



HAL
open science

Conception rationnelle de nouvelles protéines thérapeutiques dans l'hémophilie : variants du facteur Xa dépourvus du domaine Gla

Raphaël Marlu

► **To cite this version:**

Raphaël Marlu. Conception rationnelle de nouvelles protéines thérapeutiques dans l'hémophilie : variants du facteur Xa dépourvus du domaine Gla. Médecine humaine et pathologie. Université de Grenoble, 2013. Français. NNT : 2013GRENS004 . tel-00949107

HAL Id: tel-00949107

<https://theses.hal.science/tel-00949107>

Submitted on 19 Feb 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biotechnologie, Instrumentation, Signal et Imagerie
pour la Biologie, la Médecine et l'Environnement**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Raphaël MARLU

Thèse dirigée par **Benoît POLACK**

préparée au sein du **Laboratoire TIMC-IMAG UJF UMR
CNRS5525, TheREx**
dans l'**École Doctorale de l'Ingénierie de la Santé, la Cognition
et l'Environnement**

Conception rationnelle de nouvelles protéines thérapeutiques dans l'hémophilie : variants du facteur Xa dépourvus du domaine Gla

Thèse soutenue publiquement le **07 février 2013**
devant le jury composé de :

Professeur Bertrand TOUSSAINT

Université de Grenoble, Président

Professeur Anne-Marie FISCHER

Université de Paris Descartes, Rapporteur

Professeur Philippe NGUYEN

Université de Reims, Rapporteur

Professeur Thomas LECOMPTE

Université de Genève, Examineur

Docteur Aline THOMAS,

Université de Grenoble, Examineur

Professeur Benoît POLACK,

Université de Grenoble, Directeur



REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord remercier le Professeur Benoît Polack, directeur de l'équipe ThEREx du laboratoire TIMC-IMAG et responsable du laboratoire d'hémostase du CHU de Grenoble, pour avoir dirigé cette thèse et élaboré un sujet à la hauteur de mes attentes. Je le remercie de m'avoir accordé sa confiance pour démarrer une nouvelle thématique dans le laboratoire.

Je remercie les membres du Jury. J'adresse tous mes remerciements à Monsieur le Professeur Bertrand Toussaint pour avoir accepté de présider ce jury, à Madame le Professeur Anne-Marie Fischer et à Monsieur le Professeur Philippe NGuyen d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être rapporteurs. J'adresse également mes remerciements au Docteur Aline Thomas et au Professeur Thomas Lecompte pour avoir accepté d'être membres de ce jury. Soyez assurés de ma profonde reconnaissance.

Je remercie le Docteur Aline Thomas, chercheuse CNRS à l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble, d'avoir collaboré à ce travail. Elle a effectué toute l'étude *in silico*. Sa collaboration était indispensable à la naissance de ce projet. Nos échanges sont toujours très intéressants.

Je remercie le Docteur Marie-Claire Dagher, chercheuse CNRS dans l'équipe TheRex, qui a rejoint notre groupe de travail depuis deux ans. Son intégration à l'équipe est essentielle à la poursuite de ce projet. Sa motivation et son expérience en génie génétique sont des atouts indéniables.

Mes remerciements s'adressent aussi à mes collègues hospitaliers le Docteur Claire Barro et le Docteur Bénédicte Bulaboïs, biologistes médicaux au laboratoire d'hémostase pour leur soutien et leurs encouragements. Je remercie également Mme Claire Coudoux, cadre supérieur du laboratoire d'hémostase pour les nombreuses commandes de réactifs et pour sa disponibilité.

Je n'oublie pas les doctorants et les chercheurs de l'équipe TheREX, en particulier Bruno Marquez : je le remercie d'avoir partagé son expérience et de m'avoir prodigué de précieux conseils lorsque j'ai débuté cette thèse.

J'adresse mes remerciements à toutes les techniciennes et à tous les techniciens, à toutes les secrétaires, aux biologistes et aux différents internes passés au laboratoire d'hématologie pour leur soutien et leur bonne humeur.

Je remercie également le Laboratoire Français des Biotechnologies d'avoir supporté financièrement ces travaux de recherche.

Enfin, j'adresse toute ma gratitude à mes amis et à mes proches. Merci à Alice pour sa patience et son inconditionnel soutien. Merci à mes parents et à ma sœur.

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION	16
1.1. HEMOSTASE PHYSIOLOGIQUE	16
1.1.1. Hémostase primaire	16
1.1.2. Coagulation plasmatique	17
1.1.2.1. Initiation de la coagulation	18
1.1.2.2. Amplification et propagation de la coagulation	18
1.1.2.3. Rôle de la thrombine	19
1.1.2.4. Synthèse des facteurs de la coagulation	19
1.1.2.5. Facteurs de la phase contact	20
1.1.2.6. Fibrinof ormation	20
1.1.3. Inhibiteurs physiologiques de la coagulation	21
1.1.3.1. TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor)	21
1) Synthèse/Élimination	22
2) Structure	22
3) Inhibition de la coagulation par le TFPI	25
4) Inhibition enzymatique du facteur Xa par le TFPI	26
1.1.3.2. Antithrombine	27
1.1.3.3. Système protéines C/S	29
1.1.4. Fibrinolyse	29
1.2. HEMOPHILIE	30
1.2.1. Définition	30
1.2.2. Génétique	30
1.2.3. Histoire	31
1.2.4. Diagnostic biologique	32
1.2.5. Signes cliniques	32
1.2.6. Diagnostic prénatal	33
1.2.7. Complications	33
1.2.7.1. Arthropathie hémophilique	33
1.2.7.2. VIH et Hépatites virales	34
1.2.7.3. Inhibiteurs anti-facteurs	34
1) Définition	34
2) Mécanisme d'action	35
3) Détection et titration	35
4) Facteurs de risque	35
5) Induction de tolérance immunitaire	36
6) Impact médical	37
7) Impact économique	37
8) Hémophilie acquise	38
1.2.8. Traitements hémostatiques	38
1.2.8.1. Traitement de l'hémophilie sans inhibiteurs	39
1) Concentrés de facteur VIII et IX	39
2) Desmopressine	40
3) Antifibrinolytiques	41
1.2.8.2. Traitement de l'hémophilie avec inhibiteurs	41
1) Concentrés de complexe prothrombinique activé (FEIBA®)	42
2) Facteur VII activé recombinant (Novoseven®)	43
1.3. NOUVELLES APPROCHES THERAPEUTIQUES DANS L'HEMOPHILIE	44
1.3.1. Facteurs VIII et IX optimisés	44
1.3.1.1. Facteur VIII à longue durée d'action	44
1.3.1.2. Facteur IX à longue durée d'action	45
1.3.1.3. Facteur IX à activité catalytique accrue	46
1.3.2. Thérapie génique	46

