGIE**
Madame Pascale COHEN (PR)
Madame Caroline MOYRET-LALLE (PR)
Madame Emilie BLOND (MCU-PH)
Monsieur Karim CHIKH (MCU-PH)
Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU-PH-HDR)
Monsieur Anthony FOURIER (MCU-PH)
Monsieur Boyan GRIGOROV (MCU)
Monsieur Alexandre JANIN (MCU-PH)
Monsieur Hubert LINCET (MCU-HDR)
Monsieur Olivier MEURETTE (MCU-HDR)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Stéphanie SENTIS (MCU)
Monsieur David GONCALVES (AHU)
- **BIOLOGIE CELLULAIRE**
Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)
Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU-HDR)

INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON

- Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (PR)
- Monsieur Philippe LAWTON (PR)
- Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
- Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
- Madame Alexandra MONTEMBAULT (MCU)
- Madame Angélique MULARONI (MCU)
- Madame Marie-Françoise KLUCKER (MCU-enseignant contractuel temps partiel)
- Madame Valérie VOIRON (MCU-enseignant contractuel temps partiel)

- PR :** Professeur des Universités
- PU-PH :** Professeur des Universités-Praticien Hospitalier
- MCU :** Maître de Conférences des Universités
- MCU-PH :** Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier
- HDR :** Habilitation à Diriger des Recherches
- AHU :** Assistant Hospitalier Universitaire

Remerciements

A Madame le Professeur Christine Vinciguerra,

Je vous remercie de me faire l'honneur de présider ce jury. J'ai eu le privilège de recevoir vos enseignements à la faculté à propos d'aspects traités dans ce mémoire. Je suis donc reconnaissant de pouvoir également recevoir votre jugement sur ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mon grand respect.

A Madame le Docteur Valérie Chamouard,

Je vous remercie pour avoir accepté de m'encadrer et pour votre accompagnement bienveillant. Merci de m'avoir aidé à trouver un projet qui puisse joindre si bien mes deux cursus et m'ouvrir sur tant d'aspects et d'opportunités. Je vous remercie aussi pour votre disponibilité et votre attention. J'ai particulièrement apprécié de travailler avec vous ; j'espère que le résultat de ce travail en sera à la hauteur. Veuillez trouver ici l'expression de mes remerciements les plus profonds.

A Monsieur le Docteur Michel Hanss,

Je vous remercie d'avoir accepté d'apporter votre expertise sur le sujet du fibrinogène à la critique de ce travail. Je suis honoré de votre présence parmi les membres du jury. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance.

A Monsieur Ludovic Burlot,

Je tiens à vous remercier pour toute votre aide dans ce projet ; autant pour le partage de vos connaissances que pour vos conseils, et votre bienveillance à chaque étape de mon travail. Veuillez trouver ici l'expression de mes plus sincères remerciements.

A l'ensemble des membres du jury,

Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez accepté de porter à mon travail. Si je doute de parvenir à vous apprendre quelque chose, j'espère néanmoins qu'il saura vous transmettre le plaisir que j'ai eu à découvrir, puis approfondir les thèmes du fractionnement du plasma et du fibrinogène.

A Madame Sophie Dantan Lewis,

Je vous remercie tout particulièrement pour votre aide sur ce travail. De plus, la continuité que vous avez permis de créer entre ma thèse et l'application prochaine des connaissances qu'elle explore, a offert une très belle dimension à ce travail de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère gratitude.

A ma famille,

Père, Mère, Marion et Claire, merci pour tout ce que nous partageons, pour votre soutien indéfectible, pour votre humour, pour vos influences, vos avis et vos conseils. Vous êtes un pilier important pour la personne que je suis devenue. Chers parents, un de mes souhaits a toujours été de vous rendre fiers. J'espère au plus profond de moi que cela sera un peu le cas en passant de l'humble état d'étudiant d'un quart de siècle et Tanguy à ses heures de confinement, à celui éventuellement plus enviable d'étudiant thésé.

A ma chère et tendre amie,

Merci Aline pour t'être lancée avec moi dans des projets assez fous au cours de ces trois dernières années, et en prévision des prochains. Merci de me faire rire, de tes attentions, et pour tout le reste. Sache que sans ne serait-ce que la moitié de ton soutien, plus de la moitié de ce travail serait probablement à moitié moins qualitatif que ce qu'il ne l'est actuellement.

A mes amis,

Merci à ceux qui m'ont beaucoup apporté avant que je ne les perde de vue, à ceux que j'ai retrouvés, et à ceux qui sont restés.

A Simon, pour les miracles dont tu es capable. Sois toujours le bienvenu chez moi.

A mon ancienne collocation et à ses pièces rapportées plus ou moins pérennes ; merci Benoît, Hugo et Rosalie, j'ai adoré vivre avec vous. Autant pour les craquantes que pour les lundis soir ; pour les quelques croisements de nos vies à l'aurore, et pour toutes les autres fois fortes inspirantes qui ne sauraient être suffisamment résumées pour être énoncées ici. Prenez soin de vous.

A ceux trouvés chez moi au détour d'occasions fort sympathiques, Rafael, Héléna, Cécile et Rémi (englober les familles Clément et Poichotte irait probablement plus vite). A Buch, Pierre-Michel, Gimbert, Nolwenn, Quentin, Cyril, Georges, Ramière, Cardin, Parfait, Louis-Marie, Michou, Anne-Héloïse, Laurène, Ducasse, Marina et tous les autres – principalement du coin navalais, des promos Jame et MGG, ainsi que de ma famille de tradition – que j'ai rencontrés en entrant à la « boîte ». Les valeurs de partage ne seront jamais bien loin.

A ceux de la famille @HP, Clémence et Mylène qui sont devenues des mères de substitution, de même que Pierre et Marie ; ainsi que Solène et tous mes BZH. Car le parrainage et l'entraide sont deux des plus belles valeurs qui soient.

A François, Jeanne, Lucie, Marine, Capucine, Claudia et tous ceux que j'ai connu à la fac de pharma, à l'AELPI et en filière ingé. A ceux avec qui je suis allé outre-Atlantique, Erwan et Léna. L'aventure était grande, les compagnons aussi. Je vous dois une bonne partie de mon jonc.

A l'Ecole de Santé des Armées,

Merci de m'avoir permis de rejoindre la grande famille @HP. Je n'aurais jamais pu espérer un meilleur chemin pour apprendre à me réinventer, et pour la liberté de choix que ce chemin m'accorde aujourd'hui.

A Liam,

Pour être un chat de toute beauté ayant su montrer l'étendue de sa profonde indifférence face à l'écriture de ce mémoire, et cela, tous les jours pendant plusieurs mois.

A la musique,

Et plus particulièrement, pour celle des groupes The Pretty Reckless, Dorothy, In This Moment, Paramore, Linkin Park, Nirvana, Powerwolf, Metallica, Halestorm, U2, System of a Down, Black Veil Brides, The Nearly Deads, Five Finger Death Punch, Bullet for my Valentine, Wind Rose, Gloryhammer, Brothers of Metal qui m'a accompagnée tout au long de mes études et de la rédaction de ce mémoire.

A sa défunte éminence le pape Clément VIII,

Bien qu'originaires d'Ethiopie, les premières cultures du caféier arabica furent retrouvées au Yémen et datées du règne de Soliman Le Magnifique. Aussi, il faut attendre le 15^{ème} siècle pour que la consommation du café se démocratise dans l'ensemble de l'empire Ottoman. Ce développement mena à son introduction en Europe par les commerçants italiens à partir du 17^{ème} siècle. Compte tenu de ses origines, une interdiction du café ne tarda pas à être demandée au pape Clément VIII. Celui-ci l'aurait refusée après avoir goûté le breuvage et estimé qu'une telle boisson ne pouvait être une hérésie. Cette décision aurait ainsi joué dans la diffusion du café en Europe et par extension au monde occidental actuel hérité de cette époque. (Source : Maison du café) L'histoire du café – complexe, emplies de rebondissements et extrêmement résumée ici – mène finalement à l'écriture de ce manuscrit qui n'aurait probablement jamais pu aboutir sans une consommation régulière de ladite boisson.

Table des matières

Liste des abréviations	4
Liste des figures	7
Liste des tableaux	8
Introduction	10
1 Fractionnement du plasma	11
1.1 Mise en place du fractionnement et situation mondiale actuelle.....	11
1.1.1 Développement historique du fractionnement	11
1.1.2 Aperçu du marché des produits dérivés du plasma et des moteurs du fractionnement.....	15
1.2 Approvisionnement de la matière première.....	18
1.2.1 Organisation de l’approvisionnement de plasma	18
1.2.2 Débats éthiques sur l’approvisionnement en plasma	20
1.2.3 Sélection des donneurs	20
1.2.4 Méthodes de collecte.....	21
1.2.5 Dépistage des dons	25
1.3 Description des procédés de fractionnement et de purification.....	27
1.3.1 Des procédés en évolution.....	27
1.3.2 Mise à disposition du plasma	28
1.3.3 Cryoprécipitation, fractionnement éthanolique et chromatographie.....	29
1.3.4 Formulation et conditionnement	35
1.4 Opérations d’inactivation virale	35
1.4.1 Evaluation des besoins en traitements viraux	35
1.4.2 Mesures de sécurisation biologique	36
1.4.3 Objectifs lors du développement de procédés de traitements biologiques.....	37
1.4.4 Description des procédés d’inactivation et d’élimination virale	39
1.5 Précisions sur l’environnement réglementaire	42

2	Intérêt du fibrinogène en clinique	45
2.1	Description de la protéine.....	45
2.1.1	Point historique	45
2.1.2	Production de fibrinogène, structure et caractéristiques	46
2.1.3	Physiologie de la coagulation et rôle du fibrinogène	48
2.1.4	Méthodes de mesure du fibrinogène	50
2.2	Pathologies congénitales associées au fibrinogène	54
2.2.1	Classification des déficits héréditaires du fibrinogène.....	54
2.2.2	Afibrinogénémie.....	57
2.2.3	Hypofibrinogénémie.....	58
2.2.4	Dysfibrinogénémie	59
2.2.5	Hypodysfibrinogénémie	61
2.2.6	Prise en charge des pathologies congénitales du fibrinogène	61
2.3	Pathologies acquises associées au fibrinogène.....	66
2.3.1	Coagulopathie induite par traumatisme.....	66
2.3.2	Hémorragie de la chirurgie cardiaque	68
2.3.3	Hémorragie du post-partum	69
2.3.4	Autres hémorragies périopératoires	70
2.4	Spécialités pharmaceutiques de fibrinogène.....	70
2.4.1	Options thérapeutiques de la supplémentation en fibrinogène.....	70
2.4.2	Les spécialités pharmaceutiques de fibrinogène à l'international.....	72
2.4.3	Les spécialités pharmaceutiques de fibrinogène en France	74
3	Analyse de l'impact du procédé de fabrication sur les spécialités pharmaceutiques de fibrinogène	77
3.1	Enjeux de la fabrication du fibrinogène	77
3.2	Comparaison des procédés de fractionnement et de purification du fibrinogène.....	77
3.2.1	Comparaison des méthodes d'approvisionnement du plasma pour le fractionnement.....	77

3.2.2	Présentation du procédé de production du Riastap®	79
3.2.3	Présentation du procédé de production du Fibryga®	83
3.2.4	Présentation du procédé de production du Clottafact®	87
3.3	Evaluation des différences entre les spécialités pharmaceutiques de fibrinogène	93
3.3.1	Comparaison de la composition biochimique des trois spécialités pharmaceutiques.....	93
3.3.2	Evaluation in vitro des fibrinogènes.....	96
3.3.3	Influence de la présence d'agrégats de fibrinogène dans les spécialités pharmaceutiques.....	100
3.3.4	Comparaisons cliniques des spécialités de fibrinogène	103
3.3.5	Comparaison des données biochimiques, des résultats in vitro, de l'influence structurelle des agrégats de fibrinogène et des études cliniques	105
3.4	Introduction de nouveaux procédés : intérêts et contraintes.....	114
	Discussion	116
	Conclusions	120
	Bibliographie.....	122
	Annexes.....	133
	Annexe A : Procédés de fractionnement historiques	133
	Annexe B : Procédés de fractionnement issus de la littérature	135
	Annexe C : Cadre légal de la production de MDS en Union Européenne tel que présenté dans la directive EMA/CHMP/BWP/706271/2010.....	139
	Annexe D : Caractéristiques des spécialités pharmaceutiques de fibrinogène présentes en France	141
	Annexe E : Résultats complémentaires des facteurs de réduction virale du Riastap®	142
	Annexe F : Résultats complémentaires d'analyses biochimiques.....	144
	Annexe G : Résultats d'analyses in vitro de comparaison de l'efficacité du Fibryga® et du Riastap® dans le traitement de la coagulopathie de dilution	146
	Annexe H : Données complémentaires pour l'influence de la présence d'agrégats de fibrinogène dans les spécialités pharmaceutiques	151

Liste des abréviations

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé

ARN : Acide RiboNucléotidique

ASC : Aire Sous la Courbe

ASMR : Amélioration du Service Médical Rendu

ATU : Autorisations Temporaires d'Utilisation

BDVD : Virus de la diarrhée virale bovine (*Bovine Viral Diarrhea Virus*)

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication

B19V : Parvovirus B19

CFT : Temps de formation du thrombus (*Clot Formation Time*)

CGR : Concentré de Globules Rouges

CPV : Parvovirus canin (*Canine ParvoVirus*)

CTSA : Centre de Transfusion Sanguine des Armées

DENV : Virus de la Dengue

EFS : Etablissement Français du Sang

EMA : Agence Européenne des Médicaments (*European Medicines Agency*)

ELISA : Test immuno-enzymatique (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)

FIBTEM[®] : Test thromboélastométrique (ROTEM[®]) basé sur la fibrine (*Fibrin-Based TromboElastoMetry test*)

FDA : Food and Drug Administration

FPA : Fibrinopeptide A

FPB : Fibrinopeptide B

HAV : Virus de l'hépatite A (*Hepatitis A Virus*)

HBV : Virus de l'hépatite B (*Hepatitis B Virus*)

HCV : Virus de l'hépatite C (*Hepatitis C Virus*)

HEV : Virus de l'hépatite E (*Hepatitis E Virus*)

HPP : Hémorragie du Post-Partum

HSV 1 : Virus de l'herpès simplex de type 1 (*Herpes Simplex Virus 1*)

HTLV : Virus T-lymphotrope humain (*Human T-Lymphotropic Virus*)

ICH : Conseil international d'harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement des médicaments à usage humain (*International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*)

IVIG : Immunoglobuline intraveineuse (*IntraVeinouse ImmunoGlobuline*)

LFB : Laboratoire français du Fractionnement et des Biotechnologies

MCF : Résistance maximale du thrombus (*Maximum Clot Firmness*)

MDS : Médicament(s) Dérivé(s) du Sang

n.a. : non applicable

NAT : Test d'acide nucléique (*Nucleic Acid Test*)

n.d. : non déterminé

NRC : Conseil de Recherches National – organisme des Etats-Unis (*National Research Council*)

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne (*Polymerase Chain Reaction*)

PDF : Produits de Dégradation de la Fibrine

PFC : Plasma Frais Congelé

PfF : Plasma pour le fractionnement, matière première (*Plasma for Fractionation*)

PMF : Plasma Master File

PNDS : Protocole National de Diagnostic et de Soins

PPV : Parvovirus Porcin (*Porcin ParvoVirus*)

PRV : Virus de la pseudo-rage (*PseudoRabies Virus*)

PSL : Produit Sanguin Labile

S/D : Traitement par Solvant/Détergent

SDRA : Syndrome de détresse respiratoire aiguë

SMR : Service Médical Rendu

SRAS : Syndrome Respiratoire Aigu Sévère

TACO : Surcharge circulatoire associée à la transfusion (*Transfusion Associated Circulatory Overload*)

TCA : Temps de Céphaline avec Activateur

TIC : Coagulopathie induite par traumatisme (*Trauma-Induced Coagulopathie*)

TnBP : Phosphate de Tri-n-Butyle

TP : Taux de Prothrombine

TQ : Temps de Quick

TRALI : Lésion pulmonaire aiguë liée à la transfusion (*Transfusion-Related Acute Lung Injury*)

TT : Temps de Thrombine

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

vMCJ : Variant de la Maladie de Creutzfeldt-Jacob

VZV : Virus varicelle-zona (*Varicelle-Zona Virus*)

WNV : Virus du Nil Occidental (*West Nil Virus*)

ZAC : Zone à Atmosphère Contrôlé

ZIKV : Virus Zika

Liste des figures

Figure 1 : Schéma du cycle de vie du plasma lors de l’approvisionnement (2).....	22
Figure 2 : Procédé de fractionnement du plasma de la fraction I à V (33)	31
Figure 3 : Mise en valeur de la place des opérations chromatographiques dans le fractionnement du plasma (10).....	34
Figure 4 : Molécule de fibrinogène (55)	46
Figure 5 : Schéma de la structure du fibrinogène selon les domaines D et E formés par les chaînes A α , B β et γ (48).....	47
Figure 6 : Schéma de la cascade de la coagulation (48).....	49
Figure 7 : Molécule de fibrinogène et polymérisation de la fibrine (53,60)	50
Figure 8 : Algorithme diagnostique des anomalies héréditaires du fibrinogène (56,73)	63
Figure 9 : Schéma de production Riastap [®] (96,100–102).....	79
Figure 10 : Schéma de production Fibryga [®] (105,108)	84
Figure 11 : Schéma de production Clottafact [®] (98,110)	89
Figure 12 : Electrophorèse d’une solution de Riastap [®] (gauche) et profils de 6 lots de Fibryga [®] par SE-HPLC (droite) (52,108).....	93
Figure 13 : Variation de la dispersion des profils de préparations de fibrinogènes par chromatographie sur gel filtration et influence sur l’épaisseur des fibres (121).....	101
Figure 14 : Chromatogrammes (exclusion par la taille) du Riastap [®] , du Fib1 et du Clottafact [®] (120)	102
Figure 15 : Mécanismes de formation de la fibrine à partir des fibrinogènes comportant des agrégats et sans agrégats	103
Figure 16 : Représentation des intervalles relatifs d’effet des MDS à partir de l’estimation A de la contribution relative d’une part des composants.....	111
Figure 17 : Représentation des intervalles relatifs d’effet des MDS à partir de l’estimation B de la contribution relative d’une part des composants.....	111

Figure 18 : Procédé Cohn-Onclay (4)	133
Figure 19 : Procédé Kistler-Nitschmann (4)	134
Figure 20 : Procédé de fractionnement standard pour la production de protéines thérapeutiques (3)	135
Figure 21 : Procédé de fractionnement (5,10).....	136
Figure 22 : Procédé issu du Protein Fractionation Centre du Scottish National Blood Transfusion Service (2)	137
Figure 23 : Procédé de fractionnement du LFB en 2021 (110).....	138
Figure 24 : Analyse de la structure des fibrines des trois fibrinogènes (nombre de protofibrilles à gauche, densité des fibres à droite et rayon des fibres en bas) (120)	152

Liste des tableaux

Tableau 1 : Utilisation clinique des protéines issues du plasma (6,8,11).....	14
Tableau 2 : Compositions des fractions I à V du fractionnement éthanolique à froid du plasma (2,33,34)	33
Tableau 3 : Classification des déficits héréditaires du fibrinogène (47,72)	56
Tableau 4 : Utilisations thérapeutiques en France pour les différentes spécialités pharmaceutiques (83,84)	74
Tableau 5 : Réduction de la charge virale lors de la fabrication du Riastap [®] (106)	82
Tableau 6 : Réduction de la charge virale lors de la fabrication du Fibryga [®] (96,105,108)....	86
Tableau 7 : Réduction de la charge virale lors de la fabrication du Wilfactin [®] pour indication des performances du procédé Clottafact [®] (110).....	92
Tableau 8 : Quantités et activités mesurées des composants d'une dose de 3 g de produit fini après remise en solution (116)	95
Tableau 9 : Résultats thromboélastométriques sur des échantillons de sang de patient en chirurgie cardiaque après supplémentation par placebo ou fibrinogène (Fibryga [®] , Riastap [®] , ou Clottafact [®]) (119).....	99
Tableau 10 : Ecart des valeurs expérimentales aux valeurs de référence à partir des 23 échantillons expérimentaux remis en solution présentés dans l'article de Stolt et al (119)...	106

Tableau 11 : Interprétation de la contribution relative positive ou négative de chaque composant sur l'effet des MDS à partir des données de la littérature (116)	109
Tableau 12 : Estimation de la contribution relative positive ou négative d'une part des composants sur l'effet des MDS à partir des données issues de la littérature (60,116)	110
Tableau 13 : Réglementation spécifique aux médicaments dérivés du sang ou du plasma humain, en plus de la réglementation générale pour les médicaments biologiques (44)	139
Tableau 14 : Caractéristiques des spécialités pharmaceutiques de fibrinogène présentes en France (56)	141
Tableau 15 : Réduction de la charge virale lors de la fabrication du Riastap [®] (97)	142
Tableau 16 : Réduction de la charge virale lors de la fabrication du Riastap [®] (101)	143
Tableau 17 : Concentrations et activités mesurées des composants d'un flacon remis en solution (116)	144
Tableau 18 : Comparaison des valeurs issues de Neisser et al (116) et adaptées à celles présentées par Schulz et al (108) pour le ratio des quantités et activités mesurées des composants du Fibryga [®] par rapport à la quantité de protéines de la coagulation	145
Tableau 19 : Dilution avec la solution d'hydroxyéthylamidon (117)	146
Tableau 20 : Dilution avec la gélatine (117)	147
Tableau 21 : Dilution avec l'albumine (117)	148
Tableau 22 : Dilution avec le solution d'acétate de Ringer (117)	149
Tableau 23 : Comparaison des mesures de coagulation des échantillons patients avant et après dilution et comparaison des mesures de coagulation après supplémentation in vitro en fibrinogène en normalisant (a.p.) ou non (a.n.) l'activité du fibrinogène par rapport à la concentration respective du fibrinogène dans chacune des spécialités (118)	150
Tableau 24 : Composition du Clottafact [®] (FibWoA) et du Fib1 (FibWA) (60)	151
Tableau 25 : Paramètres pharmacocinétiques de l'activité du fibrinogène (range médian) de trois spécialités de fibrinogène issus de la littérature (69)	153
Tableau 26 : Efficacité des spécialités pharmaceutiques de fibrinogène dans les déficits héréditaires du fibrinogène (69)	154
Tableau 27 : Données de sécurité des spécialités pharmaceutiques de fibrinogène dans le traitement de déficits héréditaires du fibrinogène (69)	155

Introduction

L'industrie du fractionnement représente un marché de niche des produits biopharmaceutiques. Elle n'a cessé de se développer depuis les années 1940 afin de mieux répondre aux besoins thérapeutiques associés à ses spécialités pharmaceutiques, notamment les médicaments dérivés du sang (MDS). Dans les avancées que le fractionnement a permises, citons parmi d'autres, la purification des facteurs de la coagulation comme le fibrinogène (ou facteur I de la coagulation). L'étude de ces protéines est liée par la même occasion à de meilleures méthodes de purification mais aussi à de meilleures utilisations en clinique. Il pourra donc être intéressant de mettre en parallèle les procédés de fractionnement des facteurs de la coagulation et l'impact de ces derniers sur la protéine d'intérêt ; car comme le dit une philosophie associée au fractionnement : *le produit est défini par le procédé*.

Ce travail propose de présenter dans une première partie les enjeux du fractionnement : de son développement historique au marché international actuel lié à l'industrie du fractionnement. De même, une présentation des méthodes de production sera réalisée depuis l'approvisionnement en plasma aux procédés de purification des protéines d'intérêt, sans omettre les procédés d'élimination et d'inactivation virale ainsi que les aspects réglementaires. Une seconde partie se concentrera sur l'utilisation clinique du fibrinogène en France, plus particulièrement sur les pathologies héréditaires ainsi que sur ses domaines d'application en pathologies acquises associées au fibrinogène. A noter que seule l'utilisation des spécialités pharmaceutiques de fibrinogène sera abordée. Ainsi, une dernière partie permettra l'analyse des trois procédés de production du fibrinogène, associés aux médicaments dérivés du sang présents en France – Riastap[®], Fibryga[®] et Clottafact[®] – comparativement aux résultats des analyses biochimiques et d'activités protéiques, ainsi que des études in vitro et des études cliniques réalisées sur les produits finis. Bien que le fibrinogène entre également dans la composition des colles biologiques produites par fractionnement du plasma, ces dernières seront exclues de nos analyses comme de la partie clinique.

1 Fractionnement du plasma

1.1 Mise en place du fractionnement et situation mondiale actuelle

1.1.1 Développement historique du fractionnement

De la nécessité de l'albumine en temps de guerre...

Selon les observations faites pendant la Grande Guerre de 1914-1918, 80 % des décès sur le champ de bataille étaient le résultat de la perte de sang plutôt que l'effet direct du projectile. Ainsi, en 1918 il fut préconisé de favoriser l'utilisation du plasma sanguin au combat au lieu du sang total (1). Celle-ci permettrait notamment d'éliminer les risques associés à la transfusion de sang total et de simplifier la logistique de stockage, de transport et d'administration (1). C'est pourquoi, l'utilisation d'albumine – responsable de 80 % de la pression osmotique colloïdale du plasma – a été mise à l'honneur pour servir de fluide de réanimation efficace sur le champ de bataille (2,3). En réponse à ces besoins, les innovations scientifiques et technologiques de Edwin J. Cohn et de ses nombreux collègues de la Harvard Medical School ont marqué l'histoire en posant les bases du fractionnement du plasma (1,4).

« Il a récemment semblé important de normaliser une méthode, pouvant être employée pour des préparations à grande échelle, pour la séparation du plasma en autant de protéines que possible », écrivit Cohn en 1940 (1). Cette même année, il mit au point plusieurs procédures permettant alors d'obtenir environ 50 g d'albumine à partir de 2 L de plasma (1). Si une première procédure s'appuie sur des précipitations successives par l'ajout de sulfate d'ammonium à travers des membranes et en utilisant un pH, une force ionique et une température contrôlée ; la seconde repose sur des conditions soigneusement contrôlées de concentration d'éthanol, de pH, de température, de concentration de protéines et de force ionique (1,3–5). Toutefois, les premières préparations d'albumine – dérivées des plasmas équin et bovin – se sont avérées particulièrement immunogènes lorsqu'elles furent injectées pour la première fois à des prisonniers volontaires (2,5). L'attention s'est par conséquent davantage portée sur la production d'albumine humaine qui avait été développée en parallèle pour la préparation d'une solution stable et physiologiquement acceptable (1,2).

... Aux prémices du développement industriel...

Les études à plus grande échelle du fractionnement du plasma par les équipes d'Harvard nécessitaient l'accès à usine pilote pour l'optimisation des procédures de fractionnement. En

effet, si le premier fractionnement du plasma humain a été effectué avec succès par Armstrong en août 1940 au laboratoire de Harvard ; l'albumine humaine produite n'était toujours disponible qu'à l'échelle du laboratoire au premier semestre 1941 (1). Cet accès fut permis grâce au laboratoire Armour en 1941 qui fit construire une installation d'une capacité de 40 litres par lot pour les universitaires (1,5). Ainsi, le premier lot d'albumine provenant de l'usine pilote fut mis en circulation le 9 juillet 1941 pour un usage clinique sous forme de bouteilles de 100 ml de solution à 25 % (1).

Le 7 décembre 1941, date de l'attaque de Pearl Harbor, l'ensemble des flacons d'albumine humaine disponibles dans l'usine pilote de Harvard sont envoyés en urgence à Hawaï pour participer au traitement des blessés de la base navale (2). Le rapport du professeur de chirurgie Ravdin, qui utilisa le traitement expérimental d'albumine sur sept patients, fait état d'une amélioration clinique rapide de l'ensemble des blessés (1). Cette première utilisation ouvre de ainsi la voie à une recommandation de l'albumine pour un usage clinique officiel aux chirurgiens généraux de l'armée et de la marine le 5 janvier 1942 (1).

Il conviendra alors d'assurer au lecteur que les recherches de cette époque ne furent pas uniquement portées sur la purification, les propriétés et l'utilisation de l'albumine. En outre, les immunoglobulines et les protéines de la coagulation ne firent pas exception ; menant à la suite de l'albumine, à la recommandation aux forces armées le 22 mars 1943 de l'utilisation clinique de l'immunoglobuline sérique humaine (1).

... Avant son transfert dans le monde civil...

Le 5 janvier 1942, sept contrats furent établis entre le NRC (*National Research Council*) – organisme faisant alors autorité aux Etats-Unis sur la question du fractionnement – et Armour, Lederle, Upjohn Co., Eli Lilly Laboratories, E.R. Squibb, Cutter Laboratories, et Sharp and Dohme ; permettant à ces entreprises de devenir les premiers fractionneurs commerciaux (1,2). A noter qu'aux États-Unis, le fractionnement du plasma est essentiellement considéré comme une activité commerciale normale parmi les autres secteurs pharmaceutiques au sortir de la guerre et jusqu'à aujourd'hui (2). En collaboration avec les fractionneurs, la Croix-Rouge Américaine institua en 1944 un programme visant à mettre les surplus d'immunoglobulines sériques destinées à la prévention de la rougeole à la disposition des citoyens américains au prix coûtant (1). Cette initiative a marqué une étape importante dans la fourniture de produits plasmatiques à usage civil (1).

De son côté, Cohn, comprenant que les méthodes précédemment publiées avaient été développées sous le stress de la guerre, continuera ses recherches sur des méthodes de précipitation à base d'éthanol. En 1950 – trois ans avant sa mort – il publie la méthode 10, conçue pour être applicable à toute échelle de quelques millilitres à des milliers de litres de plasma (1). C'est toutefois la méthode 6 – revue par Oncley en 1949 – qui est généralement citée comme référence originale (1). La méthode dite Cohn-Oncley ainsi que celle de Kistler et Nitschmann, proposée en 1962, sont les plus reconnues à ce jour (3–5) (voir Annexe A). En effet, ces procédés constituent le pilier de la plupart des procédés de fractionnement modernes, bien qu'ils aient subi des modifications – notamment par le développement de chromatographies (voir Annexe B) – pour purifier des protéines individuelles, inactiver des agents infectieux ou encore améliorer les rendements protéiques (3,5). A ce titre, CSL Behring est unique dans son adoption d'un schéma de fractionnement s'écartant de celui proposé par Cohn et Oncley. Ainsi en 1994, la société a ouvert une nouvelle installation s'appuyant sur la chromatographie, et disposait en 2000 d'un portefeuille de produits basés sur l'utilisation de cette dernière (6).

... Et son expansion d'après-guerre

Dans la plupart des autres pays, le traitement du plasma a été entrepris par une branche locale de la Croix-Rouge ou des services de transfusion sanguine qui ont vu le jour après la Seconde Guerre mondiale (2). Dans ces organisations, le fractionnement du plasma fait généralement partie d'une opération plus vaste visant à fournir du sang total, des composants sanguins et des services médicaux spécialisés sur une échelle nationale (2). Ces différentes approches ont entraîné le développement de deux secteurs distincts dans l'industrie du fractionnement du plasma, à savoir un secteur commercial basé généralement sur la rémunération de donneurs et un secteur non commercial plutôt associé à l'utilisation de dons non rémunérés (2,7).

Aujourd'hui, plus de 25 produits protéiques plasmatiques sont extraits du plasma pour un usage thérapeutique (8). Parmi eux, le facteur VIII, le facteur IX, les immunoglobulines, les IgG anti-Rh, les IgG antitétaniques et les IgG antirabiques figurent sur la liste des médicaments essentiels de l'OMS (9). A noter également que les principaux produits générés à partir du plasma sont l'albumine, l'immunoglobuline (IgG) et les concentrés de facteurs de coagulation (avec en tête de ceux-ci le facteur VIII, le facteur IX et l'antithrombine III) (4,10). Cependant, de nouveaux produits continuent d'apparaître à mesure que les fonctions et les valeurs thérapeutiques d'autres protéines plasmatiques sont identifiées (4,10).

Tableau 1 : Utilisation clinique des protéines issues du plasma (6,8,11)

Protéine	Utilisation clinique
Facteur I	Déficit acquis et congénital (voir 2. Intérêt du fibrinogène en clinique)
Colles biologiques	Colle pour tissus pour faire adhérer les tissus sous-cutanés en chirurgie et renforcer les sutures vasculaires ou les anastomoses gastrointestinales
	Traitement adjuvant de l'hémostase sur les surfaces tissulaires sous-cutanées
Facteur II	Déficit en facteur II
Facteur V	Déficit en facteur V
Facteur VII	Déficit en facteur VII
Facteur IX	Hémophilie B
Facteur X	Déficit en facteur X
Facteur XI	Déficit en facteur XI
Facteur XIII	Déficit en facteur XIII
Facteur de von Willebrand	Phase initiale de la maladie de von Willebrand chez les patients avec un taux de facteur VIII bas quand le traitement par la desmopressine est inefficace ou contre-indiqué
Facteur VIII	Hémophilie A
Facteur de von Willebrand/Facteur VIII	Traitement préventif et curatif des hémorragies dans la maladie de von Willebrand quand le traitement seul par la desmopressine est inefficace ou contre-indiqué
Complexe prothrombique	Traitement des saignements et prophylaxie péri-opératoire des accidents hémorragiques lors d'un déficit acquis ou congénital en facteurs de coagulation du complexe prothrombique
	Traitement des hémorragies menaçant le pronostic vital ou en cas de chirurgie urgente des patients traités par anticoagulants oraux directs
Complexe prothrombique activé	Traitement et prévention des hémorragies et en situation chirurgicale du déficit en facteur VIII avec un inhibiteur contre le facteur VIII
	Traitement et prévention des hémorragies chez les patients avec hémophilie acquise par auto-anticorps anti-facteur VIII
	Traitement et prévention des hémorragies du déficit en facteur IX avec un inhibiteur contre le facteur IX et en cas d'échec de traitement par le facteur VIIa
Albumine	Restauration et maintien du volume sanguin après un traumatisme, chez le brûlé grave, chez la femme enceinte en pré-éclampsie, ou en cas d'hypoalbuminémie profonde
IGIV	Traitement substitutif en cas de déficit immunitaire primitif ou secondaire.
	Traitement immunomodulateur
IgG hyperimmun	Prévention ou traitement des infections (hépatite B, hépatite A, tétanos, rage, VZV)

Anti-Rh	Prévention de la maladie hémolytique du nouveau-né
Antithrombine	Traitement du déficit constitutionnel et du déficit acquis sévère en prévention des thromboses veineuses et en traitement des accidents thrombo-emboliques
Alpha-1-antitrypsine	Traitement substitutif de des formes graves de déficit primitif avec emphysème pulmonaire
	Traitement d'entretien du déficit sévère et documenté afin de ralentir la progression de l'emphysème pulmonaire
Inhibiteur de la C1-estérase	Traitement des crises et préventif avant intervention chirurgicale des angioœdèmes
Protéine C	Déficit constitutionnel sévère responsable d'une thrombose veineuse sévère et massive et de l'adulte lors du relais héparine/antivitamine K pour éviter la nécrose cutanée
	Prévention de la thrombose en cas de chirurgie ou de césarienne, en cas d'inefficacité du traitement héparine/antivitamine K

Bien que les produits thérapeutiques dérivés du plasma représentent une niche spécifique sur le marché biopharmaceutique ; ils permettent non seulement à de nombreuses personnes de conserver leur qualité de vie tout en faisant face à des affections graves comme l'hémophilie, les déficiences immunitaires et les maladies auto-immunes mais aussi de sauver des vie dans certains cas d'urgence (7).

1.1.2 Aperçu du marché des produits dérivés du plasma et des moteurs du fractionnement

Deux secteurs industriels distincts pour peu d'acteurs internationaux

Issu d'un large éventail d'organisations commerciales et d'organisations soutenues par les États dans les années 1970, le marché du fractionnement est actuellement dominé par trois acteurs internationaux qui détiennent la majorité des parts de marché : Grifols, CSL Behring et Baxter (1,6,7,12). Ensemble, CSL et Grifols représentent approximativement 45 % des revenus du marché (13). Un deuxième groupe d'entreprises participe également au dynamisme du marché ; il s'agit d'Octapharma, Kedrion, Biotest, Shire, BPL et du LFB (12–14).

Comme énoncé précédemment, ce marché est scindé entre deux secteurs industriels, le secteur à but non lucratif et le secteur commercial (7). Il existait en 2013, 78 usines de fractionnement dans le monde dont 53 installations commerciales (7). La capacité globale de fractionnement était alors estimée à plus de 40 millions de litres (1,12). En effet, les structures à but non lucratif

ont des capacités réduite (entre 100 000 et 600 000 litres par an, à l'exception de la Croix-Rouge japonaise et du LFB en France qui ont des capacités supérieures) comparativement aux fractionneurs commerciaux (de 4 à 6 millions de litres de plasma fractionné en 2011) (1). A titre de référence, la première usine à l'échelle industrielle d'Armor, avait la capacité de traiter environ 100 000 litres de plasma par an en 1943 (1). Ajoutons par ailleurs que le marché est marqué par une disparité géographique profonde des usines de fractionnement entre les pays développés et les pays en voie de développement (15).

Remaniement et consolidation de l'échiquier des acteurs économiques

Au cours de son histoire, l'industrie de fractionnement du plasma s'est révélée être remarquablement dynamique et résiliente pour s'adapter aux défis rencontrés ; qu'il s'agisse de problèmes viraux (VIH, VHC), de préoccupations liées aux prions, d'une offre excédentaire ou encore de la concurrence des produits recombinants (7,12). Ces événements et leurs impacts financiers ont en outre contribué à promouvoir la consolidation des acteurs clés, guidés par des besoins d'économie d'échelle et de rationalisation de la production (12,15). Cette consolidation s'est traduite essentiellement par des acquisitions ou des fusions au profit des acteurs du secteur commerciale ; réduisant par la même occasion le nombre d'acteurs (15). Citons par exemple le rachat des activités d'Aventis et d'Alpha Therapeutics par Grifols ou bien de Bayer par Talecris (15). Pour les mêmes raisons, les grands fractionneurs ont mené une politique d'intégration verticale avec l'acquisition d'organisations de collecte de plasma (7). Ainsi, ces derniers collectent actuellement 90 % du plasma mondial (7).

Si le marché tend à favoriser les grandes structures, ces dernières s'avèrent également mieux armées pour construire leur stratégie de production à l'échelle des installations individuelles et faire face aux principales barrières que sont les normes qualités, les contraintes réglementaires, la logistique intégrée, et des investissements élevés pour des marges étroites (3,7). La production est régit par *l'économie du dernier litre* qui tend au besoin de diversification des produits (15). En outre, la part du plasma (de l'ordre de 100 euros le litre) dans le coût des produits finis – environ 45 % – ainsi que les coûts de production, poussent les fractionneurs à extraire le maximum de protéines du plasma afin d'assurer la viabilité économique de l'installation de fractionnement (7,12,15). Le revenu total de l'installation de fractionnement dépend alors à son tour de la demande du marché pour les produits auxquels l'usine doit s'adapter (12). Ainsi, les capacités et le débit des usines sont essentiellement définis en fonction

des principaux produits que sont l'immunoglobuline intraveineuse (IVIG) en premier lieu, suivi par l'albumine et le facteur VIII (2).

Taille du marché mondial, moteurs et contraintes économiques

La taille du marché mondial du fractionnement du plasma est estimée à environ 25 milliards US\$ en 2019 et 29 milliards US\$ en 2020 et devrait atteindre un chiffre compris entre 40 et 50 milliards US\$, selon les sources, à l'horizon de 2025 (13,14).

Si l'albumine était le moteur initial du fractionnement ; le traitement efficace des patients hémophiles à l'aide du facteur VIII ont entraîné une augmentation incroyable des activités de fractionnement et de la demande en plasma à la fin des années 1970 (16). Depuis les années 1990, les IVIG sont le moteur du marché des produits plasmatiques. Elles déterminent la quantité de plasma nécessaire et dictent la demande qui devrait encore augmenter au cours des prochaines années (7,13,14,16). Notons par ailleurs que l'OMS a inscrit les facteurs de coagulation et les immunoglobulines sur la liste des médicaments essentiels (7).

Par opposition, le coût élevé des produits plasmatiques, les remboursements limités et l'émergence d'alternatives recombinantes devraient freiner la croissance de ce marché dans les années à venir (14). De même, les réglementations strictes relatives à l'installation de fabrication et à la source de sang total peuvent freiner la croissance du marché, notamment dans les pays en voie de développement (13,15).

Le marché en France

En France, des raisons de sécurités sanitaires ont conduit à une rationalisation importante des activités (1,9). Ainsi, dans les années 1990, les centres régionaux responsables de la production des produits dérivés du plasma ont été remplacés par un "Groupement d'Intérêt Public", le LFB (1,9,17,18) (voir 1.2.1. Organisation de l'approvisionnement de plasma). Ce dernier est devenu en 2005 une société anonyme dont l'État est le principal actionnaire (1,9,17,18). A noter que sa création, par l'article 6 de la loi 93-5 du 4 juillet 1993, prévoyait que seul le LFB puisse préparer des MDS à partir du plasma collecté par l'EFS, justifiant notamment la place actuelle de leader du LFB dans le marché français du fractionnement (9,17-20). En 2011, le marché français de 575,8 millions € se partageait entre le LFB (58,8 % de part de marché), CSL Behring (18,3 %), Baxter (16,6 %), Octapharma (5,5 %) et Nycomed Pharma (0,8 %) (16). Ce marché représente le traitement annuel d'environ 500 000 personnes (9).

1.2 Approvisionnement de la matière première

1.2.1 Organisation de l'approvisionnement de plasma

Distinction entre PSL et MDS

Le plasma issu du sang humain peut être valorisé selon deux façons distinctes (9,10,19). Il peut tout d'abord être utilisé comme un produit thérapeutique à part entière – appelé plasma clinique ou plasma frais congelé (PFC) – qui appartient alors à la famille des produits sanguins labiles (PSL) (9,10,19). Le plasma est également la matière première pour la production de produits plasmatiques (ou dérivés du plasma), ces derniers correspondent aux médicaments dérivés du sang (MDS) (9,10,19). Il est évident que le plasma thérapeutique et les dérivés plasmatiques ne peuvent être obtenus qu'à partir de donneurs humains (9,16). Le plasma est par conséquent une ressource limitée qui devra être partagée entre les deux options PSL et MDS (9,16). Si l'approvisionnement est exclusivement national pour les PSL, il existe en revanche un marché international pour les MDS (9,19).

D'un point de vue légal, la directive européenne 89/381/CEE indique que les produits issus du fractionnement du plasma sont des "médicaments" (9,21). Pour cette raison, les MDS nécessitent une procédure d'AMM avec des critères de qualité, de sécurité et d'efficacité précisés par la directive 2001/83/CE actuellement en vigueur (9,22). Par opposition, les PSL ne sont pas concernés par cette disposition dans la législation française, mais par la loi 98-535 du 1^{er} juillet 1998 et entrent par conséquent dans le monopole de l'EFS (9,23). Notons toutefois que la séparation entre MDS et PSL au niveau européen peut être plus floue qu'elle n'y paraît, en témoigne l'affaire Octaplas[®] dans la qualification du PFC, portée devant la Cour européenne de justice par le laboratoire Octapharma (16). Le véridique de la Cour européenne porte ainsi sur l'interprétation de la directive 2002/98/CE du Parlement européen et du Conseil du 27 janvier 2003 (relative à l'établissement des normes de qualité et de sécurité pour la collecte, le contrôle, la transformation, le contrôle, la transformation, la conservation et la distribution du sang humain et des composants sanguins) sur la description d'un MDS dans le sens où « le plasma préparé par une méthode impliquant un procédé industriel à un régime plus rigoureux que celui auquel sont soumis les médicaments pour ce qui concerne uniquement sa collecte et son contrôle », permettant par conséquent de caractériser l'Octaplas[®] comme un MDS et non un PSL (16,24).

La collecte de plasma, une première étape de fabrication à part entière

Dans le cas du fractionnement, la collecte de plasma est la première étape de la fabrication de produits plasmatiques fractionnés (25). En outre, les pratiques utilisées peuvent être directement responsables du profil de sécurité des MDS ainsi que de l'efficacité (par l'intermédiaire des rendements) et de la fiabilité (par l'absence de protéases) du procédé de fractionnement (8,10,25). Il semble alors logique que la collecte de plasma soit considérée comme faisant partie intégrante de la fabrication des produits dérivés du plasma (8,10,26). Rappelons d'ailleurs à ce titre que les fractionneurs sont légalement responsables de la conformité des méthodes de collecte et de la qualité du plasma, car détenteurs de l'AMM des produits fabriqués à partir du plasma collecté (8). Cette responsabilité est directe si les fractionneurs collectent le plasma ou indirecte s'ils achètent leur matière première à un fournisseur (8). Une licence devra néanmoins être accordée aux établissements produisant du plasma destiné au fractionnement par l'autorité réglementaire nationale compétente (8,26).

Les fractionneurs européens auront quant à eux l'obligation réglementaire de définir précisément l'origine et les caractéristiques du plasma utilisé pour le fractionnement – depuis la collecte jusqu'au pool de plasma, ainsi que les accords contractuels passés avec les collecteurs de plasma – dans un document spécifique dénommé Plasma Master File (PMF) (8,10,15,27,28). Ce dernier permet de donner une assurance sur la qualité et la sécurité de la matière première (8,15,27). A ce titre, le PMF est nécessaire dans les procédures de demande d'AMM en UE (8,27).

Principaux acteurs de la filière de production des PSL et MDS en France

En France, comme l'indique l'article L. 5124-14 du Code de la santé publique français sur l'acquisition et la fabrication du plasma, l'EFS a le monopole de la collecte de sang, de plasma et de plaquettes ainsi que le monopole de la commercialisation des produits sanguins labiles aux établissements de santé (9,16,18,19,29). De plus, le LFB fractionne le plasma acheté à l'EFS, commercialise ses produits sur un marché concurrentiel de trois classes de médicaments dérivés du sang (albumine, immunoglobuline et facteurs de coagulation), et a également pour mission de répondre aux besoins nationaux, notamment en termes de traitement des maladies rares (9,19) (voir 1.1.2. Aperçu du marché des produits dérivés du plasma et des moteurs du fractionnement). Il est par ailleurs tenu de réaliser des audits pour s'assurer de la conformité du plasma fourni par l'EFS (9,19). L'ANSM est l'autorité compétente en matière de sécurité sanitaire des produits sanguins labiles et des médicaments dérivés du sang, en particulier pour

l'hémovigilance, en lien avec les Agences Régionales de Santé (9,19). L'ANSM est également responsable de la délivrance d'AMM françaises pour les procédures nationales et par reconnaissance mutuelle (9). Elle participe enfin activement aux procédures centralisées dans le cadre d'AMM gérées par l'EMA et délivrées par la Commission européenne (9). A noter qu'outre les MDS préparés à l'aide de méthodes biotechnologiques (chromatographie d'affinité reposant sur des anticorps monoclonaux), les dérivés du plasma ne sont pas nécessairement soumis à la procédure d'enregistrement centralisée, le choix étant laissé à la discrétion de l'organisme initiant la procédure (9).

1.2.2 Débats éthiques sur l'approvisionnement en plasma

La France est l'un des rares pays à avoir affirmé très tôt dans sa législation – loi numéro 52-854 du 21 juillet 1952 – le principe de don de sang volontaire et bénévole (1,17,30). En effet, cette ouverture sur un « don du sang éthique » est fortement lié aux principes de non-propriété et de non-commercialisation du corps humain et de ses produits qui sont d'ailleurs repris dans les lois de bioéthique (18,19). Aussi, la pratique actuelle d'approvisionnement du plasma en France a hérité de ces engagements puisqu'elle repose sur les valeurs d'altruisme, de bénévolat, d'anonymat et d'absence de profit (18).

Toutefois, ces valeurs ont généré un conflit, en France et dans les autres pays qui les avaient adoptées, lorsque des produits plasmatiques commerciaux ont commencé à être fabriqués à partir de dons volontaires rémunérés (1,19). En Europe, l'Allemagne, le Royaume-Uni et l'Autriche prévoient encore la rémunération de certains types de dons, au même titre qu'aux Etats-Unis (1,18,26). A noter que l'OMS, l'Union Européenne et le Conseil de l'Europe encouragent les dons volontaires et non rémunérés de sang et de plasma (1,16,18).

Si la collecte de plasma en France repose sur des postulats éthiques, elle doit également faire face de façon pragmatique à une demande croissante de dérivés du plasma (17).

1.2.3 Sélection des donneurs

Les donneurs admissibles au don de plasma pour le fractionnement sont des personnes qui rencontrent les critères de don, que sont notamment l'âge et la fréquence des dons (10). Ils doivent par ailleurs ne pas présenter de facteurs de risque d'agents infectieux transmis par le sang (10). Pour cela, les candidats au don reçoivent du matériel éducatif et sont soumis à un entretien médical afin d'établir l'absence de risques ou de signes d'infections et de prouver la conformité du don de plasma en vue de son fractionnement (10).

Seuls les candidats qui ont été testés à plusieurs reprises comme non réactifs aux agents pathogènes transmissibles par le sang et qui ont passé avec succès la procédure d'entretien médicale pourront donner leur plasma pour qu'il soit fractionné (31). De ce fait, le plasma des primo-donneurs est exclu afin d'éviter les contributions de personnes susceptibles d'être porteuses d'une infection à un stade précoce, dont les niveaux plasmatiques pourraient être trop faibles pour être détectés lors de leur premier don (31). En outre, la proportion de donneurs positifs aux tests sérologiques et au NAT pour le VIH, le HCV et le HBV est environ 10 fois plus élevée chez les primo-donneurs comparativement aux donneurs répétés (31). Cette procédure induit donc une réduction d'environ un \log_{10} de la charge virale (31).

A noter que dans la plupart des situations, les critères d'admissibilité des donneurs de sang total et des donneurs d'aphérèse se recoupent, à l'exception de la fréquence des dons qui est plus élevée pour les donneurs de plasmaphérèse (10). Par ailleurs, des critères spéciaux peuvent exister pour la collecte de plasma hyperimmun, qui sera utilisé pour fabriquer des IgG hyperimmuns (10). Ces dernières impliquent alors des procédures d'immunisation des donneurs ainsi qu'un titre minimal d'anticorps requis pour la réalisation du don (10).

La surveillance épidémiologique continue de la population des donneurs est généralement exigée pour assurer une sécurisation biologique fiable des MDS (voir 1.4.2. Mesures de sécurisation biologique) (10). Elle permet d'établir la prévalence, l'incidence et les tendances des marqueurs infectieux connus dans la population (10). Citons à ce titre les anticorps anti-VIH 1 et 2, les anticorps anti-HCV et l'antigène de surface de l'hépatite B (AgHBs) (10). La surveillance épidémiologique permet également la détection précoce des maladies émergentes et par conséquent de mettre en place rapidement des mesures de lutte appropriées en cas de besoin (10).

1.2.4 Méthodes de collecte

Deux méthodes de collecte

Le plasma, matière première des médicaments dérivés du plasma et des produits sanguins labiles, est obtenu à partir de deux méthodes de collecte : l'aphérèse automatisée et la centrifugation des dons de sang total (2,9,32). Il sera appelé respectivement plasma source, lorsqu'il est collecté par aphaérèse ; et plasma récupéré, lorsqu'il est séparé des composants cellulaires d'un don de sang total (2,8,15,27,32). Aussi, le plasma récupéré à partir du sang total et le plasma source peuvent tous deux être fractionnés (8,15,25). A noter cependant que le plasma source constitue la majorité du plasma – de l'ordre de 80 % – utilisé dans la fabrication

de dérivés du plasma (32). Il est intéressant de remarquer que certains pays, comme la Chine, n'autorisent que le plasma source pour le fractionnement (15).

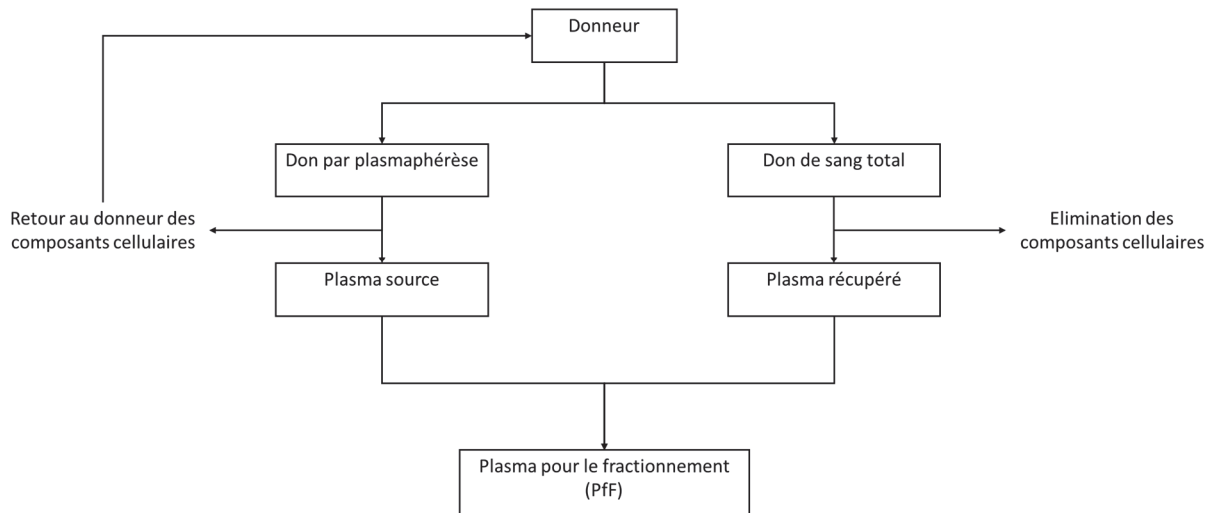


Figure 1 : Schéma du cycle de vie du plasma lors de l'approvisionnement (2)

Le volume mondial de plasma utilisé pour le fractionnement n'a cessé d'augmenter depuis les débuts de cette industrie, pour atteindre une valeur actuelle estimée entre 42 et 45 millions de litres (d'après le Marketing Research Bureau) (8). Si le volume de plasma source varie dans le temps, celui du plasma récupéré est essentiellement resté stable, car il découle de la demande de composants sanguins labiles à durée de vie relativement courte comme indiqué précédemment (16). Toutefois, comme le souligne la déclaration du Consensus de Dublin : « Les besoins des patients doivent déterminer la collecte optimale de sang et de plasma » (16).

Opérations spécifiques à la collecte du plasma par aphérèse

La plasmaphérèse consiste à collecter le sang du donneur, et séparer le plasma des composants cellulaires par centrifugation ou filtration (ou une combinaison de ces deux options) (10). Les globules rouges sont retournés au donneur, tandis que le plasma est collecté dans un récipient (poche plastique ou bouteille) en utilisant du citrate de sodium à 4 % comme anticoagulant (10,32). La durée typique d'une plasmaphérèse dépend du nombre de cycles opérés – et par conséquent du volume de plasma collecté – et s'étend généralement sur 35 à 70 minutes (10). De même, le volume de plasma issu de cette technique peut varier de 450 à 880 ml en fonction de la réglementation et du protocole de collecte du pays (8,10). Notons que le plasma d'aphérèse peut également être obtenu comme sous-produit de la plaquettaphérèse, qui est une méthode permettant de produire des concentrés de plaquettes (PSL) (10).

Le plasma source destiné uniquement à la récupération de protéines qui ne sont pas labiles est congelé par refroidissement rapide dans une chambre à -20 °C ou moins dès que possible et au plus tard dans les 24 heures suivant le prélèvement (32).

Opérations spécifiques de la collecte de plasma à partir de sang total

Un don de sang total correspond à un volume de 400 à 450 mL – dépendamment de l'hématocrite du donneur – collecté directement dans une poche (10). Quelques heures après le don, le sang total est soumis à une centrifugation pour séparer les éléments cellulaires (plus particulièrement les globules rouges) du plasma (10).

Le plasma issu d'un don de sang total destiné uniquement à la récupération de protéines non labiles est congelé dans une chambre à -20 °C ou moins dès que possible et au plus tard dans les 72 heures suivant le prélèvement (32).

Opérations communes aux deux méthodes lors de la collecte

Les dons doivent être collectés de manière aseptique, ce qui correspond notamment à un système de prélèvement approuvé, fermé, stérile, apyrogène et contenant un anticoagulant (2,32). De même, la peau du donneur doit être préparée de manière à garantir la stérilité du produit (32). Aucun agent antibactérien ou antifongique ne doit être ajouté au plasma (32). Depuis 1998 en France, les produits (en l'occurrence les plasmas sources et récupérés dans le cas du fractionnement) sont sécurisés par déleucocytation – qui utilise un procédé de filtration – au cours de la phase de préparation du plasma, avant d'être placés en quarantaine dans l'attente des résultats du laboratoire d'analyse des dons (18).

Quelle que soit son utilisation subséquente, le plasma préparé doit être congelé le plus rapidement possible afin de préserver les facteurs de coagulation labiles (18). En outre, il existe deux catégories de plasma différenciées selon le délai entre le prélèvement et la congélation (18). La catégorie 1 correspond à une congélation du plasma à une température inférieure à -20 °C dans les 24 heures après le prélèvement, et la catégorie 2 à une congélation du plasma à une température inférieure à -20 °C entre 24 heures et 72 heures après le prélèvement (10,18,25). La catégorie 1 permettant une meilleure préservation de l'activité des protéines labiles est la seule éligible à la purification des facteurs de coagulation (10,18,25). Le plasma de catégorie 2 est quant à lui réservé à la production d'immunoglobulines et d'albumine (10,18,25). A noter que si le plasma peut être déclassé vers la catégorie 2 pour des raisons de délais de congélation ; un temps de prélèvement du sang total dépassant 15 minutes, un volume

de plasma issu du sang total compris entre 150 et 200 ml, et la présence de caillots dans un don de sang total résultent également en un déclassement du plasma en catégorie 2 (18).

Par la suite, le plasma congelé est stocké puis doit être transporté dans des conditions conçues pour maintenir la température à -20 °C ou moins (10,32). Pour des raisons accidentelles, la température de stockage peut s'élever au-dessus de -20 °C en une ou plusieurs occasions pendant le stockage et le transport (32). Cependant, le plasma devra rencontrer les conditions suivantes pour pouvoir être considéré comme approprié pour le fractionnement (32) :

- La période totale pendant laquelle la température est au-delà de -20 °C ne dépasse pas 72 heures
- La température ne dépasse pas -15 °C à plus d'une occasion.
- La température ne dépasse à aucun moment -5 °C .

Les envois de plasma pour fractionnement d'un continent à l'autre ou d'un pays à l'autre sont fréquents, et doivent respecter les conditions de transport et de stockage ci-dessus (10). Les dons non-conformes devront être détruits (18). Toutefois, les non-conformités sont enregistrées, et utilisées pour mettre en place des actions préventives et correctives ainsi que des indicateurs mesurant l'efficacité de ces actions (18). Enfin, quelle qu'ait été la technique de collecte utilisée, la traçabilité complète des unités de plasma doit être impérativement assurée (26).

Différences entre plasmaphérèse et collecte de plasma récupéré

Un délai supplémentaire avant la congélation du plasma augmente les risques d'activation des systèmes de coagulation, de complément et de fibrinolyse, qui peuvent conduire à la génération de protéases plasmatiques (10). Aussi, la collecte du plasma par aphérèse présente généralement une meilleure qualité en vue de la production (catégorie 1) pour la production de dérivés plasmatiques ; associé à des niveaux typiquement supérieurs de 10 à 30 % en facteur VIII comparativement au plasma récupéré (8,10). Toutefois, le plasma source contient moins d'IgG – de l'ordre de 10 à 20 % – lorsqu'il est collecté auprès de donneurs fréquents (8,10).

Le plasma source peut généralement être congelé dans les minutes qui suivent la fin du prélèvement contrairement au plasma récupéré dont la congélation est retardée, en raison du temps nécessaire à la transformation du sang total en ses composants (8). De plus, un taux d'anticoagulant plus élevé est utilisé dans le cas du plasma récupéré (10). Le plasma récupéré est éventuellement à risque de présenter des niveaux plus élevés de contamination cellulaire

que le plasma source (10). Or les globules rouges peuvent libérer des enzymes protéolytiques affectant la stabilité des facteurs de coagulation (10).

Par ailleurs, le coût du plasma d'aphérèse est plus élevé que celui du plasma récupéré (8). Rappelons que ce point est d'autant plus important que le coût du plasma représente à lui seul près de 45 % des coûts de production des produits plasmatiques (8).

1.2.5 Dépistage des dons

Mise en place des deux types de dépistages

Historiquement, l'introduction de dépistages des dons individuels par les fractionneurs a été contrainte par le manque de garantie de sécurité des procédés de fractionnement vis-à-vis des virus non-enveloppés (15). Rappelons que les principaux virus préoccupants ayant été transmis par les MDS sont le VIH, le HBV et le HCV (virus enveloppés) ainsi que le HAV et le B19V (virus non enveloppés) (31). Par ailleurs, des données épidémiologiques ont montré des fenêtres pré-sérologiques longues dans le cas du HCV, témoignant d'un risque d'utilisation d'un don contaminé malgré des dépistages d'anticorps anti-HCV négatifs (15). Ce constat ouvrit la voie aux tests d'acides nucléiques ou NAT – dont la réaction en chaîne par polymérase (PCR) est la plus utilisée – sur les pools de fabrication (32). Cette méthode étant la plus sensible pour détecter les virus, l'EMA a rendu obligatoire la recherche des acides nucléiques du HCV dans les pools (ou lots) de plasma pour fractionnement (15,31). L'EMA sera confirmée à ce sujet par la Pharmacopée européenne du plasma pour fractionnement (15).

Rappelons que les bactéries, les parasites et les virus intracellulaires ne sont pas transmis par les produits plasmatiques car ils sont détruits par les étapes de congélation-décongélation ou éliminés par les étapes de filtration de 0,2 à 1 μm utilisées lors du traitement des produits fractionnés (10).

Précisions sur les méthodes utilisées

La recherche de virus se partage ainsi entre tests sur les dons individuels et tests sur les pools ou mini-pools de plasma. Les mini-pools sont des combinaisons d'aliquotes de plusieurs dons en un seul (15,32). L'intérêt étant de limiter la perte de plasma provenant d'un pool pour la réalisation du test (15,32). A noter que les mini-pools de 12 ou 24 dons sont très courants car ces tailles permettent une bonne sensibilité analytique des NAT ; tout en étant conformes aux réglementations communes sur la sensibilité globale (32). En outre, les NAT ne reposent pas sur la détection des anticorps produits par l'hôte infecté après l'exposition – comme ce peut être

le cas avec les tests ELISA majoritairement réalisés sur les dons individuels – mais ciblent l'acide nucléique des agents infectieux cibles (32). Dans le cas de la PCR l'amplification exponentielle de l'ADN ou de l'ARN cible permet sa détection, même si sa charge virale est particulièrement faible (31).

Si un mini-pool est réactif pour un virus testé, le don individuel qui a donné lieu au résultat positif devra être identifié et éliminé (9,15,32). Les dons résiduels considérés comme non infectés pourront quant à eux être utilisés pour la suite de la fabrication (9,32). De même, un don qui serait positif pour un test individuel sera éliminé de la chaîne de production (9,18). Dans le cas de nouvelles informations de la part du donneur, de l'organisme de collecte du plasma, ou d'un organisme de pharmacovigilance (par rapport à l'état d'un patient receveur) pouvant justifier des inquiétudes sur la qualité ou la sécurité d'un don déjà utilisé pour la fabrication de MDS ; un rappel de lots issu de l'utilisation de ce don peut être réalisé par le fractionneur après avoir effectué une évaluation des risques et accord avec l'autorité compétente, en l'occurrence l'ANSM pour la France (9).

Dépistages réalisés actuellement

Tous les dons individuels doivent au moins être testés sérologiquement pour les anticorps anti-VIH 1 et anti-VIH 2, les anticorps anti-HCV et l'antigène de surface de l'hépatite B (AgHBs) (15,26,31). Ajoutons également la recherche de l'antigène p24 du VIH pour certaines zones géographiques (31). Des tests d'acide nucléique ou NAT sur mini-pools pour le virus de l'immunodéficiência humaine, les virus de l'hépatite A, B et C, de même que le parvovirus B19 peuvent être demandés ou effectués par des fractionneurs de plasma en plus des dons sur les plasma individuels (26,31). Dans la pratique, ces NAT sur mini-pools sont généralement réalisés pour le VIH et l'HBV (15).

En France, l'EFS réalise des tests viraux individuels et des mini-tests sur les dons de sang sur des marqueurs indirects (anticorps anti-VIH1 et anti-VIH2, anti-HCV, anti-HBc et anti-HTLV I et anti-HTLV II) et des marqueurs directs (AgHBs et contrôle par PCR de l'ARN du VIH-1, du HCV et de l'ADN du HBV) (9). A la réception des plasmas sources et récupérés, le LFB applique une période de quarantaine pour permettre la gestion des informations post-don fournies par l'EFS (9). Il réalise par la suite des tests PCR sur des mini-pools pour vérifier l'absence du Parvovirus B19 et du HAV, ainsi qu'un contrôle virologique du pool de plasma de fabrication (sérologie et PCR) : anti-VIH1 et anti-VIH2, ARN du VIH-1, ARN du HCV,

AgHBs, ADN du HBV, ARN du HAV et ADN du B19V ; comme indiqué par la Pharmacopée européenne (9).

1.3 Description des procédés de fractionnement et de purification

1.3.1 Des procédés en évolution

Le fractionnement du plasma est resté relativement conservateur en termes de méthodologie de base puisque celle-ci s'appuie encore largement sur les étapes de cryoprécipitation et de fractionnement à l'éthanol développées par Cohn et ses collègues ou ses modifications par Kistler et Nitschmann (5,8). Il existe néanmoins des raisons techniques et réglementaires à l'origine de ce constat (8). En outre, la mise en œuvre industrielle d'un fractionnement basé sur la combinaison de la cryoprécipitation et du fractionnement à l'éthanol froid a d'abord été réalisée pour répondre aux besoins cliniques – représentés initialement par l'albumine, puis par le facteur VIII et les IGIV – a progressivement façonné la technologie encore utilisée aujourd'hui, la demande étant premièrement tournée vers ces produits (2,8) (voir 1.1. Mise en place du fractionnement et situation mondiale actuelle).

Au fil des années, la complexité du processus de fractionnement s'est néanmoins accrue pour répondre à des besoins cliniques plus larges – en diversifiant le portefeuille de produits plasmatiques thérapeutiques – avec des niveaux de pureté et de qualité améliorés, ainsi qu'en incluant des étapes spécifiques d'élimination et d'inactivation virale (3,8,10,27). Cette complexité s'est essentiellement traduite par l'introduction et le développement de la chromatographie (8,10). En effet, si le fractionnement à l'éthanol reste largement utilisé pour l'extraction de l'albumine ainsi que la production d'intermédiaires clés (le cryoprécipité et les fractions I, II+III, IV-1, IV-4 et V) ; les immunoglobulines, la plupart des facteurs de coagulation tels que le facteur VIII, IX et XI, et le facteur de von Willebrand, ainsi que les inhibiteurs de protéase et les anticoagulants nécessitent l'intégration de procédures chromatographiques pour être purifiés (3,5,8,15). Ainsi, la technologie continue d'évoluer dans une direction où les étapes de précipitation à l'éthanol sont progressivement, mais pas encore totalement, abandonnées (8).

Notons que les procédés de Cohn-Oncley et Kistler-Nitschmann sont utilisés avec succès depuis près de 80 ans car ils sont robustes et peuvent facilement être adaptés à des échelles allant de plusieurs centaines à plusieurs milliers de litres de plasma (3). Par ailleurs, les produits intermédiaires qu'ils permettent d'isoler peuvent être stockés pendant de longues périodes avant

d'être regroupés et traités ultérieurement (3,10). De cette façon, plusieurs fractions intermédiaires sont généralement mélangées pour constituer un lot de produits finis qui sera préparé sur un équivalent de 20 000 à 40 000 dons (15). Toutefois, cela est à mettre en perspective de la taille du fractionneur qui pourra traiter un volume allant de 2 000 à 20 000 L de plasma (3,15,27). Par opposition, le fractionnement du plasma hyperimmun – notamment utilisé pour produire l'anti-Rh – est plutôt effectué sur des lots de plasma de petite taille, en s'appuyant davantage sur des procédés chromatographiques pour optimiser la récupération des IgG (10).

1.3.2 Mise à disposition du plasma

A la livraison du plasma, la conformité physique aux exigences d'expédition est vérifiée ainsi que la documentation nécessaire (certificat d'origine et de contrôle du plasma signé, date de prélèvement, numéro du conteneur d'expédition, données de dépistage virologique et immuno-hématologique, kits de test utilisés et numéro de lot) en parallèle de la mise en quarantaine de la matière première dans un congélateur-chambre (10). Des tests supplémentaires peuvent éventuellement être effectués (comme des tests nucléiques HCV, VIH, HBV, HAV et/ou B19V) (10). Rappelons que seuls les dons de plasma individuels qui répondent aux exigences de qualité et de test peuvent être utilisés pour les étapes suivantes (10).

Suivant s'il a été obtenu par plasmaphérèse ou à partir d'un don de sang total, le don réceptionné peut varier de 250 mL à 800 mL (3). De même, il peut être stocké congeler dans des sacs, ou éventuellement dans des bouteilles dans le cas de certains plasmas sources (3). Par conséquent, si des lignes de pelage entièrement automatisées ont été mises au point pour le plasma congelé dans des bouteilles, le décollement des poches doit dans une certaine mesure être effectué manuellement (3). En outre, les sacs – qui comportent généralement encore des tuyaux de raccords – sont souvent déformés par la congélation et ne sont donc pas uniformes à leur réception, ce qui limite l'automatisation de leur ouverture (3). Différentes méthodes ont été développées pour que leur ouverture puisse être réalisée tout en limitant la charge biologique (10).

Les sacs de plasma peuvent être brisés par contact avec de l'azote liquide, avant que le plastique ne soit retiré manuellement autour du noyau de plasma congelé (3). Ils peuvent également être coupés manuellement avec des couteaux portatifs ou avec des lames stationnaires fixées au réservoir de mise en commun (3). Notons que les dons peuvent être conditionnés à température contrôlée pendant quelques heures au préalable pour faciliter l'ouverture des sacs de plasma

(3,10). Pour le traitement automatique des bouteilles, une des méthodes consiste à décongeler le flacon à l'eau chaude, à le sécher, à couper le bouchon et à utiliser un robot pour verser le plasma dans le réservoir de décongélation (3). Les plasmas congelés sont finalement expulsés des conteneurs en plastique, regroupés et décongelés pour la cryoprécipitation et les étapes ultérieures de fabrication (3,10).

1.3.3 Cryoprécipitation, fractionnement éthanolique et chromatographie

Suite à la création des lots de plasma, les opérations reposent sur la cryoprécipitation, le fractionnement à l'éthanol – permettant de séparer les fractions I à V – et des opérations de chromatographies (25,27). Les étapes d'isolation des fractions, réalisées de façon séquentielles et intégrées, visent à obtenir un certain degré de purification dans un environnement stable et exempt de croissance bactérienne ; l'éthanol froid présentant l'avantage d'être bactéricides (2,27). Elles permettent également une éventuelle réduction significative du volume de traitement ainsi que la production de produits intermédiaires pouvant être stockés avant une purification ultérieure (2,5,27). L'utilisation d'un traitement à flux continu sous contrôle automatique a été suggérée pour le fractionnement éthanolique à froid (2). Toutefois, le flux continu mis en place en 1976 fut finalement abandonné à la fin des années 1990, au profit du traitement par lots comme cela était le cas à l'origine (2). En effet, le traitement par lot est plus sécuritaire en termes de limitation des contaminations du plasma (2). Par conséquent, malgré l'intérêt que peut susciter le traitement en continu, le traitement par lots reste la norme de fonctionnement de l'industrie du fractionnement (2).

Principe de séparation des fractions I à V

La solubilité, propriété unique d'une protéine, est déterminée par la taille de celle-ci, sa composition, sa conformation et par l'environnement dans lequel la protéine se trouve (2). Parmi le grand nombre de paramètres potentiellement disponibles pour la manipulation de la solubilité, ceux retenus pour obtenir la précipitation sélective des protéines sont la concentration d'éthanol, le pH, la température, la concentration en protéines et la force ionique dans des conditions statiques spécifiques (2,3,33) (voir ci-dessous). Ainsi, pour chaque étape successive, la solution est ajustée à un pH proche du point isoionique des protéines à précipiter (2). Elle est accompagnée d'une augmentation progressive de la concentration d'éthanol – allant de 8 à 40 % v/v – pour diminuer la solubilité des protéines cibles (2,5,33). De même, la température de la solution variant de $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ à $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$, est maintenue proche du point de congélation pour éviter la dénaturation des protéines (2,25). L'utilisation de solutions très diluées est également évitée

pour assurer une meilleure stabilité des protéines (2). A noter que les conditions dynamiques des procédés se doivent d'être contrôlées au cours des étapes de précipitation afin d'assurer une méthodologie réellement contrôlée et reproductible (3). Un manquement dans le contrôle des paramètres dynamique peut mener par exemple à la surconcentration locale d'éthanol ou d'acide au point d'introduction de l'agent précipitant, résultant alors en une dénaturation irréversible des protéines ou la coprécipitation de protéines qui devraient rester solubles (3).

A chaque étape, les précipités et les surnageants sont séparés soit par centrifugation à flux continu, soit par filtration en profondeur (5,10). Cette dernière est d'ailleurs préférable à la centrifugation pour améliorer la récupération des protéines (10). Enfin, outre ses propriétés bactéricide, l'éthanol a été choisi comme réactif de précipitation en raison de sa volatilité (2). Il peut ainsi être éliminé ultérieurement par lyophilisation ou par ultrafiltration (2,5,25). Au vu des quantités d'éthanol potentiellement nécessaires, une unité de récupération et de recyclage de celui-ci peut être envisagée (12).

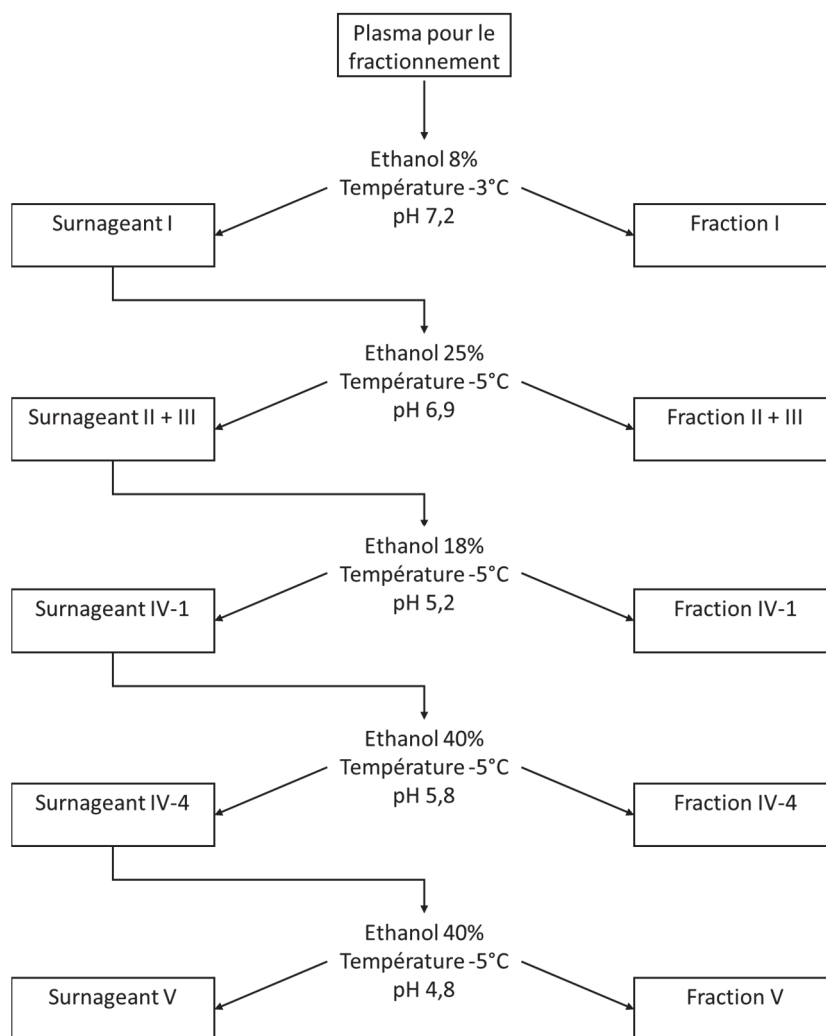


Figure 2 : Procédé de fractionnement du plasma de la fraction I à V (33)

Cryoprécipité

Le premier intermédiaire isolé dans un processus typique de fractionnement du plasma à grande échelle est le cryoprécipité (3). Pour cela, le plasma est décongelé lentement à température contrôlée pour ne pas dépasser 3 °C à 4 °C, sans quoi le cryoprécipité commencerait à se dissoudre (3,15,25,27). Si le cryoprécipité peut être utilisé directement comme source de fibrinogène (voir 2. Utilisation du fibrinogène en clinique), il permet plus particulièrement la production des concentrés de facteur VIII, de facteur Willebrand et de fibrinogène, notamment à l'aide de procédés chromatographiques subséquents (3,5,15,25). De façon plus restreinte, le cryoprécipité est également composé de fibronectine et de facteur XIII (5). A noter que l'activité du facteur VIII dans le plasma cryoprécipité diminue avec le temps et que ce facteur est également labile et sensible aux forces de cisaillement (3,15,25). Le cryoprécipité étant généralement séparé du cryosurnageant par centrifugation, les conditions de mélange et le transfert de chaleur devront par conséquent être soigneusement contrôlés (3,5).

Fractions I à V

Le premier précipité, la fraction I à 8 % d'alcool, contient essentiellement le facteur VIII, le fibrinogène et d'autres protéines peu solubles (5). Un grand nombre de protéines de la fraction I étant éliminées en amont dans le cryoprécipité, certains fractionneurs font le choix de ne pas produire de fraction I distincte (5), ils obtiendront alors à la suite du cryoprécipité une fraction combinée I+II+III (5). En effet, les fractions II et III sont précipitées ensemble à partir du surnageant I (5). Notons que la fraction II + III nécessitera un retraitement, qui correspond à des étapes supplémentaires de fractionnement pour obtenir des immunoglobulines relativement pures (5,15,33). La fraction IV, produite à partir du surnageant de la fraction (I +) II + III, est parfois produite en deux sous-fractions : les fractions IV₁ et IV₄ (2,5). Ces dernières peuvent ainsi fournir un ou deux produits intermédiaires en vue de la production d'antithrombine III et d'inhibiteur de l' α_1 -protéinase (2,5). En plus de ces deux produits, ajoutons que la fraction IV₁ contient également les facteurs de coagulation vitamine K dépendants et l'inhibiteur de l' α_1 -protéinase ; tandis que la fraction IV₄ contient la transferrine, l'haptoglobine et une partie de l'albumine (5). Pour finir, la fraction V permettra d'obtenir l'albumine ; qui bien qu'étant assez pure, nécessitera d'être retraitée pour la débarrasser de certaines impuretés, notamment les lipoprotéines (5,33).

Les produits intermédiaires seront mobilisés pour obtenir les substances médicamenteuses d'intérêt. Pour cela, ces derniers rencontreront avant la formulation : au moins une étape de purification par précipitation, chromatographie ou adsorption ; au moins deux étapes dédiées à l'élimination ou l'inactivation virale ; et une étape de polissage permettant d'éliminer les produits chimiques résiduels ainsi que les protéines et les agrégats non désirés (3).

Tableau 2 : Compositions des fractions I à V du fractionnement éthanolique à froid du plasma (2,33,34)

	Pourcentage initial de protéine dans le plasma	Composants principaux
Cryoprécipité	5 à 10	Facteurs VIII et de Von Willebrand
		Fibrinogène
Fraction I	5 à 10	Facteur VIII
		Fibrinogène
		Fibronectine
Fraction II + III	20 à 25	IgA IgM IgG
		Facteurs II, V, VII, IX et X
		β -lipoprotéines
		Plasminogène
		Plasmine
Fraction II	7 à 9	Fibrinogène
		IgG
		β -lipoprotéines
Fraction III	6 à 7	IgA IgM
		Facteurs II, V, VII, IX et X
		β -lipoprotéines
		Plasminogène
		Plasmine
Fraction IV₁	5 à 10	Antithrombine III
		α_1 -antitrypsine
		α - et β -globulines
Fraction IV₂	5 à 10	Transferrine
		Haptoglobine
		Céruleoplasmine
		α - et β -globulines
		Albumine
Fraction V	50 à 60	Albumine
		α -globulines

Chromatographie

Comme énoncé précédemment, la chromatographie a au cours des années pris une place plus marquée dans les procédés. Nous pourrions citer à titre d'exemple son utilisation sur le cryosurnageant pour capturer le facteur IX et/ou l'antithrombine et/ou l'inhibiteur de la C₁-estérase et/ou le complexe prothrombique avant que ce dernier ne soit traité par la méthode de fractionnement éthanolique à froid (5,10). De même, la chromatographie est un outil particulièrement intéressant pour la purification des facteurs de coagulation labiles – que sont les facteurs de von Willebrand, le facteur VIII, le facteur IX, ou encore le facteur VII – mais aussi celle des inhibiteurs de protéase – tel que l' α_1 -antitrypsine – ou encore celle des anticoagulants, comme la protéine C et l'antithrombine (25,27). Les chromatographies les plus souvent utilisées sont celles d'affinité et par échange d'ions (anions ou cations) car ces méthodes peuvent être utilisées dans une plage de pH neutre assurant le maintien des fonctions protéiques (25). Notons que la mise en place de ces techniques peut être compliquée sur le plan réglementaire (6,8,25).

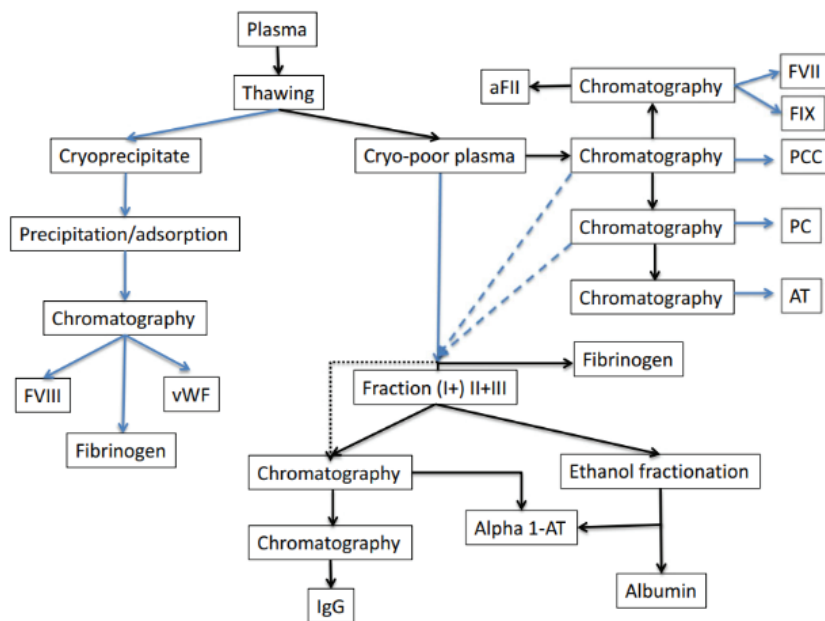


Figure 3 : Mise en valeur de la place des opérations chromatographiques dans le fractionnement du plasma (10)

Remarque

Les procédés historiques de Cohn-Oncley et de Kistler-Nitschmann sont disponibles en Annexe A. De même, des exemples de procédés entiers et relativement complexes peuvent être retrouvés en Annexe B.

1.3.4 Formulation et conditionnement

Après purification des produits et passage par plusieurs opérations d'inactivation virale, les principes actifs peuvent être utilisés pour réaliser la formulation des différents produits de l'usine. Ainsi, l'activité de la ou des protéine(s), la concentration des sels, celle des stabilisateurs si nécessaire, et le pH sont ajustés (3). Les produits purifiés et filtrés de manière stérile sont alors distribués de manière aseptique dans des flacons ou bouteilles en verre faisant office de récipients finaux (3,10). A ce stade, un système de traitement de l'air approprié (ZAC A) et l'utilisation de flacons et de bouchons correctement nettoyés sont essentiels pour assurer l'asepsie (3,10). Cette opération est généralement automatisée (3). De nombreux produits nécessitent par la suite d'être lyophilisés (3,10). A noter que les bouteilles d'albumine subissent une pasteurisation terminale (10). Après la distribution, les produits sont inspectés visuellement pour repérer d'éventuels défauts (3). Les lots seront également gardés en quarantaine le temps que les contrôles de qualité et les vérifications des dossiers de production aient lieu (10). Les lots conformes aux spécifications sont étiquetés, conditionnés et expédiés pour la distribution (10). Enfin, le stockage et le transport devront être adaptés en fonction de la stabilité du produit à une température pouvant être ambiante, à moins de 20 °C ou comprise entre 2 et 8 °C, (3). Le cycle de production aura duré en tout entre quelques semaines et plusieurs mois (10).

1.4 Opérations d'inactivation virale

1.4.1 Evaluation des besoins en traitements viraux

Il n'a pas échappé, lors de la mise au point du fractionnement, que le plasma utilisé pour la production pouvait potentiellement être contaminé par des virus humains (2). Toutefois, avant la fin des années 1980 et malgré la prise de précautions, l'utilisation des produits dérivés du plasma entraîna de nombreuses transmissions virales, notamment des virus de l'hépatite et du VIH (5,25). Ainsi, certains lots d'IGIV issus du fractionnement éthanolique à froid – bien qu'initialement considérés comme pratiquement exempts de risque de transmission du HCV – furent responsables de la contraction de la maladie chez des patients (2,5). Aussi l'organisation, la validation et le contrôle des opérations de fractionnement du plasma furent revus afin d'accroître la sécurité et la fiabilité des procédures de fabrication ; même si l'introduction de certaines méthodes – comme la pasteurisation terminale de l'albumine – aient été en réalité antérieures aux années 1980 (2,8).

1.4.2 Mesures de sécurisation biologique

Plusieurs mesures furent développées afin de limiter la transmission de pathogène aux patients utilisant les produits dérivés du plasma. Elles permettent non seulement de limiter l'introduction de pathogènes dans les lots utilisés pour le fractionnement mais aussi de limiter les risques de transmission au patient de pathogènes dans le cas éventuel de leur présence dans les lots fractionnés malgré les dispositions prises en amont (8,10,25,35). A noter que ce dernier cas peut résider dans une possible erreur technique ou humaine, un don provenant d'un sujet très récemment infecté (« fenêtre silencieuse »), un don infectieux séronégatif chez un porteur chronique, ou éventuellement un variant viral ou émergent non reconnu par certains réactifs (15).

Ainsi, les trois grandes mesures de sécurisation biologique mise en œuvre sont (5,8,25,27,31,35) :

- La sélection des donneurs de plasma et de sang ainsi que le contrôle épidémiologique de la population (voir 1.2. Approvisionnement de la matière première)
- Le contrôle des dons par la recherche de marqueurs viraux dans les dons individuels de sang ou de plasma, ainsi que sur les mini-lots de plasma et les lots de fabrication
- La réalisation de traitements robustes d'inactivation et d'élimination des virus pendant le fractionnement du plasma conformément aux BPF en vigueur (*cGMP*)

Remarquons que la fourniture des données de traitement est essentielle pour l'obtention d'une AMM (31). De même, le fractionneur devra pouvoir prouver qu'il comprend, documente, surveille et examine de manière convaincante les paramètres critiques susceptibles d'affecter l'efficacité des traitements d'élimination et d'inactivation virale (8). En cas de nouvelles menaces potentielles, la robustesse des procédés sera réévaluée par les autorités réglementaires compétentes (8).

Par ailleurs, un système de traçabilité allant des donneurs aux patients et inversement a également été intégré au système de pharmacovigilance afin d'effectuer des vérifications par retour aux sources en cas d'une potentielle transmission virale chez un ou plusieurs patient(s) (8). A noter que les traitements d'élimination et d'inactivation virale constituent véritablement la barrière essentielle pour ne pas en arriver à de telles extrémités et garantir ainsi la sécurité des produits plasmatiques (35).

1.4.3 Objectifs lors du développement de procédés de traitements biologiques

Un minimum de deux étapes de réduction virale

La combinaison d'au moins deux étapes « orthogonales » pour le traitement de réduction virale est la norme des schémas actuels de production de dérivés du plasma dans le but de garantir la sécurité des produits plasmatiques contre différents pathogènes (8,10,15,25,27,31,35). Cette approche repose sur la combinaison d'une étape d'élimination ou d'inactivation virale efficace contre les virus à enveloppe lipidique (VIH, HBV et HCV), suivie d'une seconde étape distincte ciblant les virus non enveloppés (HAV, HEV, B19V) ; offrant par la même occasion une marge de sécurité supplémentaire contre les virus à enveloppe lipidique (8,10,15,25,27,35). De cette manière, un virus enveloppé résiduel échappant à l'inactivation de la première étape devrait a priori être inactivé ou éliminé par l'étape suivante (8,31). A noter que ce principe est notamment soutenu les "Directives sur les procédures d'inactivation et d'élimination virales destinées à assurer la sécurité virale des produits plasmatiques sanguins humains" de l'OMS ou encore la directive EMA/CHMP/BWP/706271/2010 de l'EMA (8,9).

Limites d'acceptation

La démonstration de la robustesse d'un procédé de traitement d'inactivation ou d'élimination virale repose sur des preuves scientifiques et une documentation appropriée (8,25). Pour cela, des études de validation de virus pour un produit plasmatique sont réalisées dans une version réduite d'une étape de production (4,10,25,27,31). Ces études consistent à mettre en fonction la version réduite en inoculant un virus d'essai contrôlé afin de comparer sa charge virale est comparée entre les situations avant et après traitement (4,10,25,27,31). A noter que les virus utilisés dans les études de validation peuvent être les virus en cause dans le plasma humain – ou virus pertinents – ou des virus non pathogènes dont les propriétés physicochimiques sont similaires aux virus pertinents ; ils seront appelés virus modèles (4,31). Les virus utilisés dans les études de validation sont généralement des virus modèles car les souches de laboratoire peuvent différer des souches en circulation, ce qui pourrait avoir des répercussions sur leurs propriétés physicochimiques (4). Ainsi certains virus modèles tels que le virus de l'encéphalomyocardite, le parvovirus canin, le virus minute de la souris, le parvovirus bovin ou encore le virus orphelin respiratoire (etc.) peuvent être utilisés à titre d'étude (31).

Dans le fractionnement la robustesse d'un procédé de traitement d'inactivation ou d'élimination virale est généralement considérée comme prouvée – comme énoncé dans la directive CPMP/BWP/269/95 de l'EMA – lorsque plus de quatre logs décimaux d'inactivation ou

d'élimination de l'infectivité virale peuvent être obtenus de manière reproductible dans les limites de fonctionnement de l'opération (3,8,36). Inclure des limites de fonctionnement d'une opération nécessite par conséquent de démontrer la robustesse de la méthode y compris pour les pires conditions de fabrication (31). Il est évident que ces limites acceptables auront été définies au préalable lors de la validation, assurant ainsi un contrôle adapté de la technologie sélectionnée (durée d'opération, température, concentration en protéines, pH) (15,35). En outre, il sera intéressant de relever que si certaines étapes – telles que la précipitation, l'adsorption ou la chromatographie – participent à l'élimination globale de l'infectivité sur l'ensemble du procédé ; elles n'atteignent pas individuellement la limite de $4 \log_{10}$, permettant de les définir comme étape de traitement d'inactivation ou d'élimination virale (3,4,10,25,36). Par ailleurs, une réduction inférieure à 10^{-6} unités infectieuses, qui correspond à l'exigence pour définir la stérilité des produits parentéraux, indique la marge requise de sécurité virale des dérivés du plasma telle que recommandée par la directive CPMP/BWP/269/95 de l'EMA (31,36). Aussi, si cette valeur théorique est calculée pour être obtenues au niveau du produit final dans le cas du VIH, du HBV et du HCV ; des valeurs significativement plus basses sont généralement atteintes (31). Bien que le risque de transmission d'infection soit infiniment petit, il n'existe actuellement aucun produit issu du plasma qui puisse être présenté comme exempt de pathogène (4,5).

Pathogènes et virus émergents

Le système visant à garantir la sécurité contre les virus est périodiquement remis en question par les virus émergents (8,31,35). Toutefois, la robustesse des dispositifs mis en place a largement contribué à limiter la transmission d'agents viraux récents que sont le WNV, le H1N1, le DENV, le coronavirus du SRAS ou encore le vMCJ, sans nécessairement de tests sur les dons ou les lots de plasma de fabrication (8,27,35). Cela peut être notamment illustré par la décision de la FDA de ne pas demander le test de dépistage de virus comme le WNV, le ZIKV ou le DENV dans le plasma destiné au fractionnement (8). En somme, il semble peu probable que de nouvelles technologies d'élimination ou d'inactivation virale soient nécessaires dans un avenir proche, à moins que des risques liés à de très petits virus non enveloppés – non retenus par nanofiltration – se mettent à susciter des inquiétudes sérieuses (35).

Optimisation des rendements

Si les technologies de réduction virale doivent être sélectionnées en fonction de leur capacité à inactiver ou à éliminer des virus modèles soigneusement ; il est essentiel que la sélection soit

faite pour ne pas affecter l'intégrité physiologique des protéines thérapeutiques afin d'éviter ainsi la génération de néo-antigènes (8). Ce dernier point va de pair avec la potentielle réduction de l'activité biologique des protéines par dénaturation (3,8). De même, chacune des étapes d'élimination et d'inactivation virale doit être optimisée pour minimiser les pertes qui se produisent nécessairement dans les procédés comportant plusieurs étapes (3).

1.4.4 Description des procédés d'inactivation et d'élimination virale

Petite digression terminologique

La palette de traitements de réduction virale développés dans l'industrie du fractionnement du plasma est de loin la plus diversifiée de toute l'industrie des produits biologiques (8). Cette diversité est à mettre en parallèle de la variété des protéines thérapeutiques générées par le fractionnement car chacune nécessite des spécificités particulières (8). Deux types d'approches permettent de limiter les risques de contamination virale. Ainsi, l'inactivation virale implique la destruction des virus ou la suppression de leur caractère infectieux tandis que l'élimination virale consiste à séparer les virus de la fraction protéique d'intérêt (8,25). Notons que les traitements de réduction virale doivent garantir une bonne disposition de la production pour éviter les risques de contamination croisée en aval (15,35). Aussi, aucune transmission documentée du VIH, du HBV ou du HCV par des produits soumis à des traitements dédiés d'inactivation virale n'a été enregistrée depuis la fin des années 1980, preuve de l'efficacité des barrières mises en place (10,25).

Les traitements de réduction virale sont généralement intégrés au procédé de purification des protéines. Il s'agit des traitements "en cours de production" que sont la pasteurisation, la nanofiltration, le traitement par solvant-détergent ou encore par pH acide (27). Ajoutons que les procédures chromatographiques en tant que telles utilisées spécifiquement pour la purification des protéines ou l'élimination des agents chimiques d'inactivation des virus (S/D) participent à l'élimination globale des virus (4,31). Par opposition, certaines opérations sont réalisées sur les produits finaux. Il s'agit de la procédure d'inactivation thermique ou chauffage à sec ainsi que de la pasteurisation terminale, qui est spécifique à l'albumine (27). Toutefois, ces traitements thermiques sont utilisés principalement comme une étape supplémentaire d'inactivation virale, plutôt que comme le traitement principal d'inactivation comme cela aurait pu être le cas par le passé (15,25).

Traitement par Solvant/Détergent

Le traitement par solvant-détergent représente une force dans la sécurisation de la plupart des produits plasmatiques en contribuant notamment à stopper la transmission du VIH, du HBV et du HCV à la fin des années 1980 ; et plus récemment, celle de virus émergents comme le WNV, le DENV ou le ZIKV (8). À ce jour, cette technologie est utilisée pour l'inactivation des virus à enveloppe lipidique (elle est inefficace contre les virus non-enveloppés) dans pratiquement tous les produits plasmatiques (3,8,10,31,35). Le type de détergent sélectionné a quant à lui évolué, comprenant 0,3 % à 1 % de phosphate de tri-n-butyle (TnBP) ; il est associé à un ou plusieurs détergents. Tout d'abord à du cholate de sodium et du Tween-80, sa composition introduira par la suite du Triton X-100, du Tween-20 ou du Triton X-45 en fonction des produits protéiques ciblés. Ces derniers sont utilisés à des concentrations de 0,2 à 1 % (v/v) (8,10,15,31).

Il sera important de garantir des conditions d'homogénéité dans toute la solution à traiter dans le cas d'une inactivation virale utilisant des produits chimiques ou des conditions physico-chimiques spécifiques (3). A ce titre, il est recommandé d'ajouter les agents d'inactivation, de mélanger la solution, puis de la transférer dans un réservoir propre pour l'étape d'inactivation virale proprement dite (3). De même, afin de s'assurer qu'aucun virus ne soit protégé de l'inactivation par inclusion dans des particules ou des agrégats protéiques, la solution sera préalablement clarifiée à l'aide d'une membrane filtrante avant son transfert dans la cuve d'inactivation virale (3). Dans le cas du traitement S/D, les solutions protéiques resteront en incubation pendant 4 à 6 heures à des températures comprises entre 24 et 37 °C (10). Les agents du traitement par S/D seront ensuite éliminés à un niveau de quelques parties par million, généralement par adsorption chromatographique (chromatographie par échange d'ions ou hydrophobe) ou précipitation spécifique des protéines (8,10,15).