1.3.3.	Facteurs VIIa recombinants optimisés	48
1.3.3.1.	Administration combinée de facteur VIIa et de facteur X.....	48
1.3.3.2.	Facteur VIIa recombinant à activité accrue.....	49
1.3.3.3.	Facteur VIIa recombinant à longue durée d'action.....	50
1.3.4.	Approches basées sur le facteur Xa	51
1.3.4.1.	Facteur Xa.....	51
1.3.4.2.	Facteur Xa activable par la thrombine.....	51
1.3.4.3.	Variants Xa « zymogen like ».....	52
1.3.5.	Antagonistes anti-TFPI	52
1.3.5.1.	Anticorps monoclonal anti-TFPI.....	53
1.3.5.2.	Aptamères anti-TFPI.....	53
1.3.5.3.	Polysaccharides sulfatés non anticoagulants (NASP).....	54
1.3.5.4.	Peptides synthétiques anti-TFPI.....	54
1.3.6.	Inhibiteurs peptidomimétiques de la protéine C activée	55
1.3.7.	Anticorps bi-spécifique anti-facteur IXa et anti-facteur X	55
1.3.8.	Génération de microparticules exprimant du facteur tissulaire	56
1.4.	FACTEUR X	57
1.4.1.	Introduction	57
1.4.2.	Structure du facteur X	57
1.4.3.	Fonction des différents domaines du facteur X	60
1.4.4.	Facteur Xa dépourvu du domaine Gla	62
1.4.5.	Partenaires physiologiques du facteur X et interactions entre facteurs	63
1.4.5.1.	Au sein du complexe ténase extrinsèque.....	64
1)	Facteur VIIa.....	64
2)	Facteur tissulaire.....	64
1.4.5.2.	Au sein du complexe ténase intrinsèque.....	64
1)	Facteur VIIIa.....	64
2)	Facteur IXa.....	65
1.4.5.3.	Au sein de la prothrombinase.....	65
1)	Facteur Va.....	65
2)	Prothrombine.....	66
1.4.6.	Fonctions de signalisation cellulaire du facteur Xa	66
2.	OBJECTIFS DU TRAVAIL	68
2.1.	Preuve de concept : restauration de la génération de thrombine de plasmas d'hémophiles par le GDXa.....	68
2.2.	Conception rationnelle de variants du GDXa à affinité augmentée pour le TFPI.....	69
3.	MATERIEL ET METHODES	71
3.1.	PARTIE 1	71
3.1.1.	Matériel	71
3.1.2.	Méthodes	71
3.1.2.1.	Tests fonctionnels.....	71
1)	Tests de fluorescence.....	71
a)	Test de génération de thrombine.....	71
b)	Mesure du clivage du substrat ZGGR-AMC par le GDXa.....	72
2)	Tests chromogéniques.....	72
a)	Détermination des constantes enzymatiques de GDXa et du facteur Xa.....	72
b)	Inhibition enzymatique du GDXa et du facteur Xa par le TFPI.....	73
c)	Inhibition enzymatique du GDXa et du facteur Xa par l'antithrombine.....	73
d)	Détermination de la demi-vie plasmatique du GDXa et du facteur Xa.....	73
3)	Inhibition du complexe facteur tissulaire – facteur VIIa par le TFPI.....	73
3.1.2.2.	Neutralisation du TFPI et de l'antithrombine par des anticorps.....	74
3.1.2.3.	Electrophorèse des protéines.....	74

3.2. PARTIE 2	75
3.2.1. Matériel	75
3.2.2. Méthodes	75
3.2.2.1. Etude <i>in silico</i> des interactions TFPI – facteur Xa	75
3.2.2.2. Biologie Moléculaire	77
1) Conception et structure du gène synthétique TIMX	77
2) Clonage du gène TIMX dans pTT5	79
3) Amplification de l'ADN plasmidique	81
4) Mutagenèses dirigées	82
3.2.2.3. Transfection cellulaire	85
3.2.2.4. Dialyse des surnageants de culture cellulaire	86
3.2.2.5. Electrophorèse des protéines	86
3.2.2.6. Quantification des variants GDXa (ELISA)	86
3.2.2.7. Tests fonctionnels des variants	86
1) Activité chromogénique des différents variants	86
2) Test de génération de thrombine	86
4. RESULTATS	87
4.1. PARTIE 1 : VALIDATION DU CONCEPT	87
4.1.1. Caractérisation SDS-PAGE du GDXa	87
4.1.2. Impact du GDXa et du facteur Xa sur la génération de thrombine	87
4.1.3. Clivage du substrat ZGGR-AMC par le GDXa	90
4.1.4. Inhibition du complexe facteur tissulaire – facteur VIIa par le TFPI	91
4.1.5. Propriétés enzymatiques du GDXa	92
4.1.6. Inhibition enzymatique du GDXa et du facteur Xa	92
4.1.6.1. Inhibition enzymatique du GDXa et du facteur Xa par le TFPI	92
4.1.6.2. Inhibition enzymatique du GDXa et du facteur Xa par l'antithrombine	93
4.1.7. Neutralisation de l'antithrombine et du TFPI d'un plasma d'hémophile par des anticorps spécifiques	96
4.1.7.1. Neutralisation de l'antithrombine d'un plasma d'hémophile	96
4.1.7.2. Neutralisation du TFPI d'un plasma d'hémophile	97
4.1.8. Demi-vie plasmatique et durée d'action du GDXa	98
4.2. PARTIE 2 : CONCEPTION RATIONNELLE DE VARIANTS GDXA	100
4.2.1. Etude <i>in silico</i> de l'interaction entre le facteur Xa et le TFPI	100
4.2.1.1. Etude des interactions entre chaîne lourde du facteur Xa et domaine K2 du TFPI	100
4.2.1.2. Etude <i>in silico</i> des interactions entre la chaîne lourde du facteur Xa mutée en position R138 ou K82 et le domaine K2 du TFPI	101
4.2.2. Variants produits	103
4.2.3. Tests des dialysats de surnageant cellulaire	103
4.2.3.1. Western Blot	103
4.2.3.2. Dosage quantitatif des variants	104
4.2.3.3. Activité chromogénique des variants	104
4.2.3.4. Effet des variants sur la génération de thrombine d'un plasma d'hémophile A	105
5. DISCUSSION	107
5.1. PARTIE 1	107
5.2. PARTIE 2	109
6. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	112
7. BIBLIOGRAPHIE	114