Traitement par pH acide et acide caprylique

Une incubation à faible pH – généralement à pH 4 – pendant plusieurs heures à une température avoisinant 30 à 35 °C a longtemps été appliquée aux IGIV comme un moyen d'améliorer la tolérance lors de la perfusion chez les patients (8,10). Cette incubation permet également un traitement robuste d'inactivation virale des virus à enveloppe lipidique (8,10). L'opération peut éventuellement être utilisée pour l'inactivation de virus non enveloppés en ajustant le pH, le temps d'incubation et la température (31). Toutefois, l'utilisation du traitement à pH acide en tant qu'étape principale d'inactivation virale pour les immunoglobulines est en déclin, remplacée par le traitement par S/D, par l'acide caprylique, ou par une stratégie différente de

fractionnement dans le but d'améliorer la productivité et la pureté des IgG (8,35). A noter qu'elle reste toutefois utilisée pour certaines IgG comme étape supplémentaire de sécurité virale et lors de la formulation finale (8).

Le traitement par l'acide caprylique – ou acide octanoïque – à un pH inférieur à 6 est un traitement d'inactivation virale efficace introduit pour l'inactivation de virus enveloppés dans certaines préparations d'IgG et d'IgM (15,31). Cette opération était à l'origine utilisée comme étape de purification des immunoglobulines (31,35). Il permet en effet d'éliminer les facteurs potentiellement thrombogènes (8).

Pasteurisation et inactivation virale par la chaleur

Les traitements d'inactivation par la chaleur peuvent être réalisés au cours du procédé de fractionnement ou après le remplissage aseptique des produits dans le récipient final (3,25). Dans un cas comme dans l'autre, il est essentiel d'être en mesure de prouver que la température suit une distribution homogène dans le produit à traiter et de s'assurer qu'il n'y a pas de points froids dans les récipients contenant le produit (3). Une option en ce sens pour le maintien de la température du produit dans la plage validée serait de placer le récipient contenant le produit d'intérêt dans un four à air chaud suffisamment grand, dont la température est soigneusement contrôlée (3).

La pasteurisation correspond ainsi au traitement à 60 °C pendant 10 heures permettant de dénaturer les protéines virales et d'inhiber la réplication virale (8,10,25,31). Cette procédure inactive efficacement de nombreux virus enveloppés et non enveloppés, y compris le B19V (31). Il est néanmoins essentiel que le risque de formation de néo-antigènes soit pris en compte lors de l'utilisation de procédés d'inactivation basés sur la chaleur (8,10). C'est pourquoi, des stabilisateurs de la fonction protéique – du caprylate et/ou du tryptophanate – seront ajoutés (8,10,25,31). Dans le cas de la pasteurisation terminale de l'albumine, les stabilisateurs sont à des doses compatibles avec l'usage thérapeutique car ils ne sont donc pas éliminés avant la perfusion du produit (8,10,25,31). La pasteurisation est également utilisée avec succès pour l'inactivation virale du facteur VIII, de l'antithrombine, de l' α_1 -antitrypsine mais aussi des immunoglobulines (8,31). Toutefois, celle-ci ayant lieu au cours du fractionnement, les stabilisants utilisés à fortes doses – acides aminés, sucres et/ou polyols – sont éliminés généralement par filtration tangentielle (8).

Le traitement thermique à sec a été introduit dans les années 1980 principalement pour inactiver le VIH (2,8). Adapté pour les produits lyophilisés, le traitement thermique à 80 °C pendant 72 heures ou à 100 °C pendant 30 minutes est un moyen efficace comme traitement secondaire d'inactivation virale ; notamment pour améliorer la marge de sécurité contre les virus non enveloppés (2,8,10,25,31,35). Cette étape offre ainsi une sécurité supplémentaire contre les virus de l'hépatite virale et d'autres sensibles à la chaleur, mais n'est pas nécessairement suffisant pour exclure la transmission du B19V (8,10,35)

Nanofiltration

La nanofiltration est un procédé de filtration virale spécifique appliqué aux solutions protéiques à l'aide de membranes de 15 à 75 nm (3,8,10,15,25,35). Ainsi, les protéines plus petites que la taille des pores peuvent filtrer à travers tandis que les virus sont éliminés par un mécanisme de tamisage (8,31). Introduite au début des années 1990, elle a été largement acceptée comme une étape d'élimination virale robuste ; et ce, à tel point qu'elle soit actuellement perçue comme obligatoire pour pratiquement tous les produits (3,10,15,25,35). Elle permet d'éliminer les agents pathogènes tels que les virus enveloppés et non enveloppés, ainsi que les prions, par exclusion de taille (3,8,10,15,25,35,37). Elle présente également l'avantage complémentaire de ne pas induire d'activation protéique ou de formation de néo-antigènes, et son rendement est (sauf exception) supérieur à 90 – 95 % (15). Ajoutons qu'il est possible d'obtenir une élimination virale de l'ordre de 7 log₁₀ avec cette technique (31). Toutefois, afin d'éviter le colmatage du nano-filtre, une préfiltration appropriée de la solution protéique devra être effectuée (3). A noter qu'il existe deux modes de filtration : la filtration frontale et la filtration à flux tangentiel (3). Le choix du mode de filtration dépendra des caractéristiques de la solution, comme la concentration en protéines, la facilité d'utilisation et l'aspect économique de l'application (3).

1.5 Précisions sur l'environnement réglementaire

Les contraintes réglementaires sont relativement indissociables des procédés et méthodes utilisés pour la production de MDS. Aussi, de nombreux points ont déjà été présentés précédemment. Cette partie permettra d'apporter quelques précisions qui n'ont pas été posées par ailleurs.

Au niveau européen, de nombreuses initiatives liées aux secteurs du sang et du plasma ont été entreprises depuis 1989 (16). Actuellement, la réglementation sur le sang et ses composants repose plus particulièrement (mais pas exclusivement) sur (9,16,24,38-43) :

- La directive 2002/98/CE du Parlement européen et du Conseil du 27 janvier 2003 "établissant des normes de qualité et de sécurité pour la collecte, le contrôle, la transformation, la conservation et la distribution du sang humain et des composants sanguins, et modifiant la directive 2001/83/CE".
- La directive 2004/33/CE "apportant de nouvelles exigences techniques pour le sang et les composants sanguins".
- La directive 2005/61/CE "apportant de nouvelles exigences en matière de traçabilité et de notification des réactions indésirables et des incidents".
- La directive 2005/62/CE "concernant les normes et spécifications communautaires relatives à un système de qualité dans les établissements de transfusion sanguine".
- La directive 2004/27/CE, modifiant la directive 2001/83/CE, établissant des exigences spécifiques concernant la fabrication, le stockage et la distribution des médicaments.
- La directive 2003/63/CE, modifiant la directive 2001/83/CE et la directive 2003/94/CE, établissent les principes et lignes directrices de Bonnes Pratiques de Fabrication concernant les médicaments à usage humain et les médicaments expérimentaux à usage humain.

Un tableau issu de la directive EMA/CHMP/BWP/706271/2010 détaille le cadre légal de la production de MDS dans l'Union Européenne, celui-ci est mis à la disposition du lecteur en français en Annexe C (44).

Avec ces directives, la commission européenne souhaite maintenir l'approvisionnement en sang pour les patients en besoin, garantir la qualité et la sécurité des produits dérivés du sang ainsi que leur utilisation appropriée, et assurer la prévention de la transmission des maladies infectieuses pour l'ensemble des citoyens européens (9,16). A noter que l'UE n'empêche pas un de ses Etats membres d'établir ou de maintenir des dispositions plus strictes que celles énoncées précédemment (9). Un bon exemple de ce principe repose sur la disposition mis en place en France concernant le rappel de lot de MDS en cas de détection de MCJ (sporadique, génétique ou iatrogène) contrairement au reste de l'UE, et ce jusqu'en 2015, date à laquelle la France s'est finalement conformée aux recommandations de l'EMA (9).

Par ailleurs, la sécurité, le développement et le contrôle des BPF ainsi que la bonne mise en place réglementaire des activités de fractionnement et de mise sur le marché de nouveaux produits reposent sur plusieurs organismes, notamment :

- Le Conseil de l'Europe participe à la fiabilité des MDS par l'intermédiaire de la Pharmacopée européenne (9). En outre, les monographies de la Pharmacopée constituent une référence scientifique pour le contrôle de la qualité au cours des processus de développement, de production et de commercialisation (9,39,45). A noter que la directive 2001/83/CE énoncée précédemment appuie la nécessité du respect de ces monographies dans le cadre de demande d'AMM (9,22).
- L'EMA créée par le règlement (CE) n° 726/2004 du Parlement européen et du Conseil du 31 mars 2004, a pour mission d'établir des procédures d'approbation et d'autorisation de mise sur le marché des médicaments de l'UE (9). Cette agence comprend notamment des comités qui assume la responsabilité générale des avis scientifiques sur la qualité, la sécurité et l'efficacité des médicaments à usage humain (9).
- L'ICH est une organisation réunissant les autorités réglementaires et les associations commerciales de l'industrie pharmaceutique qui a pour but de parvenir à une plus grande harmonisation réglementaire au niveau mondial (9).
- L'ANSM s'attèle en France à la création de cadres réglementaires appropriés, à l'application de procédures réglementaires strictes et l'évaluation de l'ensemble du processus de sécurité biologique conformément aux notes d'orientation européennes ou de l'ICH (9).
- L'OMS fournit également des lignes directives pour la collecte, le contrôle et la réglementation du plasma ainsi que pour les Bonnes Pratiques de Fabrication dans le cadre du fractionnement (3,27).

2 Intérêt du fibrinogène en clinique

2.1 Description de la protéine

2.1.1 Point historique

Découverte du fibrinogène

En 1666, Marcello Malpighi observa à l'aide d'une lentille optique simple que les caillots sanguins avaient une structure fibreuse et corpusculaire (46,47). Cette structure fut associée en 1801 au terme fibrine par Antoine Fourcroy. Ce dernier montra également l'existence dans le plasma d'une substance soluble, pouvant être considéré comme précurseur de la fibrine car cette dernière est absente du sérum (46). Il faut toutefois attendre jusqu'en 1838 pour que le terme de protéine soit inventé par Jacob Berzelius (47).

En 1847, Rudolf Virchow introduisit quant à lui le mot fibrinogène : « *s'il l'on pouvait donner un nom, ce pourrait être fibrinogène* » ; traduit de l'allemand : « *vielmehr, wollte man sie benennen, so könnte man sie höchstens Fibrinogen taufen.* ». Plusieurs hypothèses proposent une origine pour le mot fibrinogène. Une première suppose qu'il soit construit à partir des mots fibrine et oxygène. La fibrine étant une « masse homogène formée à partir de fibrine soluble après exposition du sang ou d'exsudat à l'oxygène ». Une seconde hypothèse identifie quant à elle l'utilisation du suffixe « -ogène » pour définir un précurseur au lieu du préfixe « pro- » (46).

Purification de la protéine

Si Alexander Schmidt parvint à mettre en évidence en 1872 qu'un procédé enzymatique est à l'origine de la conversion du fibrinogène en fibrine (47), il faut encore attendre jusqu'en 1879 pour qu'Olaf Hammarsten présente un premier rapport d'identification de la protéine (46–48). Hammarsten découvrit non seulement l'intervention de la thrombine dans la conversion du fibrinogène en fibrine mais aussi une méthode d'utilisation de sel sur du sang de cheval pour réaliser une précipitation puis une purification du fibrinogène. Cette méthode devint une procédure classique de préparation du fibrinogène (46). Enfin, Hammarsten démontra l'insolubilité du fibrinogène et la possibilité de le précipiter depuis le plasma par dialyse contre un courant d'eau (48).

En 1947 puis en 1959, une autre caractéristique du fibrinogène fut observée : il s'agit du dernier composant plasmatique à retourner en solution après congélation, puis décongélation. Ainsi, il

est possible d'obtenir un faible volume riche en fibrinogène (ainsi qu'en facteur VIII et en facteur de von Willebrand) en isolant le précipité restant du plasma froid. Notons que cette technique dite de cryoprécipité est toujours utilisée actuellement dans les centres de fractionnement du sang (48).

2.1.2 Production de fibrinogène, structure et caractéristiques

Paramètres physiologiques

Le fibrinogène ou facteur I de la coagulation, est la troisième protéine la plus représentée dans le plasma (49). Il s'agit également du facteur de coagulation le plus abondant avec une concentration plasmatique normale comprise entre 2,0 et 4,0 g/L (46,48–54), les autres facteurs de la coagulation étant plutôt de l'ordre du milligramme par litre (55). Les plus hauts niveaux de fibrinogène sont observés au cours de la grossesse, souvent supérieurs à 5 g/L durant le troisième trimestre (53,55). Le niveau dit « critique » de fibrinogène au maintien de l'hémostase peut quant à lui varier en fonction des contextes de déficience congénitale ou acquise en fibrinogène (56). Le fibrinogène est une glycoprotéine plasmatique de 340 kDa sécrétée par les hépatocytes (47,50,51,54,55,57) et stockée dans les granules α des plaquettes (52,54). Autant les plaquettes que les mégacaryocytes sont capables d'internaliser le fibrinogène plasmatique par l'intermédiaire de récepteurs glycoprotéiques au fibrinogène IIb/IIIa (54). La demi-vie plasmatique moyenne du fibrinogène est de 3,7 jours et des valeurs allant de 3,0 à 4,1 jours sont essentiellement retrouvées dans la littérature (50,52,55,57). Le fibrinogène est catabolisé par le système normal de dégradation protéique, le système de coagulation mais aussi d'autres voies inconnues à ce jour. Notons que la coagulation et la lyse comptent seulement pour 2 à 3 % de la perte en fibrinogène chez l'individu sain (52).

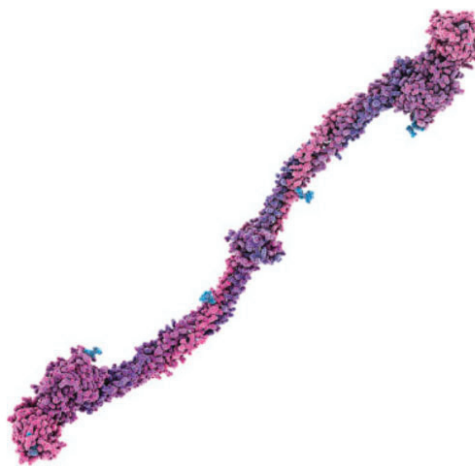


Figure 4 : Molécule de fibrinogène (55)

Structure du fibrinogène

Le fibrinogène dit normal – Fib₃₄₀ – correspond à un complexe protéique en forme de bâtonnet constituée d'un homodimère hexamérique, dont chacun des monomères possède un exemplaire de chacune des trois chaînes polypeptidiques A α , B β et γ (47–49,51–54,58,59). Sa structure comprend deux domaines D extérieurs, reliés par un domaine E central liant les deux monomères par leurs extrémités N-terminales grâce à des ponts disulfures (53,54). Le domaine E est de l'ordre de 5 nm de diamètre, tandis que les domaines D présentent un diamètre de 6 nm pour former une structure longue d'environ 45 nm (60). Il sera intéressant de noter parmi les propriétés de cette molécule, la stabilité des domaines face à la température : le domaine D est dénaturé pour des températures de l'ordre de 45-60 °C tandis que le domaine E résiste à des températures pouvant monter jusqu'à 95 °C. Ainsi, la défibrinogénéation du plasma consiste à chauffer le plasma à environ 56 °C pendant 10 minutes permettant la dénaturation des domaines D et menant à la précipitation du fibrinogène. Toutefois, des méthodes et formulations ont été mises en place afin de permettre une meilleure stabilité de la molécule à la température ; assurant notamment la possibilité d'utiliser la pasteurisation sur le fibrinogène (68 °C, 10 h) (48).

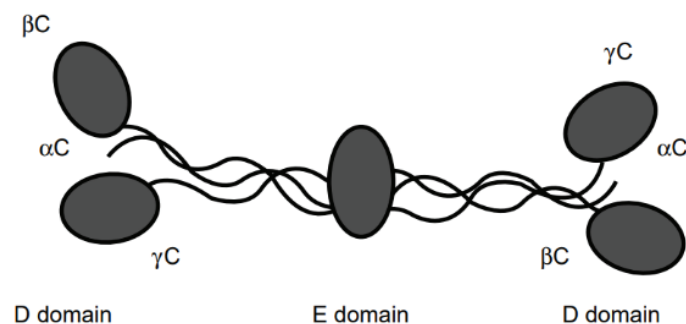


Figure 5 : Schéma de la structure du fibrinogène selon les domaines D et E formés par les chaînes A α , B β et γ (48)

Génétique

Les chaînes A α , B β et γ sont codées par les gènes respectifs FGA, FGB et FGG se trouvant dans une région d'environ 50 kilobases sur le bras long du chromosome 4 (47,54,59). Chaque gène est transcrit de façon indépendante pour produire des polypeptides de respectivement 644 acides aminés (A α), 491 acides aminés (B β), et 437 acides aminés (γ). Un épissage alternatif sur la chaîne A α permet de produire un isoforme (A α -E), tandis qu'un épissage alternatif sur la chaîne γ produit l'isoforme γ' (54). Au cours de la translocation de chaque chaîne simple dans la lumière du réticulum endoplasmique, un peptide signal est clivé de chaque chaîne (54). Les

chaînes seront tout d'abord assemblées selon deux complexes : $A\alpha\text{-}\gamma$ et $B\beta\text{-}\gamma$. Un intermédiaire $(A\alpha \cdot B\beta \cdot \gamma)_1$ est ensuite formé avant d'être dimérisé pour former un fibrinogène dit normal (Fib_{340}) : $(A\alpha \cdot B\beta \cdot \gamma)_2$ (48,54). La protéine comprendra également plusieurs modifications post-traductionnelles dans le complexe Golgi avant d'être sécrétée (54).

2.1.3 Physiologie de la coagulation et rôle du fibrinogène

Rôle du fibrinogène dans la coagulation

Le fibrinogène joue un rôle clé dans le fonctionnement normal de l'hémostase en favorisant la formation de caillots, l'agrégation plaquettaire et ultimement la fibrinolyse (57). La maintenance de l'hémostase repose ainsi sur une série d'interactions entre les composants cellulaires et protéiques de la coagulation. A la suite d'une altération de la paroi vasculaire, les plaquettes sont activées par le collagène subendothélial et par la thrombine (facteur IIa). Les plaquettes activées sécrètent à leur tour des inducteurs de l'agrégation plaquettaire (49,59). Le fibrinogène facilite cette agrégation plaquettaire par liaison aux récepteurs glycoprotéiques de surface IIb/IIIa (48–50,52,53). Les plaquettes activées adhèrent à la paroi sanguine détériorée et s'agrègent les unes aux autres. Ces dernières colmatent de cette façon la lésion et sécurisent l'hémostase (hémostase primaire). Par la suite, le caillot de plaquettes est stabilisé par la formation de fibrine (hémostase secondaire) (49,50,53).

La conversion du fibrinogène en caillot de fibrine est réalisée selon une trois phases distinctes : le clivage enzymatique par la thrombine pour produire des monomères de fibrine, l'autoassemblage spontané des unités de fibrine pour former une structure polymérique, et la fixation covalente des brins de fibrines par le facteur XIIIa (50,52,54,55,61). Le mécanisme généralement accepté pour la conversion du fibrinogène soluble en un caillot de fibrine insoluble implique une action directe de la thrombine. Cette dernière est générée via les branches intrinsèques et extrinsèques de la cascade de coagulation (48).

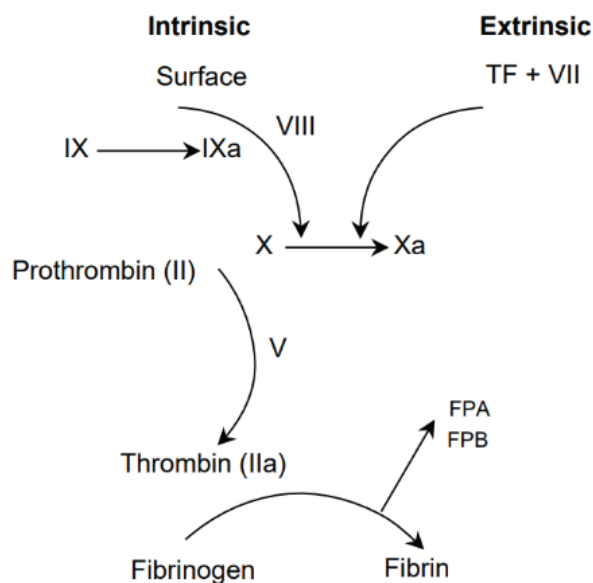


Figure 6 : Schéma de la cascade de la coagulation (48)

L'assemblage des facteurs IXa et VIIIa sur des phospholipides, ou du facteur tissulaire et du facteur VIIa, résulte en une génération de facteur Xa à partir de la surface liant le facteur. Le facteur Xa, à son tour, convertit la prothrombine (facteur II) en thrombine en présence de son cofacteur, le facteur Va, de calcium, et de phospholipides activés (le complexe prothrombinase). Notons que l'activation physiologique de la coagulation se produit majoritairement par l'intermédiaire de l'activité due au facteur tissulaire et au facteur VIIa (62).

Polymérisation et lyse de la fibrine

La thrombine clive les chaînes A α et B β pour relarguer respectivement les fibrinopeptides A (FPA) et B (FPB) de chacune de leurs extrémités N-terminales. Avec les fibrinopeptides A et B clivés, le monomère de fibrine présente un déficit en charge négative (initialement portée par ces peptides) permettant de repousser les molécules de fibrinogène entre elles. De cette manière, les monomères de fibrine peuvent se fixer bout à bout et latéralement. Les fibres se fondent alors en un motif de mailles croisées, produisant un réseau capable de capturer les érythrocytes, les plaquettes et de fixer la thrombine. Notons que la densité du maillage peut être affectée par des conditions physiques (pH, température, etc.). Le polymère de fibrine produit est ensuite modifié par le facteur XIIIa qui change les liaisons hydrogènes entre les monomères par des liaisons covalentes ϵ -(- γ -glutamyl)-lysyl, augmentant par la même occasion la résistance et la stabilisation du caillot. Des liaisons longitudinales entre les chaînes γ de protofibrilles adjacentes assurent la densité et la rigidité des fibres. De même, des liaisons transversales entre

les chaînes A α développent la rigidité des fibres de fibrine, et permettent de limiter la lyse du caillot par fibrinolyse (47,49–51,58–60,62).

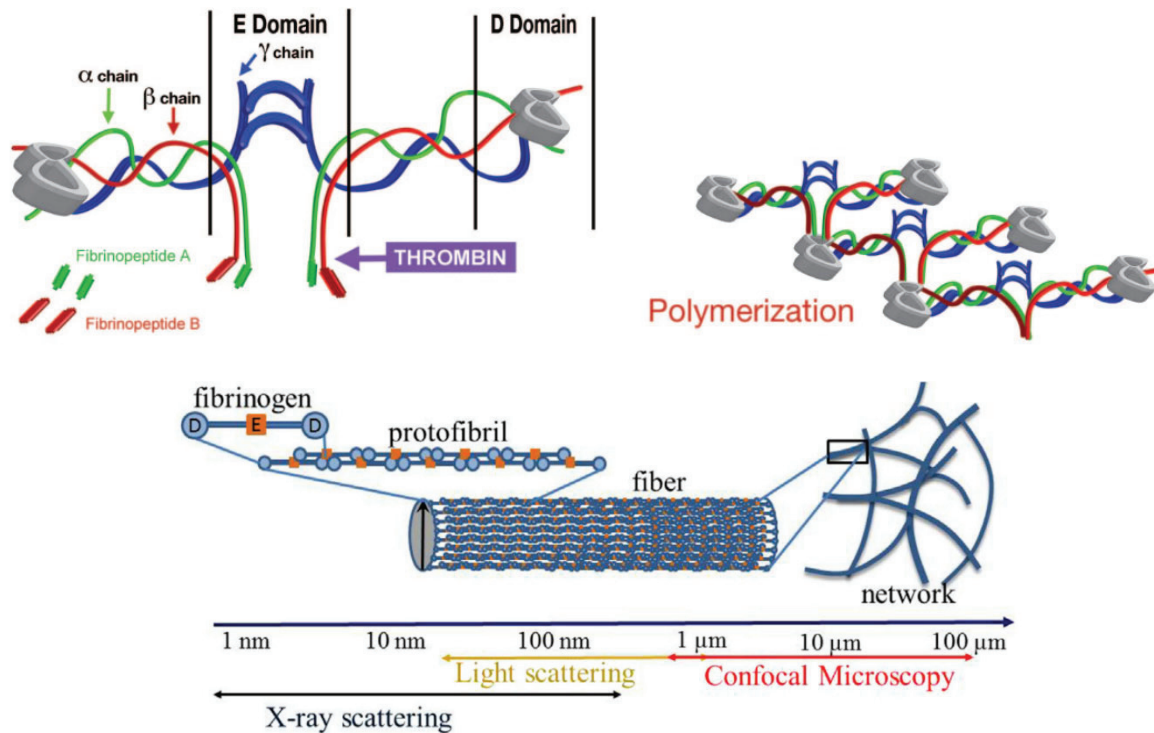


Figure 7 : Molécule de fibrinogène et polymérisation de la fibrine (53,60)

La fibrine sera par la suite lysée par le système fibrinolytique endogène – notamment la plasmine – formant les produits de dégradation de fibrine (PDF). En outre, la fibrine est un cofacteur de l'activateur de plasminogène tissulaire (47,49,62). Si les récepteurs du plasminogène sur le fibrinogène ne sont pas accessibles, la polymérisation de la fibrine permet néanmoins de les rendre accessibles. Ainsi, la fibrine se lie à l'activateur tissulaire du plasminogène, permettant de rendre la plasmine efficace pour jouer son rôle fibrinolytique. Notons toutefois que la densité des protofibrilles ne permet pas aux enzymes fibrinolytiques de diffuser jusqu'à l'intérieur de la fibre de fibrine. Les fibres seront alors lysées transversalement et non longitudinalement depuis la face externe (47).

2.1.4 Méthodes de mesure du fibrinogène

Temps de céphaline avec activateur

Le Temps de céphaline avec activateur (TCA) mesure le temps de coagulation à 37 °C d'un plasma citraté pauvre en plaquettes en présence de phospholipides (céphaline), d'un activateur de la phase de contact (kaolin, acide ellagique, silice micronisée ou autre) et de calcium ajouté en excès (63). Le résultat, exprimé en secondes, est comparé à un pool de plasmas témoins sous

la forme d'un ratio malade/témoin (63). Aussi, un ratio malade/témoin supérieur à 1,2 est considéré comme normal chez l'adulte (63). Ce test permet l'exploration des facteurs de la voie intrinsèque (prékallitréine, kininogène de haut poids moléculaire, facteurs XII, XI, IX, VIII) et les facteurs de la voie commune (facteurs X, V, II et fibrinogène) (63). Dans le cas du fibrinogène, ce test ne sera pas modifié pour des concentrations comprises entre 0,6 et 8 g/L (63). A noter enfin qu'il est néanmoins sensible à la présence d'inhibiteurs acquis de la coagulation (anticoagulants circulants de type lupique, antiphospholipides) et aux traitements anticoagulants (63).

Temps de Quick

Le temps de Quick (TQ) correspond au temps de coagulation à 37°C d'un plasma citraté, pauvre en plaquettes et en présence de facteur tissulaire, de phospholipides et de calcium (63). Lorsque le plasma d'un patient est testé, le temps de coagulation obtenu est comparé à un pool de plasma témoins, dont les valeurs normales sont prises entre 12 et 13 secondes (63). En France, il sera plus généralement fait mention du taux de prothrombine (TP), exprimé en pourcentage d'activité ; ce dernier diffère du temps de Quick par l'utilisation d'une courbe d'étalonnage issue de dilutions d'un plasma témoin représentant l'activité de référence (63). A noter qu'une valeur normale de TP est située entre 70 et 100 % (64). Il peut également être fait mention de l'INR (*International Normalized Ratio*) qui est une dernière valeur dérivée du temps de Quick, exprimée sous la forme d'un ratio entre le temps de Quick du patient et le temps de Quick de référence et corrigé par un facteur de puissance ISI (*International Sensitivity Index*) (63). Ce dernier dépend du réactif utilisé et normalise donc – comme son nom l'indique – la valeur obtenue (63). Les valeurs de TQ/TP/INR permettent d'explorer les facteurs de coagulation de la voie extrinsèque (facteurs VII et X) et de la voie commune de la coagulation (facteurs X, V, II et fibrinogène) (63,64).

En somme, le TP et le TCA sont deux tests cliniques simples et peu coûteux, utilisés en routine (64,65). Si ces tests considèrent le temps comme la seule variable, ils donnent peu d'indications sur les caractéristiques physiques telles que la structure du caillot, sa résistance mécanique et ses propriétés fibrinolytiques, ni sur les caractéristiques fonctionnelles et quantitatives spécifiques de facteurs d'intérêt (58,65). C'est pourquoi, des tests complémentaires peuvent être réalisés afin d'explorer davantage un allongement du TCA ou d'une diminution du TP (64) (voir 2.2.6. Prise en charge des pathologies congénitales du fibrinogène).

Test de Clauss

Le test de Clauss est un test fonctionnel et quantitatif basé sur la capacité du fibrinogène à former un caillot de fibrine après avoir été mis en contact avec une quantité importante de thrombine, utilisée comme réactif (58). Le dosage, généralement automatisé, est réalisé sur le plasma du patient à 37 °C (58). La forte concentration de thrombine associée à une source en fibrinogène issue du plasma diluée par le tampon du réactif implique que la concentration de fibrinogène limite la cinétique de la réaction polymérisation de la fibrine (66). Par conséquent, si le fibrinogène est bien responsable du temps de coagulation dans ce système, ce dernier – mesuré en secondes – est inversement proportionnel à la quantité de fibrinogène (58,66,67). Le temps de coagulation est converti en une concentration de fibrinogène à partir d'une courbe standard construite à l'aide d'un standard de concentration de fibrinogène connu et traçable selon des normes internationales (66). En raison de la dilution de l'échantillon dans le tampon, toute interférence des inhibiteurs de la coagulation est minimisée dans le test de Clauss, y compris l'héparine ou les produits de dégradation du fibrinogène pouvant être présent lors d'une coagulation intravasculaire disséminée ou d'une thérapie thrombolytique (66).

Test du fibrinogène dérivé du taux de prothrombine

Le fibrinogène dérivé du taux de prothrombine permet d'attribuer un résultat de fibrinogène indirectement évaluant le changement de densité optique (ou de turbidité, voir 3.3.3. Influence de la présence d'agrégats de fibrinogène dans les spécialités pharmaceutiques) de l'échantillon du patient lors du test de Quick (66). Ainsi, la différence entre la ligne de base et la densité optique maximale est proportionnelle à la concentration de fibrinogène (67). Bien que certains automates évaluant le temps de Quick permettent d'obtenir cette valeur directement, cette estimation est peu recommandée en pratique clinique (63).

A noter que le test de Clauss et le test du fibrinogène dérivé du taux de prothrombine ne peuvent pas être utilisés de manière interchangeable (67). En effet, le test du fibrinogène dérivé donne des estimations plus élevées de la concentration de fibrinogène par rapport au test de Clauss (66). De même, des variations significatives de la reproductibilité et de la cohérence des niveaux de fibrinogène sont observées entre les laboratoires qui utilisent chacun uniquement l'un et l'autre des deux tests (67). Toutefois, ces différences sont bien documentées (66,67).

Temps de thrombine

Le temps de thrombine est le temps de coagulation à 37°C d'un plasma citraté, pauvre en plaquettes et en présence de thrombine (63). Il s'agit d'un indicateur de la polymérisation initiale des monomères de fibrine sous l'action de la thrombine, utilisée comme réactif (63). La vitesse de coagulation est ainsi fonction de la quantité et de la qualité du fibrinogène et de la présence ou non d'inhibiteurs de la fibrinof ormation (héparine non fractionnée, produits de dégradation de la fibrine, autoanticorps inhibant la polymérisation, etc.) (63). Les résultats – exprimés en secondes – sont comparés à un témoin, dont la valeur normale est généralement comprise entre 16 et 20 secondes (63). Une variante de ce test, utilisant des concentrations plus élevées de thrombine et une dilution de plasma à tester, permet de mesurer la concentration plasmatique de fibrinogène (63). Toutefois, si le dosage du fibrinogène plasmatique est couramment réalisé en clinique, le TT est plutôt réservé à l'exploration d'un TCA allongé avec une concentration de fibrinogène normale (63).

Temps de reptilase

La reptilase est une enzyme extraite d'un venin de serpent qui transforme le fibrinogène en fibrine (63). Contrairement à la thrombine, cette enzyme est insensible à l'héparine (63). Par conséquent, ce test permet de différencier les allongements du TT dus à la présence d'héparine non fractionnées de ceux indépendants de l'héparine (63).

Concentration antigénique de fibrinogène

Plusieurs options pourront être utilisées pour l'évaluation de la concentration antigénique de fibrinogène. Citons à ce titre, des techniques pondérales par précipitation à la chaleur ou aux sels d'aluminium ainsi que des techniques immunologiques (56). Une méthode très répandue actuellement est l'ELISA, qui est une technique immunologique (56).

Thromboélastométrie et thromboélastographie

La thromboélastométrie repose sur l'évolution de la rotation d'un axe, pris dans un échantillon de sang, en fonction du changement de la viscosité ce celui-ci en lien avec la polymérisation de la fibrine lors de la coagulation (64). La mesure est donc liée à l'évolution de la viscoélasticité du thrombus qui modifie la vitesse de rotation de l'axe de mesure (64). Deux technologies s'illustrent principalement dans ce domaine : la thromboélastométrie rotationnelle avec le ROTEM® qui utilise la rotation de la cupule contenant l'échantillon autour de l'axe, et la

thromboélastographie avec le TEG[®] qui utilise la rotation de l'axe dans la cupule contenant l'échantillon (64,66).

Dans le cas du TEG[®], le dosage fonctionnel du fibrinogène utilise un antagoniste de la glycoprotéine IIb/IIIa dans le réactif pour séparer la fonction plaquettaire et la contribution du fibrinogène (66). Le FIBTEM[®], test issu du ROTEM[®], est quant à lui utilisé pour surveiller la contribution du fibrinogène sur la formation du thrombus, en inhibant la contribution des plaquettes à l'aide de cytochalasine D dans le réactif (66). L'EXTEM[®], également issu du ROTEM[®], permet d'explorer la contribution du fibrinogène sur la formation du thrombus, en prenant en compte la contribution des plaquettes à la différence du FIBTEM[®] (66). Le ROTEM[®] peut être utilisé pour réaliser en tout cinq tests différents ; cependant, seuls le FIBTEM[®] et l'EXTEM[®] seront abordés dans ce manuscrit.

Dans ces tests (ROTEM[®] et TEG[®]), le taux de fibrinogène fonctionnel est proportionnel à l'amplitude de la courbe en cloche obtenue (amplitude maximale ou fermeté maximale du caillot) (64). Ces tests permettent ainsi de réaliser en quelques minutes (généralement 7 à 10 minutes) une évaluation complète de la coagulation en explorant l'initiation, la stabilisation et la lyse du caillot, tout en intégrant les propriétés des plaquettes, des leucocytes et des érythrocytes (64,66). En plus de la chirurgie cardiaque, cette technologie est utilisée et recommandée en gynécologie-obstétrique dans la prise en charge des hémorragies du post-partum, en traumatologie et en transplantation hépatique (64).

2.2 Pathologies congénitales associées au fibrinogène

2.2.1 Classification des déficits héréditaires du fibrinogène

Les déficits héréditaires du fibrinogène incluent des désordres quantitatifs (afibrinogénémie et hypofibrinogénémie) et qualitatifs (dysfibrinogénémie et hypodysfibrinogénémie), définis selon des niveaux fonctionnels et antigéniques de fibrinogène circulant (68–70). Les pathologies héréditaires associées au fibrinogène toucheraient actuellement 42 patients en France, ce qui représente 7 % des maladies hémorragiques rares ; elles sont plus fréquentes chez les femmes que chez les hommes (54,71). A titre de comparaison, en 2019 près de 17 500 patients ont été traités avec du fibrinogène humain dans le cadre du traitement d'un déficit acquis en fibrinogène (d'après l'ATIH). Les pathologies héréditaires, issues de mutations mono- ou bi-allélique sur au moins l'une des trois chaînes du fibrinogène, mènent à la synthèse, l'assemblage et/ou à la sécrétion défectueuse de fibrinogène ; ou éventuellement à la sécrétion

effective de fibrinogène dysfonctionnel (52,59,68,69). Actuellement, plus de 450 mutations sur FGA, FGB et FGG ont été enregistrées dont plus 250 entraînent un phénotype asymptomatique ; entre 50 et 80 % des mutations les plus communes correspondent à des mutations faux-sens (72). Ainsi, les phénotypes possibles des patients atteints de déficit héréditaire du fibrinogène sont non seulement nombreux en termes de sévérité, mais aussi variables pour un même génotype (69). La majorité des déficits héréditaires du fibrinogène peut être suspectée par des tendances au saignement, ou être découvertes au préalable d'une intervention chirurgicale. Ces pathologies peuvent aussi être décelées lors d'événements thrombotiques, de récupérations altérées en cas de blessures ou d'avortements spontanés récurrents (72).

En 2018, le Comité Scientifiques de la Société Internationale de Thrombose et d'Hémostase (*Research Standardization Committee at the International Society on Thrombosis and Haemostasis*) a reclassé les pathologies congénitales associées au fibrinogène. Il a ainsi été suggéré de classer ces pathologies selon le phénotype clinique et biologique (47,72), comme il est possible de le voir dans le tableau suivant :

Tableau 3 : Classification des déficits héréditaires du fibrinogène (47,72)

Individu sain		
	<i>Phénotype</i>	<i>Fibrinogène fonctionnel circulant</i>
	Normal	1,5 - 4 g/L
Type 1	Afibrinogénémie	
	<i>Phénotype</i>	
Sous-type 1A	Asymptomatique	
	Hémorragique	
Sous-type 1B	Thrombotique	
Type 2	Hypofibrinogénémie	
	<i>Phénotype</i>	<i>Fibrinogène fonctionnel circulant</i>
Sous-type 2A	Sévère	< 0,5 g/L
Sous-type 2B	Modéré	0.5 - 0.9 g/L
Sous-type 2C	Léger	1 g/L - limite inférieure de normalité
Sous-type 2D	Pathologie associée au stockage (pathologie familiale avec une accumulation de fibrine dans les hépatocytes)	
Type 3	Dysfibrinogénémie	
Sous-type 3A	Patients avec des thromboses ne correspondant pas aux critères 3B	
	Patients avec des hémorragies ne correspondant pas aux critères 3B	
	Patients asymptomatiques	
Sous-type 3B	Patient porteur d'une mutation impliquant un fibrinogène thrombotique	
	Patient souffrant d'événements thrombotiques avec une histoire thrombotique affectant un parent au 1er degré sans autre thrombophilie	
Type 4	Hypodysfibrinogénémie	
	<i>Phénotype</i>	<i>Antigène de fibrinogène circulant</i>
Sous-type 4A	Sévère	< 0,5 g/L
Sous-type 4B	Modéré	0.5 - 0.9 g/L
Sous-type 4C	Léger	1 g/L - limite inférieure de normalité

2.2.2 Afibrinogénémie

Epidémiologie et découverte de la maladie

L'afibrinogénémie est une pathologie autosomique récessive de la coagulation, initialement décrite en 1920 et présentant une prévalence d'environ 1 pour 1 000 000 (54,59,72). Ainsi, au même titre que les autres pathologies récessives, la prévalence de l'afibrinogénémie augmente dans les populations pour lesquelles les mariages consanguins sont courants (54,59,72). L'afibrinogénémie se manifeste généralement en période néonatale par l'intermédiaire d'hémorragie au niveau du cordon ombilical – dans 85 % des cas – associées le plus souvent à d'autres hémorragies allant de légères à sévères (57,59,72). Un diagnostic de l'afibrinogénémie peut être réalisé par des essais immunologiques et fonctionnels, qui montreront une absence totale de molécule de fibrinogène fonctionnelle et immunoréactive (59).

Génétique

L'afibrinogénémie peut être déterminée par une mutation sur n'importe lequel des gènes des trois chaînes composant le fibrinogène. Cependant, la plupart des allèles observées chez les individus afibrinogénémiques sont trouvés sur la séquence de la chaîne A α (59,72). En effet, plus de 16 variants non-sens sont reportés pour FGA contre seulement 5 pour FGG ou FGB. Citons parmi les mutations principales causant l'afibrinogénémie, une délétion de 11 kb sur FGA ainsi que la mutation IVS4 + 1G > T sur le site d'épissage de l'intron 4 de FGA. Cette dernière est plus répandue que la délétion de 11 kb chez les individus d'origine caucasienne (59).

Physiopathologie

Les patients afibrinogénémiques sont affectés par des saignements pouvant survenir non seulement au niveau de la peau, de la cavité orale, du tractus intestinal, des voies génito-urinaires, du système musculosquelettique, mais aussi du système nerveux central avec des hémorragies intracrâniennes. Ces dernières sont d'ailleurs à l'origine de la majorité des décès de patients (54,57,69,72). L'afibrinogénémie peut également être à l'origine de rupture splénique et de kystes osseux (54,72). Comme décrit pour les déficiences du facteur XIII, les troubles quantitatifs du fibrinogène résultent en une guérison peu efficace (54). Par ailleurs, les femmes afibrinogénémiques ont une fréquence accrue de complications gynécologiques et obstétriques par rapport à la population générale. Ces complications regroupent les ménorragies, les avortements spontanés principalement lors du premier trimestre, le

décollement placentaire entraînant la perte du fœtus, la délivrance prématurée mais aussi les hémorragies ante-partum et post-partum (54,57,59,72). Enfin, des complications thrombotiques veineuses et artérielles peuvent paradoxalement être observées chez des patients afibrinogénémiques (54,72).

2.2.3 Hypofibrinogénémie

Découverte de la maladie

L'hypofibrinogénémie a été reportée pour la première fois en 1935. Elle est définie comme une diminution des concentrations plasmatiques du fibrinogène fonctionnel et immunoréactif (54). C'est d'ailleurs sur ces critères que le diagnostic est posé (59,70).

Génétique

L'hypofibrinogénémie est le plus souvent causée par un génotype hétérozygote pour une mutation causant l'afibrinogénémie sur un gène du fibrinogène. Aussi, l'hypofibrinogénémie est plus fréquente que l'afibrinogénémie ; d'autant que les individus diagnostiqués pour l'hypofibrinogénémie sont généralement porteurs d'un allèle associé à l'afibrinogénémie (54,59,72). L'état de ces patients est d'ailleurs exploré comme ce pourrait être le cas pour l'afibrinogénémie : une première étude de la séquence de FGA suivie d'une exploration sur l'exon 8 de FGB (59). En effet, la majorité des européens atteints d'hypofibrinogénémie présentent une des deux mutations sur FGA, déjà citées pour l'afibrinogénémie : IVS4+1G>T ou la délétion de 11 kb (70). Le phénotype thrombotique est quant à lui associé à des mutations sur la séquence de la chaîne B β (59).

Physiopathologie

L'hypofibrinogénémie est souvent asymptomatique – particulièrement lorsque le niveau de fibrinogène plasmatique est supérieur à 1 g/L – et par conséquent découverte lors d'exams de routine (59,70,72). En effet, un niveau de fibrinogène circulant de l'ordre de 1,0 g/L est suffisamment élevé pour protéger le patient contre des hémorragies et maintenir une grossesse. Cependant, des saignements en cas de traumatisme peuvent survenir au même titre que des patients normaux ou en cas de pathologie hémostatique secondaire (54). Pour les autres patients hypofibrinogénémiques, le phénotype hémorragique prédomine – comparativement au phénotype thrombotique – dépendamment des niveaux plasmatiques de fibrinogène circulant (72). Ainsi de faibles quantités de fibrinogène fonctionnel entraînent un risque accru de saignements au cours d'interventions notamment cardiovasculaire, traumatiques et obstétriques

(50,70,72). Près de 20 % des patients présentent des saignements spontanés aux niveaux gastro-intestinal et musculaire (72). De même, les femmes hypofibrinogénémiques peuvent souffrir d'avortements spontanés et d'hémorragies du post-partum (54). Rappelons toutefois que les patients atteints d'hypofibrinogénémie sont généralement moins affectés par des événements hémorragiques sévères que les patients afibrinogénémiques (57,69). En outre, les familles d'hypofibrinogénémiques montrent essentiellement des patientes avec des hémorragies du post-partum comme seul problème de saignement. Statistiquement, une femme sur quatre est affectées par ces saignements dans ces familles (54).

Cas du sous-type 2D

L'hypofibrinogénémie peut être associée dans de très rares cas à des dysfonctionnements hépatiques. Citons ainsi le variant p.Gly284Arg qui fut le premier à être associé à l'hypofibrinogénémie et l'accumulation hépatique d'agrégats de fibrinogène (59). Dans ce cas, le relargage de fibrinogène anormal provient d'une accumulation d'agrégats dans le réticulum endoplasmique des hépatocytes (54). Depuis, de nombreuses autres mutations ont été décrites dans le cas de maladies de stockage du fibrinogène (59,72).

2.2.4 Dysfibrinogénémie

Découverte de la maladie

Le diagnostic suggère une réduction de fibrinogène plasmatique fonctionnel, combinée à des niveaux d'antigène de fibrinogène normaux voir augmentés (54,59,70). Ainsi, les tests de coagulation sont infiniment prolongés dans les cas classiques de la maladie (70). A noter que certaines formes sont assez difficiles à diagnostiquer suivant les techniques utilisées par les laboratoires ; par exemple, le temps de thrombine normal de la dysfibrinogénémie dite Oslo I peut laisser supposer un niveau de fibrinogène fonctionnel qui soit également dans la normal (54).

Génétique

La dysfibrinogénémie fut reportée pour la première fois en 1958 (54). La dysfibrinogénémie est le terme utilisé pour définir une pathologie fonctionnelle du fibrinogène (59). La dysfibrinogénémie est généralement associée à des caractères héréditaires autosomaux dominants causés par un génotype hétérozygote lié à une mutation faux-sens dans le codage de la région de l'un des trois gènes du fibrinogène. C'est pourquoi il s'agit d'une pathologie plus fréquente que l'afibrinogénémie (54,59,68). Près de 85 % des variants de fibrinogènes détectés

sont dus à des altération sur des nucléotides de la séquence de l'exon 2 de FGA ou sur l'exon 8 de FGG, respectivement très près de la partie N-terminale de la chaîne A α du fibrinogène et de la partie C-terminale de la chaîne γ (59,68,72). Citons par exemple c.103C>T (p.Arg35Cys) et c.104G>A (p.Arg35His) sur l'exon 2 de FGA, ainsi que c.901C>T (p.Arg301Cys) et c.902G>A (p.Arg301His) sur l'exon 8 de FGG (68). Dans le cas de dysfibrinogénémies avec thrombose, des mutations peuvent être identifiés dans l'ensembles des trois chaînes du fibrinogène ; la plupart d'entre eux mène à un nouveau résidu cystéine principalement ceux impliquant un résidu entre les chaînes A α et γ . Ainsi, dans le contexte clinique d'une dysfibrinogénémie, la corrélation génotype-phénotype pourrait aider au diagnostic contrairement aux autres pathologies héréditaires du fibrinogène (59).

Physiopathologie

Les patients héritant de dysfibrinogénémie sont asymptomatiques dans plus de la moitié des cas (54,59,70). C'est pourquoi, la dysfibrinogénémie est souvent découverte fortuitement lors de tests anormaux de la coagulation ou lorsque celle-ci a été découverte préalablement dans la famille (54). A l'inverse, près de 25 % des patients constatent la survenue de saignements (70,72) ; tandis qu'entre 10 % (59) et 20 % (70) des patients ont été reportés pour des cas de thrombose, notamment des thromboses veineuses profondes, des thrombophlébites ou encore des embolies pulmonaires liés à une cicatrisation incomplète (54,59,70). Aussi des preuves récentes montrent que les patients atteints de dysfibrinogénémie présentant de l'embolisme pulmonaire peuvent souffrir par la suite de complications sévères telles que de l'hypertension thromboembolique pulmonaire (72). Les hypothèses actuelles proposées pour la survenue de ces thromboses regroupent deux mécanismes : les molécules de fibrinogène anormales réduisent la fixation de la thrombine provoquant des niveaux élevés de thrombine circulant ; elles sont également associées à polymérisation de la fibrine anormale résultant en des réseaux de fibrines anormaux, aboutissent à des caillots résistants à la dégradation par la plasmine (54,59,72). A noter que certains patients souffrent non seulement de saignements mais aussi de thromboses (59,69). Les patients atteints de dysfibrinogénémie associée à des hémorragies sont quant à eux généralement révélés après des traumatismes, des chirurgies ou en postpartum (54,69). Notons chez les femmes atteintes de dysfibrinogénémie des cas d'avortements spontanés dans le premier trimestre ainsi que des décollements du placenta qui ne semblent toutefois pas corrélés avec les concentrations en fibrinogène. Des thromboses peuvent aussi se déclarer en post-partum (54,72).

2.2.5 Hypodysfibrinogénémie

Découverte de la maladie

L'hypodysfibrinogénémie est la pathologie congénitale associée au fibrinogène la plus rarement reportée. Ainsi en cas de faibles niveaux de fibrinogènes plasmatiques associés à une activité réduite, une hypodysfibrinogénémie peut être reportée (72). Pour autant, les patients peuvent être diagnostiqués par erreur comme hypofibrinogénémiques car il peut être difficile de mener des essais de fonctionnalité sur le fibrinogène (59).

Génétique

La forme la plus courante de la pathologie implique des agrégats de fibrinogène dans le réticulum endoplasmique des hépatocytes des patients, liée à une mutation faux-sens sur le gène FGG (59,68). Actuellement, une trentaine de mutations réparties sur les trois chaînes de fibrinogène ont été décrites dans le cas de l'hypodysfibrinogénémie. Aussi les pathologies s'expriment pour un génotype autosomique dominant (72) ainsi une grande majorité des patients hypodysfibrinogénémiques sont hétérozygotes (68) ; auxquels s'ajoutent de très rares cas homozygotes ou partiellement hétérozygotes pour certains allèles (59).

Physiopathologie

Cette pathologie associe les symptômes de l'hypofibrinogénémie et de la dysfibrinogénémie (72). En outre, le phénotype intermédiaire peut résulter d'un assemblage défectueux et une sécrétion anormale du fibrinogène ou la combinaison de deux allèles porteurs de déficience, l'un affectant quantitativement le fibrinogène tandis que l'autre atteint sa fonctionnalité (59,72). Les hémorragies post-partum et les ménorragies sont particulièrement fréquentes expliquant notamment pourquoi ce type de pathologie héréditaire du fibrinogène est plus particulièrement retrouvé en clinique chez les femmes (72).

2.2.6 Prise en charge des pathologies congénitales du fibrinogène

Diagnostic

Une anomalie du fibrinogène est généralement évoquée chez un patient présentant un faible taux de fibrinogène, ou sujet à des hémorragies (73). Les phénotypes des patients rencontrés étant souvent asymptomatiques ou peu sévères ; par conséquent, les découvertes fortuites sont fréquentes (73). Lorsqu'une pathologie constitutionnelle associée au fibrinogène est suspectée, il conviendra de s'assurer que la cause des symptômes ne proviennent pas d'une pathologie

acquise qui pourrait induire des modifications post-traductionnelles, accélérer la clairance, ou altérer la synthèse de fibrinogène (56,72,73). Ainsi à titre d'exemple, une maladie hépatique, un cancer, une pathologie plasmocytaire, une maladie rhumatismale ou encore la prise de certains médicaments (asparagine, tigécycline, acide valproïque, altéplase) devront être étudiés car ils peuvent être associés à une baisse significative du fibrinogène, voir même à une hémorragie sévère (56,73). De même, le fibrinogène étant une protéine impactée par l'inflammation, des mesures répétées seront parfois nécessaires afin de poser le diagnostic ; notamment en cas de grossesse, d'utilisation de contraceptifs hormonaux oraux, d'infection ou après une intervention chirurgicale (72). Auquel cas, l'histoire familiale en parallèle du contexte clinique permettra de distinguer anomalie héréditaire et acquise du fibrinogène (56,73). A noter que le génotype sera indispensable pour confirmer le diagnostic et identifier le sous-type précis d'anomalie associée au fibrinogène afin de prendre en charge le patient et anticiper des risques thrombotiques ou hémorragiques (56).

Les tests les plus courants pour le diagnostic des déficits héréditaires du fibrinogène sont (56,72) (voir 2.1.4. Méthodes de mesure du fibrinogène) :

- Le taux de prothrombine (TP)
- Le temps de céphaline avec activateur (TCA)
- L'évaluation de l'activité du fibrinogène par la méthode de Clauss
- L'évaluation de la concentration antigénique de fibrinogène par techniques immunologiques (ELISA)

De cette façon, un algorithme diagnostique par étape a été proposé par Casini et Lebreton en 2021, et précisé ici à l'aide des données du PNDS (56,73) (voir Figure 8) :

- I. Dosage des temps de coagulation ainsi que de l'activité du fibrinogène par la méthode de Clauss
- II. En cas de baisse du fibrinogène, dosage de l'antigène de fibrinogène et des temps de thrombine et de reptilase et *le fibrinogène dérivé* (en italique car il s'agit d'un test complémentaire non indispensable pour le diagnostic)
- III. Confirmation du diagnostic par le génotype (les anomalies les plus fréquentes sont indiquées pour chaque type dans la Figure 8)

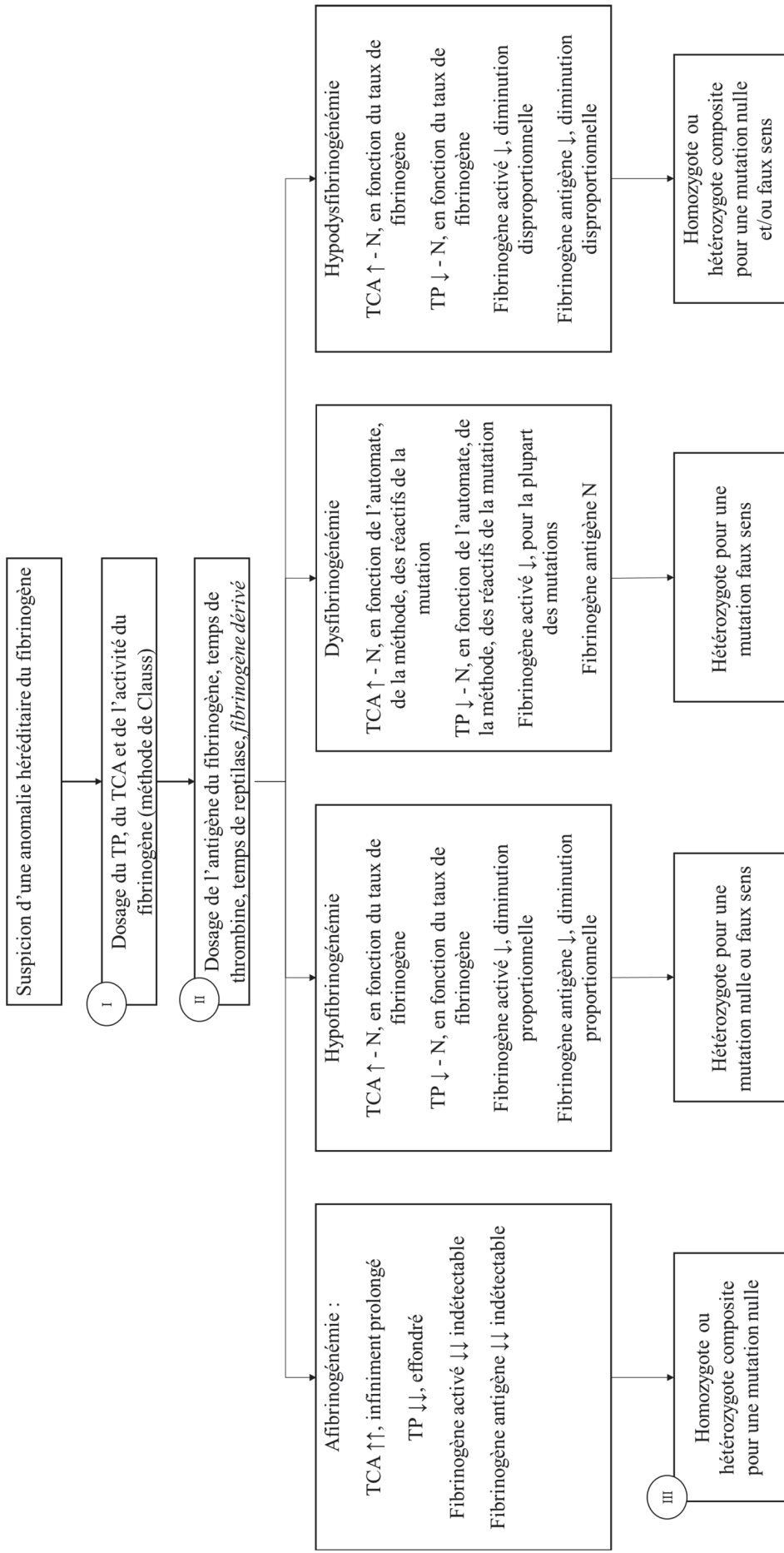


Figure 8 : Algorithme diagnostic des anomalies héréditaires du fibrinogène (56,73)

Sources de fibrinogène en thérapeutique

A l'image de la plupart des déficits en facteur de la coagulation, la prévention et la gestion des saignements des déficit héréditaires du fibrinogène sont basés sur le remplacement de la protéine manquante. Dépendamment du pays de résidence, il existe actuellement trois sources de fibrinogène : le plasma frais congelé (PFC), le cryoprécipité, et les spécialités pharmaceutiques de fibrinogène lyophilisés (54,69,70,74). Les fibrinogènes lyophilisés représentent les médicaments les plus sécurisés des trois types à disposition ; principalement dû à une meilleure innocuité, leur rapidité d'action, la flexibilité de la dose délivrée, le faible volume de transfusion, et la facilité d'administration comparativement au cryoprécipité et au plasma frais congelé (54,69,70). Néanmoins, le cryoprécipité et le plasma frais congelé restent particulièrement utiles lorsque les spécialités pharmaceutiques ne sont pas disponibles localement (54). A noter que le cryoprécipité n'est plus utilisé en France, contrairement au Royaume-Uni ou à l'Amérique du Nord (17,75–77).

Niveau critique des déficits héréditaires en fibrinogène

La supplémentation en fibrinogène est basée sur des opinions d'experts et des études observationnelles, et elle est recommandée pour atteindre les concentrations en fibrinogène fonctionnelles comprises entre 1 et 1,5 g/L (72). Historiquement, un niveau de 1,0 g/L a été établi chez les patients atteints de déficit héréditaire du fibrinogène (50,72). En outre, les publications du Réseau Européen de Diathèses Hémorragiques Rares considère cette valeur comme minimale pour prévenir les saignements excessifs et sécuriser l'hémostase chez la plupart des patients ; en somme pour maintenir un état asymptomatique (50,72). Cependant, certains experts suggèrent qu'une concentration plus faible pourrait être utilisée (72) ; le Protocole National de Diagnostic et de Soins (PNDS) des déficits rares en protéines de la coagulation propose notamment en 2021 un taux supérieur à 0,8 g/L pour éviter la survenue de saignements spontanée (56).

Adaptation de la prise en charge

Un traitement par prophylaxie peut être envisagé chez les patients atteints d'afibrinogénémie ou d'hypofibrinogénémie sévère pour prévenir de la survenue d'hémorragies (54,72,74). La prophylaxie, dite primaire, peut être utilisée depuis le plus jeune âge chez tous les patients afibrinogénémiques afin de prévenir les saignements (54,72). Notons que la prophylaxie – dite secondaire – peut être initiée plus tard dans la vie du patient. Elle sera recommandée si ce dernier souffre de saignements majeurs et récurrents, ou après un événement qui aurait pu leur

coûter la vie comme ce peut être le cas lors d'une hémorragie intracrânienne (54,70,72). La fréquence et la dose de fibrinogène doivent alors être ajustées de manière à maintenir un niveau de fibrinogène compris entre 0,5 et 1 g/L, en prenant en compte les caractéristiques pharmacocinétiques propres du patient (70). La demi-vie plasmatique du fibrinogène étant relativement longue, il est possible de mettre en place une prophylaxie par l'administration de fibrinogène tous les 7 à 14 jours (54,70,74). En opposition à un traitement par prophylaxie, le fibrinogène peut être administré à la demande chez les patients atteints de déficit héréditaire du fibrinogène, notamment dans le cas de saignements aiguës (72). Lors de la survenue d'un accident hémorragique, un taux objectif de fibrinogène circulant supérieur à 1 g/L sera recherché avec une première injection de fibrinogène dans le cas d'un saignement mineur ; un taux objectif supérieur 1,5 g/L sera posé dans le cas d'un saignement majeur (56). De même, la durée du traitement doit être adaptée en fonction de la blessure ou de la procédure d'opération (54).

Prise en charge gynécologique et obstétrique

Les femmes afibrinogénémiques peuvent présenter une conception et une implantation embryonnaire normale. Cependant, la grossesse est généralement perturbée, et résulte en avortements spontanés dans les 5 à 8 premières semaines de gestation. C'est pourquoi, une thérapie substitutive doit être mise en place le plus tôt possible afin de prévenir les risques de complications hémorragiques et la perte du fœtus (54,59,70). La prophylaxie devra être conservée tout au long de la grossesse et même après la naissance (70). En outre, même si les avis d'experts restent actuellement divergents concernant les taux cible de fibrinogène au cours de la grossesse, il semblerait qu'un taux supérieur à 1 g/L soit suffisant pour le premier trimestre. Il sera augmenté à 1,5 g/L voir 2 g/L pour les deux derniers trimestres (56). Des concentrations plus faibles en fibrinogène, inférieur à 0,4 g/L, ont également montré pouvoir maintenir une grossesse mais n'évitent pas les complications hémorragiques (54). Une concentration en fibrinogène supérieure à 1,5 g/L – idéalement supérieure à 2 g/L – est également recommandée au cours de l'accouchement pour limiter les risques de décollement placentaire (54,70). Les patientes hypofibrinogénémiques présentent également des problèmes au cours de la grossesse et du post-partum, principalement celles ayant de faibles niveaux de fibrinogène augmentant par la même occasion les risques d'avortements spontanés (54,70). Dans ce cas, la supplémentation en fibrinogène devrait être considérée compte tenu de la concentration plasmatique de fibrinogène, de la tendance aux saignements et du passif obstétrique. Le suivi régulier des concentrations de fibrinogène ainsi des potentielles

hémorragies placentaires par échographies au cours de la croissance fœtale sera mis en place (70). Dans le cas de dysfibrinogénémie, les problèmes encourus au cours de la grossesse dépendent essentiellement du phénotype de la maladie, notamment des antécédents personnels et familiaux concernant la survenue d'événements thrombotiques et/ou hémorragiques (54,70). Enfin, si la ménorragie est un problème important et récurrent chez les femmes atteintes de pathologies héréditaires du fibrinogène, les oestro-progestatifs peuvent être utiles pour limiter ses effets (54). Aucun traitement spécifique n'est requis chez les femmes asymptomatiques (70).

Gestion du risque thrombotique

La survenue de thromboses chez certains patients requiert simultanément la supplémentation en fibrinogène et l'administration d'anticoagulant, à l'aide de fines supervisions cliniques et laboratoires (72). Les héparines, et plus précisément les héparines de bas poids moléculaires, sont les médicaments de choix pour le traitement des thromboses chez ce genre de patients, et plus particulièrement pour le post-partum ou suivant une césarienne réalisée sous perfusion de fibrinogène (54,70,72). En plus de la thérapie substitutive en fibrinogène, des antifibrinolytiques devraient être donnés, particulièrement en cas d'intervention chirurgicale (54). Enfin, contrairement aux patients hémophiles, les anticorps anti-fibrinogène n'apparaissent pas pour compliquer la gestion du déficit en fibrinogène. En outre, seuls deux cas ont été reportés dans la littérature (70).

2.3 Pathologies acquises associées au fibrinogène

2.3.1 Coagulopathie induite par traumatisme

Caractérisation de la TIC

Les déficiences acquises en fibrinogène impliquent une définition plus large – et par conséquent un plus grand nombre de patients – que celle des déficiences congénitales (52,78). Ces déficiences acquises en fibrinogène apparaissent lorsque des conditions cliniques affectent les niveaux et/ou la fonctionnalité du fibrinogène (52). C'est d'abord le cas lors d'hémorragies massives suivant un traumatisme, pour lesquelles le fibrinogène est le premier facteur de coagulation à atteindre des niveaux critiques (50,52,67,76). Le nom de coagulopathie induite par traumatisme ou TIC (*Trauma-Induced Coagulopathy*) sera alors évoqué et annonciateur d'une issue potentiellement fatale pour le patient (61,67).

La TIC est caractérisée par une réduction de la résistance des thrombus liée à une hypo/dysfibrinogénémie, un dysfonctionnement plaquettaire, une hyperfibrinolyse et un dysfonctionnement endothélial (67). En somme, la baisse de la concentration plasmatique de fibrinogène et l'augmentation sa dégradation sont bien des caractéristiques clefs de cette coagulopathie (67). Notons que de faibles niveaux de fibrinogène à l'arrivée aux urgences, ou une résistance diminuée des caillots de fibrine, ont été associés à des besoins de transfusion ainsi qu'à une augmentation de la mortalité (55). De plus, la perte importante de volume sanguin associée aux hémorragies précipite souvent une triade létale constituée par l'acidose, l'hypothermie et la coagulopathie ; les deux premières aggravant les effets de la dernière (53,55,61,67). Ainsi, la restauration du volume circulatoire est un objectif primaire dans le cas des hémorragies sévères ; généralement abordée avec des expanseurs de volume tels que les cristalloïdes, les colloïdes ou une combinaison des deux (53). Cependant, l'administration de tels médicaments sera accompagnée d'une thrombocytopénie de dilution et d'une réduction des facteurs de coagulation plasmatiques (50). C'est pourquoi, la supplémentation en fibrinogène sera essentielle pour normaliser la fonction de coagulation en restaurant les concentrations plasmatiques de fibrinogène chez le patient (50). Actuellement, les recommandations européennes pour la gestion des traumatismes indiquent de traiter le plus tôt possible avec du fibrinogène, les patients traumatiques souffrant de saignements significatifs et montrant des signes de déficit en fibrinogène ou un niveau plasmatique plus faible que 1,5 à 2 g/L (55,67,77).

Prise en charge de la TIC

L'objectif de tout traitement hémostatique est de minimiser les pertes sanguines et les besoins transfusionnels (61). En effet, un besoin transfusionnel accru augmente la morbidité et la mortalité chez les patients traumatisés (61). Les événements hémorragiques préhospitaliers – des traumatismes dans la plupart des cas – devraient être traités avec une spécialité pharmaceutique de fibrinogène, ou par transfusion de concentré de globule rouge (CGR) ou de composants du sang (PFC et CGR) dont le ratio devrait être préalablement fixé (77). Le fibrinogène pourrait également être apporté au patient par l'intermédiaire de Plasma Frais Congelé (PFC). Cependant, il a été montré que les besoins en transfusion de produits sanguins allogéniques étaient inférieurs chez les patients traumatisés traités par du fibrinogène par rapport aux patients traités par PFC (55). De plus, la transfusion de PFC est associée à un risque de futures défaillances d'organes, de syndromes de stress respiratoires, de TRALI, de TACO (55). Enfin, par opposition à une spécialité pharmaceutique de fibrinogène qui permet d'élever au besoin les niveaux plasmatiques de fibrinogène en étant guidé par les résultats

thromboélastométriques (ROTEM®), le PFC ne fournit qu'une perspective limitée d'augmentations cliniques significatifs des niveaux de fibrinogène (55).

Si une supplémentation en fibrinogène peut être donnée de manière probabiliste – sans test de la coagulation – dans le cas des patients présentant une hémorragie sévère et potentiellement mortelle (77); l'administration de fibrinogène sera préférablement guidée par thromboélastométrie (ROTEM®) au cours de la prise en charge (*point-of-care*) (55,76,77). Les paramètres A05 et A10 de FIBTEM®, permettant de caractériser la résistance du thrombus à 5 et 10 minutes de formation, sont le plus souvent utilisés en ce sens (76), car ils permettent d'éviter une utilisation inappropriée, un délai dans l'administration ou encore un surdosage (77). A défaut d'un test viscoélastique, le diagnostic sera posé par la baisse du niveau de fibrinogène, obtenu par la méthode de Clauss dans le cas où le FIBTEM® ne serait pas disponible (76,77).

Sur la base des preuves actuelles, le caractère bénéfique de l'utilisation du fibrinogène chez les patients souffrant d'une hémorragie liée à un traumatisme est de moins en moins à démontrer. Les essais contrôlés et randomisés sont en outre difficiles à réaliser dans ce domaine, et davantage de données provenant de telles études sont clairement nécessaires pour arriver à des recommandations qui puissent faire parfaitement consensus (50,53,55). Si les spécialités pharmaceutiques de fibrinogène ont démontré une réduction des besoins en transfusions allogéniques dans les hémorragies sévères, l'efficacité de celles-ci sur la mortalité des patients doit être davantage mise en évidence (67).

2.3.2 Hémorragie de la chirurgie cardiaque

Les interventions chirurgicales cardiovasculaires et vasculaires s'accompagnent souvent de d'une hémorragie excessive. Celle-ci peut être due à une déficience du système de coagulation, à une hémostase chirurgicale inadéquate, ou une combinaison des deux (50,53). En effet, la coagulation du patient peut être compromise par plusieurs facteurs comme l'activation hémostatique, la consommation de facteurs de la coagulation, l'effet des héparines et protéamines, l'hypothermie et l'hémodilution (55). Rappelons qu'une hémorragie périopératoire est un problème grave menant à une augmentation des taux de morbidité et de mortalité (50,53).

Contrairement aux polytraumatisés, l'utilisation de spécialités pharmaceutiques de fibrinogène a fait l'objet d'études approfondies dans le cadre d'essais contrôlés randomisés chez les patients

recevant une chirurgie cardiaque (67). Aussi, les recommandations actuelles indiquent que l'administration de fibrinogène est hautement conseillée pour la gestion des hémorragies des chirurgies cardiaques (77). En effet, il a pu être montré que le fibrinogène réduit à la fois les saignements et les besoins de transfusion en chirurgie cardiovasculaire et vasculaire ainsi que la durée moyenne des traitements subséquents dans l'unité de soins intensifs (50,53). Toutefois, s'il semble qu'il n'y ait aucun avantage à supplémenter en fibrinogène les patients ayant des taux de fibrinogène normaux ; il reste difficile de prédire quels patients devrait bénéficier d'une supplémentation en fibrinogène (67).

Ainsi, compte tenu des causes multifactorielles de coagulopathie, l'utilisation du point d'intérêt guidé par les résultats du ROTEM[®] de la coagulation est recommandée pour permettre une thérapie rapide et ciblée (55,77). De façon pragmatique et comme énoncé précédemment, le risque d'hémorragie majeure est considérablement accru lorsque le taux de fibrinogène chute en dessous de 1,5 à 2 g/L ; c'est pourquoi le patient devra également être pris en charge en fonction d'un niveau critique en fibrinogène (55). Notons enfin que le fibrinogène semble présenter une bonne innocuité et bien être toléré. En outre, les études ont tendance à montrer actuellement que l'administration de fibrinogène n'est pas associée à une augmentation des événements thromboemboliques (77,78) (Voir 2.4.1. Options thérapeutiques de la supplémentation en fibrinogène).

2.3.3 Hémorragie du post-partum

L'hémorragie obstétricale est une cause majeure de mortalité et de morbidité lors de l'accouchement (50,53). En effet, l'augmentation du débit sanguin artériel utérin pendant le travail est indissociable d'un risque hémorragique (50). Notons qu'une coagulopathie associée au post-partum peut survenir très précocement, en opposition aux coagulopathies des patients sous chirurgie cardiaque qui présentent des dysfonctionnements plaquettaires et un commencement retardé (77). De cette façon, l'hémorragie obstétricale peut entraîner une rapide perte de sang qui peut alors nécessiter une réanimation volémique et une transfusion (50). Cependant, cette approche thérapeutique peut contribuer aux effets de la coagulopathie en raison d'une dilution supplémentaire des facteurs de coagulation (53).

Les Hémorragies du Post-Partum (HPP) sévères nécessitent un diagnostic rapide et approfondi ; celui-ci peut être suivi d'une administration de spécialité pharmaceutique de fibrinogène comme traitement au point d'intérêt (77). Encore une fois, les résultats des essais hémostatiques viscoélastiques et/ou sur des tests standards de la coagulation permettront d'obtenir un résultat

rapide pour le diagnostic et la prise en charge de la coagulopathie (77). Notons qu'un niveau de fibrinogène plasmatique faible ou en baisse semble être associé à une hémorragie sévère du post-partum, et les données disponibles suggèrent un seuil critique de 2 g/L (55).

Ainsi, l'administration de fibrinogène est actuellement recommandée pour le contrôle des saignements d'une hémorragie obstétricale (77). Par opposition, les taux de fibrinogène avant l'accouchement ne semblent pas affecter le risque d'HPP (55). Par conséquent, l'administration prophylactique de fibrinogène avant l'accouchement semble peu susceptible d'être bénéfique (55).

2.3.4 Autres hémorragies périopératoires

Le fibrinogène est également prescrit dans la transplantation hépatique afin de contrôler des hémorragies sévères (50,77). Celle-ci repose sur l'administration de spécialité pharmaceutique de fibrinogène guidée par les résultats d'un essai viscoélastique de la coagulation au point d'intérêt. Toutefois, les recommandations actuelles indiquent que l'administration de fibrinogène n'est que faiblement conseillée dans ce cas clinique (77). Dernièrement, il a été suggéré de ne pas utiliser de fibrinogène en prophylaxie d'une transplantation hépatique et de conserver son utilisation uniquement pour le contrôle des hémorragies périopératoires (55).

Les avantages de l'utilisation ciblée de facteurs de coagulation tels que le fibrinogène en chirurgie pédiatrique ont pu être étudiés, notamment lorsqu'elle est guidée par des tests viscoélastiques. Le traitement par spécialité pharmaceutique de fibrinogène en chirurgie pédiatrique a montré qu'il pouvait être associé à une réduction des saignements et qu'il semble réduire la mortalité toutes causes confondues. Cependant, la réalisation de nouvelles études est nécessaire pour préciser les avantages potentiels de l'administration de fibrinogène aux enfants ainsi que pour valider des directives claires concernant le monitoring, les seuils et les doses appropriés à une gestion de la coagulation rapide, efficace et sûre (55).

2.4 Spécialités pharmaceutiques de fibrinogène

2.4.1 Options thérapeutiques de la supplémentation en fibrinogène

Comme énoncé dans les parties Pathologies congénitales associées au fibrinogène et Pathologies acquises associées au fibrinogène, il existe historiquement trois approches thérapeutiques pour la supplémentation en fibrinogène : la perfusion de plasma frais congelé, et celle de cryoprécipité, ou encore de fibrinogène (46,53,57,79). Les spécialités

pharmaceutiques de fibrinogène sont considérées comme le traitement de choix ; et représentent par la même occasion la seule option thérapeutique recommandée actuellement en France, contrairement au Royaume-Uni ou à l'Amérique du Nord où le cryoprécipité est toujours utilisé (17,56,75–77,80). Aussi, la prise en charge des patients peut différer entre les trois approches en fonction des pays (54).

Supériorité de l'option fibrinogène

Les spécialités de fibrinogène représentent avant tout l'option thérapeutique la plus sécuritaire grâce à de nombreuses étapes validées de sécurisation virale (69). De plus, contrairement au plasma ou au cryoprécipité, les MDS délivrent une quantité standardisée de la protéine d'intérêt et par conséquent plus précise (46,50,54). Ajoutons que ces spécialités pharmaceutiques ne nécessitent pas d'appariement des groupes sanguins ni de décongélation à l'inverse du PFC (50,53). Elles sont donc disponibles très rapidement et peuvent être reconstituées dans un faible volume de 50 à 100 mL, permettant l'administration de solution allant jusqu'à 20 g/L de fibrinogène pour certaines spécialités pharmaceutiques (voir Annexe D) (11,53). Des doses aussi élevées que 6 g perfusées en seulement 1 à 2 minutes ont été rapportées dans des cas d'hémorragie critique (53). Par ailleurs, actuellement les études ont tendance à montrer que l'administration de fibrinogène n'est pas associée à une augmentation des événements thromboemboliques (77,78). Une étude de surveillance post-commercialisation de l'Haemocomplettan P[®] menée entre 1986 et 2008, allait déjà en ce sens en ne rapportant que neuf rapports volontaires d'événements thrombotiques potentiellement liés pour 1 034 389 g de fibrinogène administrés (81).

Le PFC contient l'ensemble des protéines plasmatiques, incluant l'albumine, les immunoglobulines et les facteurs de coagulation et de fibrinolyse à des concentrations inférieures ou égales aux concentrations physiologiques, soit environ 2,0 g/L dans le cas du fibrinogène (53). Etant issu du plasma, le cryoprécipité contient quant à lui des facteurs de coagulation globaux, notamment une concentration élevée de fibrinogène – de l'ordre de 15 à 17 g/L – ainsi que les facteurs VIII, XIII et le facteur de von Willebrand (50,53). Toutefois, les utilisations du PFC et du cryoprécipité ont diminué en raison des préoccupations de complications associées à la transfusion (57). Outre le risque de transmission de pathogènes, notons le risque de lésion pulmonaire aiguë liée à la transfusion (TRALI), et de syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) et de surcharge circulatoire associée à la transfusion (TACO) qui ne sont théoriquement pas présents dans le cas des spécialités pharmaceutiques de

fibrinogène (57,79). Cependant, ces produits (PFC et cryoprécipité) trouvent leur utilité dans les pays industrialisés lorsqu'aucune spécialité pharmaceutique de fibrinogène n'est disponible (54). Relevons également que les spécialités pharmaceutiques de fibrinogène sont plus coûteuses que le cryoprécipité, lui-même moins abordable que le plasma frais congelé (79). Ces deux derniers facteurs expliquent ainsi en partie leur utilisation plus courante dans les pays en voie de développement (15).

Situation internationale sur l'utilisation du cryoprécipité et du fibrinogène

Le cryoprécipité a été retiré du marché dans de nombreux pays européens, dont la France, en réponse à ces problèmes de sécurité – portant principalement sur le risque infectieux puisque sa production ne comprend pas de procédés de réduction de pathogènes – mais il est encore couramment utilisé pour le traitement de la supplémentation en fibrinogène en Amérique du Nord et au Royaume-Uni (17,75–77). Si la question de l'efficacité et de l'innocuité est longtemps restée en suspens dans le cas des thérapies de remplacement du fibrinogène entre cryoprécipité et spécialité pharmaceutique de fibrinogène ; celle-ci a été finalement explorée pour la première fois en 2019. L'étude FIBRES a développé une comparaison randomisée de non-infériorité entre une spécialité pharmaceutique de fibrinogène (Fibryga®) et du cryoprécipité pour le traitement de l'hypofibrinogénémie acquise chez les patients hémorragiques en chirurgie cardiaque. Ainsi le fibrinogène a effectivement pu montrer une non-infériorité en termes d'efficacité et de sécurité comparativement au cryoprécipité, amenant les auteurs de l'étude à recommander l'utilisation de spécialités de fibrinogène (82).

2.4.2 Les spécialités pharmaceutiques de fibrinogène à l'international

La mise à disposition internationale des spécialités pharmaceutiques de fibrinogène pourrait être posée au 4 mars 1963 ; date à laquelle Fibrinogenio Humano Lio® a été approuvé au Brésil (46). En Europe, il faudra officiellement attendre jusqu'au 4 janvier 1966 pour que la société Behringwerke – future CSL Behring – fasse approuver son HumanFibrinogen Behringwerke Konzentrat® par le ministère fédéral allemand de la Santé ; bien que le produit ait en réalité un usage thérapeutique depuis 1956 (46,52). Il est rebaptisé Haemocomplettan P® à partir de 1985 après que les procédés de production aient été modifiés pour améliorer sa pureté et sa sécurité biologique ; notamment en introduisant la pasteurisation comme étape d'inactivation virale (46,52). Aucune transmission de pathogène en lien avec l'utilisation de ce produit n'a été enregistrée depuis (52). La production de fibrinogène recombinant a quant à elle été explorée

pour la première fois par Lord et al en 1993 (46). Un fibrinogène humain recombinant est actuellement en cours de développement par la société ProFibrix[®] au Pays-Bas (80).

A ce jour, plusieurs spécialités pharmaceutiques sont présentes sur les marchés internationaux ; citons ainsi (50,52,54,57,80):

- Haemocomplettan P[®], également nommé Riastap[®] suivant les localités et produit par le laboratoire CSL Behring
- Fibryga[®] ou Fibryn[®] du suisse Octapharma AG
- Clottafact[®] également connu sous le nom FibCLOT[®] et développé par LFB Biomédicaments en France
- Fibrinogen HT[®] par Yoshitomi au Japon
- FibroRAAS[®] produit en Chine par Shanghai RAAS Blood Products Co
- GCCFibrinogen[®] de GC Pharma (Corée du Sud)

Au moins un de ces MDS est homologué dans la plupart des pays développés, l'Haemocomplettan P[®]/Riastap[®] étant la plus répandue (46,50). Dans certains pays, les spécialités pharmaceutiques de fibrinogène ne peuvent être utilisées que de façon nominative et individuelle d'un patient précis, sous la responsabilité du médecin (50,52). Les indications sont généralement la gestion hémorragique dans l'hypofibrinogénémie, la dysfibrinogénémie et l'afibrinogénémie ainsi que l'hypofibrinogénémie acquise (52). Toutefois, ces dernières diffèrent d'une réglementation à l'autre, comme ce peut être le cas au Royaume-Uni et aux États-Unis où le fibrinogène n'est approuvé que pour le traitement des déficits congénitaux (76). A noter que dans ces pays, le fibrinogène humain est également utilisé dans le traitement des déficits acquis (82).

2.4.3 Les spécialités pharmaceutiques de fibrinogène en France

En France, les spécialités pharmaceutiques actuellement disponibles sont le Clottafact[®] (LFB Biomédicaments), le Fibryga[®] (CSL Behring) et le Riastap[®] (Octapharma) (11,56).

Tableau 4 : Utilisations thérapeutiques en France pour les différentes spécialités pharmaceutiques (83,84)

Clottafact[®]	
Déficits constitutionnels	Hypofibrinogénémie, dysfibrinogénémie ou afibrinogénémie constitutionnelle, chez les adultes, enfants et adolescents présentant une hémorragie spontanée ou post-traumatique ou en cas de chirurgie.
Déficits acquis	Hypofibrinogénémie acquise au cours des hémorragies aiguës sévères associées à la diminution secondaire du taux de fibrinogène circulant, par exemple hémorragie aiguë sévère du post-partum après échec du traitement utérotonique et avant le recours aux traitements invasifs, hémorragies associées à une coagulopathie de dilution par exemple en situation chirurgicale ou en traumatologie.
	Hypofibrinogénémie acquise au cours d'un syndrome hémorragique associé à la diminution de synthèse hépatique du fibrinogène en cas d'insuffisance hépatique ou secondaire à un traitement par la L-Asparaginase.
Riastap[®]	
Déficits constitutionnels	Traitement de hémorragies chez les patients présentant une hypofibrinogénémie ou une afibrinogénémie congénitale avec une tendance aux saignements.
Déficits acquis	Utilisation dans les situations d'urgence dans le cadre d'une hypofibrinogénémie acquise telle que définie dans l'AMM du Clottafact [®] en cas de pénurie de ce dernier
Fibryga[®]	
Déficits constitutionnels	Traitement des saignements et prophylaxie périopératoire chez des patients présentant une hypofibrinogénémie ou afibrinogénémie congénitale, avec une tendance aux saignements.
Déficits acquis	Traitement complémentaire dans la prise en charge d'une hémorragie sévère incontrôlée chez les patients présentant une hypofibrinogénémie acquise au cours d'une intervention chirurgicale.

Les avancées des connaissances sur l'utilisation du fibrinogène ont amené à une modification de l'AMM du Clottafact[®] le 18 novembre 2020 pour obtenir celle présentée ici (85).

Le Clottafact[®] fut le premier à recevoir une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) en France le 5 mai 2009 par l'intermédiaire d'une procédure nationale (86). Cette AMM met fin

aux Autorisations Temporaires d'Utilisation (ATU) préalablement en vigueur pour l'Haemocomplettan P[®] et le Clottagen[®] (médicament anciennement produit par le LFB avant la commercialisation du Clottafact[®]) (87). Il faudra attendre le 28 octobre 2010 pour que le fibrinogène du laboratoire CSL Behring soit de nouveau présent sur le territoire français sous le nom Riastap[®], grâce à une AMM obtenue par l'intermédiaire d'une procédure de reconnaissance mutuelle (88). Le Fibryga[®] est mis à disposition à titre exceptionnel et transitoire par l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM) à partir de 2017 dans le cadre de tensions d'approvisionnement en fibrinogène sur le marché français (11,83). Le Fibryga[®] obtient finalement une AMM le 17 juillet 2020 (83). Si toutes ces spécialités pharmaceutiques ont été reconnues comme ayant un Service Médical Rendu (SMR) important, seul le Riastap[®] partage l'Amélioration du Service Médical Rendu (ASMR) du Clottafact[®] (ASMR I) pour la prise en charge des pathologies congénitales (88). En effet, le Fibryga[®] n'ayant pas pu démontrer son efficacité et sa tolérance comparativement au Clottafact[®], il a été considéré par la Commission de la Transparence que le Fibryga[®] n'apporte pas d'amélioration du service médical rendu, soit une ASMR de niveau V (83). A noter par ailleurs que seul un ASMR de niveau IV a été accordé au Clottafact[®] pour la prise en charge de l'hypofibrinogénémie acquise (83).

Situation de tensions d'approvisionnement en France

Les incidents techniques sont le lot de toute production, et les produits dérivés du plasma n'y font pas exception. Aussi, plusieurs épisodes de tensions d'approvisionnement de fibrinogène humain en France ont été constatés ces dernières années ; en témoignent plusieurs lettres d'Octapharma et du LFB entre septembre 2017 et février 2020 écrites à l'attention des hospitaliers concernés dans le cadre des tensions d'approvisionnement en fibrinogène humain (89–92). Ces lettres font mention de la rupture d'approvisionnement du Clottafact[®] et de la mise à disposition exceptionnelle du Fibryga[®] – avant l'obtention de son AMM centralisée en 2020 – pour pallier ce manque. C'est d'ailleurs pour les mêmes raisons qu'à partir de 2017, les indications du Riastap[®] évoluent afin d'inclure une utilisation dans les situations de pénurie de Clottafact[®] et en situation d'urgence dans le cadre d'une hypofibrinogénémie acquise telle que définie dans l'AMM du Clottafact[®] (voir Tableau 4) (11,84).

Au cours de cette période, la logistique des trois laboratoires a été modifiée pour mettre à disposition du marché français des spécialités pharmaceutiques de fibrinogène initialement destinées à d'autres marchés ; notamment polonais, italien et autres marchés européens dans le

cas du Riastap[®], le marché allemand dans le cas du Fibryga[®] et plus largement le marché international dans le cas du Fibclot[®] (93). Cette situation permet ainsi de mettre en évidence les limites d'un marché monopolistique national pour des produits essentiels. D'autant que ces tensions d'approvisionnement peuvent concerner tous les fractionneurs, puisque le Riastap[®] a été déclaré en risque de rupture d'approvisionnement à la date du 18 février 2019, auprès de l'ANSM (94).

Afin de limiter les tensions d'approvisionnement futures, un décret a été publié le 30 mars 2021 pour instaurer l'obligation pour les entreprises pharmaceutiques de constituer un stock de sécurité pour tous les médicaments destinés au marché national (95). Ce dernier est entré en vigueur le 1er septembre 2021 et prévoit entre autres le développement de stocks de sécurité par l'intermédiaire de plans de gestion de pénurie (95). En outre, il est fait mention dans la lettre du 22 décembre 2017 que le LFB n'avait alors qu'un stock limité de Clottafact[®], menant aux tensions d'approvisionnement subséquentes (89). Gageons alors que si les risques de tension d'approvisionnement en France ne peuvent pas être totalement éliminés, ce décret et la présence de trois fournisseurs de fibrinogène humain offrent une plus grande sécurité de réponse adaptée à la demande des hôpitaux.

3 Analyse de l'impact du procédé de fabrication sur les spécialités pharmaceutiques de fibrinogène

3.1 Enjeux de la fabrication du fibrinogène

Le fibrinogène utilisé en clinique se doit d'être un produit fiable afin d'assurer la meilleure prise en charge possible des patients, autant dans le cadre de coagulopathies héréditaires que dans le cadre de coagulopathies acquises. Pour cela, il est important que les procédés de fractionnement du plasma permettent une standardisation du produit fini ainsi qu'une sécurisation biologique fiable. Ce dernier point devra d'ailleurs être réalisé ; et ce, bien que la matière première utilisée – le plasma pour le fractionnement (PFF) – puisse avoir des caractéristiques variables d'un lot à l'autre en lien avec leur origine biologique (combinaison de plusieurs dons de différents patients). De même, il est clair que plusieurs stratégies de purification et de réduction du risque infectieux peuvent être envisagées, comme le montreront les descriptions et analyses des procédés Riastap[®], Fibryga[®] et Clottafact[®]. Il peut néanmoins être attendu quelle que soit la stratégie retenue que l'efficacité et l'innocuité de chacune des spécialités pharmaceutiques soient non seulement adaptées à une utilisation thérapeutique mais aussi conformes aux cadres légaux imposés par la France et l'Union Européenne sur la production de MDS destinés au marché français.

Au cours de ce chapitre, les différences entre les procédés de fractionnement des fibrinogènes humain présents sur le marché français seront étudiées et mises en relation avec les différences biochimiques des produits finis ainsi que les différences potentiellement observées dans les études in vitro et les études cliniques portées sur ces produits dérivés du plasma.

3.2 Comparaison des procédés de fractionnement et de purification du fibrinogène

3.2.1 Comparaison des méthodes d'approvisionnement du plasma pour le fractionnement

Les plasmas pour le fractionnement utilisés en amont de la production des spécialités pharmaceutiques de fibrinogène présentes sur le marché français peuvent être distingués selon deux critères : dons rémunérés et non rémunérés d'une part, plasma source et plasma récupéré d'autre part.

Il avait été estimé en 2013 que la part de MDS issue de plasma rémunéré en France atteignait 40 % sur le plan global ; proportion par ailleurs en augmentation (19). De plus, cette part pouvait atteindre les 100 % pour certaines spécialités (19). Dans le cas du fibrinogène, le Clottafact[®] répond au critère de plasma non rémunéré car celui-ci est issu de la filière d'approvisionnement géré par l'EFS, qui est légalement et moralement fondée sur ce principe (9,18,19). Ce critère pourrait également être appliqué en France pour la production du Fibryga[®]. En outre, il est issu du site d'exploitation strasbourgeois d'Octapharma (anciennement détenu par le LFB et acquis par le laboratoire pour répondre à la demande du marché français) (1,19). Or dans le cadre du rapport Véran, le laboratoire indiquait avoir assuré aux autorités de régulation française (ANSM) que l'approvisionnement de l'usine ne comprenait que du plasma acquis bénévolement par la Croix Rouge allemande (19). A noter que les deux firmes (LFB et Octapharma) commercialisent par ailleurs des MDS issus de dons rémunérés dans d'autres pays (19). Dans le cas du Riastap[®], les deux sources de plasma sont utilisées indistinctement par CSL-Behring (19,57).

Si l'argument sécuritaire vis-à-vis du risque infectieux (virus et prions) pour le plasma bénévole est notamment mis en avant par les organismes qui le promeuvent (EFS, OMS, UE, etc.), le débat serait actuellement davantage éthique (et éventuellement économique) que technique, compte tenu de l'ensemble des autres étapes entrant dans les stratégies de sécurisation développées dans l'industrie (1,16,18,19,96,97). En outre, l'EMA déclarait en 2002 que les études cliniques et de pharmacovigilance n'apportaient aucune preuve concernant l'augmentation du risque de transmission virale des MDS qui ont fait l'objet par ailleurs d'un dépistage approprié au moment du don et d'une étape validée d'inactivation ou d'élimination virale (16). Ce même point est repris en 2018 par Rossi qui indiquait qu'aucune transmission de maladie virale n'a été observée au cours de ces 25 dernières années grâce à la mise en place de procédés efficaces et validés d'inactivation et d'élimination virale (9).

Le plasma source constitue la majorité du plasma utilisé dans la fabrication de dérivés du plasma et ce pour l'ensemble des acteurs cités précédemment (9,32). Si des différences de qualités du plasma peuvent être entraînées entre les méthodes d'obtention du plasma source et du plasma récupéré (Voir 1.2. Approvisionnement de la matière première) – notamment dans le cas de protéines labiles comme le facteur VIII – aucune source n'a indiqué une influence spécifique d'une technique par rapport à l'autre sur le fibrinogène. Par ailleurs, le document technique 2021 du Clottafact[®] indique qu'une étude reconnue par l'ANSM et menée

conjointement par l'EFS, le LFB et le CTSA a montré une qualité comparable pour le fractionnement du plasma récupéré et déleucocyté par rapport au plasma source (98).

Enfin, la directive européenne 2003/63/CE assure sur le plan réglementaire la qualité et la traçabilité des plasmas pour le fractionnement à destination de l'UE, par l'intermédiaire du (ou des) Plasma Master File(s) mis à jour annuellement en parallèle de l'AMM de chacun des produits dérivés du plasma (99). Ainsi, une harmonisation de la qualité requise du plasma est permise pour le fractionnement des fibrinogènes humains présents sur le marché français.

3.2.2 Présentation du procédé de production du Riastap®

Description du procédé

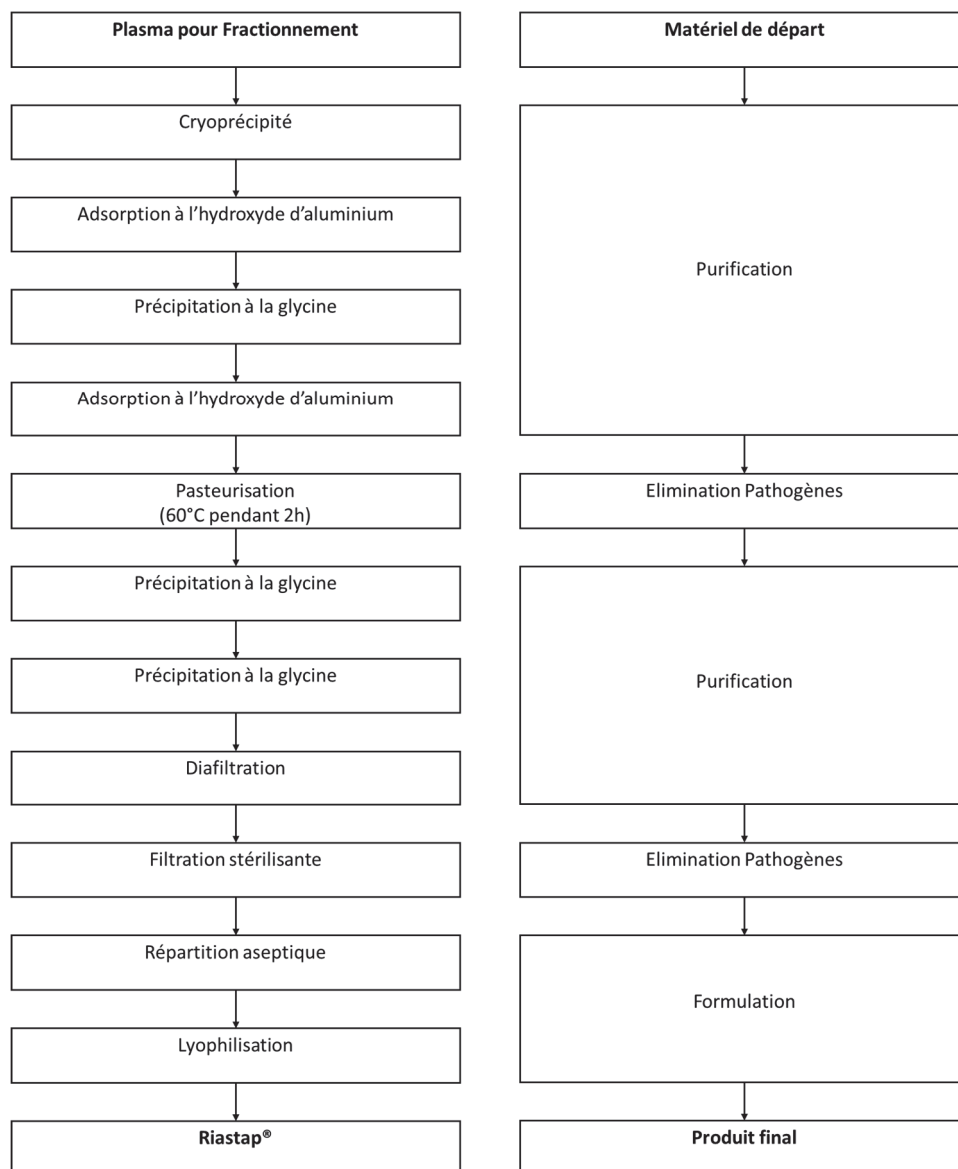


Figure 9 : Schéma de production Riastap® (96,100–102)

Le procédé de purification du Riastap[®] tel qu'il est notamment énoncé dans la monographie canadienne de 2020 constitue le plus ancien des trois procédés, et ne repose pas à ce titre sur l'utilisation de procédés chromatographiques contrairement à ses homologues ; la chromatographie s'étant progressivement démocratisée à partir des 1990 (6,15,100). Aussi, la purification s'appuie tout d'abord sur la valorisation du cryoprécipité qui contient la majorité des molécules faiblement solubles que sont principalement le facteur VIII, le facteur de Von Willebrand et le fibrinogène (2,3,33,34,48). Toutefois, cette cryoprécipitation de même que les précipitations subséquentes sont réalisées en utilisant la glycine comme agent de précipitation, et non l'éthanol comme présenté dans la partie 1.3. Description des procédés de fractionnement et de purification (100). En outre, la glycine présente non seulement l'avantage d'être un agent de précipitation sélectif du fibrinogène mais aussi d'être un agent de précipitation « doux » – non dénaturant et protecteur de l'activité fonctionnelle – ce qui est particulièrement intéressant pour des procédés étant en commun avec la purification du facteur VIII (1,103). La glycine présente comme second avantage de protéger l'intégrité des facteurs de coagulation au cours de la pasteurisation (104).