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma de la coagulation plasmatique <i>in vivo</i>	19
Figure 2 : Structure du TFPI.....	24
Figure 3 : Inhibition du complexe facteur tissulaire-facteur VIIa par le complexe TFPI - facteur Xa.....	26
Figure 4 : Mécanisme cinétique des inhibiteurs enzymatiques de type « Slow tight-binding inhibitor »	27
Figure 5 : Structure primaire du facteur X	59
Figure 6 : Structure du propeptide du facteur X, des facteurs X, Xa et du GDxa.....	63
Figure 7 : Hypothèse du mécanisme d'action du GDxa	69
Figure 8 : Alignement des séquences du domaine catalytique du facteur Xa humain et de la trypsine porcine.....	76
Figure 9 : Séquence nucléotidique du gène TIMX.....	78
Figure 10 : Structure de la protéine 2 RKR-TIMX après clivage par les furines.....	78
Figure 11 : Plasmide pTT5	80
Figure 12 : Principales étapes de la mutagenèse dirigée.....	83
Figure 13 : Plasmide pTT5 2RKR-TIMX.....	84
Figure 14 : Sites de mutagenèse dirigée du facteur X	84
Figure 15 : SDS-PAGE du GDxa et du facteur Xa.....	87
Figure 16 : Effet du GDxa et du facteur Xa sur la génération de thrombine d'un plasma hémophile A sévère.....	88
Figure 17 : Effet du GDxa et du facteur VIIa recombinant sur la génération de thrombine d'un plasma hémophile A sévère.....	90
Figure 18 : Effet du GDxa sur le clivage du substrat ZGGR-AMC.....	91
Figure 19 : Effet du facteur Xa et du GDxa sur l'inhibition par le TFPI du complexe facteur tissulaire / facteur VIIa.....	91
Figure 20 : Inhibition enzymatique du GDxa et du facteur Xa par le TFPI	93
Figure 21 : Inhibition enzymatique du GDxa et du facteur Xa par l'antithrombine	95
Figure 22 : Effet de la neutralisation de l'antithrombine sur la génération de thrombine de plasma d'hémophile	96
Figure 23 : Effet de la neutralisation du TFPI sur la génération de thrombine de plasma d'hémophile.....	97
Figure 24 : Détermination de la demi-vie plasmatique du GDxa et du facteur Xa.....	99
Figure 25 : Etude <i>in silico</i> des énergies d'interactions entre les acides aminés de la chaîne lourde du facteur Xa et le TFPI.....	100
Figure 26 : Etude des énergies d'interactions entre le TFPI et les mutants R138F et K82Y	102
Figure 27 : Western Blot des surnageants de culture des différents variants.	104
Figure 28 : Activité chromogénique des différents variants dialysés.	105

Figure 29 : Impact des différents variants du GD _{Xa} sur la génération de thrombine d'un plasma de patient hémophile A sévère.	106
---	-----

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Composition du FEIBA [®]	42
Tableau 2 : Acides aminés impliqués dans les interactions du facteur X avec le facteur tissulaire, le facteur VIIa et le facteur Va.	62
Tableau 3 : Protocole PCR de mutagenèse dirigée	83
Tableau 4 : Séquence des amorces de mutagenèse dirigée	85
Tableau 5 : Effet du GD _{Xa} sur la génération de thrombine de différents plasmas d'hémophiles	89
Tableau 6 : Propriétés enzymatiques du GD _{Xa} et du facteur Xa	92
Tableau 7 : Effet de la neutralisation de l'antithrombine et du TFPI sur la génération de thrombine de plasmas d'hémophiles	98
Tableau 8 : Effet du GD _{Xa} sur la génération de thrombine d'un plasma d'un patient hémophile A sévère après 60 minutes d'incubation à 37°C.....	99
Tableau 9 : Tableau récapitulatif des différents variants.	103

LISTE DES ABREVIATIONS

AAV :	Adenovirus Associated Virus
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADP :	Adénosine diphosphate
ARN :	Acide ribonucléique
AT :	Antithrombine
BHK :	Baby Hamster Kidney
CMV :	Cytomégalovirus
CTI :	Corn Trypsin Inhibitor
CTLA-4 :	Cytotoxic T-Lymphocyte antigen 4
EBV :	Ebstein Bar Virus
EBNA :	Ebstein Bar Nuclear Antigen
EDTA :	Ethylène Diamine Tetracetic Acid
EGF :	Endothelial Growth Factor
ELISA :	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ETP :	Endogenous Thrombin Potential
EPCR :	Endothelial Protein C Receptor
FEIBA :	Factor Eight Inhibitor Bypassing Activity
VIIa :	Facteur VII activé
IXa :	Facteur IX activé
Xa :	Facteur X activé
GDXa :	Facteur Xa délété du domaine Gla
Gla :	Acide carboxy-glutamique
GPI :	Glycosyl Phosphatidyl Inositol
HEK :	Human Embryonic Kidney
JCPA :	Jours Cumulés de Présence de l'Antigène
KHPM :	Kininogène de Haut Poids Moléculaire
LB :	Luria Broth
MCS :	Multicloning Site
NASP :	Non-anticoagulants Sulfated Polysaccharides
PAGE :	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PAI :	Plasminogen Activator Inhibitor
PAR :	Protease Activated Receptor
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PH :	Peak Height
RCL :	Reactive Center Loop
SDS :	Sodium Dodécyl Sulfate
SELEX :	Systemic Evolution of Ligands by Exponential enrichment
TAE :	Tampon Tris Acétate EDTA