Les étapes de précipitation et d'adsorption par l'hydroxyde d'aluminium permettront d'éliminer les facteurs de coagulation non désirés (principalement les facteurs VIII et de Von Willebrand) du flux de production par précipitation puis centrifugation (3,105). Aussi, comme pour tout précipité, quelques protéines du cryosurnageant sont emprisonnées et passent dans le flux de production associé au cryoprécipité, c'est pourquoi des phases d'adsorption à l'hydroxyde d'aluminium sont spécifiquement utilisées (notamment pour l'élimination des facteurs de coagulation résiduels associés au complexe prothrombique) (2). La diafiltration permet quant à elle d'ajuster la concentration des protéines et la teneur en sel conformément aux spécifications requises pour la formulation (3). Elle est également utile pour éliminer les sels ou les tampons considérés alors comme contaminants pour les étapes subséquentes (2). Nous pouvons citer à ce titre la glycine qui n'est pas retrouvée dans le produit final ainsi que les sels d'aluminium hérités des différentes étapes d'adsorption (2,100). Bien que les différents produits aient été manipulés jusqu'ici dans des conditions particulièrement contrôlées, ils seront tout de même soumis à une filtration stérilisante à l'aide de filtre allant de 0,45 et 0,22 µm pour assurer une charge bactérienne théorique nulle lors de la répartition aseptique (15). A noter que l'absence d'endotoxines est contrôlée aux stades critiques de la fabrication, notamment au moment de la formulation (15). La lyophilisation permet enfin d'assurer une stabilité à long terme du fibrinogène au sein du produit fini (25).

Produit fini

Le Riastap[®] est composé de (48,97,100) :

- Fibrinogène Humain 900-1300 mg
- Albumine Humaine 400-700 mg
- Chlorhydrate de L-Arginine 375-600 mg
- Chlorure de sodium 200-350 mg
- Citrate de sodium 50-100 mg

Il sera solubilisé dans 50 mL d'eau stérile pour préparation injectable, soit une concentration en fibrinogène de 20 mg/mL après reconstitution (56,84,100,106).

Les excipients permettent d'augmenter la charge ionique de la solution et limitent ainsi l'adsorption du fibrinogène au récipient du produit (2). Ils permettront également de stabiliser le fibrinogène pendant la lyophilisation – principalement dans le cas du chlorhydrate de L-arginine et de l'albumine – tout en constituant un agent gonflant qui favorisera la rapidité de la remise en solution du lyophilisat (2,48). Le citrate de sodium et le chlorure de sodium participent principalement au tamponnage du pH et à l'isotonisation de la solution (bien que l'albumine y contribue également) (5,100,106). Enfin, le Riastap[®] ne contient pas de conservateur dans sa composition (100,106). Toutefois, il reste stable pendant 8 heures à température ambiante (de + 20 °C à + 25 °C) après reconstitution (100). A noter que l'administration est recommandée immédiatement après reconstitution (84,100). Sous forme lyophilisée, le produit pourra être conservé jusqu'à 3 ans selon la monographie canadienne et 5 ans selon l'ANSM, aux conditions que celui-ci soit gardé entre + 2 °C et + 8 °C, à l'abri de la lumière et ne soit pas congelé (84,106).

Stratégie de sécurisation virale

Tableau 5 : Réduction de la charge virale lors de la fabrication du Riastap® (106)

	Facteur de réduction virale (log ₁₀)					
	Virus Enveloppés				Virus Non-Enveloppés	
	VIH	WNV	BVDV	PRV	HAV	CPV
Virus modèle de	VIH 1 et VIH 2		WNV et HCV	Grand virus à ADN enveloppés (HSV 1)		B19V
Cryoprécipitation	n.d.	n.d.	n.d.	1,6	n.d.	1,9
Pasteurisation	≥ 5,7	≥ 8,3	≥ 9,1	5,4	5,9	1,4
Précipitations (2)	3,9	n.d.	2,1	1,8	1,0	1,6
Lyophilisation	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,7	n.d.
Facteur global de réduction virale	≥ 9,6	≥ 8,3	≥ 11,2	8,8	8,6	4,9

Ce tableau de 2021 est à mettre en perspective des données moins récentes (2008 et 2009) publiées sur le même sujet et mises à la disposition du lecteur en Annexe E.

Il est tout d'abord intéressant de constater que la stratégie de sécurisation biologique du procédé Riastap® ne repose pas sur deux étapes orthogonales comme cela est encouragé par la directive EMA/CHMP/BWP/706271/2010 (9,44). Toutefois, une seule étape spécifique de sécurisation virale permet non seulement de satisfaire la directive EMA/CHMP/BWP/706271/2010 mentionnée précédemment mais aussi la monographie du fibrinogène de la Pharmacopée Européenne (44,107). En effet, il est précisé dans la directive de l'EMA qu'un procédé ayant montré sa fiabilité dans la réduction ou l'inactivation d'une large gamme de virus enveloppés et non-enveloppés, ne nécessite pas de seconde étape spécifique de réduction ou d'inactivation virale (44). Or, si la pasteurisation agit seule comme étape spécifique d'inactivation virale, elle a été considérée comme fiable par la directive CHMP/BWP/268/95 (36). Par ailleurs, la contribution à la réduction virale des étapes de purification est prise en compte dans le calcul de la réduction de la charge virale globale ; et ce, même lorsque les étapes n'atteignent pas une valeur de 4 log₁₀ de réduction (voir 1.4. Opérations d'inactivation virale) (36). Toutefois, les réductions de charge virale globale sont d'environ 5 à 10 log₁₀, ce qui représente des chiffres

relativement comparables à ceux présentés par la stratégie de sécurisation virale du Fibryga[®] (et même parfois supérieur dans le cas du HAV).

Il ne manquera pas d'échapper au lecteur la limite de l'utilisation de virus modèles notamment dans le cas du BVDV qui montre une différence de réduction virale avec le WNV pour la pasteurisation. A ce titre, la directive EMA/CHMP/BWP/706271/2010 indique que le BVDV peut être considéré comme le *modèle du pire cas possible* puisqu'il est particulièrement résistant aux milieux à faible pH et est moins affecté par les traitements de filtration (36). Par ailleurs, l'évolution des chiffres publiés entre 2008 et 2021 (voir Annexe E) montrent non seulement l'utilisation de différents virus modèles mais aussi l'obtention de résultats différents ; comme peuvent l'illustrer les chiffres du B19V en 2009 dans l'évaluation de la pasteurisation qui n'apparaissent pas dans les autres publications, le passage progressif de l'utilisation du HSV-1 au PRV, ou encore la précision de la réduction virale du HAV par la lyophilisation et la pasteurisation pour obtenir une réduction globale plus précise et augmentée (de $\geq 6,7$ à $8,6$). Si les évaluations de la réduction de la charge virale ont évolués pour les virus non enveloppés, cela est moins le cas des virus enveloppés pour lesquels les facteurs globaux de charge virale annoncés sont restés inchangé entre 2008 et 2021. Il est néanmoins possible de constater pour les virus enveloppés une évaluation des étapes d'adsorptions et précipitations sans qu'elles soient pour autant intégrée à l'estimation de la réduction de la charge globale. Ces différents tableaux témoignent d'une grande attention de la part des industriels pour l'efficacité de leur stratégie de sécurisation biologique. Cependant, l'utilisation des virus modèles ne semble pas encore parfaitement uniformisée (voir stratégie de sécurisation biologique du Fibryga[®], et du Clottafact[®]) et nous pourrions supposer qu'une évolution réglementaire dans ce sens apparaisse dans les années à venir.

3.2.3 Présentation du procédé de production du Fibryga[®]

Description du procédé

Le procédé de fabrication du Fibryga[®] comprend des étapes de fabrication communes avec l'Eqwilate[®], qui est un concentré de facteur de Von Willebrand commercialisé par Octapharma (105). Ces étapes regroupent celles depuis la séparation du cryoprécipité par centrifugation jusqu'à la précipitation par la glycine, qui a pour rôle de séparer le fibrinogène du facteur de Von Willebrand (105).

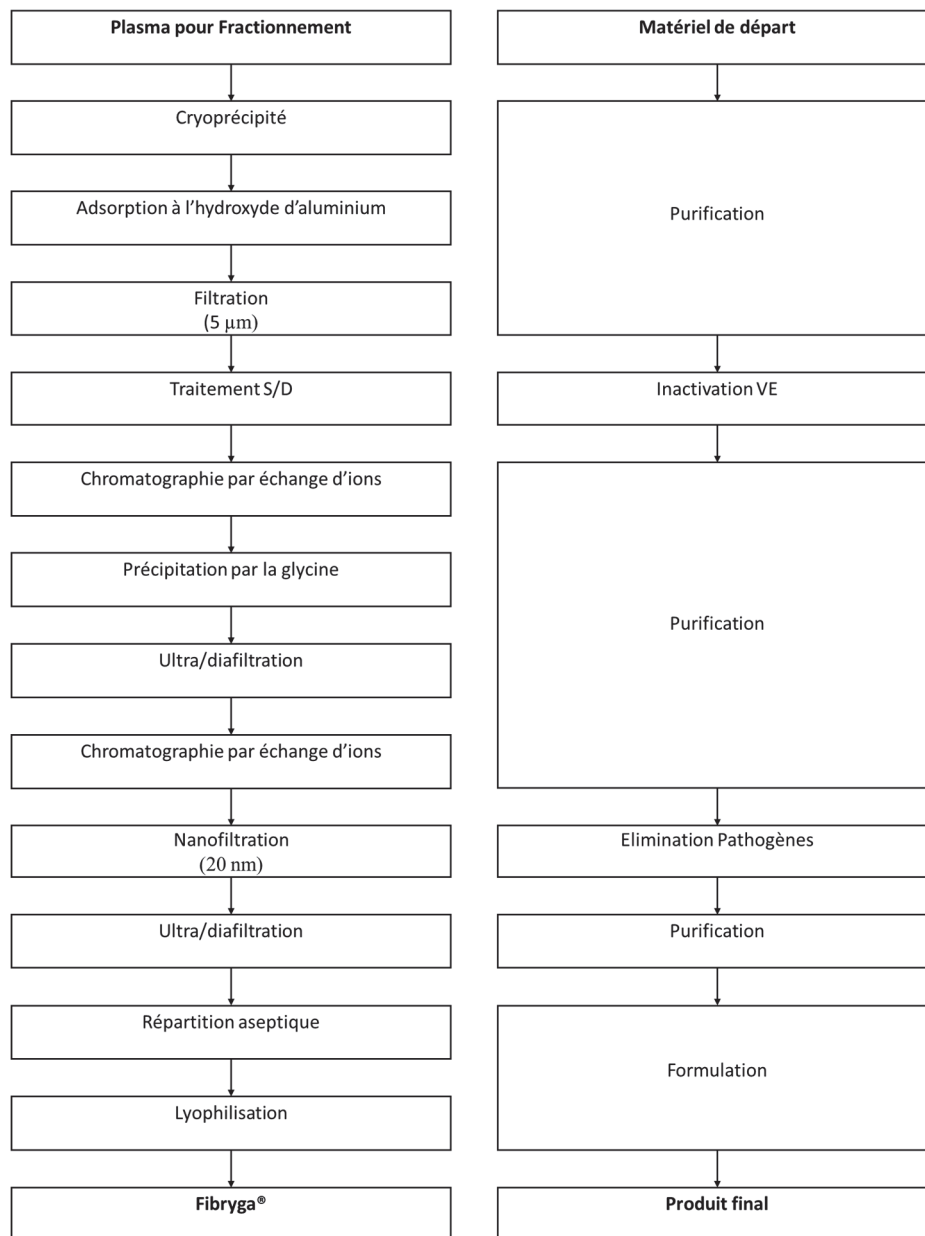


Figure 10 : Schéma de production Fibryga® (105,108)

Entre-temps, l'adsorption par hydroxyde d'aluminium permet d'écarter le facteur VIII ainsi que les autres facteurs de coagulation non désirés du flux de production par élimination du précipité (par centrifugation) (3,105). Cette dernière sera suivie d'une filtration clarifiante des composants inférieurs à 5 µm afin de limiter la présence résiduelle d'agrégats qui pourrait limiter l'efficacité du traitement S/D par inclusion de particules virales (3). Le traitement S/D repose sur l'utilisation d'un mélange à 1 % d'octoxymol (cité préalablement sous le nom de Triton X-100) et 0,3 % de TnBP (105). De plus, il implique une incubation à $+ 25,5 \pm 2,5$ °C pendant 240 minutes (108). Cette étape cible ainsi spécifiquement l'inactivation des virus enveloppés et est inefficace contre les virus non-enveloppés (3,8,10,31,35). Le mélange des

réactifs solvant détergent est récupéré à la suite de l'étape de traitement par extraction liquide-liquide depuis la phase aqueuse vers une phase lipophile d'huile de castor, suivie d'une filtration des composants inférieurs à 3 µm (105). La chromatographie permet également d'éliminer efficacement les réactifs S/D résiduels des phases éluées (2,3,103).

La phase éluée par la chromatographie par échange d'ions contenant le fibrinogène subit une précipitation par la glycine afin d'assurer une bonne séparation du facteur de Von Willebrand résiduel (105). Les facteurs de coagulation ainsi séparés, le flux contenant le fibrinogène passe par une première phase d'ultra/diafiltration pour éliminer la glycine en prévision de l'utilisation d'un tampon adapté pour la chromatographie par échange d'ion subséquente (2). La seconde chromatographie constitue une étape de polissage du fibrinogène permettant d'assurer une grande pureté de la protéine d'intérêt (3). La nanofiltration (à l'aide d'un filtre de 20 nm) constitue quant à elle la seconde étape de sécurisation biologique non seulement contre les virus non-enveloppés mais aussi contre les virus enveloppés qui auraient pu échapper au traitement S/D, ainsi que les prions (105). Elle est suivie d'une phase d'ultra/diafiltration qui a pour but d'ajuster la concentration des protéines et la teneur en sel en prévision de la formulation en éliminant par filtration à flux tangentiel les composants inférieurs à 100 kDa (3,105). A noter que la concentration de la préparation en fibrinogène permise par la phase d'ultra/diafiltration est liée à l'appellation de *concentrés de fibrinogène* pour les spécialités pharmaceutiques (48,103). Finalement, le remplissage aseptique suivi de la lyophilisation permet d'obtenir le produit fini.

Produit fini

Le Fibryga[®] est composé de (96) :

- Fibrinogène Humain 1000 mg
- Chlorhydrate de L-Arginine 500 mg
- Chlorure de sodium 300 mg
- Citrate de sodium hydraté 75 mg
- Glycine 500 mg

Il sera solubilisé dans 50 mL d'eau stérile pour préparation injectable (56,84,109).

Les adjuvants reprendront essentiellement les mêmes rôles que dans le cas du Riastap[®]. La glycine participe quant à elle au rôle de stabilisateur de l'activité du facteur de coagulation (1). A noter que le Fibryga[®] ne contient pas de conservateur au sens strict (109). Toutefois, le

produit sous forme lyophilisé a montré sa stabilité sur une période de 36 mois pour des températures de stockage de $+ 5 \pm 3$ °C et de $+ 25 \pm 2$ °C lors d'une étude portant sur trois lots (et sur six lots jusqu'à 24 mois) (108). En outre, l'activité du fibrinogène est restée de cette façon pratiquement inchangée au cours de cette période. C'est pourquoi, la monographie canadienne du produit indique une conservation entre $+ 2$ °C et $+ 25$ °C jusqu'à 3 ans à partir de la date de fabrication et de ne pas utiliser le produit après la date de péremption (l'ANSM indique quant à elle une conservation maximum de 2 ans) (84,109). La stabilité de la solution reconstituée à 20 mg/mL de fibrinogène a été démontrée quant à elle jusqu'à 24 heures à $+ 25$ °C (109). Il est cependant recommandé d'utiliser le produit immédiatement après reconstitution pour limiter le risque infectieux (84,109).

Stratégie de sécurisation virale

Tableau 6 : Réduction de la charge virale lors de la fabrication du Fibryga® (96,105,108)

	Facteur de réduction virale (log ₁₀)					
	Virus Enveloppés			Virus Non Enveloppés		Prions
	VIH 1	BVDV	PRV	HAV	PPV	HAS 263 K
Virus modèle de	VIH 1 et VIH 2	HCV et WNV	Grand virus à ADN enveloppés (HSV 1)		B19V	Virus résistant à ADN
Précipitations séquentielles	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,69
Traitement S/D	≥ 5,15	≥ 5,80	6,81	n.a.	n.a.	n.a.
Nanofiltration (Peagasus SV4®)	≥ 3,89	≥ 4,97	≥ 6,34	≥ 5,21	4,53	≥ 2,70
Nanofiltration* (Plasnova 20N®)	≥ 4,19	≥ 4,85	≥ 6,64	≥ 5,21	5,25	≥ 3,70
Facteur global de réduction virale	≥ 9,04	≥ 10,77	≥ 13,15	≥ 5,21	4,53	≥ 4,39

*Les résultats de réduction virale utilisant le filtre Plasnova 20N® sont présents dans le dossier d'AMM du Fibryga®. Ils sont ajoutés à titre complémentaire mais ne rentrent pas dans le calcul du facteur global de réduction virale présenté ici.

La stratégie de sécurisation biologique du Fibryga® repose essentiellement sur les étapes d'élimination et d'inactivation virale qui leur sont dédiées contrairement à ce qui a été présenté précédemment pour le Riastap®. Nous pouvons supposer que cette démarche en termes de

stratégie de conception et/ou réglementaire (vis-à-vis des tests de validation) est liée à la récence du procédé Fibryga[®]. Toutefois, l'hypothèse d'une efficacité supérieure du procédé Fibryga[®] en termes de réduction virale peut être raisonnablement posée. En effet, bien que les facteurs globaux de réduction virale présentés par les stratégies de sécurisation virale du Fibryga[®] et du Riastap[®] soient relativement comparables, il peut être attendu que la contribution des étapes de purification du procédé Fibryga[®] aille dans le sens de cette hypothèse. Par ailleurs, les chiffres obtenus dans la littérature témoignent d'une attention particulière apportée à l'élimination des prions – comparativement aux chiffres trouvés pour le Riastap[®] – non seulement par nanofiltration mais aussi par l'intermédiaire des étapes de précipitations.

Notons que si le dossier d'AMM du Fibryga[®] fait mention de deux types de filtres pour la nanofiltration, le Plasnova 20N[®] apporte une sécurité supplémentaire contre les virus non-enveloppés (PPV) et les prions. Toutefois, ces résultats sont à relativiser compte tenu de l'utilisation de virus modèles, comme cela a pu être montré précédemment avec le procédé Riastap[®]. Enfin, une étude de sécurité menée par Octapharma a mis en évidence que la nanofiltration permet de réduire les prions, les virus enveloppés ainsi que les virus non enveloppés (dans le cas du virus modèle HAV) en dessous du seuil de détection (108).

3.2.4 Présentation du procédé de production du Clottafact[®]

Description du procédé

Le procédé Clottafact[®] de purification du fibrinogène se démarque tout d'abord par son utilisation du cryosurnageant et non du cryoprécipité comme cela est le cas pour les procédés Fibryga[®] et Riastap[®] (98,110). Si le choix du LFB a été guidé par une recherche d'optimisation industrielle (Burlot, communication personnelle), nous pouvons proposer une hypothèse sur les raisons de ce choix. Le cryosurnageant contient environ 68 % de fibrinogène issu du plasma contre environ 32 % dans le cryoprécipité (111). Cette stratégie de production permet par conséquent une augmentation du rendement d'extraction en fibrinogène à partir du plasma pour le fractionnement. Par ailleurs, les facteur VIII et de Von Willebrand sont vendus au flacon, formulé sur une base d'activité protéique pour les spécialités pharmaceutiques Factane[®], Wilfactin[®] et Wilstart[®], et non massique comme c'est le cas pour le fibrinogène avec le Clottafact[®] (112–115). Or le facteur VIII est une protéine dont l'activité est relativement fragile comme nous avons pu l'énoncer à plusieurs reprises. Limiter les phases de purifications successives sur le cryoprécipité permet par la même occasion de limiter la réduction d'activité du facteur VIII (et du facteur de Von Willebrand également) ainsi que les pertes dans les flux

de production adjacents (celui du fibrinogène en l'occurrence) (1,3). Ainsi, le manque à gagner par la non-valorisation du fibrinogène issu du cryoprécipité devrait être également compensé par la valorisation du gain quantitatif et qualitatif obtenu sur les deux autres facteurs de coagulation issus du cryoprécipité. Il semble alors peu probable que la valorisation globale de cette stratégie soit moins intéressante que celle de la stratégie de purification du fibrinogène à partir du cryoprécipité. Cette dernière affirmation sera néanmoins nuancée par la mission de santé publique confiée en France au LFB consistant à devoir répondre aux besoins nationaux en termes de MDS (9,18). En effet, le facteur VIII représente le facteur de coagulation (MDS) dont la demande est la plus importante (4,10). Aussi, une optimisation industrielle favorisant la production du facteur VIII, bien que moins économiquement attrayante, pourrait être justifiée.

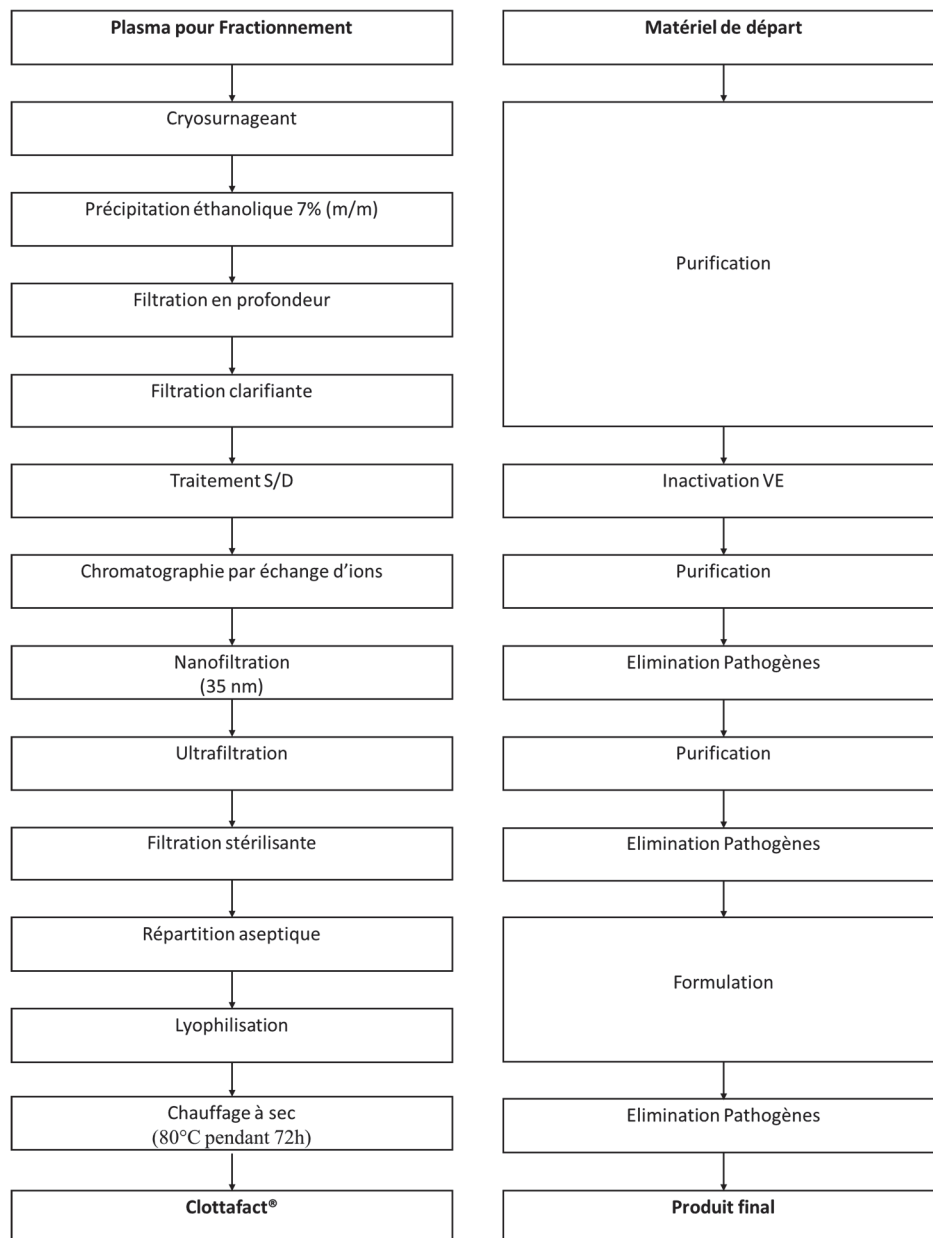


Figure 11 : Schéma de production Clottafact® (98,110)

De la même façon, l'absence de valorisation du facteur VIII permet de réaliser une précipitation éthanolique 7 % – proche des conditions de la précipitation I du procédé de Cohn-Oncley – sur le cryosurnageant et non une précipitation à la glycine (3,4,33). Le surnageant sera transféré vers une nouvelle étape de précipitation éthanolique (voir Annexe B) ; tandis que le précipité est récupéré par centrifugation et remis en solution (98,110). Cette étape est suivie d'une filtration en profondeur permettant non seulement d'assurer une étape fiable de protection contre les prions mais aussi d'éliminer les agrégats protéiques hérités de la précipitation (10,15,110). A noter que la filtration en profondeur est plus efficace que la centrifugation pour la séparation de précipité (10,15). Une nouvelle étape de filtration clarifiante prend ensuite

place en prévision du traitement S/D afin de limiter l'efficacité du traitement S/D par inclusion de particules virales dans des agrégats (3). Le traitement S/D permet alors d'offrir une première étape spécifique de protection contre les virus enveloppés (3,8,10,31,35). A l'image du procédé Fibryga[®], la chromatographie permet ensuite d'éliminer les réactifs S/D résiduels des phases éluées (2,3). Elle constitue donc une phase de polissage du fibrinogène. La nanofiltration (à l'aide d'un filtre de 35 nm) permet d'assurer une seconde étape de sécurisation biologique aussi bien contre les virus non-enveloppés que les virus enveloppés ou les prions (105,110). Les étapes d'ultrafiltration, filtration stérilisante, répartition aseptique et lyophilisation reprennent les rôles expliqués précédemment dans les procédés Fibryga[®] et Riastap[®]. Il est d'ailleurs relativement peu surprenant de retrouver ces dernières étapes de la même façon dans les trois procédés. Notons toutefois l'absence de filtration stérilisante du procédé Fibryga[®] contrairement aux deux autres. La production s'achève sur un traitement par chauffage à sec terminal – sur le flacon contenant le produit fini – permettant de produire un fibrinogène triplement sécurisé.

Produit fini

Le Clottafact[®] est composé de (84,110) :

- Fibrinogène humain 1500 mg
- Chlorhydrate d'arginine
- Chlorhydrate de lysine
- Isoleucine
- Citrate de sodium hydraté
- Glycine

Il sera solubilisé dans 100 mL d'eau stérile pour préparation injectable afin d'atteindre une concentration de 15 mg/mL de fibrinogène après reconstitution (56,84,112).

Les adjuvants prendront essentiellement rôles équivalents à ceux énoncés pour les excipients des spécialités pharmaceutiques Riastap[®] et Fibryga[®] puisque beaucoup sont en commun. Notons toutefois la présence en plus dans le Clottafact[®] du chlorhydrate de lysine et d'isoleucine qui participent à préserver l'activité du fibrinogène lors de l'étape d'inactivation virale terminale (2,27). Rappelons que les stabilisateurs utilisés dans traitement d'inactivation virale terminal doivent être ajustés à des doses compatibles avec l'usage thérapeutique car ils ne seront pas éliminés avant l'injection du produit (8,10,25,31). Outre une recommandation d'utilisation immédiate du Clottafact[®] après reconstitution par sa monographie et l'ANSM ; la

stabilité du produit est garantie sous forme lyophilisée pendant 3 ans, s'il est conservé à l'abri de la lumière à une température de dépassant pas + 25 °C et s'il n'est pas congelé (84,112).

Stratégie de sécurisation virale

Si la stratégie de sécurisation biologique du Clottafact® respecte la règle de deux étapes d'inactivation et d'élimination orthogonales à l'aide du traitement S/D et de la nanofiltration ; elle est également complétée par le chauffage à sec comme troisième et dernière étape. Toutefois, le chauffage à sec est généralement réalisé davantage comme une étape supplémentaire d'inactivation virale que comme traitement principal d'inactivation (15,25). Nous gagerons que cela est également le cas ici ; même si les facteurs de réduction virale associés au chauffage à sec sont proches de ceux de la nanofiltration et du traitement S/D (comme nous pouvons le constater pour les virus enveloppés dans le cas du procédé Wilfactin®).

La recherche bibliographique n'a permis d'obtenir que des chiffres de réduction des prions dans le cas du Clottafact®. Ainsi, la chromatographie par échange d'ions utilisant la résine DEAE Macrorep présente une réduction supérieure à 2,8 log₁₀ ; tandis que la filtration en profondeur montre une réduction supérieure à 3,8 log₁₀ sur la fraction microsomale de la souche H 263K (110). Ces deux étapes portent ainsi le facteur global de réduction à plus de 6,6 log₁₀, soit plus de deux logarithmes que les chiffres présentés par la stratégie de sécurisation du Fibryga® vis à vis du prion ; et ce, sans compter la contribution de la nanofiltration dans le procédé Clottafact®.

Une idée de la réduction de la charge virale peut être donnée pour le Clottafact® à l'aide des chiffres du Wilfactin® et du Betafact® présentés dans le tableau suivant. En outre, les chiffres de réduction de la charge virale par traitement S/D du Wilfactin® et du Betafact® semblent relativement proches, à l'exception de ceux du BVDV qui diffèrent significativement entre les deux procédés. Par ailleurs, les facteurs de réduction de la charge virale du Wilfactin® et du Fibryga® pour la nanofiltration sont également relativement proches. Toutefois, la supériorité de la réduction de la charge virale par la nanofiltration 35 nm par rapport à la nanofiltration 20 nm dans le cas du VIH et du PRV – qui semble donc plutôt discutable – montre la limite d'un tel parallèle. Nous pourrions alors supposer raisonnablement que la stratégie de réduction virale du Clottafact® soit équivalente à celle du Fibryga®.

Tableau 7 : Réduction de la charge virale lors de la fabrication du Wilfactin® pour indication des performances du procédé Clottafact® (110)

	Facteur de réduction virale (log₁₀)					
	Virus Enveloppés			Virus Non Enveloppés		
	VIH	BVDV	PRV	HAV	PPV	SV 40
Virus modèle de	VIH 1 et VIH 2	HCV et WNV	Grand virus à ADN enveloppés (HSV 1)		B19V	Virus résistant à ADN
Traitement S/D* Betafact®	≥ 5,2	≥ 5,8	≥ 4,4	n.d.	n.d.	n.d.
Traitement S/D	≥ 5,2	≥ 3,8	≥ 4,1	n.d.	n.d.	n.d.
Nanofiltration 35 nm	≥ 5,5	≥ 5,5	≥ 5,4	n.d.	n.d.	4,5
Chauffage à sec	4,8	≥ 5,1	5,5	5	3,2	n.d.
Facteur global de réduction virale	≥ 15,5	≥ 14,4	≥ 15,0	6,2	4,9	4,5

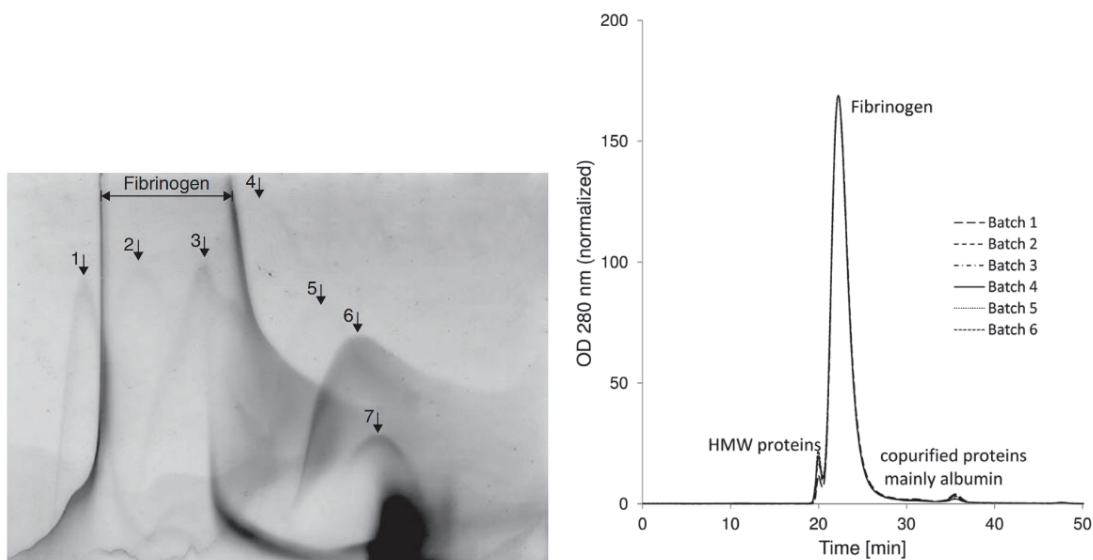
* A titre comparatif avec le traitement S/D du Wilfactin® mais non pris en compte dans le calcul du facteur global de réduction virale

Bien que la composition des réactifs S/D du procédé Clottafact® ne soient pas connus ici (et pourraient donc avoir une efficacité non équivalente voir inférieure ; comme pourraient le laisser suggérer les chiffres de réduction de la charge virale du Betafact® et du Wilfactin® comparativement à ceux du Fibryga®, dans la limite d'acceptabilité de cette comparaison) et que le Fibryga® comprend une étape de nanofiltration à 20 nm (qui devrait donc être a priori plus efficace qu'une nanofiltration à 35 nm) ; la présence d'une étape supplémentaire de sécurisation virale dans le procédé Clottafact® devrait en effet jouer dans le sens de cette hypothèse. La présence d'une troisième étape de sécurisation pourrait par ailleurs assurer une supériorité en termes de sécurisation biologique du Clottafact® sur le Fibryga®. Cependant, l'absence de chiffres ne permet pas d'être aussi affirmatif.

3.3 Evaluation des différences entre les spécialités pharmaceutiques de fibrinogène

3.3.1 Comparaison de la composition biochimique des trois spécialités pharmaceutiques

Les différences observées sur l'ensemble des procédés de purification du fibrinogène interrogent sur la capacité de chacun à discriminer la bonne protéine d'intérêt, tout en limitant son activation et par extension sa dégradation (116). Aussi, il est possible de constater avec la Figure 12 que deux des spécialités pharmaceutiques contiennent de composants co-purifiés. Les études présentées par la suite montreront que le Clottafact® n'échappe pas à la règle et contient également des composants co-purifiés.



Les points 1 à 7 montrent la présence d'autres composants que le fibrinogène

Figure 12 : Electrophorèse d'une solution de Riastap® (gauche) et profils de 6 lots de Fibryga® par SE-HPLC (droite) (52,108)

En outre, ces différences de composition pourraient mener à l'observation de différences cliniques entre les MDS (116). Il est de ce fait important de les caractériser afin de pouvoir mettre en relation une potentielle supériorité clinique avec la présence ou l'absence de composants co-purifiés ; ce qui permettrait aux fractionneurs de mettre en place des adaptations du procédé en regard de la clinique. Pour cela, la littérature comprend une publication de 2018 présentant notamment la caractérisation des composants biochimiques du Fibryga® (108). Elle est complétée en 2021 par une étude mettant en parallèle les compositions des trois spécialités pharmaceutiques de fibrinogène (116).

Les résultats de l'étude de 2021 par Neisser-Svae et al, obtenus sur une dose de 3 g sont présentés dans le Tableau 8 (un tableau présentant les valeurs de concentration après remise en solution est disponible dans l'Annexe F) (116). Il sera intéressant de relever que cette dose a été retenue par les auteurs car estimée comme dose initiale moyenne la plus couramment utilisée – pour des doses comprises généralement entre 2 et 4 g – et non car il s'agit du plus petit dénominateur commun entre les doses de Fibryga[®] et Riastap[®] (1 g) d'une part et du Clottafact[®] d'autre part (1,5 g) (116). Notons par ailleurs que les résultats présentés ici concordent quasiment parfaitement dans le cas du Fibryga[®] avec les résultats publiés en 2018 par Schulz et al (comme il est possible de le constater avec les chiffres retravaillés à partir de l'étude de Neisser-Svae et al et présentés dans l'Annexe F).

Si ces analyses montrent tout d'abord une grande différence entre les quantités totales de protéines, celle-ci peut être en grande partie expliquée par la présence d'albumine qui est ajoutée comme stabilisateur du fibrinogène pour la Riastap[®] (dosée à 1449 mg dans le Riastap[®] et bien au-dessus de ces homologues) (2,48,116). Par ailleurs, les résultats indiquent des quantités de fibrinogène plus faibles que la dose de référence dans le cas du Clottafact[®] (1500 mg par flacon) (110). Elles sont en revanche dans les normes pour le Riastap[®] (900-1300 mg pour un flacon) et exactes dans le cas du Fibryga[®] (48,96,97,100,110). Notons que la fonctionnalité du fibrinogène est préservée par tous les procédés avec des ratio activité-antigène allant de 1 pour le Clottafact[®] à 1,2 pour le Fibryga[®] ($1,08 \pm 0,09$ dans l'étude de Schultz et al) avec un intermédiaire de 1,18 pour le Riastap[®] (108). Le fibrinopeptide A, indicateur de l'activation du fibrinogène, est néanmoins très faible dans le cas du Fibryga[®] contrairement aux deux autres. De même, les D-dimères – marqueurs de la fibrinolyse – sont bien plus faibles pour ce dernier. Il semblerait ainsi que le Fibryga[®] puisse présenter une meilleure stabilité au moment de sa remise en solution (116).

Tableau 8 : Quantités et activités mesurées des composants d'une dose de 3 g de produit fini après remise en solution (116)

		Fibryga[®]	Riastap[®]	Clottafact[®]
Activité du fibrinogène				
Protéines totales	[g]	3,3	5,1	3,2
Fibrinogène (antigène)	[g]	3,0	3,3	2,6
Fibrinogène (activité par test de Clauss)	[g]	3,6	3,9	2,6
Protéines de la coagulation	[g]	3,0	3,0	2,8
Marqueurs protéiques de l'activation et de la fibrinolyse				
D-dimère	[µg]	11	54	24
Fibrinopeptide A	[µg]	0,9	11,4	19,4
Plasminogène	[UI]	6	6	4
Protéines co-purifiées				
Fibronectine	[mg]	2,1	140,0	25,6
Facteur de Von Willebrand	[UI]	30	570	100
Vitronectine	[µg]	2,1	6,0	24,0
Albumine	[mg]	63	1449	0,7
Facteur XIII (activité)	[UI]	585	165	420

Neisser-Svae et al estiment que les différences de compositions entre les trois MDS n'ont probablement pas d'impact clinique en dehors de celles observées dans les concentrations et activités de la fibronectine, du facteur de Von Willebrand et du facteur XIII (116). En outre, des taux plasmatiques élevés de fibronectine sont potentiellement associés à des thromboses artérielles et veineuses (116). Or la concentration de fibronectine est plus importante dans le cas du Riastap[®] et correspond à 931,8 µg/mL, soit près de trois fois la concentration plasmatique normale (~ 300 µg/mL) alors que les concentrations restent inférieures dans le cas du Clottafact[®] et du Fibryga[®] (respectivement de 128 et 14,3 µg/mL) (116). De même, des taux plasmatiques élevés de facteur de Von Willebrand sont associés à un risque accru de thrombose, notamment chez les patients atteints de cirrhose et subissant une transplantation hépatique, mais peuvent également être un avantage en chirurgie cardiaque, qui peut entraîner des pertes importantes en facteur de Von Willebrand (116). Le Fibryga[®] présente ainsi les concentrations les plus faibles en facteur de Von Willebrand. A noter que les concentrations de facteur de Von Willebrand dans le Clottafact[®] et le Riastap[®] sont supérieures aux niveaux plasmatiques (116). Enfin, le facteur XIII activé permet de relier la fibronectine à la fibrine pour renforcer la structure de la fibrine réticulée et de stabiliser les caillots face à la fibrinolyse et à la perturbation

mécanique (116). Aussi, Neisser-Svae et al posent l'hypothèse que la quantité supérieure de facteur XIII dans le Fibryga® pourrait expliquer en partie la meilleure stabilisation du caillot (116). En outre, pour Neisser-Svae et al, seule la différence en facteur XIII pourrait influencer sur la formation d'un thrombus (116).

Si ces résultats et hypothèses sont plutôt favorables au Fibryga®, ils devraient être toutefois pris avec un certain recul puisque les deux études ont été réalisées par des employés d'Octapharma. Par ailleurs, l'étude de Schulz et al portant exclusivement sur le Fibryga® a l'intérêt de présenter des valeurs moyennes sur six lots ainsi que leurs écarts-types. Ces informations pourraient être précieuses sur l'ensemble des MDS pour leurs doses respectives dans une étude comparative à l'image de celle réalisée par Neisser-Svae et al afin de montrer la reproductibilité lot à lot et éventuellement de pouvoir comparer statistiquement l'ensemble des paramètres entre les MDS. De plus, des mesures d'activité du fibrinogène par thromboélastométrie permettraient de présenter des résultats complémentaires au test de Clauss.

3.3.2 Evaluation in vitro des fibrinogènes

Coagulopathies de dilution

Comme développé précédemment (Voir 2.3. Pathologies acquises associées au fibrinogène), la perte de volume sanguin peut-être traitées par des solutions de perfusion, notamment des cristalloïdes et/ou des colloïdes (53,117). En 2018, Haas et al ont exploré comparativement l'efficacité du Riastap® et du Fibryga® dans le traitement de l'hypofibrinogénémie de dilution en utilisant un modèle in vitro (118). Ils ont utilisé pour cela des échantillons de sang de 10 volontaires sains et stabilisés par du citrate (118). Ces derniers ont été dilués à hauteur de 50 % par une solution d'acétate de Ringer (cristalloïde) ; cette dilution a impliqué une détérioration des paramètres biologiques étudiés (mise en évidence statistiquement) (118). Les échantillons dilués ont par la suite été traités par des solutions à 20 mg/mL de Riastap® et de Fibryga® pour une dose équivalente à 50 mg/kg (118).

Cette étude a été complétée en 2020 par celle de Groene et al qui évalue la performance de ces mêmes MDS sur la base de quatre modélisations différentes de coagulopathie par dilution in vitro, réalisées à l'aide de solution d'hydroxyéthylamidon, de gélatine, d'albumine et d'acétate de Ringer (117). Les échantillons de sang citraté de 12 volontaires sains ont pour cela été dilués à hauteur de 60 % (40 % de sang et 60 % de diluant) avec chacun des diluants (117). Ceux-ci ont été traités par des solutions à 20 mg/mL de Riastap® et de Fibryga® pour des doses cliniques

équivalentes à 50 mg/kg et 100 mg/kg (117). Les tableaux récapitulatifs des résultats des études de Haas et al ainsi que de Groene et al peuvent être consultés dans l'Annexe G.

Il est premièrement intéressant de voir que ces deux études sont parfaitement complémentaires. En outre, celle de Groene et al permet de mettre en évidence les impacts respectifs du Riastap[®] et du Fibryga[®] sur les échantillons dilués et non dilués ; tandis que l'étude de Haas et al compare statistiquement les impacts de la supplémentation en Fibryga[®] à celle en Riastap[®]. De cette façon, l'étude de Groene et al montre que la supplémentation en Fibryga[®] et en Riastap[®] ont des résultats similaires dans les modèles de coagulopathies dilutives (117). Cependant, des différences mineures peuvent être observées sur les temps de thrombine et les temps de coagulation évalués par EXTEM[®] (117). En outre, le Fibryga[®] présente globalement un plus grand impact sur l'amélioration du temps de thrombine ; là où le Riastap[®] montre un raccourcissement plus important du temps de coagulation par EXTEM[®] (117). Aussi, Groene et al proposent deux hypothèses respectives pour expliquer ces phénomènes : l'impact du Fibryga[®] pourrait être lié à une plus grande concentration en facteur XIII ; là où une concentration plus forte en facteur VIII pourrait expliquer les performances supérieures du Riastap[®]. Cette hypothèse peut prendre sens avec la présence de deux étapes chromatographiques dans le procédé Fibryga[®] qui seraient susceptibles de favoriser une meilleure élimination du facteur VIII comparativement au procédé Riastap[®] pour lequel la précipitation par la glycine constitue les étapes finales de purification.

Par ailleurs, l'étude de Haas et al montre quant à elle une différence statistique ($p < 0,001$) in vitro entre les supplémentations de Riastap[®] et de Fibryga[®] dans le traitement de l'hypofibrinogénémie dilutive pour les niveaux de fibronectine (plus élevés dans le cas du Riastap[®]) et ceux de facteur XIII (plus élevés dans le cas du Fibryga[®]). Ces deux résultats concordent par la même occasion avec ceux présentés précédemment par l'étude de Neisser et al (116). A noter également que les résultats pour le taux de Clauss sont statistiquement différents, avec des valeurs en faveur du Fibryga[®]. Cependant, ces derniers résultats ne sont pas soutenus par une différence statistique entre les valeurs de FIBTEM[®] suite à la supplémentation de l'un et l'autre des produits dérivés du plasma (118). Aussi, il semblerait plus raisonnable d'affirmer que l'efficacité in vitro de la supplémentation par ces deux MDS n'est pas différente pour leurs effets sur le fibrinogène. Enfin, l'étude de Haas et al a pris également le parti de normaliser les résultats thromboélastométriques (témoin de l'activité du fibrinogène pour le FIBTEM[®] et des autres facteurs de coagulation pour l'EXTEM[®]) des différentes spécialités par rapport à la quantité antigénique de chacun des MDS utilisés (Voir Annexe G). Or, cette

normalisation des résultats du ROTEM[®] par rapport à la quantité antigénique de fibrinogène implique une différence statistique entre les résultats EXTEM[®] des deux produits en faveur du Fibryga[®] (118). En prenant en compte que le FIBTEM[®] n'est pas statistiquement différent entre les deux spécialités avant et après normalisation par rapport à la concentration antigénique de fibrinogène (118) ; nous pouvons avancer qu'à même concentration antigénique de fibrinogène, l'activité du fibrinogène (et par conséquent l'activité de la protéine principale des MDS) n'est pas statistiquement différente entre les deux les spécialités, tandis que les facteurs de coagulation co-précipités permettent une meilleure réponse de la coagulation dans le cas du Fibryga[®]. Ainsi, l'analyse biochimique associée à ces résultats permet de préciser l'intérêt du procédé pour certaines protéines co-purifiés dans le cas du Fibryga[®] par rapport au Riastap[®]. De même, ces résultats permettent de donner du poids aux hypothèses proposées dans les études de Neisser-Svae et al, ainsi que celle de Groene et al.

A noter qu'une comparaison des temps de coagulation tels qu'étudiés par Groene et al pourrait être un paramètre comparatif intéressant entre des spécialités de fibrinogène. Pour finir, les deux études présentées ici ont été subventionnées par Octapharma.

Chirurgie cardiaque

Comme énoncé dans la partie 2.3. Pathologies acquises associées au fibrinogène, la chirurgie cardiaque est un des pôles d'utilisation du fibrinogène pour le traitement de l'hypofibrinogénémie acquise. En 2021, l'équipe Stolt et al a publié un travail sur l'exploration de l'efficacité des trois fibrinogènes dans l'augmentation in vitro de la résistance des thrombus pour des patients opérés en chirurgie cardiaque, ayant eu un bypass cardiopulmonaire (119). Pour cela, les échantillons de sang de 23 patients ont été collectés 10 minutes après l'administration de protamine (et stabilisés par du citrate de sodium 3,2%) ; afin qu'au moment du prélèvement, le sang soit non seulement dilué mais aussi que la concentration en fibrinogène issue du patient soit significativement réduite par rapport à la concentration préopératoire (cette dernière étant inférieure ou égale à 3,6 g/L) (119). De plus, l'étude a été réalisée sur l'ajout, 30 minutes après le prélèvement, d'une dose antigénique en fibrinogène de 1,125 mg dans 2,5 mL de sang citraté d'une des spécialités. A titre de comparaison avec les doses énoncées plus haut, celle-ci représente environ 35 mg/kg (119). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 9 : Résultats thromboélastométriques sur des échantillons de sang de patient en chirurgie cardiaque après supplémentation par placebo ou fibrinogène (Fibryga[®], Riastap[®], ou Clottafact[®]) (119)

	Placebo	Fibryga [®]	Riastap [®]	Clottafact [®]
FIBTEM[®] MCF (mm)	11,5 (10 - 14)	14,5 (12 - 17) ^a	15,5 (12 - 18) ^a	17 (14,5 - 20) ^{a, b}
EXTEM[®] MCF (mm)	57 (51,5 - 60)	60 (55,5 - 63,5) ^{a, c}	58,5 (54 - 61,5) ^a	61 (57 - 64) ^{a, b}
EXTEM[®] CFT (s)	99 (87 - 131,5)	92,5 (82,5 - 119) ^a	96,5 (80 - 118,5) ^d	80 (74 - 106,5) ^{a, b}

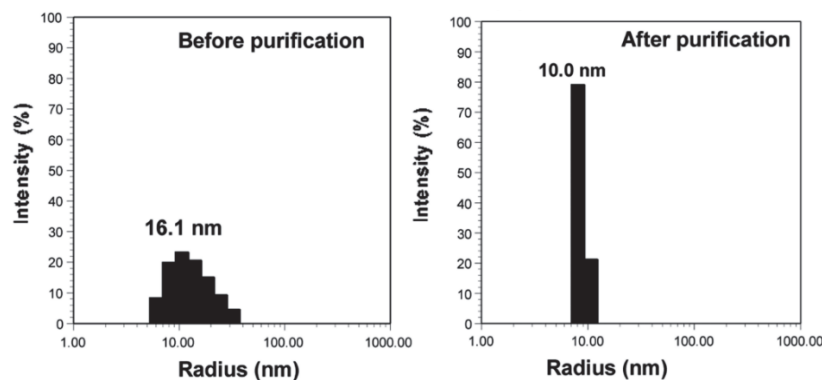
^a $p < 0,001$ contre placebo ; ^b $p < 0,001$ contre Fibryga[®] et Riastap[®] ; ^c $p < 0,001$ contre Riastap[®] ; ^d $p = 0,003$ contre placebo ; Les valeurs présentées sont des médianes (1^{er} - 3^{ème} quartiles).

Il apparaît dans cette étude qu'à concentration antigénique égale en fibrinogène, tous les MDS présentent un effet supérieur au placebo ($p < 0,001$) pour les trois mesures thromboélastométriques étudiées que sont le temps de coagulation et les résistances maximales du thrombus par FIBTEM[®] et EXTEM[®]. Notons toutefois ici dans le cas du Riastap[®] une valeur p de 0,003 pour la mesure de la résistance maximale par EXTEM[®]. De plus, Stolt et al ont remarqué que les résultats présentés dans cette étude sont concordant avec ceux de Haas et al car si la mesure FIBTEM[®] MCF n'est pas statistiquement différente entre le Fibryga[®] et le Riastap[®] ; la mesure EXTEM[®] CFT est bien confirmée comme étant à l'avantage de l'utilisation du Fibryga[®] (119). Enfin, le Clottafact[®] présente des valeurs significativement supérieures à ces homologues en termes de résistance du thrombus formé (EXTEM[®] et FIBTEM[®]) ainsi qu'un temps de coagulation réduit. Si ces résultats confirment une part de ce qui a été obtenu précédemment dans les études comparatives entre le Riastap[®] et le Fibryga[®], elle remet en revanche en question certaines hypothèses précédemment permettant d'expliquer les différences observées entre les efficacités respectives des MDS. En outre, les activités en facteur XIII sont très proches dans l'étude de Neisser-Svae et al entre le Clottafact[®] et le Fibryga[®] (respectivement 161 et 195 UI par gramme de fibrinogène (antigène)) et même supérieur dans le cas du Fibryga[®] (116). Ainsi, d'après Stolt et al, le facteur XIII ne permettrait pas à lui seul d'expliquer les différences observées (119). De plus, de nouveaux résultats sur le temps de coagulation ne montre plus de différence observable entre le Riastap[®] et le Fibryga[®] et remet en question par la même occasion l'hypothèse d'une activité supérieure en facteur VIII dans le Riastap[®] (117). C'est pourquoi des études sur les mécanismes mis en jeu lors de la formation de thrombus seraient nécessaires pour proposer une explication sur les différences in vitro (119).

Enfin, l'ensemble des équipes ayant rédigé les études in vitro présentées jusqu'ici s'entendent sur le besoin d'études in vivo et cliniques pour confirmer ou infirmer les différents résultats présentés ici.

3.3.3 Influence de la présence d'agrégats de fibrinogène dans les spécialités pharmaceutiques

Les études de Huang et al publiée en 2013 et 2014 ont permis de mettre en évidence l'influence de la structure du fibrinogène sur la polymérisation de la fibrine (120–122). En outre, leurs travaux ont permis tout d'abord de montrer que les préparations de fibrinogène pouvaient présenter des profils hétérogènes en termes de dispersion de taille protéiques (121,122). En outre, si l'utilisation de chromatographie par gel filtration permet de réduire la dispersion des profils de fibrinogène – passant ainsi de profils monodispersés à des profils polydispersés – les échantillons monodispersés montrent également une augmentation de la turbidité deux fois supérieure à celle des échantillons polydispersés lors de la polymérisation de la fibrine (121,122). Ceci indique que les fibres issues de préparations de fibrinogène monodispersées sont plus épaisses que celles issues de fibrinogène polydispersées (soit un rayon d'environ 1500 nm pour le fibrinogène monodispersé contre environ 800 nm pour le fibrinogène polydispersé) (121,122). A noter que ces résultats ont été également confirmés par DLS (*Dynamic Light Scattering*) (120). De plus, comme il est possible de le constater sur la Figure 13, les préparations de fibrinogène monodispersées impliquent une formation plus lente de protofibrilles mais une formation plus rapide de fibres que les préparations initiales de fibrinogène polydispersées (121).



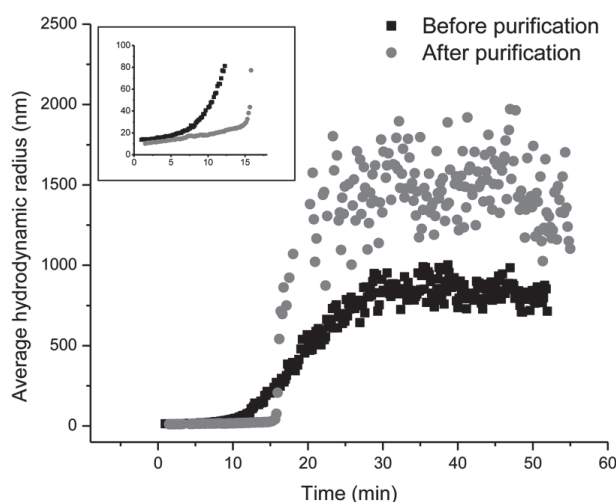
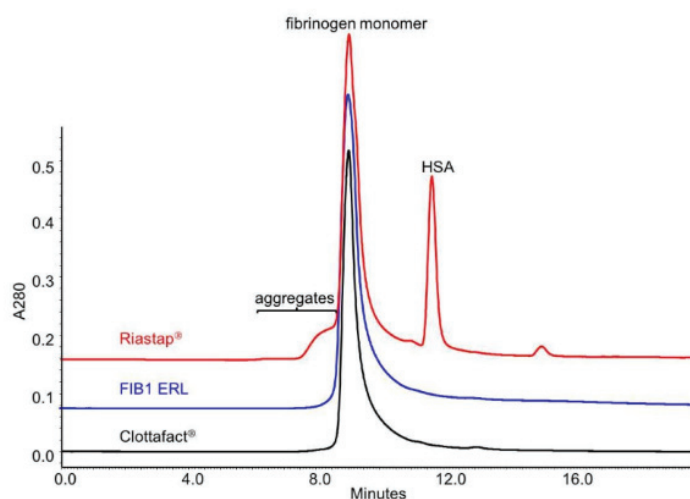


Figure 13 : Variation de la dispersion des profils de préparations de fibrinogènes par chromatographie sur gel filtration et influence sur l'épaisseur des fibres (121)

Précisons que la turbidimétrie (qui repose sur la quantification de l'atténuation de l'intensité d'un rayon incident par un échantillon), de même que la DSL (qui repose sur la quantification de la dispersion de d'un rayon incident par un échantillon) sont des techniques utilisées couramment pour suivre la polymérisation de la fibrine à partir de fibrinogène et de thrombine (120,122). Ainsi, les courbes associées à la turbidimétrie montrent trois phases (voir Figure 13) : une phase de latence correspondant à la formation de protofibrilles bicaténaires, une phase d'augmentation rapide de la densité optique associée à l'agrégation latérale des protofibrilles en fibres, et phase plateau correspondant à l'épaisseur moyenne des fibres du thrombus (121,122).

Ces résultats furent complétés une première fois en 2016 par García Gonzalez dans son travail de thèse, puis une seconde fois par une équipe autour du même auteur en vue d'une publication en 2020. Ainsi, le travail de García Gonzalez s'est concentré sur la comparaison des impacts sur la polymérisation et les propriétés mécaniques des fibres produites à partir de trois fibrinogènes différents : Fib1, Riastap[®] et Clottafact[®] (60,120). A noter que des concentrations en fibrinogène proches de celles physiologiques (3 g/L) ont été utilisées par García Gonzalez et al contre des concentrations d'environ 0,4 mg/mL par Huang et al (120).



HSA : albumine

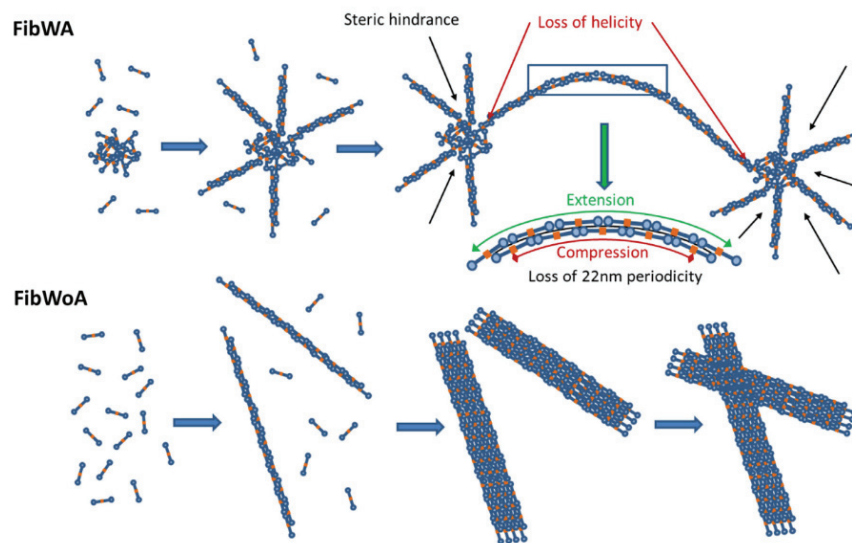
Figure 14 : Chromatogrammes (exclusion par la taille) du Riastap[®], du Fib1 et du Clottafact[®] (120)

Le Riastap[®] présente une polydispersion plus importante que les deux autres fibrinogènes, celle-ci est liée à l'accumulation d'agrégats de fibrinogène (120). Le Clottafact[®] présente quant à lui un profil quasiment monodispersé ; tandis que le pic d'agrégats élué en amont du Fib1 (quasiment invisible sur la Figure 14) correspond à 4 % de la masse totale de fibrinogène (60). Les autres caractéristiques de Fib1 étant très proches du Clottafact[®], la publication de 2020 compare essentiellement ces deux fibrinogènes pour mieux caractériser l'impact de ces agrégats, comme il est possible de le constater dans l'Annexe H (60). En outre, le Riastap[®] présente des différences significatives par rapport à ses homologues non seulement en composition de chaînes α mais aussi en concentrations d'albumine, de fibronectine et facteur XIII. A noter que les valeurs d'albumine, de fibronectine et de facteur XIII présentées par García Gonzalez concordent avec celles de Neisser-Svae et al (120).

L'analyse DSL des préparations de fibrinogène permet de mettre en évidence une structure très proche d'être cristalline, tandis que l'organisation des fibrinogènes polydispersés montre moins de régularité longitudinale et latérale (120) (voir Annexe H). De plus, le fibrinogène monodispersé montre non seulement un nombre de protofibrilles plus importantes que les fibrinogènes polydispersés, mais aussi des fibres plus denses et plus épaisses (120). Ce dernier point est concorde d'ailleurs avec les résultats que Huang et al avaient montrés par turbidimétrie. De plus, une augmentation de la concentration en fibrinogène induit une augmentation de l'épaisseur et du nombre de protofibrilles. Toutefois, les fibres associées à une concentration de 3 g/L de fibrinogène perdent en densité comparativement à une concentration

de 1g/L de fibrinogène (120). Il est intéressant de relever que les paramètres mesurés sont très proches entre le Fib1 et le Riastap[®] (120). Ces résultats peuvent être mis en lien avec les analyses mécaniques des fibres. Ainsi, la structure cristalline du Clottafact[®] implique une plus grande résistance et une plus grande rigidité que les structures moins organisées du Riastap[®] et du Fib1 (120).

Ces résultats associés à des observations au microscope mènent García Gonzalez et al à proposer deux modèles respectifs de polymérisation et d'organisation structurale pour les fibrinogènes monodispersés et polydispersés :



FibWoA : Fibrinogène sans agrégats (Fibrinogène Without Aggregats) ; FibWA : Fibrinogène avec agrégats (Fibrinogène With Aggregats)

Figure 15 : Mécanismes de formation de la fibrine à partir des fibrinogènes comportant des agrégats et sans agrégats

Neisser-Svae et al avaient mis en évidence des différences de dispersion entre les spécialités de fibrinogène (voir Annexe F) mais avaient négligé leur influence. Aussi, cette dernière semble être suffisamment importante pour expliquer en partie des différences constatées entre les spécialités de fibrinogène.

3.3.4 Comparaisons cliniques des spécialités de fibrinogène

Les études comparatives de spécialités pharmaceutiques de fibrinogène restent actuellement limitées. Nous pourrions toutefois citer l'étude financée par Octapharma FORMA-01, menée par Ross et al et publiée en 2018, qui explore les paramètres pharmacocinétique du Riastap[®] et du Fibryga[®] (123). Outre cette étude, cette partie sera plus spécifiquement illustrée à l'aide d'un

article de revue des caractéristiques pharmacologiques du fibrinogène humain, publié en 2019 par Casini et de Moerloose (69). Les tableaux récapitulatifs associés à cette revue – des paramètres pharmacocinétiques, et des données relatives à l'efficacité et à la sécurité de chacun des trois MDS – sont mis à la disposition du lecteur en Annexe I.

Pharmacocinétique

Plusieurs études ont cherché à évaluer les propriétés pharmacocinétiques de chacune des spécialités pharmaceutiques de fibrinogène (124–127). Notons que celles présentées par Casini et de Moerloose s'attachent majoritairement à une exploration de patients afibrinogénémiques avec des échantillons de patients plutôt restreints, limitant par la même occasion la portée statistique de ces analyses (69).

Comme énoncé précédemment, seule l'étude FORMA-01 a été réalisée de façon comparative entre le Riastap[®] et le Fibryga[®] (123). Il s'agit d'une étude pharmacocinétique, prospective, randomisée, contrôlée réalisée sur 22 patients et qui s'est déroulée en cross-over sur deux périodes de 45 jours pour le traitement des patients par une dose cible de 70 mg/kg de Riastap[®] (dose moyenne de 69,74 mg/kg) ou par Fibryga[®] (dose moyenne de 76,88 mg/kg) (123). Ainsi, les profils pharmacocinétiques des deux spécialités pharmaceutiques apparaissent similaires à quelques exceptions près (voir Annexe I) (69,123). Cependant, une analyse post hoc des paramètres pharmacocinétiques a montré que l'ASC normalisée par rapport à la dose administrée, la clairance et le volume de distribution à l'état d'équilibre sont légèrement plus favorables à Fibryga[®] (69). En outre, les rapports moyens de ces paramètres sont 1,196, 0,836 et 0,886, avec des intervalles de confiance à 90% respectifs de [1,117;1,281], [0,781;0,895], et [0,791;0,994], dans le cadre d'un test d'une hypothèse nulle de non-équivalence (69,123). A noter que des études supplémentaires devraient être menées pour établir la provenance de ces différences et leur pertinence clinique (faible nombre de patients, variabilité entre les flacons, etc.) (69).

De façon générale, les études pharmacocinétiques des fibrinogènes humains suggèrent qu'une dose unique d'environ 70 mg/kg permet d'atteindre une activité de fibrinogène d'environ 1,3 g/L en une heure et que le fibrinogène perfusé a une demi-vie d'environ 74 heures (69). Ces données sont d'autant plus intéressantes que le PNDS recommande justement l'utilisation d'une dose initiale probabiliste de 50 à 70 mg/kg dans le traitement d'hémorragies aiguës pour les déficit héréditaire du fibrinogène, afin d'augmenter le taux de fibrinogène plasmatique d'environ 1 g/L (56). Par ailleurs, les larges intervalles de paramètres pharmacocinétiques montrent la nécessité

de réaliser des analyses pharmacocinétiques individuelles pour mieux évaluer la concentration de fibrinogène à perfuser et la fréquence de perfusion en cas de prophylaxie (69).

Efficacité

L'efficacité d'une spécialité pharmaceutique de fibrinogène est définie par la concentration circulante de fibrinogène conduisant à un effet hémostatique efficace (69). Celle-ci est évaluée pour le traitement des hémorragies aiguës chez le patient subissant une intervention chirurgicale, et chez le patient sous prophylaxie (69). L'efficacité hémostatique globale d'un fibrinogène humain est généralement explorée dans les études cliniques selon une échelle de jugement à 4 points (Excellente, Bonne, Modérée, Nulle), évaluée par l'investigateur pour statuer sur le succès (Excellente, Bonne) ou l'échec (Modérée, Nulle) du traitement (86,128,129). Il est éventuellement possible de retrouver la résistance maximale du thrombus (MCF) – étudiée dans les études *in vitro* présentées précédemment – mais seulement comme critère de jugement secondaire de l'efficacité (129). Ainsi, l'ensemble des fibrinogènes est très efficace chez le patient traité à la demande après un épisode hémorragique (69). Dans le cadre de la prophylaxie, la perfusion de fibrinogène est également considérée comme efficace (69).

Sécurité

Le profil de sécurité du concentré de fibrinogène a été largement exploré dans plusieurs contextes cliniques et indications nécessitant une perfusion de fibrinogène (69). Notons que la définition et l'évaluation des données de sécurité varient selon les études et dépendent également de la durée du suivi, ce qui empêche véritablement toute comparaison (69). Dans l'ensemble, et comme l'indique déjà l'analyse de plus de 27 ans de données de pharmacovigilance sur le Riastap[®], les spécialités pharmaceutiques de fibrinogène présentent un profil de sécurité prometteur, bien que ces dernières ne soient pas exemptes d'événements indésirables (69,130) (voir 2. Intérêt du fibrinogène en clinique). Rappelons à ce titre qu'aucune transmission virale n'a été signalée dans les études cliniques (69).

3.3.5 Comparaison des données biochimiques, des résultats *in vitro*, de l'influence structurelle des agrégats de fibrinogène et des études cliniques

Intervalles de concentration en fibrinogène pouvant influencer les résultats

Les différences *in vitro* qui ont pu être mises en évidence reposent sur des comparaisons statistiques des produits dérivés du plasma pour une dose de fibrinogène ajustée par les opérateurs (ou normalisée mathématiquement après coup). Or les études cliniques définissent

l'utilisation des spécialités et donc les doses administrées selon les indications référencées par les fractionneurs et non en adaptant le dosage de ces dernières en fonction de la concentration antigénique de fibrinogène réellement contenu dans chaque flacon. Plus cette gamme d'acceptabilité est grande et plus de grands intervalles de réponses d'efficacité sont observés. Cette variabilité de la réponse clinique rendra plus compliquée l'analyse in vivo des valeurs.

Rappelons alors que la monographie canadienne du Riastap[®] précise une concentration en fibrinogène comprise entre 900 mg et 1300 mg par flacon, soit une valeur médiane de 1100 mg avec un intervalle de 200 mg autour de cette valeur (à noter qu'un flacon est utilisé en clinique comme étant équivalent à 1000 mg). Nous obtenons ainsi une gamme de principe actif précise à 18 % (en prenant 1100 mg pour référence) et à 30 % (pour une référence de 1000 mg). Ces données présentant des intervalles extrêmement grands, une analyse rapide des chiffres de l'étude de Stolt et al a été entreprise afin de comparer ces valeurs sur une petite population en prenant en compte l'incertitude liée à la remise en suspension :

Tableau 10 : Ecarts des valeurs expérimentales aux valeurs de référence à partir des 23 échantillons expérimentaux remis en solution présentés dans l'article de Stolt et al (119)

	Fibryga[®]	Clottafact[®]	Riastap[®]	
Dose-flacon de référence	1000 mg	1500 mg	1000 mg	1100 mg
Concentration de référence après remise en solution	20 mg/mL	15 mg/mL	20 mg/mL	22 mg/mL
Ecart relatif moyen à la valeur de référence	5 %	6 %	19 %	8 %
Ecart-type de l'écart relatif à la valeur de référence	2 %	4 %	6 %	5 %

Une seconde dose-flacon de référence hypothétique de 1100 mg pour le Riastap[®] a été proposée en lien avec le précédent paragraphe et semblerait être plus proche du centre de l'intervalle de fluctuation. Cette hypothèse nécessiterait néanmoins d'être testée statistiquement sur un plus grand échantillon.

Si la fluctuation de la quantité en fibrinogène semble effectivement importante dans le cas du Riastap[®], elle semble néanmoins plus restreinte pour les deux autres spécialités pharmaceutiques. Il semble par conséquent que l'analyse de l'effet thérapeutique ne serait probablement pas beaucoup plus délicate que pour un autre principe actif (avec une gamme d'acceptabilité à $\pm 5\%$ par rapport à la valeur de référence) en considérant que l'effet du MDS repose sur le fibrinogène seul. Une exception pourrait être faite pour le Riastap[®], dont la

différence statistique d'effet risque d'être plus compliquée à montrer comparativement à un autre MDS, compte tenu d'un intervalle de fluctuation a priori plus grand. Indiquons alors que la Pharmacopée Européenne permet une gamme d'acceptabilité de $\pm 30\%$ de fibrinogène par rapport à la concentration de référence après remise en solution (107).

Notons enfin que les études cliniques ne permettent pas actuellement de différencier les effets d'un fibrinogène par rapport à l'autre lorsqu'ils sont comparés. De plus, le manque d'analyses biochimiques des spécialités associées aux études cliniques limite la possibilité de proposer de nouvelles hypothèses quant à l'observation d'une différence statistique mettant en avant l'efficacité d'un MDS par rapport à un autre. Il est également davantage compliqué d'analyser les influences des protéines co-purifiées et par conséquent de lier ces dernières – si tant est qu'il y en ait pour être significatives – aux différences de stratégies de purification.

Influences des agrégats de fibrinogène

La présence des agrégats implique une différence en termes de temps de polymérisation ainsi que de résistance du thrombus. Aussi, les analyses réalisées par García Gonzalez indiquent clairement une différence entre le Clottafact[®] et le Riastap[®] qui concorde avec les résultats d'analyses in vitro de Stolt et al : un temps de coagulation significativement moindre et une résistance significativement plus importante (FIBTEM[®] et EXTEM[®]) dans le cas du Clottafact[®].

Le manque d'informations comparative à ce sujet sur le Fibryga[®] rend plus compliquée l'estimation de l'influence des agrégats présents à hauteur de $2,8 \pm 0,5\%$ de la masse de fibrinogène contre $1,8\%$ dans le cas du Clottafact[®] d'après les données de Neisser-Svae et al. Rappelons à ce titre que seule la valeur EXTEM[®] MCF du Fibryga[®] est statistiquement différente de celle du Riastap[®] (pour une valeur du Fibryga[®] supérieure) alors que l'ensemble des trois paramètres (FIBTEM[®] MCF, EXTEM[®] MCF et EXTEM[®] CFT) sont en faveur du Clottafact[®] (118,119). De même, l'étude de Stolt et al et Haas et al présentant des résultats du FIBTEM[®] concordent non seulement pour des doses nominales des flacons utilisés mais aussi pour des doses normalisées par rapport au fibrinogène. Aussi, Neisser-Svae et al indiquent que les agrégats de fibrinogène du Riastap[®] représentent $22,1 \pm 1,3\%$ de la masse de fibrinogène. Par conséquent, la valeur de dispersion de taille protéique du Fibryga[®] comparativement à ses concurrents en lien avec les résultats in vitro rend l'interprétation compliquée en considérant qu'elle est seule à induire une influence.

Influences supplémentaires potentielles des co-produits

Stolt et al indiquent que le facteur XIII seul ne pourrait suffire à expliquer les différences observées in vitro entre les spécialités de fibrinogène (119). Toutefois, même minoritaire, il conviendrait de reconnaître l'influence du facteur XIII dans les résultats obtenus. En outre, la bibliographie permet de confirmer que le facteur XIII a effectivement une influence positive sur la densité et la résistance de la fibrine (131). En effet, ce dernier participe à consolider la polymérisation de la fibrine, notamment en produisant des liaisons covalentes entre la matrice de fibrine et la fibronectine. A ce titre, la fibronectine participe à augmenter la vitesse de la polymérisation, de même que la densité des fibres (132). Cependant, l'augmentation de la densité de fibrinogène s'avère être un phénomène saturable (132). Ajoutons également qu'à des concentrations en fibrinogène et thrombine égales, l'augmentation de la concentration en albumine a montré induire une diminution de la résistance du thrombus (65). La vitronectine s'avère quant à elle avoir un impact ambigu, tantôt induisant l'agrégation plaquettaire et tantôt l'inhibant (133). Aussi, élucider son mécanisme d'action permettrait de spécifier davantage l'influence de ce composant co-purifié qui pourrait participer à faire varier positivement ou négativement les valeurs d'EXTEM[®]. Enfin, le facteur de Von Willebrand, qui participe positivement dans l'agrégation plaquettaire et dans l'hémostase, pourrait donc influencer également sur les valeurs d'EXTEM[®] (134,135).

Aux vues de ces informations, nous pourrions prendre le parti de remettre en question l'hypothèse de Neisser-Svae et al (selon laquelle seul le facteur XIII pourrait influencer la formation de thrombus) en proposant le Tableau 11. Celui-ci récapitule qualitativement les influences relatives des différents composants co-purifiés par comparaison des quantités présentes dans chacune des spécialités pharmaceutiques (d'après les valeurs présentées par Neisser-Svae et al). A noter que l'influence potentiellement positive liée à la variation de concentration antigénique en fibrinogène – si cette dernière était mise en évidence – pourrait se surajouter à ces effets dans une étude comparative entre MDS, et expliquer les résultats in vitro du FIBTEM[®] MCF présentés par Stolt et al (119).

Tableau 11 : Interprétation de la contribution relative positive ou négative de chaque composant sur l'effet des MDS à partir des données de la littérature (116)

	Fibryga®	Riastap®	Clottafact®
Fibrinogène			
Fibrinogène (antigène)	0	(+)	0
Protéines co-purifiées			
Fibronectine	+	+++	++
Facteur de Von Willebrand	+	+++	++
Vitronectine	0	+ / -	++ / --
Albumine	-	--	0
Facteur XIII	+++	+	++
Chromatographie d'exclusion de taille			
Agrégats élués en amont du fibrinogène	(-)	--	0

+ influence positive ; - influence négative ; Le nombre de signes a été donné comparativement à la concentration du composant dans les autres MDS d'après les données de Neisser-Svae et al (116).

Si ce tableau semble difficile à interpréter sur le plan global, ajoutons alors à celui-ci l'utilisation des données de la littérature concernant les influences sur la densité et la turbidité de la fibronectine, de l'albumine et du facteur XIII (voir Tableau 12), présentés par la documentation annexe de García Gonzalez et al (60). Pour cela, les valeurs de concentration présentées par Neisser-Svae et al de chacun de ces trois composants (albumine, fibronectine et facteur XIII) seront traduites en influences maximales relatives par interpolation linéaire. Nous poserons à cet instant l'hypothèse raisonnable que les variations de turbidité et de densité sont proportionnelles à celles de la résistance de la fibrine. Cette hypothèse est renforcée par les résultats sur l'albumine humaine présentée par Zeng et al (65). Nous poserons ensuite l'hypothèse que la variation d'effet de la turbidité est équivalente à celle trouvée sur la densité de la fibrine. De cette façon, une compilation des données pourra être réalisée afin de présenter une estimation des intervalles maximum de variation d'effet pour chacune des spécialités pharmaceutiques. Afin que les résultats soient plus facilement lisibles, des histogrammes ont été tracés à l'attention du lecteur (Figures 16 et 17).

Tableau 12 : Estimation de la contribution relative positive ou négative d'une part des composants sur l'effet des MDS à partir des données issues de la littérature (60,116)

	Extrémités de l'intervalle de variation	Effet structurel maximum	Estimation A			Estimation B				
			Fibryga®	Riastap®	Clottafact®	Fibryga®	Riastap®	Clottafact®		
Protéines co-purifiées										
Fibronectine	[mg/ml]	0	0,08	50%	Turbidité	8,9%	50,0%	8,9%	50,0%	50,0%
Albumine	[mg/ml]	0	20	40%	Turbidité	-0,8%	-0,0%	-0,8%	-19,3%	-0,0%
Facteur XIII	[µg/ml]	0	20	10%	Densité	10,0%	10,0%	10,0%	6,0%	10,0%
Chromatographie d'exclusion de taille										
Agrégats élués en amont du fibrinogène (HMW)										
	[% du pic total HMW + fibrinogène]	0	4	100%	Turbidité	-70%	-100%	-14%	-100%	0%
Compilation des données										
Estimation de l'influence maximum relative négative						-71%	-119%	-45%	-15%	-119%
Estimation de l'influence combinée maximum relative						-51,9%	-63,3%	15,0%	4,3%	-63,3%
Estimation de l'influence maximum relative positive						18,9%	56,0%	60,0%	18,9%	56,0%

Les valeurs en italique correspondent à des valeurs issues des analyses biochimiques hors de l'intervalle de variation issu de la littérature, l'hypothèse d'un effet borné par rapport au maximum issu de la littérature a été posé (phénomène de saturation du facteur XIII et de la fibronectine). Les valeurs en gras correspondent aux valeurs impactées par l'estimation de l'influence relative en bornant l'effet à 100 % pour le Riastap® par comparaison avec les travaux de García Gonzalez. Les valeurs en gras sont obtenues avec les valeurs de Neisser-Svae et al soit en posant un effet à 0 % pour le Clottafact® (Estimation B) car pris comme référence par García Gonzalez, soit en posant l'hypothèse d'une proportionnalité d'impact relatif par rapport à un effet maximum pour le Riastap® pour la valeur présentée par Neisser-Svae et al et en la comparant aux proportions d'agréats en amont du fibrinogène du Clottafact® et du Fibryga® pour estimer leurs valeurs d'impact relatif maximum (Estimation A).

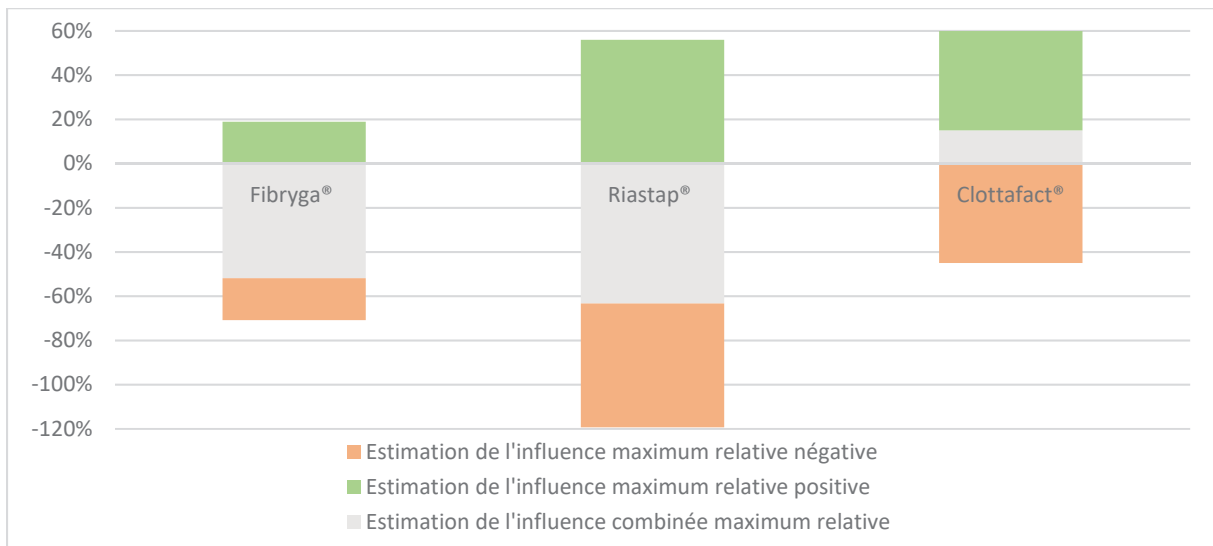


Figure 16 : Représentation des intervalles relatifs d'effet des MDS à partir de l'estimation A de la contribution relative d'une part des composants

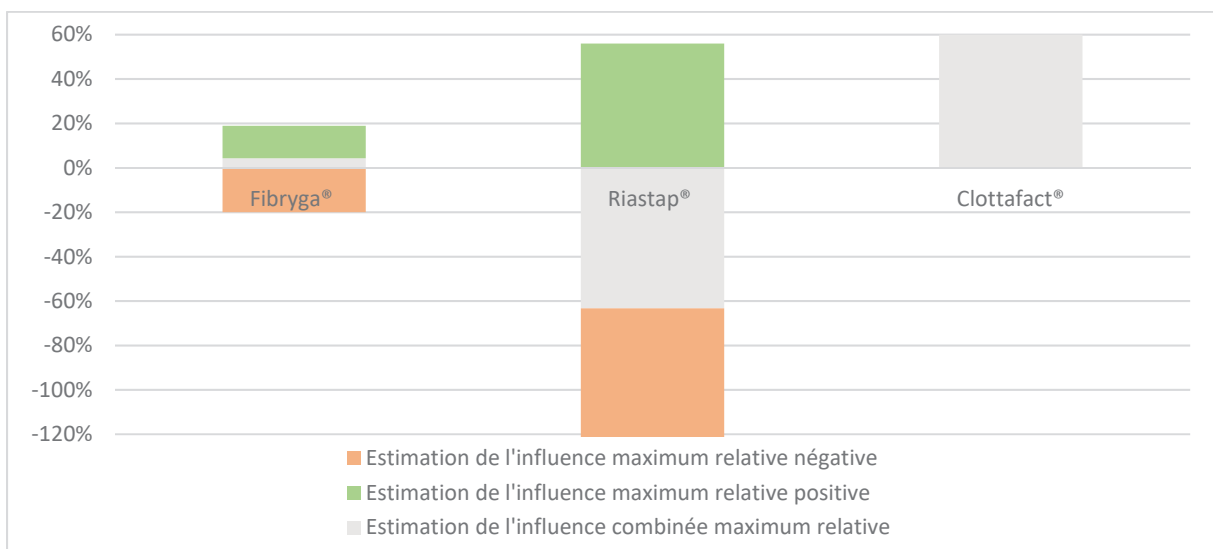


Figure 17 : Représentation des intervalles relatifs d'effet des MDS à partir de l'estimation B de la contribution relative d'une part des composants

Ces estimations impliquent des intervalles de d'effets relatifs particulièrement grands. Ainsi, dans l'estimation la plus conservatrice pour l'effet ; celui-ci ne varierait au maximum que de 33,9 % dans le cas du Fibryga®. L'étendue des intervalles est d'ailleurs toujours la plus restreinte dans le cas du Fibryga® et toujours la plus grande dans le cas du Riastap®. Ce dernier point est d'autant plus intéressant qu'il pourrait se surajouter à l'hypothèse d'un intervalle de concentration antigénique en fibrinogène plus grand dans le cas du Riastap®. Aussi, il est raisonnable d'avancer qu'un facteur de coagulation mieux purifié de ses co-produits, comme

ce pourrait être le cas du Fibryga[®] d'après les chiffres de Neisser-Svae et al, présenterait un intervalle d'effets plus restreint et serait donc potentiellement plus fiable d'un lot à l'autre (116).

Il est évident que ces données partielles ne peuvent suffire à rendre des conclusions claires et définitives. Notons toutefois que ces résultats permettent de donner du poids à l'hypothèse d'influences multiples concernant la différence significative de la résistance du thrombus par l'EXTEM[®] entre le Fibryga[®] et le Riastap[®] puisque la contribution de l'albumine joue positivement en faveur du Fibryga[®] conformément aux résultats de Stolt et al (119). Ainsi, la prise en compte de l'ensemble des autres composants co-purifiés devrait induire une influence maximum relative globale en faveur du Fibryga[®] (puisque le facteur de Von Willebrand indique plutôt une influence positive en faveur du Riastap[®] dans le Tableau 11). De plus, la prise en compte des composants co-purifiés offre une tendance permettant de rapprocher les performances du Riastap[®] et du Fibryga[®], tout en gardant les effets du Clottafact[®] supérieurs. L'estimation A permet ainsi de garder les estimations d'influence combinée relatives du Clottafact[®] plus éloignées de celles de ses homologues, que les leurs ne le sont entre elles. A l'inverse, l'estimation B indique des estimations d'influence combinée relatives pour le Fibryga[®] à mi-chemin entre celle du Clottafact[®] et celle du Riastap[®] (ce qui représente donc un résultat partiel par rapport aux effets attendus pour vérifier l'hypothèse).

L'hypothèse initiale de proportionnalité entre la variation de la turbidité et la résistance de la fibrine est limitée : García Gonzalez et al indiquent notamment une résistance de la fibrine issue du Clottafact[®] quatre fois supérieure à celle du Fib1 pour une turbidité maximale seulement deux fois supérieure. Ce point irait dans le sens d'une atténuation des résultats majoritaires associés à l'influence des agrégats de fibrinogène comme cela est déjà essentiellement le cas ici pour l'estimation A. Toutefois, l'estimation B serait probablement plus cohérente avec les résultats de García Gonzalez et al puisque cette étude prend le Clottafact[®] comme référence d'effets pour une concentration quasi-nulle d'agrégats sur la résistance de la fibrine. Enfin, il pourrait être reproché que comptabiliser les influences relatives de la fibronectine et du facteur XIII reviendrait à prendre en compte deux fois le même effet. Aussi, une étude faisant varier expérimentalement les paramètres de façon isolée (y compris les conditions de pH, d'influence ionique, etc. qui diffèrent d'une formulation à l'autre) – à l'image de l'étude de Zeng et al – pour chacun des MDS permettrait par conséquent d'obtenir des résultats ayant plus de poids que ceux présentés ici.

Provenance des agrégats de fibrinogène et différences majeures en co-produits dans les produits finis

Les agrégats de fibrinogène pourraient tout d'abord provenir de dégradations par le procédé de purification, au même titre que les co-produits pourraient être mieux éliminés par certains procédés de purification. Notons que les méthodes analytiques essentiellement utilisées pour la séparation du fibrinogène et des agrégats sont des méthodes chromatographiques (60,116,120). Bien que celles utilisées par les procédés Clottafact[®] et Fibryga[®] soient des chromatographies par échange d'ions et non des chromatographies par gel filtration, il semblerait raisonnable de supposer ces étapes comme participant majoritairement à l'élimination des agrégats de fibrinogène des phases éluées de fibrinogène. Les procédés contenant des étapes chromatographiques sont connus pour permettre une meilleure purification de la protéine d'intérêt et une meilleure élimination des contaminants et agrégats en générale (27). Nous pourrions alors supposer que la présence d'étape chromatographique permet également de mieux séparer la protéine d'intérêt de ses co-produits. L'absence d'étape de purification par chromatographie dans le procédé Riastap[®], et la grande quantité d'agrégats retrouvée après remise en solution du produit fini ainsi que les quantités en co-produits globalement plus élevées comparativement aux deux autres spécialités pharmaceutiques, permettent d'aller dans le sens de ces hypothèses.

Par ailleurs, les agrégats de fibrinogène pourraient également provenir de la remise en solution des produits finis. Or, si cette dernière peut effectivement jouer un rôle dans la production d'agrégats, nous pourrions cependant considérer cette partie comme minoritaire en lien avec les différences de quantités d'agrégats entre le Riastap[®] d'une part et celles du Clottafact[®] et du Fibryga[®] d'autre part ; alors que les excipients et la méthode de conservation par lyophilisation sont relativement équivalente entre le Riastap[®] et le Fibryga[®] (116). Notons alors que si la faible différence d'agrégats entre le Fibryga[®] et le Clottafact[®] s'avérait effectivement non négligeable, nous pourrions supposer que la remise en solution participe belle et bien à une différence, en lien avec le procédé de production. Outre des excipients différents entre ces spécialités pharmaceutiques, la présence de deux étapes chromatographiques pour le Fibryga[®] contre une seule pour le Clottafact[®] devrait induire des résultats plus favorables au Fibryga[®] (ou au moins équivalents) en termes d'agrégats de fibrinogène ; ce qui n'est pas le cas dans les résultats présentés par Neisser-Svae et al (116). Par ailleurs, Brookes et al ainsi que García Gonzalez et al indiquent qu'une méthode préparative de fibrinogène s'appuyant sur une séparation par la taille n'est pas envisageable à échelle industrielle car elle induirait une

production d'agrégats (136). Ces auteurs font alors référence à la chromatographie par gel filtration. Ceci ouvre néanmoins sur la potentielle influence de la nanofiltration puisque cette étape s'est également montrée difficile à mettre en œuvre au niveau industriel à cause de la viscosité des solutions de fibrinogène non-diluées (48). Ainsi, la différence entre les nanofiltrations à 20 nm pour le Fibryga® et 35 nm pour le Clottafact® pour le traitement du fibrinogène – protéine longue d'environ 45 nm – devrait induire des contraintes par cisaillement plus importantes sur le fibrinogène dans le cas du Fibryga®. Nous pourrions alors poser comme hypothèse que la remise en solution pourrait participer à obtenir une plus grande quantité d'agrégats de fibrinogène, sur la spécialité pharmaceutique dont le procédé a entraîné de plus grandes contraintes sur la structure du fibrinogène. Reste que cette hypothèse nécessiterait pour avoir plus de poids, non seulement de résultats d'autres études comparatives de la composition biochimique entre le Fibryga® et le Clottafact® qui soient concordant avec celle de Neisser-Svae et al et montrent une différence significative entre les deux MDS, mais aussi d'études comparatives portant sur la structure du fibrinogène dans les produits finis de Clottafact® et de Fibryga®.

3.4 Introduction de nouveaux procédés : intérêts et contraintes

L'introduction d'un nouveau procédé s'accompagne tout d'abord nécessairement de contraintes. Celles-ci sont essentiellement liées aux cadres réglementaires de l'activité ainsi qu'aux capacités économiques que la société est prête à investir dans la mise en place d'un nouveau procédé (137). Rappelons alors que ces dernières sont particulièrement limitantes dans l'industrie du fractionnement (3,7). Aussi, la philosophie selon laquelle *le produit est défini par le procédé*, peut être un frein à l'évolution des méthodes de fractionnement puisque le changement sur un procédé affecte nécessairement l'ensemble des produits en aval (6). Ce qui pourrait en effet mener à un besoin de valider à nouveau leurs profils de pureté et les impacts sur leurs thérapeutiques respectifs.

Il existe néanmoins des moteurs justifiant les changements de méthodes de fractionnement. Citons ainsi l'apparition de nouvelles demandes en lien avec les découvertes de nouveaux traitements (à l'aide d'une protéine non utilisée jusqu'ici) qui peut justifier une réorganisation de la production (6). De même, l'intégration de nouvelles technologies peut être envisagée pour augmenter les rendements et l'efficacité d'une usine (6). Viennent enfin les considérations de sécurité qui peuvent se traduire premièrement par l'élimination des agents pathogènes, deuxièmement par la réduction des impuretés des protéines plasmatiques liées à des réactions

indésirables, et troisièmement par le besoin d'augmentation des marges de sécurité par le fabricant pouvant être lié à la mise en conformité avec une réduction des intervalles d'acceptabilité par le régulateur (6).

En somme, la variabilité des procédés opérés actuellement sont les résultats des stratégies de changement par les fractionneurs afin de s'adapter à la demande et se conformer à la réglementation, tout en étant compétitif face à la concurrence. Face à cette variabilité, il conviendrait alors en plus de ces sujets, de comparer les trois procédés actuels de production du fibrinogène et les connaissances dégagées par les études de composition biochimique, les études in vitro et les études cliniques développées précédemment.

Discussion

Avant de parler plus spécifiquement des spécialités de fibrinogène, il serait opportun d'évoquer le cas du cryoprécipité. En effet, le cryoprécipité est un produit relativement ancien qui n'est plus utilisé en France pour des raisons de sécurité, contrairement au Royaume-Uni ou à l'Amérique du Nord (17,69,75–77). Il s'agit également d'un produit issu d'un procédé de purification plus sommaire que le fibrinogène humain, qui contient par conséquent plus de co-produits que les fibrinogènes (50,53). Toutefois, il trouve encore ses défenseurs au niveau international, notamment pour des raisons économiques (82). A ce titre, l'étude FIBRES pourrait avoir un impact dans les pratiques puisque ses auteurs en viennent justement recommander l'utilisation du fibrinogène par rapport au cryoprécipité, en s'appuyant sur le principe de réduction du risque infectieux (82). En effet, il est intéressant de souligner que cette étude clinique ne montre qu'une non-infériorité du fibrinogène par rapport au cryoprécipité, et non une supériorité (82). Le procédé devient donc un argument en faveur du fibrinogène mais ne se suffit pas à lui-même.

Les différences montrées au cours de ce manuscrit entre le Riastap[®], le Fibryga[®] et le Clottafact[®] pourraient alors constituer une situation similaire, puisqu'aucune étude clinique n'a pu montrer à ce jour une différence significative des effets thérapeutiques entre ces produits dérivés du plasma. Or il est important de souligner que ce sont justement ces études cliniques qui font foi dans le milieu médical et permettent d'avoir un critère de décision le plus objectif possible entre plusieurs médicaments. Aussi, assurons au lecteur que cette discussion n'a pas pour but de remettre en question ce point.

Concernant les étapes de sécurisation, si le Riastap[®] présente une seule étape de sécurisation virale contre deux pour le Fibryga[®] et trois pour le Clottafact[®] ; ces différences sont non seulement justifiées par la réglementation mais aussi par l'expérience car aucune transmission de maladie virale n'a été observée au cours de ces 25 dernières années, grâce à la mise en place de procédés efficaces et validés d'inactivation et d'élimination virale (9,36,44,107). Ainsi, sauf changement réglementaire ou apparition d'un pathogène qui change cette dernière affirmation, il semble peu probable de voir évoluer les procédés de sécurisation. Une plus grande harmonisation des méthodes de validation de sécurisation biologique pourrait en revanche être envisagée.

La question semble plus ouverte concernant les procédés de purification. En outre, les données d'analyses biochimiques et *in vitro* tendraient à montrer une gamme de concentration antigénique en fibrinogène plus large dans le cas du produit associé au procédé le plus ancien. Le Riastap[®] présenterait un intervalle de valeur d'écart à la valeur nominale après mise en solution de l'ordre de 20 %, contrairement à ses homologues qui présenteraient plutôt des écarts à la valeur de référence de l'ordre de 10 % (119). Les valeurs observées restent conformes aux recommandations de la Pharmacopée Européenne, qui fixe une valeur maximale de 30 % autour de la valeur nominale après mise en solution (107). Néanmoins, nous pourrions nous interroger sur une possible évolution des normes puisqu'elles semblent techniquement possibles, et que ce changement serait en faveur d'une meilleure fiabilité de la prise en charge du patient d'un flacon à l'autre. Aussi, nous pourrions supposer qu'une telle évolution reviendrait à inclure au moins une étape chromatographique dans les procédés de production du fibrinogène. Cette technique serait en effet la plus adaptée pour obtenir ces résultats sans pour autant être imposée par les instances de réglementation. Celle-ci participerait alors à réduire également les différences de quantités de co-produits et d'agrégats entre l'ensemble des spécialités pharmaceutiques ; menant à une plus grande similarité entre les produits finis.

A ce titre, les différences *in vitro* entre le Fibryga[®] et le Clottafact[®] semblent difficiles à affirmer dans ce travail dû au peu d'études sur lesquelles ces dernières s'appuient. De nouvelles études appelleraient alors à être menées notamment sur la question de l'influence du procédé sur la structure du fibrinogène dans les produits finis. Par ailleurs, les différences évoquées entre les deux spécialités pharmaceutiques pourraient ouvrir des perspectives de mise sur le marché des spécialités associées au fibrinogène différentes. Nous pourrions en effet imaginer d'une part des MDS centrés davantage sur une protéine de fibrinogène isolée efficacement de l'ensemble de ses co-produits (et des contaminants comme les agrégats) ; et d'autre part, des MDS résultant d'un mélange synergique de fibrinogène et de co-produits spécifiquement purifiés. A titre de comparaison, nous pourrions citer la mise sur le marché de médicaments combinant de façon synergique le facteur de Von Willebrand et le facteur VIII directement dans leur formulation (115). De même, la question de la purification du fibrinogène à partir du cryosurnageant pour la production de ces mélanges synergiques pourrait être posée.