TCA :	Temps de Céphaline Activée
TFPI :	Tissue Factor Pathway Inhibitor
TGF :	Tumor Growth Factor
TGT :	Test de Génération de Thrombine
TIMP :	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
TNF :	Tumor Necrosis Factor
t-PA :	Tissue Plasminogen Activator
UB :	Unité Bethesda
VIH :	Virus de l'immuno-déficience acquise

RESUME EN FRANÇAIS

Conception rationnelle de nouvelles protéines thérapeutiques dans l'hémophilie : variants du facteur Xa dépourvus du domaine Gla

Introduction :

L'hémophilie est une maladie génétique de la coagulation due à un déficit en facteur VIII ou en facteur IX. Ces déficits sont responsables d'un déficit du complexe ténase intrinsèque (VIIIa-IXa). De plus, le complexe ténase extrinsèque (facteur tissulaire - VIIa) est physiologiquement rapidement inhibé par le TFPI lié au facteur Xa. Nous avons évalué la capacité d'une forme tronquée du facteur Xa (GDxa), dépourvue de domaine Gla à se lier au TFPI et à soulager l'inhibition physiologique du complexe ténase extrinsèque.

Matériel et Méthodes :

Dans une première partie, nous avons évalué la capacité du GDxa à restaurer la génération de thrombine de plasmas d'hémophiles A et B sévères sans et avec inhibiteurs. Nous avons également comparé les profils de génération de thrombine obtenus après addition du GDxa à ceux obtenus en présence d'anticorps neutralisants anti-TFPI ou anti-antithrombine. Enfin, nous avons comparé les cinétiques enzymatiques de neutralisation du facteur Xa et du GDxa par le TFPI et l'antithrombine.

Dans une seconde partie, nous avons étudié *in silico* les interactions entre la chaîne lourde du facteur Xa et le TFPI pour détecter les zones d'interaction défavorables. Cette étude a identifié des acides aminés du facteur Xa qui pourraient être substitués pour optimiser l'interaction avec le TFPI. Les résultats *in silico* ont orienté nos choix de mutagenèse dirigée pour concevoir différents variants moléculaires du GDxa (R138F, R138G, R138I) où l'arginine 138 est substituée. Ces variants protéiques ont été produits de façon recombinante dans des cellules HEK293E. La capacité des différents variants à restaurer la génération de thrombine de plasmas d'hémophiles a été testée avec les surnageants de culture cellulaires correspondants.

Résultats :

Dans la première partie, nous avons montré que le GDxa est capable de restaurer la génération de thrombine de plasmas d'hémophiles A et B sans et avec inhibiteurs. Comparativement au facteur Xa, le GDxa montre une affinité moindre pour le TFPI tandis que les affinités du GDxa et du facteur Xa pour l'antithrombine sont identiques. Enfin, malgré une demi-vie courte, l'effet du GDxa sur la génération de thrombine est maintenu pendant au moins une heure.

Dans la seconde partie, nous avons produit les différents variants R138F, R138G et R138I en cellules HEK293E et montré que les surnageants de culture cellulaire étaient capables de restaurer la génération de thrombine de plasmas d'hémophiles de façon plus efficace que le GDxa.

Conclusion :

Comme le GDxa est capable de restaurer la génération de thrombine de plasmas d'hémophiles, nos résultats suggèrent que le GDxa pourrait être une alternative efficace aux thérapeutiques hémostatiques court-circuitantes actuelles chez les hémophiles sans ou avec inhibiteurs. Les résultats obtenus renforcent l'hypothèse que l'activité pro-coagulante du GDxa serait liée à la formation d'un complexe GDxa-TFPI limitant la formation du complexe Xa-TFPI nécessaire à l'inhibition physiologique du complexe ténase extrinsèque.

De plus, notre approche rationnelle basée sur une étude *in silico* visant à augmenter l'affinité du TFPI pour le GDxa a permis de produire différents variants moléculaires du GDxa dont l'activité procoagulante *in vitro* est augmentée par rapport au GDxa.

Mots clés :

Facteur Xa délété du domaine Gla (GDxa), Facteur Xa, TFPI, Génération de thrombine, Hémophilie avec inhibiteurs, Etude *in silico*, Mutagénèses dirigées.

RESUME EN ANGLAIS

Rational Design of new haemostatic drugs in haemophilia: Gla domain less factor Xa variants

Background:

Hemophilia is caused by deficiencies in coagulation factor VIII or IX, resulting in direct blockade of the intrinsic tenase complex and indirect blockade of the extrinsic tenase complex which is rapidly inhibited upon binding of factor Xa to tissue factor pathway inhibitor (TFPI). We evaluated the ability of Gla-domainless factor Xa (GDxa), a truncated form of factor Xa devoid of procoagulant properties, to bind to TFPI and to alleviate the physiological inhibition of the extrinsic tenase.

Design and Methods:

In the first part of this work, we evaluated the ability of GDxa to restore coagulation in plasmas from hemophilia A and B patients without and with inhibitors, using a thrombin generation assay triggered by a low concentration of tissue factor. We then compared its efficacy to generate thrombin to depletion of antithrombin or TFPI by specific antibodies. Finally, we compared the kinetics of neutralization of factor Xa and GDxa by antithrombin and TFPI.

In the second part of this work, we realized an *in silico* study of the interactions between factor Xa heavy chain and TFPI. The aim was to detect unfavorable interactions and to identify amino-acids candidates for mutagenesis in order to increase affinity for TFPI. Taking into account the results of this *in silico* study, we produced by genic engineering different molecular variants of GDxa (R138F, R138G, R138I) where Arg138 was substituted by site directed mutagenesis. Proteins were produced in HEK293E cells. We tested dialyzed cell culture supernatants containing each variant to restore thrombin generation in plasmas from severe hemophilia patients.

Results:

In the first part of this work, we showed that GDxa was able to restore thrombin generation in plasma samples from hemophiliacs. This effect was observed for plasma from hemophilia A patients without or with inhibitors and for plasma from hemophilia B patients. GDxa had a lower affinity than factor Xa for TFPI whereas the affinities of both proteins for antithrombin were similar. Finally, despite a short half-life in plasma, the effect of GDxa on thrombin generation was sustained for at least one hour.

In the second part of this work, we produced the different variants R138F, R138G et R138I in HEK293E cells and showed that cell culture supernatants were able to restore thrombin generation in a more efficient way than GDxa.

Conclusions:

As GDxa was able to restore thrombin generation in plasma from hemophilia patients, our results suggest that it may be an effective alternative to current treatments for hemophilia with or without inhibitors. Results sustained the hypothesis that GDxa coagulant activity is through TFPI binding and competition with factor Xa to bind TFPI resulting in limiting factor Xa-TFPI formation, which is essential for inhibition of extrinsic tenase complex.

Furthermore, rational design of GDxa variants based on an *in silico* study lead to production of proteins whose coagulant activity is increased compared to GDxa.

Key words:

Gla-domainless factor Xa, Factor Xa, TFPI, Thrombin generation, Hemophilia with inhibitor, *in silico* study, Site directed mutagenesis

AVANT PROPOS

L'hémophilie est une maladie hémorragique, génétique récessive liée à l'X, caractérisée par un déficit du complexe ténase intrinsèque dû à un déficit en facteur VIII (hémophilie A) ou en facteur IX (hémophilie B) [1]. Durant les deux dernières décennies, le traitement des patients hémophiles a considérablement évolué grâce à une plus large disponibilité des concentrés de facteurs (VIII ou IX) permettant notamment la mise en place chez les hémophiles sévères de schémas prophylactiques dès l'enfance dans les pays les plus riches [2]. Cependant, la substitution en facteurs peut s'accompagner du développement d'anticorps neutralisants anti-facteur VIII ou IX, ce qui constitue désormais la plus sévère et la plus coûteuse des complications [3]. Le développement d'inhibiteurs concerne 10 à 30 % des hémophilies A [4] et 1,5 à 3% des hémophiles B [5]. Dans ce cas, il faut alors essayer d'éradiquer l'inhibiteur par la mise en œuvre de protocoles d'induction de tolérance immunitaire [6]. Le traitement hémostatique des épisodes hémorragiques chez les hémophiles présentant un inhibiteur fait appel à des thérapeutiques dites court-circuitantes comme le facteur VIIa (Novoseven[®]) et les concentrés de complexe prothrombinique activé (FEIBA[®]) [7]. Cependant, chacun de ces traitements comporte ses limites. Une étude comparative randomisée de ces deux thérapeutiques a montré que 5% à 10% des épisodes hémorragiques ne répondent pas à ces traitements court-circuitants [8]. Ces limites soulèvent l'intérêt de développer de nouveaux traitements hémostatiques. Comme l'avait déjà montré Tuddenham [9], les voies possibles pour court-circuiter un complexe ténase intrinsèque bloqué convergent vers le complexe initiateur de la coagulation dépendant du facteur tissulaire. L'une des possibilités est de neutraliser l'activité du TFPI. L'administration d'anticorps anti-TFPI raccourcit d'ailleurs le temps de coagulation de plasmas d'hémophiles [10] et le temps de saignement de lapins hémophiles [11]. Plus récemment, d'autres approches neutralisant le TFPI ont été proposées [12, 13].

Ici, nous proposons une nouvelle approche pour court-circuiter le complexe ténase intrinsèque. Contrairement au facteur Xa, une forme tronquée du facteur Xa dépourvue du domaine Gla (GDxa) est incapable de se lier aux phospholipides procoagulants et est donc dépourvue d'activité procoagulante directe [14]. Le GDxa conserve cependant la capacité de lier le TFPI [15] mais le complexe GDxa-TFPI est en revanche incapable d'inhiber le complexe ténase extrinsèque, initiateur de la coagulation [16]. Le GDxa pourrait alors entrer en compétition avec le facteur Xa et induire une diminution du complexe quaternaire facteur tissulaire - facteur VIIa - facteur Xa - TFPI où le complexe ténase extrinsèque se trouve bloqué.

Dans ce travail, nous avons étudié dans une première partie la capacité du GDXa à restaurer la génération de thrombine de plasmas d'hémophiles A sévères, ainsi que ses propriétés enzymatiques.

Dans une seconde partie, nous avons étudié *in silico* les interactions entre le TFPI et la chaîne lourde du facteur Xa, et identifié des zones d'interaction défavorables. Nous nous sommes basés sur ces résultats pour optimiser cette interaction et tenter de concevoir des variants protéiques du GDXa dont l'affinité est accrue pour le TFPI dans l'objectif d'augmenter l'efficacité hémostatique du GDXa.

1. INTRODUCTION

1.1. Hémostase physiologique

L'hémostase est le processus physiologique qui permet d'arrêter un saignement consécutif à une blessure vasculaire. On décrit classiquement trois étapes qui peuvent toutefois être intriquées d'un point de vue temporel :

- l'hémostase primaire, dont le but est de former rapidement un clou plaquettaire ou caillot blanc, qui obture la brèche vasculaire.
- la coagulation plasmatique, qui met en jeu une cascade enzymatique d'activation de facteurs de la coagulation. Son ultime finalité est de former un caillot solide renforçant le clou plaquettaire.
- la fibrinolyse, processus physiologique lent, qui dégrade progressivement le caillot formé, le temps que le vaisseau et ses structures avoisinantes soient réparés et cicatrisés.

1.1.1. Hémostase primaire

L'hémostase primaire se déroule en 4 étapes successives :

- une vasoconstriction réflexe des vaisseaux lésés pour diminuer le débit sanguin et la perte sanguine
- l'adhésion des plaquettes sanguines (ou thrombocytes) au sous-endothélium vasculaire
- l'activation plaquettaire induite par les signaux intracellulaires générés lors de l'adhésion plaquettaire
- l'agrégation plaquettaire pour former le clou plaquettaire qui obture la brèche vasculaire.

A l'état basal, le revêtement endothélial est une surface hémocompatible. Lors d'une blessure vasculaire, les cellules endothéliales sont lésées mettant à nu les couches sous-endothéliales. La matrice extracellulaire du sous-endothélium est alors au contact du flux sanguin. Le facteur Willebrand, protéine plasmatique circulante, fixe alors le collagène sous-endothélial, ce qui modifie la conformation tridimensionnelle du facteur Willebrand qui devient capable de fixer les plaquettes circulantes au niveau des glycoprotéines plaquettaires de surface GpIb/IX/V. Il assure alors l'adhésion des thrombocytes au sous-

endothélium. D'autres glycoprotéines de surface sont également mises en jeu pour l'adhésion des plaquettes au collagène sous-endothélial : GpVI et $\alpha_2\beta_1$ [17].