Reste que pour justifier leurs mises sur le marché français, ces produits synergiques nécessiteraient d'études cliniques comparatives avec les fibrinogènes actuellement sur le marché, en plus des preuves de concept *in vitro*. Or ce dernier point pourrait actuellement sembler compromis dans le cas du fibrinogène. Nous pourrions en effet citer l'exemple des

colles biologiques – qui comprennent du fibrinogène dans leur composition – pour lesquelles les études cliniques de spécialités enrichies en facteur XIII n’ont pas réussi à montrer une supériorité par rapport à leurs homologues non enrichies en facteur XIII (103). Dans ce contexte, il semble alors également peu probable qu’un laboratoire entreprenne une nouvelle étude clinique comparative – généralement coûteuse et difficile à mettre en place – entre les différents fibrinogènes.

Ainsi, à l’image de la comparaison entre le cryoprécipité et le fibrinogène, les procédés pourraient prendre une place dans les argumentations afin de mettre en avant une spécialité de fibrinogène plutôt qu’une autre, au même titre que les études *in vitro* énoncées dans ce travail. Par ailleurs, les auteurs de l’étude FIBRES mettent en avant une logistique plus intéressante du fibrinogène comparativement au cryoprécipité (82). Pour des raisons équivalentes, le Fibryga® a été recommandé sur le marché québécois par l’INESSS (Institut National d’Excellence en Santé et en Services Sociaux) en plus du Riastap® malgré un prix plus élevé que ce dernier (96). En effet, si l’INESSS indique que la reconstitution du lyophilisat en solution prête à être injecter, de l’ordre de 10 à 15 minutes – contre environ 30 minutes pour le cryoprécipité – implique un gain pour le patient, le temps de reconstitution et d’administration plus court pour le Fibryga® est un argument supplémentaire en sa faveur (96). L’influence des excipients a été finalement relativement peu discuté au cours de ce travail (notamment par manque d’informations sur le Clottafact® non présent sur le marché québécois) mais peut donc représenter un autre enjeu pour départager une spécialité plutôt qu’une autre dans une argumentation ne s’appuyant pas uniquement sur des études cliniques.

Il convient alors de souligner la plus grande facilité d’accès à des informations dans le système canadien puisque les monographies canadiennes et les documents de l’INESSS ont été d’une grande aide dans la réalisation de ce travail. De même, à travers les études publiées sur la composition biochimique et une plus grande accessibilité à ses procédés, le laboratoire Octapharma a contribué à l’écriture d’une part de ce travail. S’il s’agit vraisemblablement d’une stratégie de communication voulue par le laboratoire pour se démarquer de ses concurrents, cette accessibilité des informations pourrait devenir une norme intéressante pour inclure des avis indépendants. Ces derniers pourraient alors favoriser non seulement la recherche d’options technologiques plus appropriées, l’amélioration de la qualité globale des produits finis et entraîneraient ainsi une meilleure prise en charge du patient. Il pourrait néanmoins être raisonnablement entendu qu’une telle norme serait sujet à débat.

Enfin, dans ce travail, les procédés ont essentiellement été comparés par rapport à leurs influences sur le produit fini et aux références réglementaires. Toutefois, une prise en compte des choix politiques comme les considérations environnementales ou de protection des travailleurs pourrait constituer une autre piste d'étude de ces procédés puisque toutes les spécialités pharmaceutiques de fibrinogène ne sont pas produites en France.

Thèse soutenue par Gautier DIDIER

Conclusions

Depuis leur mise au point dans les années 1940, les procédés de fractionnement du plasma ont progressivement évolué, notamment sur les étapes de purification et de sécurisation virale. Ainsi, la diversité actuelle des stratégies de fractionnement possible est particulièrement importante puisque ces stratégies doivent être adaptées à plus de vingt-cinq médicaments dérivés du plasma, ayant chacun leurs spécificités à prendre en compte. En somme, le but de ces procédés est avant tout de produire des médicaments dérivés du plasma efficaces et sécurisés, en préservant au maximum l'activité biologique des protéines purifiées.

Les procédés de fabrication des spécialités pharmaceutiques de fibrinogène lyophilisé utilisées en France – Clottafact[®], Fibryga[®] et Riastap[®] – reposent sur des stratégies de production qui sont propres à chaque laboratoire les commercialisant. Elles sont néanmoins utilisées indifféremment en thérapeutique pour le traitement des déficits héréditaires (afibrinogénémie, hypofibrinogénémie, dysfibrinogénémie et hypodysfibrinogénémie) et acquis (hypofibrinogénémie). Le fibrinogène humain représente en effet une des options thérapeutiques recommandées en France dans le traitement de ces pathologies, et il n'existe pas à ce jour d'étude clinique permettant d'affirmer la supériorité d'une spécialité pharmaceutique de fibrinogène par rapport aux autres.

Toutefois, il est possible d'observer des différences entre les spécialités pharmaceutiques de fibrinogènes en comparant les résultats d'études relatifs à la composition biochimique et aux activités protéiques, incitant par la même occasion à la comparaison des méthodes de fractionnement plasmatique. Parmi ces différences, citons entre autres les dosages qui – après remise en solution – pourraient conduire à l'obtention de concentration antigénique en fibrinogène avec des intervalles plus ou moins grands autour de la valeur nominale en fonction de la spécialité, mais aussi les différences en compositions de co-produits et en proportions d'agrégats de fibrinogène. De même, une étude *in vitro* en chirurgie cardiaque montre des différences significatives sur les valeurs maximales de résistance du thrombus par

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1
INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES
FACULTE DE PHARMACIE DE LYON
8, avenue Rockefeller – 69373 Cedex 08

thromboélastométrie et la durée de coagulation entre les trois médicaments dérivés du plasma. Néanmoins, ces résultats appelleraient à être mis en perspective et confirmés à l'aide de nouvelles études.

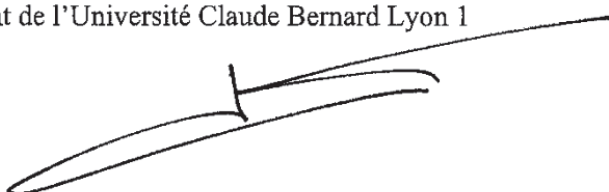
S'il n'est donc actuellement pas possible de statuer sur la supériorité d'une spécialité de fibrinogène par rapport aux autres, une analyse approfondie des procédés de purification et des procédés d'inactivation et d'élimination virale pourrait, à défaut, constituer un critère de choix alternatif entre les médicaments dérivés du sang. Dans le cas du fibrinogène, le procédé le plus ancien associé à la production du Riastap[®] semble engendrer une qualité moindre du produit fini comparativement au Clottafact[®] et au Fibryga[®] qui intègrent dans leurs procédés au moins une étape de purification par chromatographie, contrairement au procédé du Riastap[®]. Il est alors important de souligner que l'ensemble des médicaments ainsi produits respecte la réglementation en vigueur. Par conséquent, l'analyse des différences entre les produits finis et la comparaison de leurs procédés de production ouvre la discussion sur une possible évolution de la réglementation, et par extension des procédés de production, avec pour objectif une amélioration globale de la prise en charge du patient.

La Présidente du jury,
Professeur Christine VINCIGUERRA



Vu et permis d'imprimer
Lyon, le **6 DEC. 2021**

Vu, le Directeur de l'ISPB, Faculté de Pharmacie de Lyon,
Professeur Claude DUSSART,
Pour le Président de l'Université Claude Bernard Lyon 1



Bibliographie

1. Curling J, Goss N, Bertolini J. The History and Development of the Plasma Protein Fractionation Industry. In: Production of Plasma Proteins for Therapeutic Use [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2013 [cité 6 mai 2021]. p. 1-28. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118356807.ch1>
2. Foster PR. Fractionation, Plasma. In: Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology [Internet]. American Cancer Society; 2004 [cité 31 mai 2021]. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/0471238961.1612011906151920.a01.pub2>
3. Hetzl E. The Pharmaceutical Manufacturing Environment. In: Production of Plasma Proteins for Therapeutic Use [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2013 [cité 6 mai 2021]. p. 437-48. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118356807.ch32>
4. Johnston A, Adcock W. The Use of Chromatography to Manufacture Purer and Safer Plasma Products. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. août 2000;17(1):37-70.
5. Klein H, Anstee D. Plasma Fractionation and Fractionation Products. In: Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2014 [cité 6 mai 2021]. p. 846-72. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118689943.ch19>
6. Curling J. Integrating New Technology into Blood Plasma Fractionation. 2002.
7. Marcucci P. Future Trends in the Plasma Products Market. In: Production of Plasma Proteins for Therapeutic Use [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2013 [cité 6 mai 2021]. p. 461-70. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118356807.ch34>
8. Burnouf T. An overview of plasma fractionation. *Annals of Blood*. 1 juin 2018;3:33-33.
9. Rossi F. The organization of transfusion and fractionation in France and its regulation. *Ann Blood*. sept 2018;3:37-37.
10. Burnouf T. Modern Plasma Fractionation. *Transfusion Medicine Reviews*. 1 avr 2007;21(2):101-17.
11. Lopez I, Cahoreau V, Chamouard V, Chevallier Brilloit C, Danieau F, Deville L, et al. Les médicaments dérivés du plasma et les recombinants associés. 15^e éd. Société Française de Pharmacie Clinique; 2020. 146 p.
12. Goss N, Curling J. The Economics of Plasma Fractionation. In: Production of Plasma Proteins for Therapeutic Use [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2013 [cité 6 mai 2021]. p. 449-60. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118356807.ch33>

13. Fortune Business Insights. Plasma Fractionation Market Size, Share | Global Industry Trends [2027] [Internet]. 2020 [cité 12 oct 2021]. Disponible sur: <https://www.fortunebusinessinsights.com/industry-reports/plasma-fractionation-market-101614>
14. MarketsandMarkets. Plasma Fractionation Market by Product, Application, End User - Global Forecast to 2025 [Internet]. 2020 [cité 12 oct 2021]. Disponible sur: <https://secure.livechatinc.com/>
15. Burnouf T. [Plasma fractionation in the world: current status]. *Transfusion clinique et biologique : journal de la Société française de transfusion sanguine*. 1 juin 2007;14:41-50.
16. Mondher T, Duccio. An EU-wide overview of the market of blood, blood components and plasma derivatives focusing on their availability for patients Creative Ceutical Report, revised by the Commission to include stakeholders' comments [Internet]. European Commission; 2015 avr p. 139. Disponible sur: https://ec.europa.eu/health/sites/default/files/blood_tissues_organs/docs/20150408_cc_report_en.pdf
17. Garraud O, Martinaud C. The plasma supply in France. *Transfusion and Apheresis Science*. 1 août 2019;58(4):358-62.
18. Beauplet A, Courbil R, Ouazan J-M. *Transfusion medicine: The French model*. John Libbey Eurotext; 2013. 210 p.
19. Véran O, Kjour A, Sardais C. La filière du sang en France [Internet]. 2013 juill p. 56. Disponible sur: https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/Rapport_Veran_filiere-sang.pdf
20. Loi n°93-5 du 4 janvier 1993 relative à la sécurité en matière de transfusion sanguine et de médicament [Internet]. janv 4, 1993. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFSCATA000000912876>
21. Commission Européenne. Directive 89/381/CEE du conseil du 14 juin 1989 élargissant le champ d'application des directives 65/65/CEE et 75/319/CEE concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives aux spécialités pharmaceutiques, et prévoyant des dispositions spéciales pour les médicaments dérivés du sang ou du plasma humains [Internet]. 89/381/CEE Publications Office of the European Union; juin 14, 1989. Disponible sur: <http://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/ee98447f-1d8c-4f96-bc37-b750ef780616/language-fr/format-PDFA1B>
22. Commission Européenne. Directive 2001/83/CE du Parlement européen et du Conseil du 6 novembre 2001 instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain [Internet]. nov 6, 2001. Disponible sur: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/HTML/?uri=CELEX:32001L0083>
23. Loi n°98-535 du 1er juillet 1998 relative au renforcement de la veille sanitaire et du contrôle de la sécurité sanitaire des produits destinés à l'homme [Internet]. juill 1, 1998. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/JORFTEXT0000000573437/>
24. Commission Européenne. Directive 2002/98/CE du Parlement européen et du Conseil du 27 janvier 2003 établissant des normes de qualité et de sécurité pour la collecte, le contrôle,

la transformation, la conservation et la distribution du sang humain, et des composants sanguins, et modifiant la directive 2001/83/CE [Internet]. Publications Office of the European Union; janv 27, 2003. Disponible sur: <http://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/32e2c281-0ccf-4af4-a4fe-45a4fbf37988/language-fr>

25. Burnouf T. Plasma fractionation. *ISBT Science Series*. 2012;7(1):62-7.
26. El-Ekiaby M, Radosevich M, Goubran H, Sayed ME, Burnouf T. New methods of plasma fractionation – a presentation of the ‘mini-pool’ fractionation procedure developed in Egypt. *ISBT Science Series*. 2009;4(1):99-106.
27. Burnouf T. Quality of plasma and its fractionation. *ISBT Science Series*. 2008;3(1):148-51.
28. Farrugia A, Evers T, Falcou P-F, Burnouf T, Amorim L, Thomas S. Plasma fractionation issues. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization*. 1 mai 2009;37:88-93.
29. Code de la santé publique - Article L5124-14 [Internet]. Disponible sur: <https://www.codes-et-lois.fr/code-de-la-sante-publique/article-l5124-14>
30. Loi n°52-854 du 21 juillet 1952 relative à l’utilisation thérapeutique du sang humain, de son plasma et de leurs dérivés [Internet]. juill 21, 1952. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000000512411>
31. Dichtelmüller H. Ensuring Virus Safety of Plasma Products. In: *Production of Plasma Proteins for Therapeutic Use* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2013 [cité 6 mai 2021]. p. 359-68. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118356807.ch26>
32. Bertolini J, Hayes T. Plasma for Fractionation. In: *Production of Plasma Proteins for Therapeutic Use* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2013 [cité 6 mai 2021]. p. 423-36. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118356807.ch31>
33. Hosseini K, Ghasemzadeh M. Implementation of Plasma Fractionation in Biological Medicines Production. *Iranian Journal of Biotechnology*. 1 déc 2016;14.4 (2016): 213-220.
34. Jeans ERA, Marshall PJ, Lowe CR. Plasma protein fractionation. *Trends in Biotechnology*. 1 oct 1985;3(10):267-71.
35. Burnouf T. Current status and new developments in the production of plasma derivatives. *ISBT Science Series*. 2016;11(S2):18-25.
36. European Medicines Agency. Guidance CPMP/BWP/269/95 of February, 14th 1996 on Plasma-Derived Medicinal Products [Internet]. févr 14, 1996 p. 13. Disponible sur: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/note-guidance-virus-validation-studies-design-contribution-interpretation-studies-validating_en.pdf
37. Cai K, Gröner A, Dichtelmüller HO, Fabbrizzi F, Flechsig E, Gajardo R, et al. Prion removal capacity of plasma protein manufacturing processes: a data collection from PPTA member companies. *Transfusion*. sept 2013;53(9):1894-905.

38. Commission Européenne. Directive 2004/33/CE du 22 mars 2004 portant application de la directive 2002/98/CE du Parlement européen et du Conseil concernant certaines exigences techniques relatives au sang et aux composants sanguins [Internet]. Publications Office of the European Union; mars 22, 2004. Disponible sur: <http://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/be4e9e4d-8d8c-4e6c-a59f-77f56a9d8e97/language-en>
39. Human plasma for fractionation. In: Pharmacopée Européenne [Internet]. 6.0. 2018. p. 2073-5. Disponible sur: <http://www.uspbpep.com/ep60/human%20plasma%20for%20fractionation%200853e.pdf>
40. Commission Européenne. Directive 2005/61/CE du 30 septembre 2005 portant application de la directive 2002/98/CE du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne les exigences de traçabilité et la notification des réactions et incidents indésirables graves [Internet]. sept 30, 2005. Disponible sur: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32005L0061>
41. Commission Européenne. Directive 2005/62/CE de la Commission du 30 septembre 2005 portant application de la directive 2002/98/CE du Parlement européen et du Conseil concernant les normes et spécifications communautaires relatives à un système de qualité dans les établissements de transfusion sanguine [Internet]. Publications Office of the European Union; sept 30, 2005. Disponible sur: <http://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/c0d0920e-b54e-4534-83d0-ca2a9aeb0dc/language-fr>
42. Commission Européenne. Directive 2004/27/CE du Parlement européen et du Conseil du 31 mars 2004 modifiant la directive 2001/83/CE instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain [Internet]. 136, 32004L0027 mars 31, 2004. Disponible sur: <http://data.europa.eu/eli/dir/2004/27/oj/fra>
43. Commission Européenne. Directive 2003/63/CE de la Commission du 25 juin 2003 modifiant la directive 2001/83/CE du Parlement européen et du Conseil instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain [Internet]. 32003L0063. Disponible sur: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32003L0063>
44. European Medicines Agency. Guideline EMA/CHMP/BWP/706271/2010 of July, 21st 2011 on plasma-derived medicinal products [Internet]. juill 21, 2011 p. 33. Disponible sur: <https://www.ema.europa.eu/en/plasma-derived-medicinal-products>
45. Human plasma (pooled and treated for virus inactivation). In: Pharmacopée Européenne [Internet]. 5.0. 2005. p. 1747-8. Disponible sur: <http://uspbpep.com/ep50/Human%20plasma%20%28pooled%20and%20treated%20for%20virus%20inactivation%29.pdf>
46. Costa-Filho R, Hochleitner G, Wendt M, Teruya A, Spahn DR. Over 50 Years of Fibrinogen Concentrate. Clin Appl Thromb Hemost. 1 mars 2016;22(2):109-14.
47. Pieters M, Wolberg AS. Fibrinogen and fibrin: An illustrated review. Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis. 2019;3(2):161-72.

48. Marx G. Fibrinogen: Science and Biotechnology. In: Production of Plasma Proteins for Therapeutic Use [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2013 [cité 6 mai 2021]. p. 117-35. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118356807.ch9>
49. Lowe G, Rumley A, Mackie I. Plasma fibrinogen. *Ann Clin Biochem.* 1 nov 2004;41(6):430-40.
50. Levy JH, Welsby I, Goodnough LT. Fibrinogen as a therapeutic target for bleeding: a review of critical levels and replacement therapy. *Transfusion.* 2014;54(5):1389-405.
51. Aleman MM, Walton BL, Byrnes JR, Wolberg AS. Fibrinogen and red blood cells in venous thrombosis. *Thrombosis Research.* 1 mai 2014;133:S38-40.
52. Fenger-Eriksen C, Ingerslev J, Sørensen B. Fibrinogen concentrate – a potential universal hemostatic agent. *Expert Opinion on Biological Therapy.* 1 oct 2009;9(10):1325-33.
53. Levy JH, Szlam F, Tanaka KA, Sniecinski RM. Fibrinogen and Hemostasis: A Primary Hemostatic Target for the Management of Acquired Bleeding. *Anesthesia & Analgesia.* févr 2012;114(2):261-74.
54. de Moerloose P, Casini A, Neerman-Arbez M. Congenital Fibrinogen Disorders: An Update. *Semin Thromb Hemost.* 12 juill 2013;39(06):585-95.
55. Grottke O, Mallaiiah S, Karkouti K, Saner F, Haas T. Fibrinogen Supplementation and Its Indications. *Semin Thromb Hemost.* févr 2020;46(01):038-49.
56. Negrier C, Chamouard V, Trossaert M, Biron-Andreani C, Casini A, Dargaud Y, et al. Protocole national de diagnostic et de soins (PNDS) - Déficits rares en protéines de la coagulation [Internet]. Centre de Référence Hémophilie et autres déficits constitutionnels en protéines de la coagulation; 2021. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2021-08/pnds_autres_deficits_argumentaire_2021.08.pdf
57. Bornikova L, Peyvandi F, Allen G, Bernstein J, Manco-Johnson MJ. Fibrinogen replacement therapy for congenital fibrinogen deficiency. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2011;9(9):1687-704.
58. Stang LJ, Mitchell LG. Fibrinogen. In: Monagle P, éditeur. *Haemostasis: Methods and Protocols* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2013 [cité 6 mai 2021]. p. 181-92. (Methods in Molecular Biology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-339-8_14
59. Tiscia GL, Margaglione M. Human Fibrinogen: Molecular and Genetic Aspects of Congenital Disorders. *International Journal of Molecular Sciences.* juin 2018;19(6):1597.
60. García Gonzalez X, Seyve L, Tellier Z, Chevreux G, Bihoreau N, Polack B, et al. Aggregates Dramatically Alter Fibrin Ultrastructure. *Biophysical Journal.* 7 janv 2020;118(1):172-81.
61. Fries D, Martini WZ. Role of fibrinogen in trauma-induced coagulopathy. *BJA: British Journal of Anaesthesia.* 1 août 2010;105(2):116-21.

62. Chan AKC, Paredes N. The Coagulation System in Humans. In: Monagle P, éditeur. *Haemostasis: Methods and Protocols* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2013 [cité 3 sept 2021]. p. 3-12. (Methods in Molecular Biology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-339-8_1
63. Frère C, Aillaud M-F, Alessi M-C. Exploration de la coagulation. [//www.em-premium.com/data/traites/sa/13-46635/](http://www.em-premium.com/data/traites/sa/13-46635/) [Internet]. 8 mars 2017 [cité 6 déc 2021]; Disponible sur: <https://www-em-premium-com.docelec.univ-lyon1.fr/article/1105947/resultatrecherche/1>
64. Ribes O. Évaluation de l'impact du suivi par thromboélastométrie pour le bon usage du fibrinogène en chirurgie cardiaque. Mise en place, recueil et analyse intermédiaire d'une étude comparative de deux cohortes de patients. [France]: Claude Bernard Lyon 1; 2018.
65. Zeng Z, Fagnon M, Chakravarthula TN, Alves NJ. Fibrin clot formation under diverse clotting conditions: Comparing turbidimetry and thromboelastography. *Thrombosis Research*. 1 mars 2020;187:48-55.
66. Besser MW, MacDonald SG. Acquired hypofibrinogenemia: current perspectives. *J Blood Med*. 26 sept 2016;7:217-25.
67. Winearls J, Campbell D, Hurn C, Furyk J, Ryan G, Trout M, et al. Fibrinogen in traumatic haemorrhage: A narrative review. *Injury*. 1 févr 2017;48(2):230-42.
68. Casini A, Blondon M, Tintillier V, Goodyer M, Sezgin ME, Gunes AM, et al. Mutational epidemiology of congenital fibrinogen disorders. *Thrombosis and Haemostasis*. 2018;118(11):1867.
69. Casini A, Moerloose P de. Fibrinogen concentrates in hereditary fibrinogen disorders: Past, present and future. *Haemophilia*. 2020;26(1):25-32.
70. Peyvandi F. Epidemiology and treatment of congenital fibrinogen deficiency. *Thrombosis Research*. 1 déc 2012;130:S7-11.
71. Réseau Francecoag - Statistiques nationales [Internet]. Disponible sur: https://www.francecoag.org/SiteWebPublic/public/stats/stats_page.jsp?stat5=on
72. Undas A, Casini A. Congenital structural and functional fibrinogen disorders: a primer for internists. *Polish Archives of Internal Medicine* [Internet]. 2019 [cité 14 sept 2021]; Disponible sur: <https://archive-ouverte.unige.ch/unige:127884>
73. Casini A, Lebreton A. Stratégie diagnostique des anomalies constitutionnelles du fibrinogène. *Revue francophone d'hémostase et thrombose*. sept 2021;3(3):167-72.
74. Key NS, Negrier C. Coagulation factor concentrates: past, present, and future. *The Lancet*. 4 août 2007;370(9585):439-48.
75. Choi S (Claudia), Casias M, Tompkins D, Gonzalez J, Ray SD. Chapter 31 - Blood, blood components, plasma, and plasma products. In: Ray SD, éditeur. *Side Effects of Drugs Annual* [Internet]. Elsevier; 2019 [cité 28 mai 2021]. p. 373-86. (A Worldwide Yearly Survey of New Data in Adverse Drug Reactions; vol. 41). Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037860801930011X>

76. Ranucci M, Solomon C. Supplementation of fibrinogen in acquired bleeding disorders: experience, evidence, guidelines, and licences. *British Journal of Anaesthesia*. 1 août 2012;109(2):135-7.
77. Leal-Noval SR, Pacheco JF, Méndez MC, Cuenca-Apolo D, Muñoz-Gómez M. Current perspective on fibrinogen concentrate in critical bleeding. *Expert Review of Clinical Pharmacology*. 2 juill 2020;13(7):761-78.
78. Samama CM. Fibrinogen Concentrates for Acquired Fibrinogen Deficiencies? *Semin Thromb Hemost*. juin 2016;42(4):375-80.
79. Lunde J, Stensballe J, Wikkelsø A, Johansen M, Afshari A. Fibrinogen concentrate for bleeding – a systematic review. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*. 2014;58(9):1061-74.
80. Dorgalaleh A, Tabibian S, Hosseini MS, Shams M. Pharmacological management of rare coagulation factor deficiencies besides hemophilia. *Expert Review of Hematology*. 2 août 2020;13(8):811-34.
81. Dickneite G, Pragst I, Joch C, Bergman GE. Animal model and clinical evidence indicating low thrombogenic potential of fibrinogen concentrate (Haemocomplettan P). *Blood Coagul Fibrinolysis*. oct 2009;20(7):535-40.
82. Callum J, Farkouh ME, Scales DC, Heddle NM, Crowther M, Rao V, et al. Effect of Fibrinogen Concentrate vs Cryoprecipitate on Blood Component Transfusion After Cardiac Surgery: The FIBRES Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 26 nov 2019;322(20):1966-76.
83. Direction de l’Evaluation Médicale, Economique et de la Santé Publique. Avis de la Commission de la Transparence du 7 avril 2021 [Internet]. Haute Autorité de Santé; 2021. Disponible sur: https://has-sante.fr/upload/docs/evamed/CT-19058_FIBRYGA_PIS_INS_AvisDef_CT19058.pdf
84. ANSM, PERMEDES. Guide de bon usage des spécialités à base de fibrinogène humain en France – Conservation, reconstitution, administration [Internet]. 2021. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/uploads/2021/07/28/20210728-livret-comparatif-fibrinogene-actualise.pdf>
85. Direction de l’Evaluation Médicale, Economique et de la Santé Publique. Avis de la Commission de la Transparence du 18 novembre 2020 [Internet]. Haute Autorité de Santé; 2020. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/upload/docs/evamed/CT-16631_CLOTTAFAC_T_PIS_MCI_AvisDef_CT16631.pdf
86. Direction de l’Evaluation Médicale, Economique et de la Santé Publique. Avis de la Commission de la Transparence du 24 juin 2009 [Internet]. Haute Autorité de Santé; 2009. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2009-07/clottafact_-_ct6697.pdf
87. AFSSAPS. Commission d’AMM n° 469bis du 12 novembre 2009 [Internet]. 2009. Disponible sur: https://archiveansm.integra.fr/var/ansm_site/storage/original/application/71089b6212fcd866c8b20972918b49ae.pdf

88. Direction de l'Evaluation Médicale, Economique et de la Santé Publique. Avis de la Commission de la Transparence du 9 mars 2011 [Internet]. Haute Autorité de Santé; 2011. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2011-04/riastap_-_ct-_9732.pdf
89. Masquelier S. Lettre à l'attention des médecins et pharmaciens hospitaliers concernés dans le cadre des tensions d'approvisionnement en fibrinogène humain [Internet]. LFB; 2017. Disponible sur: http://dev4-afssaps-marche2017.integra.fr/content/download/100849/1279605/version/3/file/rs-171226-Clottafact_Courrier-LFB.pdf
90. Masquelier S. Lettre à l'attention des médecins et pharmaciens hospitaliers concernés dans le cadre des tensions d'approvisionnement en fibrinogène humain [Internet]. LFB; 2018. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/uploads/2021/01/11/courrier-lfb-06-12-2018.pdf>
91. Toussaint I. Lettre à l'attention des médecins et pharmaciens hospitaliers concernés dans le cadre des tensions d'approvisionnement en fibrinogène humain [Internet]. Octapharma; 2017. Disponible sur: <http://dev4-afssaps-marche2017.integra.fr/content/download/110025/1394531/version/1/file/rs-170913-FIBRYGA.pdf>
92. Toussaint I. Lettre à l'attention des médecins et pharmaciens hospitaliers concernés dans le cadre des tensions d'approvisionnement en fibrinogène humain [Internet]. Octapharma; 2020. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/uploads/2021/03/17/rs-20200218-fibryga-courrier-octapharma-18-02-2020.pdf>
93. Paitraud D. Rupture de stock de CLOTTAFAC (fibrinogène humain) : mise à disposition d'une spécialité allemande [Internet]. VIDAL. 2018. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/actualites/22067-rupture-de-stock-de-clottafact-fibrinogene-humain-mise-a-disposition-d-une-specialite-allemande.html>
94. ANSM. Liste des médicaments ayant fait l'objet d'un signalement de rupture ou de risque de rupture de stock en 2019 [Internet]. 2020. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/uploads/2021/10/18/20211018-signalements-ruptures-de-stock-2019.xlsx>
95. Décret relatif au stock de sécurité destiné au marché national [Internet]. 2021-349 mars 30, 2021. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000043306277>
96. INESSS. Fibryga - Concentré de fibrinogène (humain) [Internet]. Institut National d'Excellence en Santé et en Services Sociaux; 2018. Disponible sur: https://www.inesss.qc.ca/fileadmin/doc/INESSS/Produits_sanguins/Juillet_2018/INESSS_Fibryga_300718.pdf
97. INESSS. Riastap - Concentré de fibrinogène (humain) [Internet]. Institut National d'Excellence en Santé et en Services Sociaux; 2018. Disponible sur: https://www.inesss.qc.ca/fileadmin/doc/INESSS/Produits_sanguins/Juillet_2018/INESSS_RiaSTAP_300718.pdf
98. LFB. Eléments techniques Clottafact. 2021.

99. Union Européenne. Directive 2003/63/CE du 25 juin 2003 modifiant la directive 2001/83/CE du Parlement européen et du Conseil instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain [Internet]. 2003/63/CE juin 25, 2003 p. 49. Disponible sur: https://ec.europa.eu/health/sites/default/files/files/eudralex/vol-1/dir_2003_63/dir_2003_63_en.pdf
100. CSL Behring Canada. Product monograph Riastap Fibrinogen Concentrate (Human) FCH [Internet]. 2020. Disponible sur: <https://labeling.cslbehring.ca/PM/CA/RiaSTAP/EN/RiaSTAP-Product-Monograph.pdf>
101. Gröner A. Reply. Pereira A. Cryoprecipitate versus commercial fibrinogen concentrate in patients who occasionally require a therapeutic supply of fibrinogen: risk comparison in the case of an emerging transfusion-transmitted infection. *Haematologica*. 1 févr 2008;93(2):e24-6.
102. Sørensen B, Bevan D. A critical evaluation of cryoprecipitate for replacement of fibrinogen: Annotation. *British Journal of Haematology*. 29 avr 2010;149(6):834-43.
103. Hedrich HC, Gulle H. Fibrin Glues and Bandages. In: *Production of Plasma Proteins for Therapeutic Use* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2013 [cité 19 nov 2021]. p. 137-45. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118356807.ch10>
104. Burnouf T, Radosevich M. Reducing the risk of infection from plasma products: specific preventative strategies. *Blood Reviews*. 1 juin 2000;14(2):94-110.
105. Octapharma Canada. Dossier AMM - Fibryga - Description of Manufacturing Process and Process Controls. 2017.
106. CSL Behring. Package Insert - RIASTAP [Internet]. FDA; 2021. Disponible sur: <https://www.fda.gov/media/73604/download>
107. Fibrinogène humain. In: *Pharmacopée Européenne*. 10.0. 2019. p. 2845-6.
108. Schulz PM, Gehringer W, Nöhring S, Müller S, Schmidt T, Kekeiss-Schertler S, et al. Biochemical characterization, stability, and pathogen safety of a new fibrinogen concentrate (fibryga®). *Biologicals*. 1 mars 2018;52:72-7.
109. Octapharma Canada. Product monograph Fibryga Fibrinogen Concentrate (Human) FCH [Internet]. 2020. Disponible sur: https://pdf.hres.ca/dpd_pm/00058970.PDF
110. LFB. Dossier Pharmacien Hospitalier - Laboratoire LFB BIOMEDICAMENTS. 2021.
111. Nascimento B, Goodnough LT, Levy JH. Cryoprecipitate therapy. *BJA: British Journal of Anaesthesia*. 1 déc 2014;113(6):922-34.
112. CLOTTAFAC 1,5 g/100 ml pdre/solv p sol inj [Internet]. VIDAL. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/medicaments/clottafact-1-5-g-100-ml-pdre-solv-p-sol-inj-93396.html>
113. FACTANE 100 UI/ml pdre/solv p sol inj [Internet]. VIDAL. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/medicaments/factane-100-ui-ml-pdre-solv-p-sol-inj-6554.html>

114. WILFACTIN 100 UI/ml pdre/solv p sol inj [Internet]. VIDAL. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/medicaments/wilfactin-100-ui-ml-pdre-solv-p-sol-inj-20890.html>
115. WILSTART pdre/solv p sol inj [Internet]. VIDAL. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/medicaments/wilstart-pdre-solv-p-sol-inj-21090.html>
116. Neisser-Svae A, Hegener O, Görlinger K. Differences in the biochemical composition of three plasma derived human fibrinogen concentrates. *Thrombosis Research*. 1 sept 2021;205:44-6.
117. Groene P, Wiederkehr T, Kammerer T, Möhnle P, Maerte M, Bayer A, et al. Comparison of Two Different Fibrinogen Concentrates in an in vitro Model of Dilutional Coagulopathy. *TMH*. 2020;47(2):167-74.
118. Haas T, Cushing MM, Asmis LM. Comparison of the efficacy of two human fibrinogen concentrates to treat dilutional coagulopathy in vitro. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 3 avr 2018;78(3):230-5.
119. Stolt H, Shams Hakimi C, Singh S, Jeppsson A, Karlsson M. A comparison of the in vitro effects of three fibrinogen concentrates on clot strength in blood samples from cardiac surgery patients. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*. 2021;65(10):1439-46.
120. García Gonzalez X. Influence of the nature of fibrinogen on the structure and mechanics of fibrin clots. 2016.
121. Huang L, Hsiao JP-L, Powierza C, Taylor RM, Lord ST. Does Topology Drive Fiber Polymerization? *Biochemistry*. 16 déc 2014;53(49):7824-34.
122. Huang L, Lord ST. The isolation of fibrinogen monomer dramatically influences fibrin polymerization. *Thrombosis Research*. 1 juin 2013;131(6):e258-63.
123. Ross C, Rangarajan S, Karimi M, Toogeh G, Apte S, Lissitchkov T, et al. Pharmacokinetics, clot strength and safety of a new fibrinogen concentrate: randomized comparison with active control in congenital fibrinogen deficiency. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2018;16(2):253-61.
124. Djambas Khayat C, El Khorassani M, Lambert T, Gay V, Barthez-Toullec M, Lamazure J, et al. Clinical pharmacology, efficacy and safety study of a triple-secured fibrinogen concentrate in adults and adolescent patients with congenital fibrinogen deficiency. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2019;17(4):635-44.
125. Kreuz W, Meili E, Peter-Salonen K, Dobrkovská A, Devay J, Haertel S, et al. Pharmacokinetic properties of a pasteurised fibrinogen concentrate. *Transfusion and Apheresis Science*. 1 juin 2005;32(3):239-46.
126. Manco-Johnson MJ, Dimichele D, Castaman G, Fremann S, Knaub S, Kalina U, et al. Pharmacokinetics and safety of fibrinogen concentrate. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2009;7(12):2064-9.
127. Négrier C, Rothschild C, Goudemand J, Borg JY, Claeysens S, Alessi MC, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a new highly secured fibrinogen concentrate. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2008;6(9):1494-9.

128. Kreuz W, Meili E, Peter-Salonen K, Haertel S, Devay J, Krzensk U, et al. Efficacy and tolerability of a pasteurised human fibrinogen concentrate in patients with congenital fibrinogen deficiency. *Transfusion and Apheresis Science*. 1 juin 2005;32(3):247-53.
129. Lissitchkov T, Madan B, Djambas Khayat C, Zozulya N, Ross C, Karimi M, et al. Efficacy and safety of a new human fibrinogen concentrate in patients with congenital fibrinogen deficiency: an interim analysis of a Phase III trial. *Transfusion*. 2018;58(2):413-22.
130. Solomon C, Gröner A, Jian Y, Inna P. Safety of fibrinogen concentrate: analysis of more than 27 years of pharmacovigilance data. *Thromb Haemost*. 2015;113(4):759-71.
131. Kurniawan NA, Grimbergen J, Koopman J, Koenderink GH. Factor XIII stiffens fibrin clots by causing fiber compaction. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2014;12(10):1687-96.
132. Ramanathan A, Karuri N. Fibronectin alters the rate of formation and structure of the fibrin matrix. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 10 janv 2014;443(2):395-9.
133. Reheman A, Gross P, Yang H, Chen P, Allen D, Leytin V, et al. Vitronectin stabilizes thrombi and vessel occlusion but plays a dual role in platelet aggregation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2005;3(5):875-83.
134. Ruggeri ZM. The role of von Willebrand factor in thrombus formation. *Thrombosis Research*. 1 janv 2007;120:S5-9.
135. Hada M, Kaminski M, Bockenstedt P, McDonagh J. Covalent crosslinking of von Willebrand factor to fibrin. *Blood*. 1 juill 1986;68(1):95-101.
136. Brookes E, Pérez J, Cardinali B, Profumo A, Vachette P, Rocco M. Fibrinogen species as resolved by HPLC-SAXS data processing within the UltraScan Solution Modeler (US-SOMO) enhanced SAS module. *J Appl Cryst*. 1 déc 2013;46(6):1823-33.
137. Towler G, Sinnott R. *Chemical Engineering Design - Principles, Practice and Economics of Plant and Process Design* [Internet]. 3^e éd. Elsevier; 2008 [cité 24 nov 2021]. Disponible sur: <https://www.elsevier.com/books/chemical-engineering-design/towler/978-0-12-821179-3>
138. Négrier C, Rothschild C, Borg J-Y, Lambert T, Claeysens S, Sanhes L, et al. Post-authorization safety study of Clottafact®, a triply secured fibrinogen concentrate in congenital afibrinogenemia. A prospective observational study. *Vox Sanguinis*. 2016;111(4):383-90.

Annexes

Annexe A : Procédés de fractionnement historiques

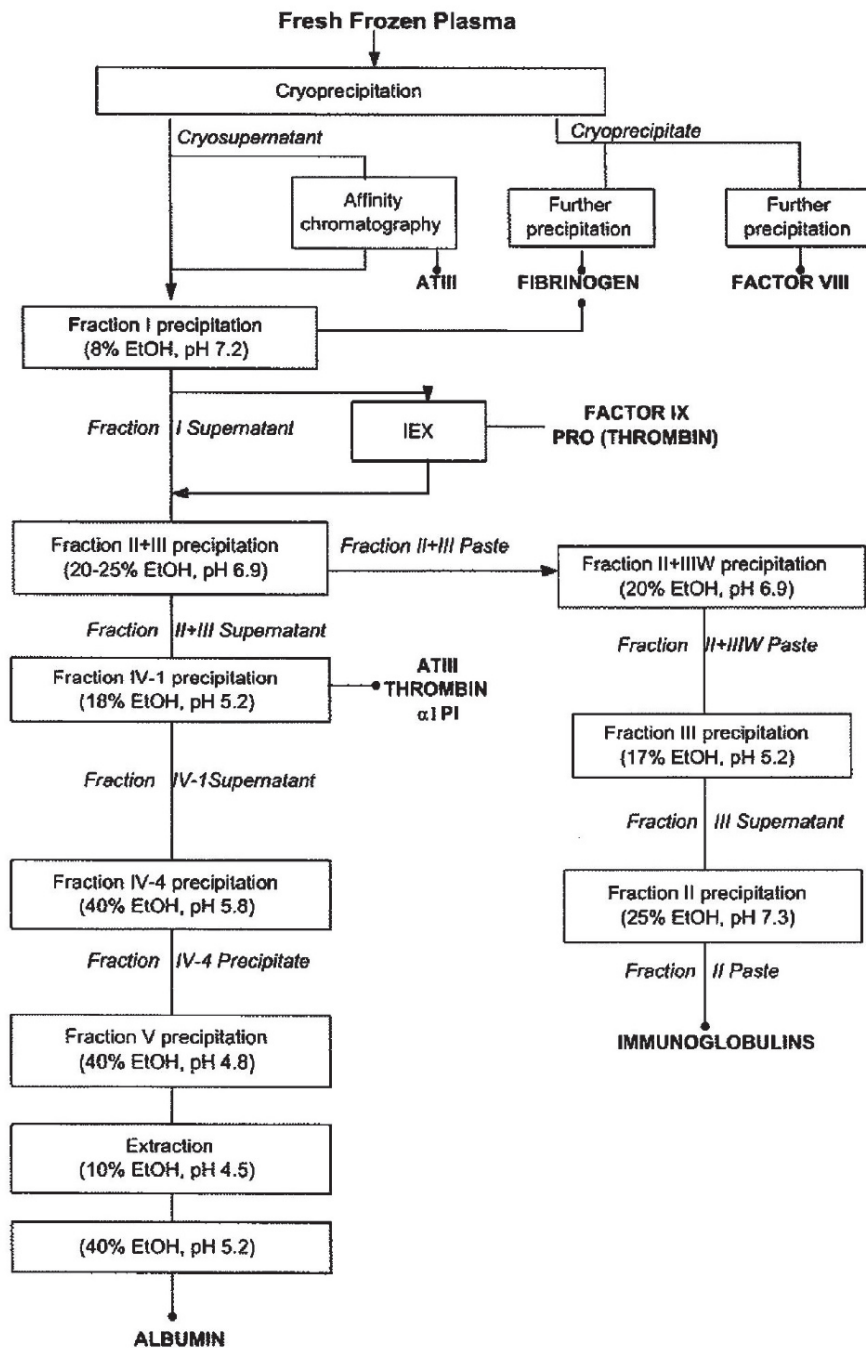


Figure 18 : Procédé Cohn-Oncley (4)

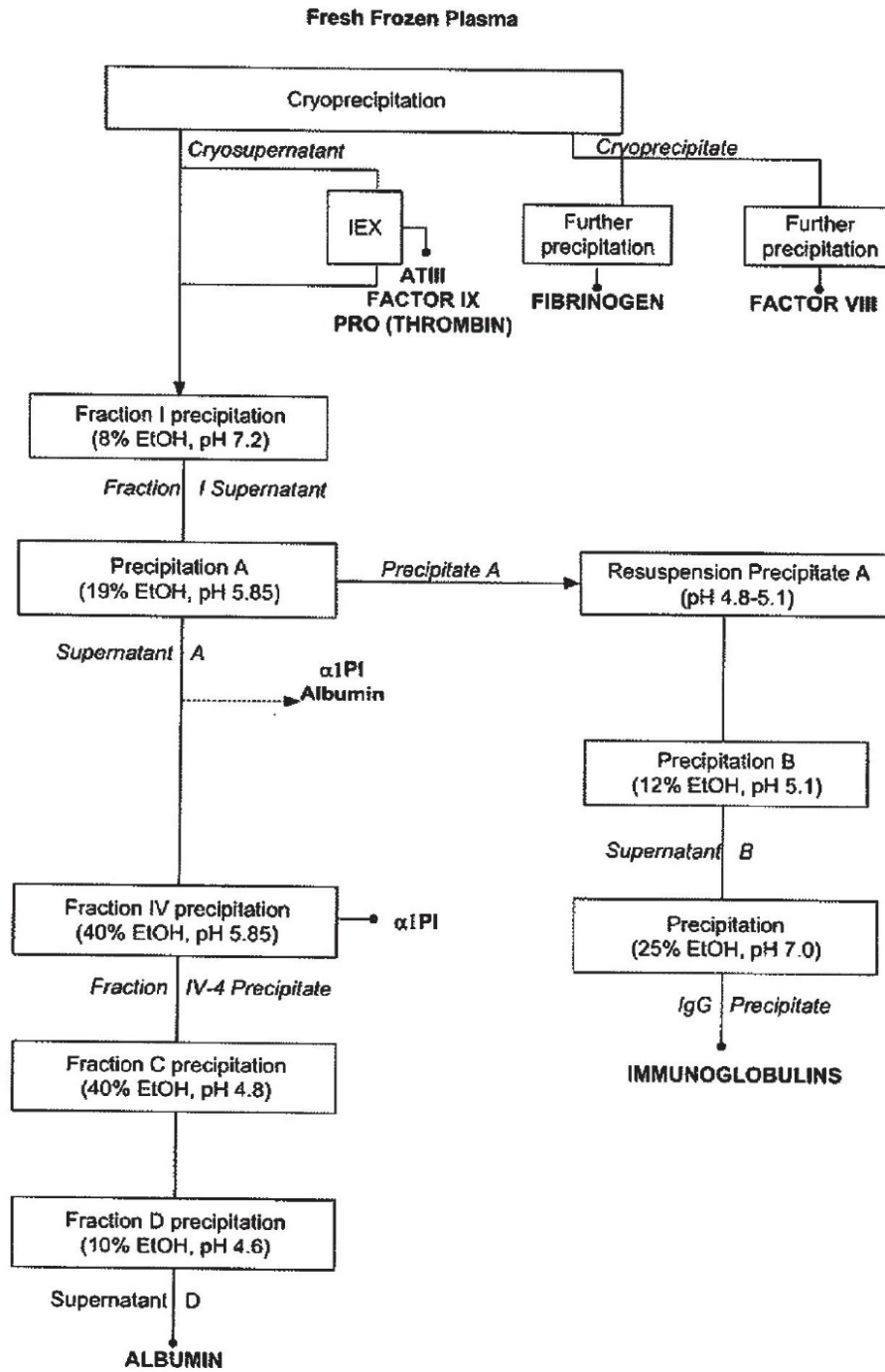


Figure 19 : Procédé Kistler-Nitschmann (4)

Annexe B : Procédés de fractionnement issus de la littérature

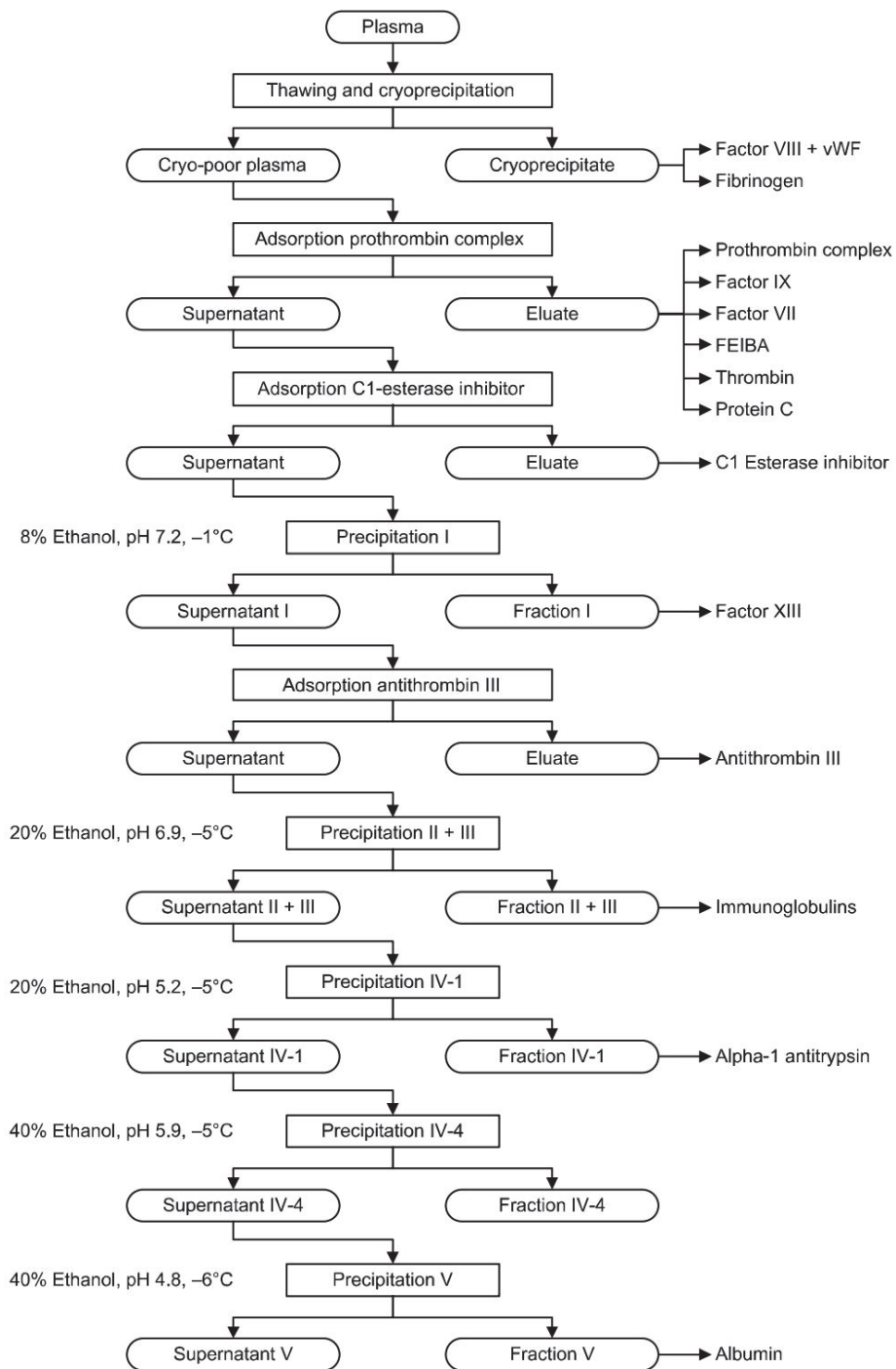


Figure 20 : Procédé de fractionnement standard pour la production de protéines thérapeutiques (3)