Des signaux intracellulaires [18] font suite à l'étape d'adhésion et activent les plaquettes. Une fois activées, les plaquettes, discoïdes au repos, émettent des pseudopodes et libèrent le contenu de leurs granules δ et α . Les granules δ libèrent de l'ADP qui intervient dans l'amplification de l'activation plaquettaire, et de la sérotonine qui possède des propriétés vasoconstrictrices. Les granules α libèrent de nombreuses protéines (fibrinogène, facteur Willebrand, facteur V, thrombospondine, facteur 4 plaquettaire) qui participent également à l'amplification de l'hémostase primaire, à l'activation plaquettaire et à la coagulation plasmatique.

L'activation plaquettaire s'accompagne aussi d'une surexpression des glycoprotéines de surface GpIIb/IIIa [19] : ces glycoprotéines fixent alors les molécules de fibrinogène circulantes et agrègent les plaquettes entre elles. Les molécules de fibrinogène assurent le contact entre les différentes plaquettes au sein de l'agrégat plaquettaire.

Enfin, l'activation plaquettaire aboutit à une modification structurale de la membrane phospholipidique cellulaire, au cours de laquelle les phosphatidylsérines du feuillet membranaire interne migrent vers le feuillet externe de la double couche lipidique membranaire par un mouvement de flip-flop [20]. Ces phospholipides chargés négativement offrent une surface procoagulante, indispensable à la fixation des facteurs de la coagulation vitamine K dépendants qui s'y fixent grâce à leur domaine γ -carboxyglutamique (Gla) chargé négativement, par l'intermédiaire d'un ion calcium.

1.1.2. Coagulation plasmatique

La coagulation plasmatique est la deuxième étape de l'hémostase. C'est un phénomène physiologique complexe qui met en jeu de nombreux facteurs de la coagulation (Figure 1). Ces facteurs sont présents sous forme de précurseurs inactifs ou zymogènes, synthétisés par le foie. Au cours du processus de coagulation plasmatique, ces facteurs sont tour à tour activés en enzymes après clivage protéolytique. Ces enzymes sont elles-mêmes dotées d'activités protéolytiques conférées par leurs domaines catalytiques sérine-protéases. Elles clivent et activent les zymogènes d'autres facteurs de la coagulation. Cette cascade de coagulation génère des quantités importantes de thrombine nécessaires à la formation d'un caillot de fibrine. Ce caillot vient renforcer le clou plaquettaire précédemment formé au cours de l'hémostase primaire.

1.1.2.1. Initiation de la coagulation

La cascade de la coagulation est initiée quand le facteur tissulaire est exposé au flux sanguin circulant à la suite d'un dommage ou d'une activation de l'endothélium. Le facteur tissulaire se lie au facteur VIIa circulant pour former le complexe ténase extrinsèque à la surface de membranes phospholipidiques provenant de débris cellulaires ou de microparticules circulantes. Le facteur VII est physiologiquement présent dans le plasma sous forme activée en très faible quantité (10 à 100 pM soit environ 0,1 à 1% du facteur VII circulant) [21]. Une fois formé, le complexe facteur VIIa - facteur tissulaire active les facteurs X et IX. La fixation du facteur tissulaire au facteur VIIa multiplie son activité protéolytique pour le facteur X par environ 10.000 [22]. Le principal rôle du facteur Xa est de protéolyser la prothrombine pour l'activer en thrombine. Le facteur Xa active également partiellement le facteur IX [23] en le coupant au niveau de l'un de ses deux sites de clivage.

Cette première étape déclenchée par la formation du complexe ténase extrinsèque génère des concentrations pico-molaires de thrombine qui activent les plaquettes [24]. Cette étape est immédiatement suivie d'une étape d'amplification.

1.1.2.2. Amplification et propagation de la coagulation

Les traces de thrombine générée au cours de l'initiation de la coagulation vont activer les facteurs V et VIII [25] et le facteur XI [26, 27].

Le facteur Va s'associe alors au facteur Xa à la surface d'une membrane phospholipidique (fournie par les plaquettes activées, des débris cellulaires ou des microparticules circulantes) pour former le complexe prothrombinase dont les capacités d'activation de la prothrombine sont 300.000 fois supérieures à celles du facteur Xa seul [28].

Le facteur VIIIa forme avec le facteur IXa à la surface d'une membrane phospholipidique le complexe ténase intrinsèque. Ce complexe active le facteur X cinquante fois plus efficacement que le complexe ténase extrinsèque [28]. Le facteur Xa forme le complexe prothrombinase en s'associant à son cofacteur, le facteur Va.

Le facteur XIa, activé par la thrombine, active à son tour le facteur IX en facteur IXa qui intègre le complexe ténase intrinsèque.

Au final, cette deuxième étape de la coagulation amplifie et propage la génération de la thrombine à la surface des plaquettes activées.

1.1.2.3. Rôle de la thrombine

La thrombine est une enzyme clé dans le processus hémostatique. Ses actions sont multiples et ont lieu aux différentes étapes de ce processus complexe. Elle intervient dans le processus de fibrinof ormation, dans l'amplification de la coagulation en activant les facteurs V, VIII et XI, et participe à l'activation plaquettaire en se fixant aux récepteurs plaquettaires PAR-1 [29]. La thrombine intervient aussi indirectement dans le processus d'inhibition de la coagulation, notamment en activant la protéine C, et dans la régulation négative de la fibrinolyse en activant le TAFI (Thrombin Activable Fibrinolysis Inhibitor).

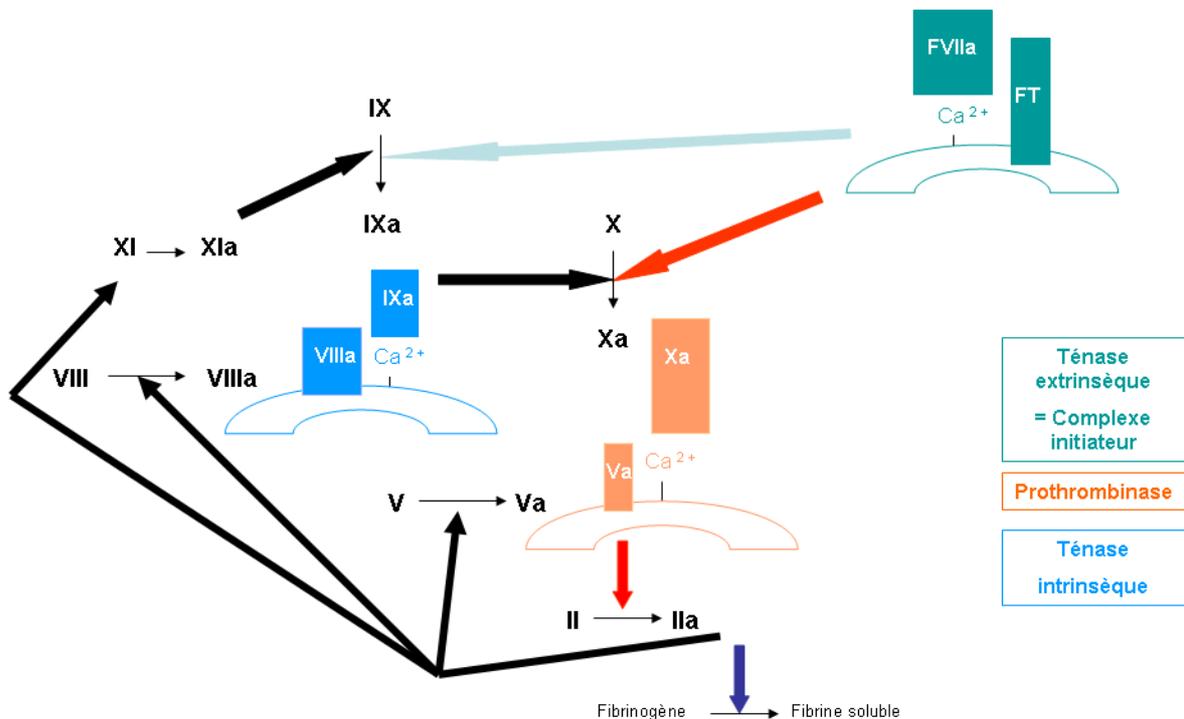


Figure 1 : Schéma de la coagulation plasmatique *in vivo*

1.1.2.4. Synthèse des facteurs de la coagulation

Tous les facteurs de la coagulation (fibrinogène, facteurs II, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII, facteurs de la phase contact) sont synthétisés par le foie. C'est également le cas pour l'antithrombine et les protéines C et S. La synthèse de certains facteurs nécessite de la vitamine K : c'est le cas des facteurs II, VII, IX, X et des protéines C et S.

La vitamine K sous forme réduite KH_2 est le co-facteur d'une γ -carboxylase qui assure la carboxylation des acides glutamiques (Glu) en acides γ -carboxyglutamiques (Gla) du domaine GLA de la région N-terminale des facteurs vitamine K dépendants.

La conversion en acides γ -carboxyglutamiques est essentielle car ces acides aminés permettent de fixer les phosphatidylsérines membranaires, chargées négativement, par l'intermédiaire d'ions calcium. Le domaine GLA est donc indispensable à la fixation des facteurs de coagulation et des inhibiteurs physiologiques vitamine K dépendants. En l'absence de vitamine K et de γ -carboxylation, ces facteurs ont une activité fortement altérée [30].

1.1.2.5. Facteurs de la phase contact

Les facteurs de la phase contact comprennent trois protéines : le facteur XII, la prékallikréine et le kininogène de haut poids moléculaire (KHPM). La prékallikréine et le KHPM forment un complexe équimolaire. Au contact de surfaces anioniques chargées négativement, le facteur XII s'auto-active en changeant de conformation. Une fois activé, le facteur XII clive la prékallikréine et la convertit en kallikréine qui, à son tour, active le facteur XII. Cette activation réciproque crée une boucle d'auto-amplification. Le KHPM lié à la (pré) kallikréine accélère cette activation du facteur XII par la kallikréine. Le facteur XIIa généré est aussi capable d'activer le facteur XI (essentiellement complexé au KHPM) qui active à son tour le facteur IX, accroissant la formation du complexe ténase intrinsèque qui active le facteur X. Le KHPM protège le facteur XIa et la kallikréine des enzymes inhibitrices C1-inhibiteur et α_2 macroglobuline [31, 32].

L'activation du facteur XII au contact des surfaces électronégatives ne semble pas jouer de rôle important dans le processus de coagulation physiologique et la voie du facteur tissulaire est largement prédominante. Les déficits en facteur XII ne sont d'ailleurs pas associés à une diathèse hémorragique [33]. Le facteur XII pourrait cependant participer au développement de thrombi [34], notamment dans certains contextes septiques où les bactéries relarguent des substances chargées négativement ou des protéases activant directement le facteur XII [35-37].

1.1.2.6. Fibrinoformation

La fibrinoformation implique la polymérisation des monomères de fibrine (provenant des molécules de fibrinogène) pour former un réseau de fibrine constituant le caillot. Ce réseau conditionne les propriétés mécaniques du caillot et constitue une matrice pour la reconstruction tissulaire.

Au cours de la fibrinoformation, la thrombine clive les fibrinopeptides A et B du domaine E d'une molécule de fibrinogène et convertit les molécules de fibrinogène en monomères de fibrine. Le clivage des fibrinopeptides démasque des charges positives au niveau du domaine E qui interagissent avec les charges négatives des domaines D d'autres molécules de fibrine pour former des protofibrilles. Ces protofibrilles s'agrègent ensuite latéralement pour former des fibres de fibrine [38].

Enfin, le facteur XIIIa résultant d'une activation du facteur XIII par la thrombine [39] stabilise le réseau de fibrine en établissant des liaisons covalentes entre les chaînes latérales des monomères de fibrine [40] pour constituer un caillot stable, insoluble.

1.1.3. Inhibiteurs physiologiques de la coagulation

Des mécanismes régulateurs viennent rétro-contrôler négativement les processus procoagulants précédemment mis en jeu. Il existe trois systèmes inhibiteurs physiologiques de la coagulation capables de neutraliser différentes sérine-protéases : le TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor), l'antithrombine et le système protéine C / protéine S.