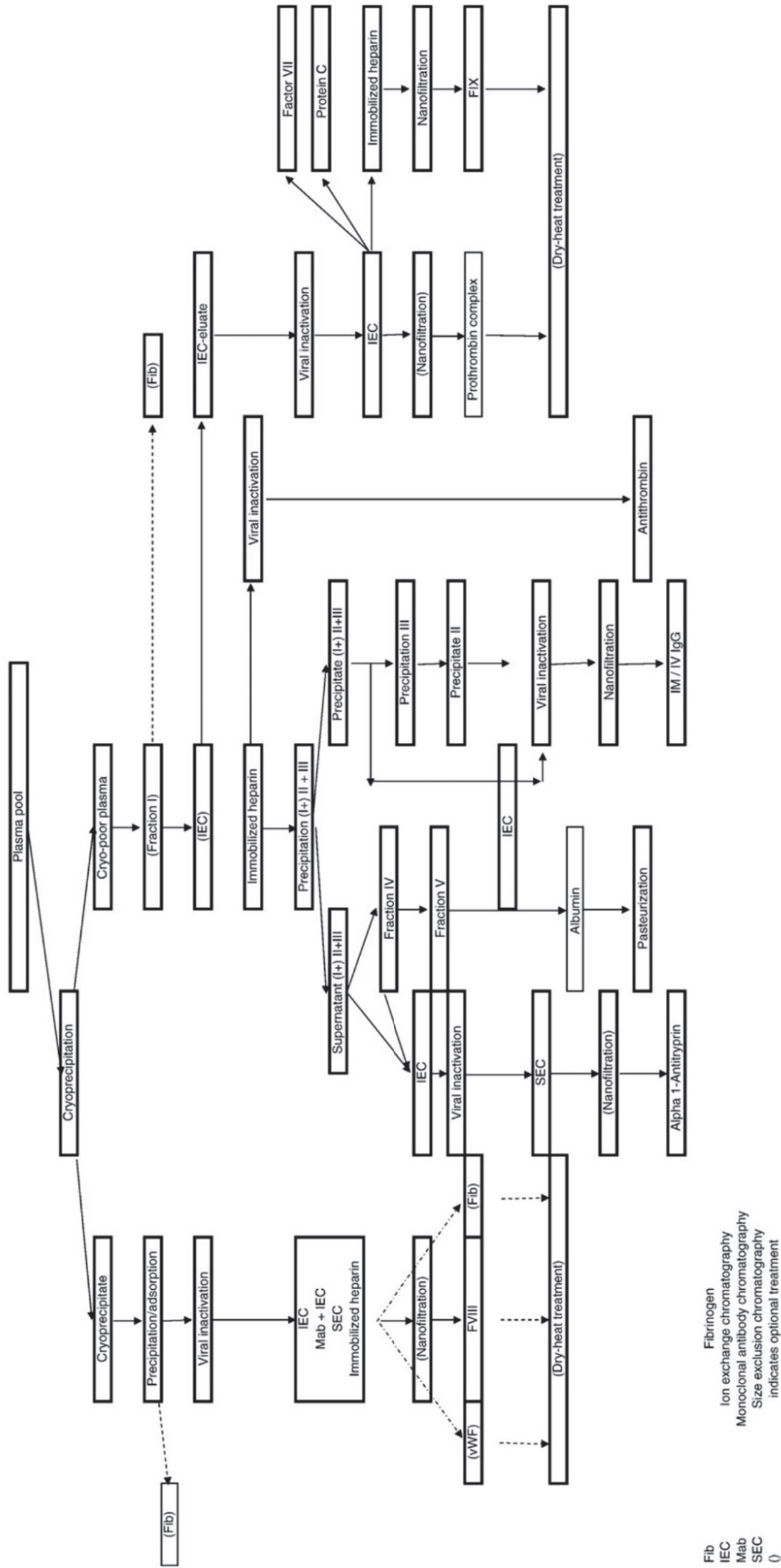


Figure 21 : Procédé de fractionnement (5,10)

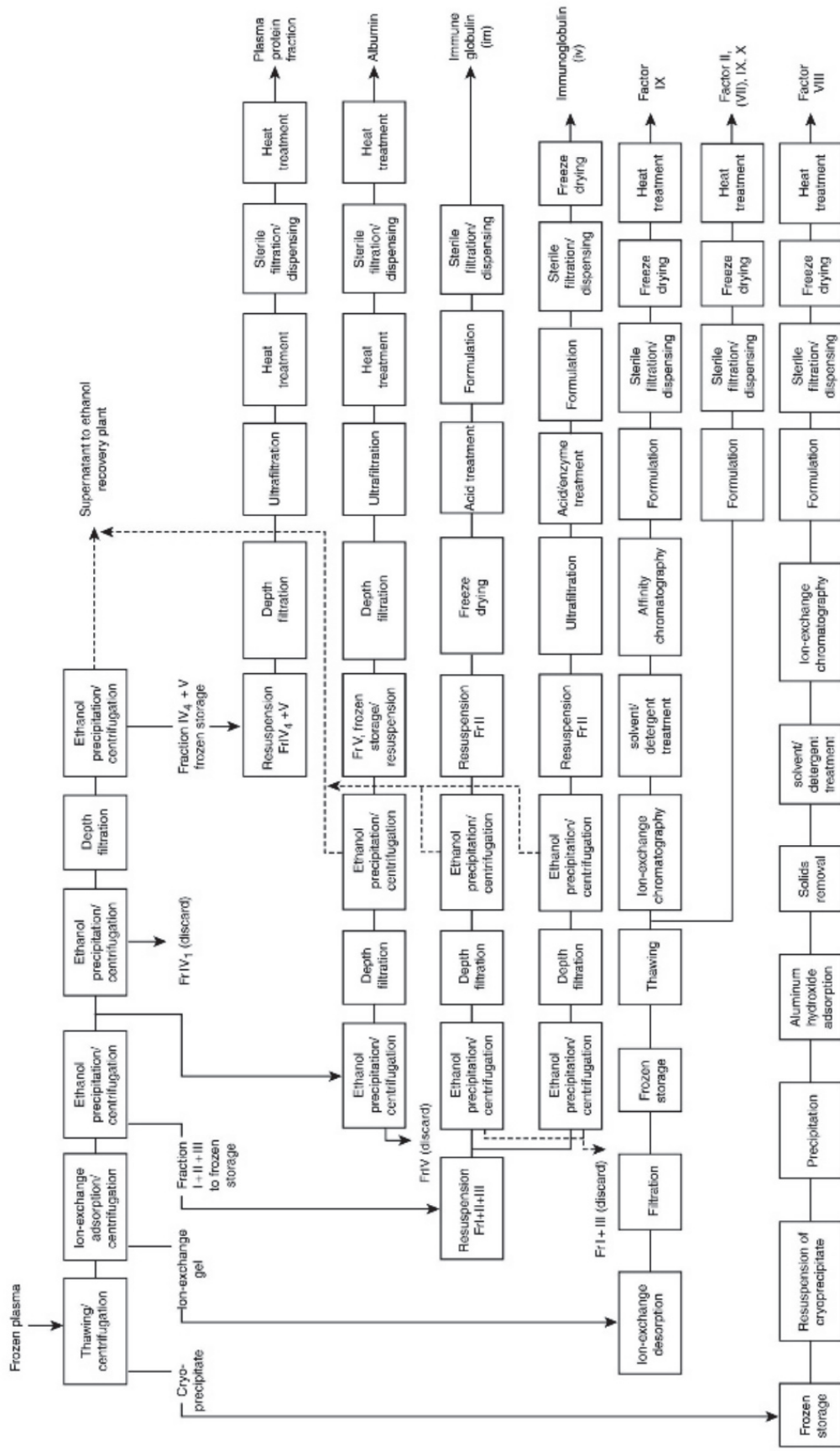


Figure 22 : Procédé issu du Protein Fractionation Centre du Scottish National Blood Transfusion Service (2)

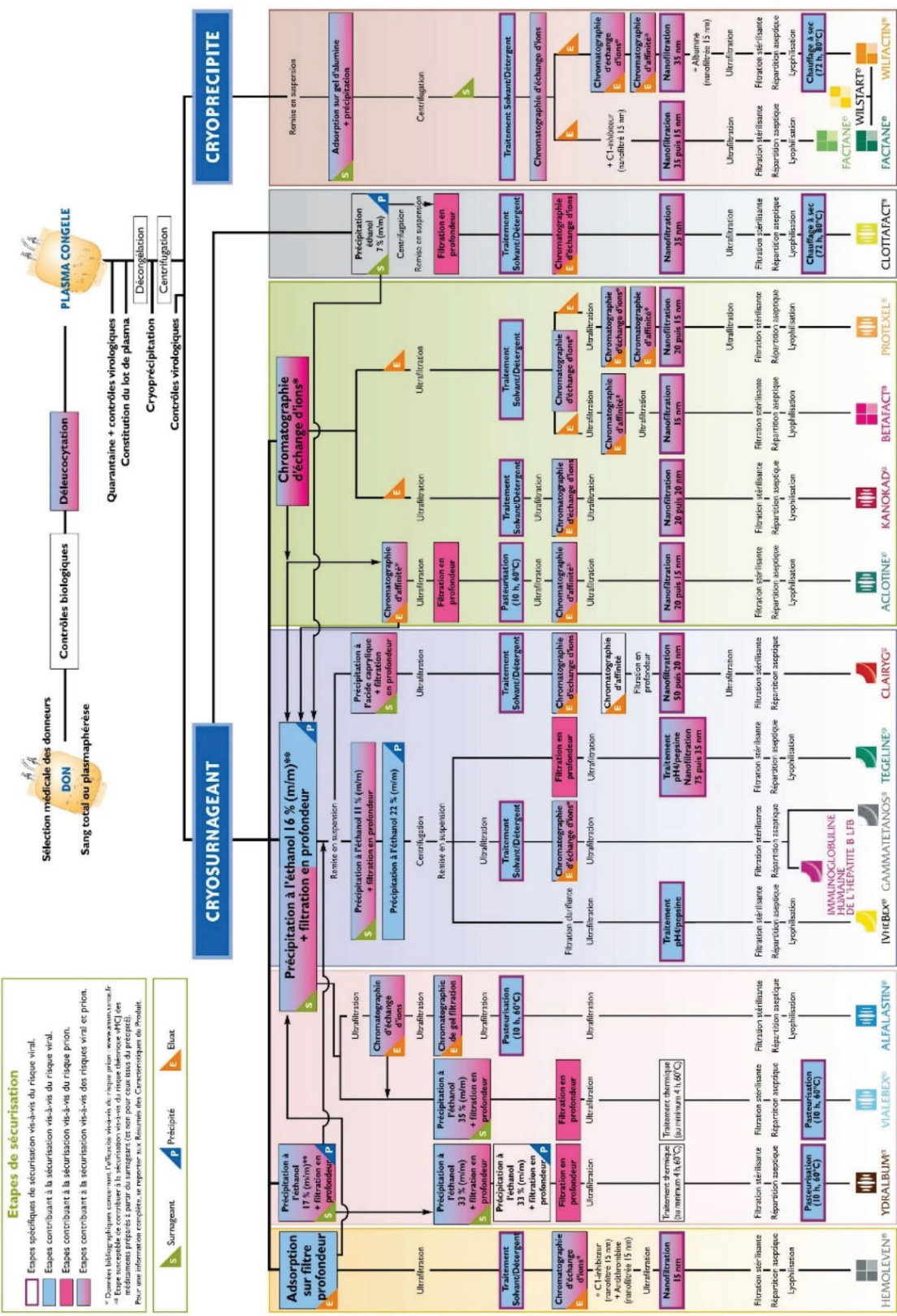


Figure 23 : Procédé de fractionnement du LFB en 2021 (110)

Annexe C : Cadre légal de la production de MDS en Union Européenne tel que présenté dans la directive EMA/CHMP/BWP/706271/2010

Tableau 13 : Réglementation spécifique aux médicaments dérivés du sang ou du plasma humain, en plus de la réglementation générale pour les médicaments biologiques (44)

Champ d'application principal	Cadre juridique, définitions, portée/objectif		Documentation	Production Impératifs de qualité et de sécurité			Système de qualité		
	2001/83/EC	2002/98/EC		2003/63/EC, Annexe I	Pharmacopée Européenne	2004/33/EC	2005/61/EC	2005/62/EC	2003/94/EC GMP
Plasma pour le fractionnement (PF)									
Collecte, essais, traçabilité, déclaration des événements indésirables	Article 109 se référant à la directive 2002/98/EC	X	Partie III. 1.1 Format et procédures PMF incluant les mises à jour annuelles	Voir Annexes II et III	X	X	X		
Traitement, stockage, transport									
Produit médical									
Fabrication	Article 115 Supervision de la cohérence de		3.2.1.1-2 Exigences sur le plasma en tant que matière première (PF)	Voir Annexes II et III					Guide BPF inclus dans l'Annexe 14
Dossier d'AMM	l'élimination des virus		Partie III. 1.1 Références à un ou plusieurs PMF et inclusion des mises à jour annuelles						

(Suite du tableau page suivante)

Champ d'application principal	Cadre juridique, définitions, portée/objectif		Documentation	Production Impératifs de qualité et de sécurité			Système de qualité	
	2001/83/EC	2002/98/EC		2003/63/EC, Annexe I	Pharmacopée Européenne	2004/33/EC	2005/61/EC	2005/62/EC
Conservation des documents Incluant les établissements livrés en plasma Tout au long de la chaîne, du don au produit fini et inversement		X				X	X	
	Article 83 Les Etats membres peuvent appliquer des exigences plus strictes		Partie III. 1.1					Guide BPF inclus dans l'Annexe 14
Distribution en gros								
Supervision Libération du lot officiel comprise								

X : le document complet est un ajout à la réglementation générale des médicaments biologiques.

Annexe D : Caractéristiques des spécialités pharmaceutiques de fibrinogène présentes en France

Tableau 14 : Caractéristiques des spécialités pharmaceutiques de fibrinogène présentes en France (56)

DCI	Nom de spécialité	Caractéristiques / Etapes spécifiques de sécurisation	Taux de récupération (exprimé en %/mg pour 1 UI ou mg/kg)	Demi-vie	Taux cible minimum à adapter en fonction du contexte clinique	Posologie usuelle à adapter en fonction du contexte clinique	Dosage/Volume (Concentration)	Forme/Solvant Nécessaire fourni pour la reconstitution	Laboratoire Statut réglementaire
Fibrinogène humain	CLOTTAFAC [®]	Protéines plasmatiques Traitement SD Nanofiltration 15 nm Chauffage à sec (72 h à 80 °C)	23,3 mg/L (≥40 kg) 19,1 mg/L (<40 kg)	66,7 ± 19 h (≥ 40 kg) 49,0 ± 12 h (< 40 kg)	1 g/L	50 à 70 mg/kg (augmentation de 20 % pour les enfants < 40 kg)	1,5 g/100 ml (15 mg/ml)	Poudre/ Eau PPI Système de transfert muni d'un évent à filtre stérilisant	LFB AMM
	FIBRYGA [®]	Protéines plasmatiques Traitement SD Nanofiltration 20 nm	18 mg/L (médiane) [10,8- 26,2]	75,9 ± 23,8 h	1 g/L	55 à 70 mg/kg	1 g/50 ml (20 mg/ml)	Poudre/ Eau PPI Dispositif de transfert Octajet [®] Filtre antiparticule 17 μm	OCTAPHARMA Autorisation d'importation
	RIASTAP [®]	Protéines plasmatiques Pasteurisation	17 mg/L (médiane) [13- 27,3] 18 mg/L (moyenne) [17,65- 18,35]	77,1 h (médiane) [55,73-117,26] 78,7 h ± 18,13 (moyenne)	1 g/L	58 à 70 mg/kg	1 g/50 ml (20 mg/ml)	Poudre/ Eau PPI (non fourni) Absence de système de transfert Pas de nécessité de filtre à particule	CSL BEHRING AMM

Annexe E : Résultats complémentaires des facteurs de réduction virale du Riastap®

Tableau 15 : Réduction de la charge virale lors de la fabrication du Riastap® (97)

	Facteur de réduction virale (log ₁₀)									
	Virus Enveloppés					Virus Non-Enveloppés				
	VIH	WNV	BVDV	HSV 1	PRV	HAV	B19V	CPV		
Virus modèle de	VIH 1 et VIH 2		WNV et HCV		Grand virus à ADN enveloppés (HSV 1)					B19V
Cryoprécipitation	n.d.	n.d.	n.d.		1,6		n.d.			
Adsorptions – précipitations (2 - 2)	2,8*	n.d.	1,5*	0,9*		2,4	n.d.			2,8
Pasteurisation	≥ 5,7	≥ 8,3	≥ 9,1	≥ 8,1		≥ 4,3	≥ 4,5			1,6
Précipitations (2)	3,9	n.d.	2,1	1		1*	n.d.			1,6*
Facteur global de réduction virale	≥ 9,6	≥ 8,3	≥ 11,2	≥ 9,1	1,6	≥ 6,7	≥ 4,5			4,4

* non pris en compte dans le calcul du facteur global de réduction virale. Tableau publié par CSL Behring en 2009.

Tableau 16 : Réduction de la charge virale lors de la fabrication du Riastap® (101)

	Facteur de réduction virale (log ₁₀)				
	Virus Enveloppés			Virus Non-Enveloppés	
	VIH	BVDV	HSV 1	HAV	CPV
Virus modèle de	VIH 1 et VIH 2	WNV et HCV			B19V
Cryoprécipitation	n.d.	n.d.	n.d.	2,4	2,8
Adsorptions - précipitations (2 - 2)	n.d.	n.d.	n.d.		
Pasteurisation	≥ 5,7	≥ 9,1	≥ 8,1	≥ 4,31	1,72
Précipitations (2)	3,9	2,1	1	1	1,6
Dialyse - Filtration stérile - Lyophilisation	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Facteur global de réduction virale	≥ 9,6	≥ 11,2	≥ 9,1	≥ 7,6	6,1

Tableau publié en 2008 par Gröner travaillant chez CSL Behring à cette date.

Annexe F : Résultats complémentaires d'analyses biochimiques

Tableau 17 : Concentrations et activités mesurées des composants d'un flacon remis en solution (116)

		Fibryga® (n=6)	Riastap® (n=5)	Clottafact® (n=2)
Activité du fibrinogène				
Protéines totales	[mg/mL]	21,8 (1,2)	33,2 (0,6)	16,1
Fibrinogène (antigène)	[mg/mL]	19,7 (1,3)	21,3 (1,2)	12,6
Fibrinogène (activité par test de Clauss)	[mg/mL]	24,8 (1,2)	25,8 (0,7)	13,1
Protéines de la coagulation	[mg/mL]	19,3 (1,7)	20,9 (0,6)	14,0
Activité spécifique	[%]	90,3 (7,7)	89,1 (4,5)	87,0
Protéines co-purifiées				
Fibronectine	[µg/mL]	14,3 (4,7)	931,8 (98,1)	128,0
Facteur de Von Willebrand	[UI/mL]	0,2 (0,03)	3,8 (0,5)	0,5
Vitronectine	[µg/mL]	< 0,013	0,04 (0,01)	0,12
Albumine	[mg/mL]	0,42 (0,11)	9,65 (0,35)	0,0035
Facteur XIII (activité)	[UI/mL]	3,9 (0,2)	1,1 (0,3)	2,1
Marqueurs protéiques de l'activation et de la fibrinolyse				
D-dimère	[µg/mL]	0,07 (0,02)	0,36 (0,05)	0,12
Fibrinopeptide A	[ng/mL]	6,8 (2,2)	75,0 (21,7)	97,0
Plasminogène	[UI/mL]	0,04 (0,01)	0,04 (0,01)	0,02
Chromatographie d'exclusion de taille				
Agrégats élués en amont du fibrinogène (HMW)	[% du pic total HMW + fibrinogène]	2,8 (0,5)	22,1 (1,3)	1,8

Les valeurs présentées sont des moyennes (écart-types).

Tableau 18 : Comparaison des valeurs issues de Neisser et al (116) et adaptées à celles présentées par Schulz et al (108) pour le ratio des quantités et activités mesurées des composants du Fibryga® par rapport à la quantité de protéines de la coagulation

		Valeurs transformées (116)	Moyenne (n=6) (108)	Ecart-type (108)
Activité du fibrinogène				
Activité spécifique (Protéines de la coagulation/Protéines totales)	[%]	90,3	98	7
Fibrinogène (antigène)	[mg/mg]	1,00	1,05	0,09
Fibrinogène (Activité par test de Clauss)	[mg/mg]	1,20	1,08	0,09
Protéines co-purifiées				
Fibronectine	[µg/mg]	0,7	0,8	0,3
Facteur de Von Willebrand	[UI/mg]	0,01	0,01	0,002
Vitronectine	[ng/mg]	0,7	<0,001	
Albumine	[mg/mg]	0,02	0,02	0,01
Facteur XIII (activité)	[UI/mg]	0,20	0,20	0,01
Marqueurs protéiques de l'activation et de la fibrinolyse				
D-dimère	[ng/mg]	3,7	3,7	0,9
Fibrinopeptide A	[ng/mg]	0,3	0,3	0,1
Plasminogène	[mUI/mg]	2,0	1,8	0,3

Annexe G : Résultats d'analyses in vitro de comparaison de l'efficacité du Fibryga® et du Riastap® dans le traitement de la coagulopathie de dilution

Résultats de l'étude de Groene et al, 2020 (117)

Tableau 19 : Dilution avec la solution d'hydroxyéthylamidon (117)

Hydroxyethyl starch	Undiluted blood	60% dilution	p	fibryga low dose	p	Haemo-completan low dose	p	fibryga high dose	p	Haemo-completan high dose	p
CT _{EXTM} , s	59.5 (58.25/65.25)	154 (134.8/166)	<0.0001*	100 (78.5/118.3)	0.0293* 0.0592#	137 (113.8/143.5)	0.0001* >0.9999#	69.5 (60.3/76.8)	>0.9999* <0.0001#	76.5 (57/91.3)	>0.9999* <0.0001#
MCF _{EXTM} , mm	59 (57/65.75)	31 (28.3/37.8)	<0.0001*	39 (37/43.8)	0.0017* 0.1148#	38 (33.75/42)	<0.0001* >0.9999#	46.5 (43/48.8)	>0.9999* <0.0001#	42 (37.3/44.8)	0.0419* 0.0062#
MCF _{FIBTEM} , mm	13 (11/18.5)	0 (0/0)	<0.0001*	3 (3/4)	0.0009* 0.3289#	2.5 (0/3.75)	<0.0001* >0.9999#	6 (5/6.75)	>0.9999* <0.0001#	4 (4/5)	0.0592* 0.0093#
Fibrinogen _{plasma} , mg/dL	253.5 (226.3/322.3)	121 (95.5/17.8)	0.0017*	219.5 (201.5/237)	0.4962* >0.9999#	225.5 (208.5/237)	>0.9999* 0.2853#	408 (373/430.8)	>0.9999* <0.0001#	425.5 (390.8/4.413)	0.2129* <0.0001#
aPTT, s	28 (26.25/29.75)	78.5 (67/91.8)	<0.0001*	74 (63.3/85.8)	0.0062* 0.1832#	73.5 (64/84.5)	0.0167* 0.0829#	73.5 (60.3/84.3)	0.0202* 0.0702#	73 (64.3/85.8)	0.0017* 0.4338#
INR	1 (1/1)	1.9 (1.8/2.1)	<0.0001*	1.75 (1.6/1.88)	0.0977* 0.0062#	1.8 (1.6/1.88)	0.0202* 0.0350#	1.75 (1.6/1.9)	0.0419* 0.0167#	1.8 (1.63/1.98)	<0.0001* >0.9999#
Thrombin time, s	17 (17/18.8)	27 (22.5/30.8)	0.4338*	14 (14/15)	0.0293* <0.0001#	18 (17/18.8)	>0.9999* 0.9336#	12 (12/12)	0.0001* <0.0001#	16 (15/16)	0.8270* 0.0009#

Les valeurs présentées sont des médianes (1^{er} / 3^{ème} quartiles). * Comparaison avec le sang dilué ; # Comparaison avec le sang non dilué

Tableau 20 : Dilution avec la gélatine (117)

Gelatine	Undiluted blood	60% dilution	p	fibrinogen low dose	p	Haemocompletan low dose	p	fibrinogen high dose	p	Haemocompletan high dose	p
CT _{EXTEM} , s	59.5 (54.75/62)	95 (86.75/102.8)	0.0499*	63 (60.3/71)	>0.9999*	51 (47.5/54.5)	0.3289*	57.5 (55.3/62.5)	>0.9999*	42.5 (41/44.8)	0.0033*
MCF _{EXTEM} , mm	60 (56.25/66)	36.5 (33.25/41.75)	<0.0001*	45 (43.3/49)	0.6439*	45.5 (42.25/49)	<0.0001*	49 (47.5/53)	0.0244*	50 (47.5/53.8)	<0.0001*
MCF _{FIBTEM} , mm	14 (10.5/16)	3 (3/4)	<0.0001*	8 (6.5/9)	0.0001*	9 (8/9)	0.0167*	10 (10/12)	0.2129*	14 (13/15)	>0.9999*
Fibrinogen _{plasma} , mg/dL	257.5 (220.5/339.8)	76 (66.25/95.75)	<0.0001*	179.5 (155.8/191.8)	>0.9999*	153.5 (122.5/171.8)	0.1148*	274 (246/314)	0.0006*	224.5 (209.3/241.8)	<0.0001*
aPTT, s	28 (25.25/30)	88.5 (74.75/108)	<0.0001*	81 (70/97)	0.0093*	79.5 (66.5/100.3)	0.0014*	81.5 (68.3/)	0.0062*	83.5 (72/100.3)	0.0001*
INR	1 (0.925/1)	2.15 (1.925/2.275)	<0.0001*	1.75 (1.6/1.9)	0.0829*	1.8 (1.7/2)	0.0007*	1.75 (1.63/1.9)	0.1148*	1.85 (1.63/1.9)	>0.9999*
Thrombin time, s	17.5 (17/18)	35 (30.5/38.75)	<0.0001*	19.5 (19/20.8)	0.0009*	27 (25.25/29)	0.0007*	16 (16/16.8)	0.0977*	24 (24/25)	0.0017*
					>0.9999*		>0.9999*		>0.9999*		0.0829*
					0.0011*		>0.9999*		<0.0001*		0.1148*

Les valeurs présentées sont des médianes (1^{er} / 3^{ème} quartiles). * Comparaison avec le sang dilué ; # Comparaison avec le sang non dilué

Tableau 21 : Dilution avec l'albumine (117)

Albumin	Undiluted blood	60% dilution	p	fibryga low dose	p	Haemocompletan low dose	p	fibryga high dose	p	Haemocompletan high dose	p
CT _{EXTEM} , s	57.5 (54.25/61)	89 (81/94.75)	0.0022*	69 (66/75.5)	0.4338* >0.9999#	56 (53.25/57)	>0.9999* <0.0001#	61 (56.3/68,3)	>0.9999* 0.0499#	51 (48.3/53)	0.1148* <0.0001#
MCF _{EXTEM} , mm	60 (56/66.5)	41 (37/41)	<0.0001*	49 (46.3/53.8)	0.0004* 0.2129#	48 (46.25/52)	<0.0001* >0.9999#	53 (50.5/47)	0.5660* <0.0001#	52.5 (50.5/57.75)	0.7307* <0.0001#
MCF _{FIBTEM} , mm	14 (11/20)	3.5 (3/5)	<0.0001*	8.5 (8/10.75)	0.0051* >0.9999#	10 (9/11)	0.1832* 0.1572#	14 (13/15)	>0.9999* <0.0001#	18 (16/19.75)	>0.9999* <0.0001#
Fibrinogen _{Plasma} , mg/dL	243.5 (218.8/336.8)	70.5 (62.5/92.25)	<0.0001*	163 (150.3/187.3)	0.0419* 0.1148#	133.5 (112.8/145)	0.0003* >0.9999#	246 (236.3/267)	>0.9999* <0.0001#	214.3 (211/221)	>0.9999* 0.0004#
aPTT, s	27.5 (25.25/30)	87.5 (76.3/105.5)	<0.0001*	83 (66/99.75)	0.0022* 0.8270#	79 (67/97.25)	0.3289* 0.0093#	84 (68.75/104)	<0.0001* >0.9999#	81 (64.5/102.3)	0.0167* 0.2129#
INR	1 (1/1)	2.2 (2.03/2.48)	<0.0001*	1.8 (1.7/2.08)	0.5660* 0.0003#	1.95 (1.83/2.1)	0.0011* 0.2468#	1.95 (1.8/2.1)	0.0977* 0.0041#	2 (1.8/2.2)	0.0001* 0.8270#
Thrombin time, s	17 (17/18)	30.5 (27/33)	<0.0001*	18 (17/18)	>0.9999* 0.0002#	24.5 (24/25.75)	0.0062* >0.9999#	15 (15/15)	0.9336* <0.0001#	22.5 (22/23)	0.4338* 0.1345#

Les valeurs présentées sont des médianes (1^{er} / 3^{ème} quartiles). * Comparaison avec le sang dilué ; # Comparaison avec le sang non dilué

Tableau 22 : Dilution avec le solution d'acétate de Ringer (117)

Balanced crystalloid	Undiluted blood	60% dilution	p	fibryga low dose	p	Haemocomplettan low dose	p	fibryga high dose	p	Haemocomplettan high dose	p
CT _{EXTEM} , s	58.5 (56.3/63.8)	65 (60.3/69.8)	>0.9999*	53.5 (53/57.8)	>0.9999* 0.1345#	45 (43/47)	<0.0001* <0.0001#	52.5 (48.5/56.8)	0.3289* 0.0167#	45.5 (41/46.75)	<0.0001* <0.0001#
MCF _{EXTEM} , mm	60.5 (56/64.8)	41 (37.3/45.8)	<0.0001*	50 (48/53)	0.0001* 0.5660#	50 (46.5/53.8)	<0.0001* 0.7307#	54.5 (51.5/57.75)	0.2468* 0.0004#	56 (52.25/59.5)	>0.9999* <0.0001#
MCF _{FIBTEM} , mm	14.5 (10.3/16)	5.5 (4/6)	0.4338*	13 (11.3/14.8)	>0.9999* 0.9336#	17 (14.3/18.8)	0.7307* 0.0007#	19.5 (18/21.75)	0.0350* <0.0001#	25.5 (23.25/29.25)	0.0001* <0.0001#
Fibrinogen _{Plasma} , mg/dL	270.5 (212/329.5)	62 (48.5/81.3)	<0.0001*	164 (144/182.3)	0.0093* 0.1148#	112 (109/135.3)	<0.0001* >0.9999#	246 (235.8/267.8)	>0.9999* <0.0001#	216 (198.3/228.8)	0.4962* 0.0011#
aPTT, s	28 (25.3/31.5)	79.5 (71.5/94)	<0.0001*	77 (60.8/94.3)	0.0027* >0.9999#	71 (61/93)	0.0977* 0.1148#	74.5 (60.8/98.8)	0.0001* >0.9999#	73.5 (63.5/93.5)	0.0062* 0.9336#
INR	1 (1/1)	2.1 (1.93/2.28)	<0.0001*	1.75 (1.7/1.9)	0.3783* 0.0004#	1.85 (1.73/2)	0.0006* 0.3289#	1.75 (1.63/1.9)	0.3783* 0.0004#	1.9 (1.73/2)	<0.0001* >0.9999#
Thrombin time, s	17.5 (17/18)	28 (25.3/30.8)	0.0011*	17 (16/17)	>0.9999* <0.0001#	23.5 (23/24)	0.0499* >0.9999#	14 (14/14)	0.1832* <0.0001#	22 (21/22.8)	>0.9999* 0.2129#

Les valeurs présentées sont des médianes (1^{er} / 3^{ème} quartiles). * Comparaison avec le sang dilué ; # Comparaison avec le sang non dilué

Résultats de l'étude de Haas et al, 2018 (118)

Tableau 23 : Comparaison des mesures de coagulation des échantillons patients avant et après dilution et comparaison des mesures de coagulation après supplémentation in vitro en fibrinogène en normalisant (a.p.) ou non (a.n.) l'activité du fibrinogène par rapport à la concentration respective du fibrinogène dans chacune des spécialités (118)

	Echantillon n	Dilution à 50 %	p *	Fibryga®		Riastap®		p **	
				a.n.	a.p.	a.n.	a.p.	a.n.	a.p.
Clauss (g/L)	2,3 (0,3)	0,87 (0,1)	<0,001	1,65 (0,14)	1,76 (0,14)	1,90 (0,17)	1,76 (0,14)	<0,001	<0,001
Fibrinogène (antigène) (g/L)	2,6 (0,3)	1,0 (0,2)	<0,001	2,02 (0,18)	1,90 (0,17)	1,90 (0,17)	1,90 (0,17)	0,026	0,026
Fibronectine	0,32 (0,05)	0,04 (0,02)	<0,001	0,02 (0,01)	0,08 (0,02)	0,08 (0,02)	0,08 (0,02)	<0,001	<0,001
Facteur XIII (%)	96,1 (13,9)	29,3 (6,7)	<0,001	40,9 (6,2)	31,0 (6,2)	31,0 (6,2)	31,0 (6,2)	<0,001	<0,001
EXTEM® A10 (mm)	57,1 (4,1)	40,6 (3,9)	<0,001	48,0 (4,1)	49,2 (4,5)	45,3 (4,1)	45,3 (4,2)	0,003	<0,001
EXTEM® MCF (mm)	63,3 (3,2)	48,0 (3,9)	<0,001	55,5 (3,2)	56,7 (3,8)	53,6 (3,5)	53,7 (3,7)	0,011	<0,001
FIBTEM® A10 (mm)	15,2 (2,9)	7,6 (1,6)	<0,001	11,5 (1,6)	12,1 (2,1)	13,4 (1,1)	13,5 (1,5)	0,002	0,002
FIBTEM® MCF (mm)	15,9 (3,1)	9,1 (1,2)	<0,001	13,5 (1,9)	14,4 (3,4)	14,9 (1,2)	14,1 (2,4)	0,011	0,584

Les valeurs présentées sont des moyennes (écartis-types). Note : a.n. : avant normalisation ; a.p. : après normalisation ; * Comparaison entre échantillon et échantillon dilué ;

** Comparaison entre Fibryga® et Riastap®

Annexe H : Données complémentaires pour l'influence de la présence d'agrégats de fibrinogène dans les spécialités pharmaceutiques

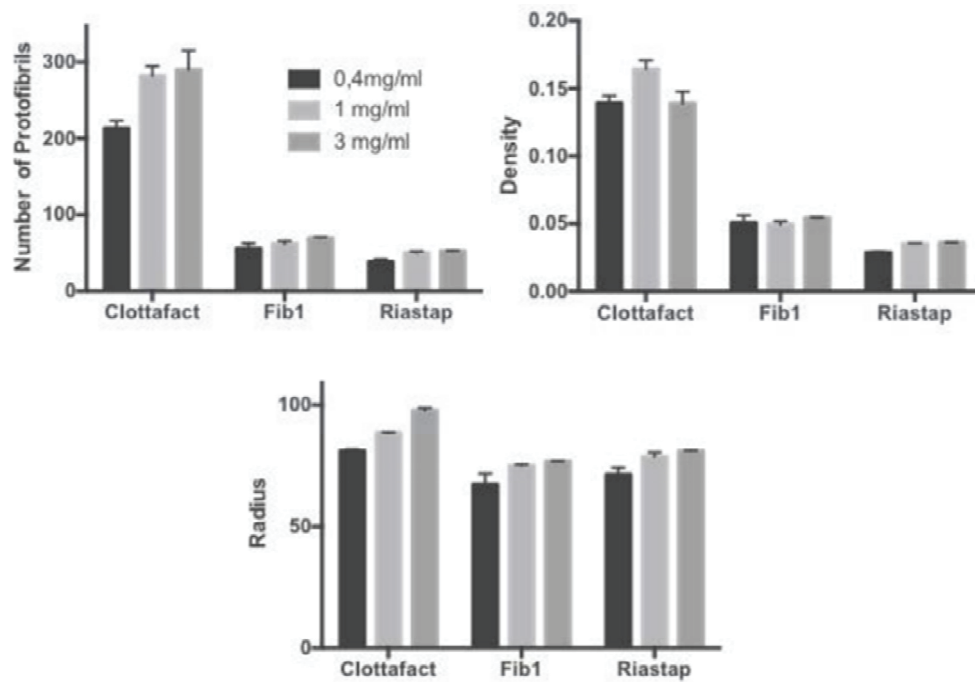
Compositions respectives du Clottafact[®] et du Fib1 (60)

Tableau 24 : Composition du Clottafact[®] (FibWoA) et du Fib1 (FibWA) (60)

	FibWoA	FibWA
Présence d'agrégats	Indélectable	4% de la masse en fibrinogène
Rayon hydrodynamique moyen (nm)	11	22
Facteur XIII (UI/mg Fg)	0,26	0,25
Fibronectine (mg/mg Fg)	0,05	0,02
Modifications post-traductionnelles	Identiques	
Chaînes α intactes (comparativement à FibWoA)	100%	95%
Chaînes β et γ intactes (comparativement à FibWoA) (%)	100%	100%
Ratio de chaînes γ'/γ	14	10

FibWoA : Fibrinogène sans agrégats (Fibrinogène Without Aggregats) ; FibWA : Fibrinogène avec agrégats (Fibrinogène With Aggregats)

Analyse structurale de la fibrine (120)



Utilisation de 0,1 UI/mL de thrombine pour des concentrations en fibrinogène de 0,4 g/L, 1 g/L et 3 g/L

Figure 24 : Analyse de la structure des fibrines des trois fibrinogènes (nombre de protofibrilles à gauche, densité des fibres à droite et rayon des fibres en bas) (120)

Annexe I : Données pharmacologiques complémentaires

Tableau 25 : Paramètres pharmacocinétiques de l'activité du fibrinogène (range médian) de trois spécialités de fibrinogène issus de la littérature (69)

	Haemocompletan® P/RiaSTAP (CSL Behring) ¹⁷			FibCLOT/Clottafact® (LFB) ¹⁸	Fibryga® (Octapharma) ²⁰
Type of PK study	Open-label, uncontrolled			Open-label, uncontrolled	Randomized, controlled, crossover
Inclusion criteria	>6 y			≥40 kg	≥12 y
Fibrinogen deficiency	Afibrinogenemia			Afibrinogenemia	Afibrinogenemia
Number of patients	14			14	22
Plasma sample collection after infusion	0.5, 1, 2, 4, 8, 24, 48 h; 4, 6, 9 and 13 d			1, 3, 6, 24 h; 3, 6, 10 and 14 d	0.5, 1, 2, 4, 8, 48 h and 3, 5, 7, 10 and 14 d
Dose infused, g kg ⁻¹	0.077 (mean)			0.060 (0.056-0.064) median (range)	0.0768 (0.60) mean (SD)
C _{max} , g L ⁻¹ , median (range)	Total (n = 14) 1.3 (1.00-2.10)	8-14 y (n = 4) 1.4 (1.00-2.10)	>16 y (n = 10) 1.3 (1.10-1.60)	1.34 (1.06-2.19)	1.219 (0.75-1.96)
In vivo recovery, %	61.8 (52.45-97.43)	Not done	Not done	89 (69.5-133)	64.193 (40.89-88.13)
Incremental recovery, mg dL ⁻¹ /mg kg ⁻¹	1.7 (1.30-2.73)	Not done	Not done	2.22 (1.77-3.65)	1.741 (1.08-2.62)
AUC _{0-last 70 mg kg⁻¹} , g [*] h L ⁻¹	126.8 (81.73-156.40)	91.4 [*] (81.73-130.13)	135.4 [*] (112.58-156.40)		111.14 (59.70-175.51)
AUC _{0-last 60 mg kg⁻¹} , g [*] h L ⁻¹	-	-	-	92 (61-154) (n = 9)	
AUC _{0-∞} , g [*] h L ⁻¹	Not done	Not done	Not done	105 (78.2-167) (n = 9)	Not done
Clearance, mL h ⁻¹ kg ⁻¹	0.55 (0.45-0.86)	0.77 [*] (0.54-0.86)	0.52 [*] (0.45-0.62)	0.57 (0.38-0.77) (n = 9)	0.630 (0.40-1.17)
Half-life, h	77.1 (55.73-117.26)	69.1 (61.85-79.45)	82.4 (55.73-117.26)	67.9 (51.0-99.9) (n = 9)	72.854 (40.03-156.96)
Mean residence time, h	85.9 (66.14-126.44)	74.7 [*] (66.14-82.98)	99.6 [*] (76.88-126.44)	94.7 (68.8-131) (n = 9)	98.975 (58.72-205.47)
V _{ss} , mL kg ⁻¹	52.7 (36.22-67.67)	57.9 (36.22-67.67)	51.4 (45.10-59.11)	53.5 (36.3-60.4) (n = 9)	61.037 (36.89-149.11)

Abbreviations: AUC_{0-last 70 mg kg⁻¹} or AUC_{0-last 60 mg kg⁻¹}, area under the plasma concentration-time curve from the start of infusion (time 0) to the last quantifiable concentration following dose administration and standardized to 70 mg kg⁻¹ or 60 mg kg⁻¹; C_{max}, maximum plasma concentration; V_{ss}, volume of distribution at steady state.

*The difference between age groups was statistically significant (P < .05) using a two-sided, two-sample t test.

Note : ¹⁷ : (126) ; ¹⁸ : (124) ; ²⁰ : (123)

Tableau 26 : Efficacité des spécialités pharmaceutiques de fibrinogène dans les déficits héréditaires du fibrinogène (69)

Product	Type of study	Bleeding episodes			Surgical procedure		
		Number of treated events, majors/minors ^a	Physician global assessment, % excellent/good	Treatment success, % (90%CI)	Number (major/minor)	Physician global assessment, % (excellent/good)	Treatment success, % (90% CI)
Haemocomplettan [®] p ¹⁵	Retrospective uncontrolled study ^b	26, NA	100/0	NA	11 (6/5)	90.1/9.9	NA ^c
FibCLOT ^{®25}	Prospective observational study	49, 3/46 in 5 patients	56.3/43.8 ^d	100 (0.92-1.0)	NA	NA	NA
Fibryga ^{®22}	Prospective uncontrolled study	23, 0/23 in 11 patients	82.6/13	95.7 (0.81-1.0)	4 (1/3) in 4 patients	75/25	100 (0.5-1.0)
FibCLOT ^{®18}	Prospective uncontrolled study	32, 23/9 in 9 patients	90.6/9.4	100 (0.89-1.0) ^e	38 (10/28) in 15 patients	100/0	100 (0.91-1.0) ^e

Abbreviation: NA, not applicable.

^aAs defined by authors: criteria' definition not provided.

^bEight patients with afibrinogenemia, three patients with hypofibrinogenemia, one patient with hypodysfibrinogenemia.

^cThe clinical efficacy was judged by the participating physicians as very good in all events, with the exception of one surgical procedure.

^dTwo bleeding episodes treated with the same infusion with an excellent efficacy rating.

^e95% CI.

Note : ¹⁵ : (128) ; ¹⁸ : (124) ; ²² : (129) ; ²⁵ : (138)

Tableau 27 : Données de sécurité des spécialités pharmaceutiques de fibrinogène dans le traitement de déficits héréditaires du fibrinogène (69)

Product	Type of study	Number of patients	Number of fibrinogen infusion	Total adverse events (AEs)			Relationship to fibrinogen treatment		
				Total AEs n AEs/N patients with AE (%)	Severity Mild/moderate/ severe (n AE)	Seriousness n AEs/N patients with AE (%)	Number of related AE/ Number of patients with probably or possibly related AE (%)	Serious related AE	
									NR
Haemocomplettan® p ¹⁵	Retrospective uncontrolled efficacy study	12	151	NR	NR	NR	NR/2 (16.7%)	2	
Haemocomplettan® p ¹⁴	Prospective uncontrolled pharmacokinetic study	5	5	NR	NR	NR	NR/2 (40%)	0	
FibCLOT® ¹⁶	Prospective uncontrolled pharmacokinetic study	5	5	0	0	0	0	0	
Haemocomplettan® p ¹⁷	Prospective uncontrolled pharmacokinetic study	14	4/2 (14.3%)	4/0/0	0	0	0	0	
FibCLOT® ²⁵	Prospective observational study	14	435	NR	NR	NR	19/5 (35.7%)	2	
Fibryga® ²²	Prospective uncontrolled study (interim efficacy study)	13	38	16/7 (53.8%)	13/1/2	2/1 (7.7%)	1/1 (7.7%)	0	
Fibryga® ²⁰	Prospective crossover randomized study (PK study)	22	22	25/11 (50%)	15/9/1	2/1 (4.5%)	2/2 (9%)	0	
Haemocomplettan® p ²⁰	Prospective crossover randomized study	22	22	30/11 (50%)	26/4/0	0	0	0	
FibCLOT® ¹⁸	Prospective uncontrolled study	20	104	134/19 (95%)	Not done	11/NR	11/7 (35.0%)	2	

Abbreviations: n, number of adverse events; N, number of patients; NR, not reported.

Note : ¹⁴ : (125) ; ¹⁵ : (128) ; ¹⁶ : (127) ; ¹⁷ : (126) ; ¹⁸ : (124) ; ²⁰ : (123) ; ²² : (129) ; ²⁵ : (138)

Serment des Pharmaciens Au moment d'être reçu Docteur en Pharmacie,

En présence des Maîtres de la Faculté, je fais le serment :



- *D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances*
- *D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement*
- *De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité*
- *En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*
- *De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession*
- *De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens*
- *De coopérer avec les autres professionnels de santé.*

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon 1 n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon est engagé dans une démarche de lutte contre le plagiat. De ce fait, une sensibilisation des étudiants et encadrants des thèses a été réalisée avec notamment l'incitation à l'utilisation d'une méthode de recherche de similitudes.

Gautier DIDIER

Fractionnement du plasma et purification d'une protéine thérapeutique, le fibrinogène

Th. D. Pharm., Lyon 1, 2022.

RESUME :

Le fibrinogène est une protéine plasmatique utilisée en thérapeutique pour le traitement de pathologies héréditaires (afibrinogénémie, hypofibrinogénémie, dysfibrinogénémie et hypodysfibrinogénémie) et acquises (hypofibrinogénémie dans un contexte d'hémorragie massive post-traumatique ou en post-partum par exemple). Il existe pour cela, trois spécialités pharmaceutiques de fibrinogène lyophilisé utilisées en France : Clottafact[®], Fibryga[®] et Riastap[®].

Une philosophie associée au fractionnement industriel indique que *le produit est défini par le procédé*. Or la production de ses trois médicaments dérivés du sang (MDS) repose sur des procédés différents. S'il n'existe pas à ce jour d'étude clinique permettant de démontrer la supériorité d'un de ces médicaments, il convient néanmoins d'étudier leurs procédés en lien avec les études de compositions biochimiques et d'activités protéiques, in vitro et cliniques.

Ce travail propose ainsi de présenter les enjeux du fractionnement et l'utilisation en France des spécialités pharmaceutiques de fibrinogène humain, avant de comparer les impacts sur les produits finis des stratégies de purification et de sécurisation du risque infectieux des procédés de fractionnement du fibrinogène.

MOTS CLES : MDS, Médicaments dérivés du sang, Fibrinogène humain, Fractionnement, Procédés

JURY :

Présidente : Mme Christine VINCIGUERRA, Professeur Universitaire – Praticien Hospitalier

Directrice : Mme Valérie CHAMOULARD, Praticien Hospitalier

Membres : M Michel HANSS, Praticien Hospitalier

M Ludovic BURLLOT, Directeur du Développement Biopharmaceutique,
LFB BIOMEDICAMENTS

DATE DE SOUTENANCE : 11 janvier 2022

ADRESSE DE L'AUTEUR : 60 allée des tilleuls 54200 Ecrouves