1.1.3.1. TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor)

Le TFPI est l'inhibiteur physiologique de la voie du facteur tissulaire : il fixe le facteur Xa pour former le complexe TFPI - Xa qui inhibe le complexe ténase extrinsèque. En 1985, Sanders et ses collaborateurs (Université de Californie, San Diego) rapportent que la fraction lipoprotéique du plasma contient un inhibiteur du complexe facteur tissulaire - facteur VIIa qui nécessite la présence de facteur X [41]. Un peu plus tard, Coburn et Buonassisi (Université de Washington, Saint Louis) identifient cet inhibiteur au niveau de cellules endothéliales de lapin [42]. Ces deux laboratoires américains s'intéressent alors à la caractérisation de cette protéine : le laboratoire de Saint Louis la dénomme TFI (Tissue Factor Inhibitor) puis LACI (Lipoprotein-Associated Coagulation Inhibitor) et le Laboratoire de San Diego l'appelle EPI (Extrinsic Pathway Inhibitor). En 1991, ces deux équipes se réunissent au meeting de l'Internal Society of Thrombosis and Haemostasis pour s'entendre sur l'appellation définitive de TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor) [43].

1) Synthèse / Elimination

Le TFPI est surtout synthétisé au niveau des cellules endothéliales mais il peut aussi être exprimé par d'autres types cellulaires : les cellules musculaires lisses [44], les mégacaryocytes et les plaquettes [45], les fibroblastes [46], les monocytes [47] et les cardiomyocytes [46].

Sa concentration plasmatique est faible de l'ordre de 3 nM [48]. La plupart du TFPI circule sous forme liée aux lipoprotéines de faible densité (LDL). Seulement 10% de la protéine circule sous une forme entière. La plupart des formes circulantes sont dépourvues de la région K3 et de la queue C-terminale, suite à un clivage par différentes protéases (thrombine, plasmine, élastase) [48].

Trois mécanismes assurent la clairance du TFPI : l'endocytose du complexe quaternaire facteur TFPI - facteur Xa - facteur tissulaire - facteur VIIa [49], l'internalisation du complexe facteur Xa-TFPI par des cellules endothéliales [50] et la capture par le LRP (Lipoprotein Receptor Protein) du TFPI circulant (lié à une LRP - associated Protein) précédant son endocytose médiée par le LRP dans des vésicules à clathrine avant sa dégradation protéolytique [51].

2) Structure

Le gène du TFPI comprend 9 exons et 8 introns sur le bras long du chromosome 2 [52]. Deux formes de TFPI peuvent être synthétisées à partir de deux transcrits ARN messagers différents résultant d'un épissage différentiel : le TFPI α fut le premier identifié alors que le TFPI β a été identifié beaucoup plus récemment. Bien que le TFPI β ait été mis en évidence *in vivo* chez des souris et des babouins [53, 54] et *in vitro* sur des cellules endothéliales humaines, il n'a jamais été retrouvé *in vivo* chez l'Homme. Contrairement au TFPI α , son rôle physiologique n'est pas démontré.

❖ TFPI α (figure 2A):

Le TFPI α est une glycoprotéine de 276 acides aminés de 43 kD. Il serait lié indirectement à des ancrs Glycosylphosphatidylinositol à la surface endothéliale grâce à un co-récepteur non encore identifié [55].

Il comprend [56] :

- une région N-terminale riche en acides aminés acides chargés négativement
- suivie de 3 domaines Kunitz en tandem (K1, K2, K3)

- puis une région C-terminale riche en acides aminés basiques chargés positivement

Les domaines Kunitz sont des domaines protéiques capables d'inhiber les sites actifs de certaines protéases. D'une longueur de 50 à 60 acides aminés, ils miment les substrats naturels de certaines protéases et assurent une inhibition enzymatique réversible de type « Slow tight-binding inhibition ».

- Le premier domaine K1 (Asp13-Arg78) fixe le facteur VIIa au sein du complexe quaternaire lorsque le domaine K2 a déjà fixé le facteur Xa [57].
- Le domaine K2 (Glu182-Lys241) fixe et inhibe le site catalytique du facteur Xa [58].
- Le domaine K3 n'a vraisemblablement aucun rôle dans l'inhibition du facteur Xa et du complexe ténase extrinsèque. Ce domaine participe en revanche à la liaison du TFPI aux surfaces cellulaires [59] et à l'héparine par interactions électrostatiques entre les acides aminés basiques du TFPI (Lys 213, Lys232 et Lys240) et les charges négatives de l'héparine [60].
- La région C-terminale, contrairement au domaine K3, est nécessaire à l'inactivation complète du facteur Xa [61, 62]. Cette région comporte également un site de liaison à l'héparine. Grâce à ses acides aminés basiques chargés positivement, elle peut lier d'autres ligands comme des protéoglycanes de surface, des lipoprotéines et la thrombospondine-1.

Le TFPI α comporte également des modifications post-traductionnelles [63] :

- deux N-glycosylations au niveau des Asn117 et Asn167
- une O-glycosylation au niveau des Ser174 et Thr175
- une phosphorylation au niveau de la Ser2

Ces modifications post-traductionnelles n'interviennent pas dans les fonctions inhibitrices du TFPI vis-à-vis du facteur Xa : elles pourraient cependant modifier les capacités de liaison du TFPI aux cellules et influencer sa clairance plasmatique [63].

❖ TFPI β (figure 2B) :

Le TFPI β n'a été identifié que très récemment. Sa structure est plus courte : il comporte la même région amino-terminale et les mêmes domaines K1 et K2 que le TFPI α mais il est dépourvu de domaine K3 et la queue C-terminale est différente. Il résulte de la traduction d'un transcrit ARN messenger ayant subi un épissage alternatif après l'exon 7 qui code pour la région située au-delà du domaine K2. Chez l'Homme, l'exon 8 code pour une séquence de douze acides aminés suivie d'une séquence d'attachement au Glycosylphosphatidyl Inositol. Cette séquence d'attachement est clivée dans le réticulum

endoplasmique. Contrairement au TFPI α , sa liaison au GPI à la surface des cellules endothéliales est directe et ne fait pas intervenir de co-récepteur liant le GPI. Le TFPI β possède des capacités d'inhibition du facteur Xa et du complexe facteur tissulaire / facteur tissulaire non négligeables [59], bien qu'inférieures à celles du TFPI α .

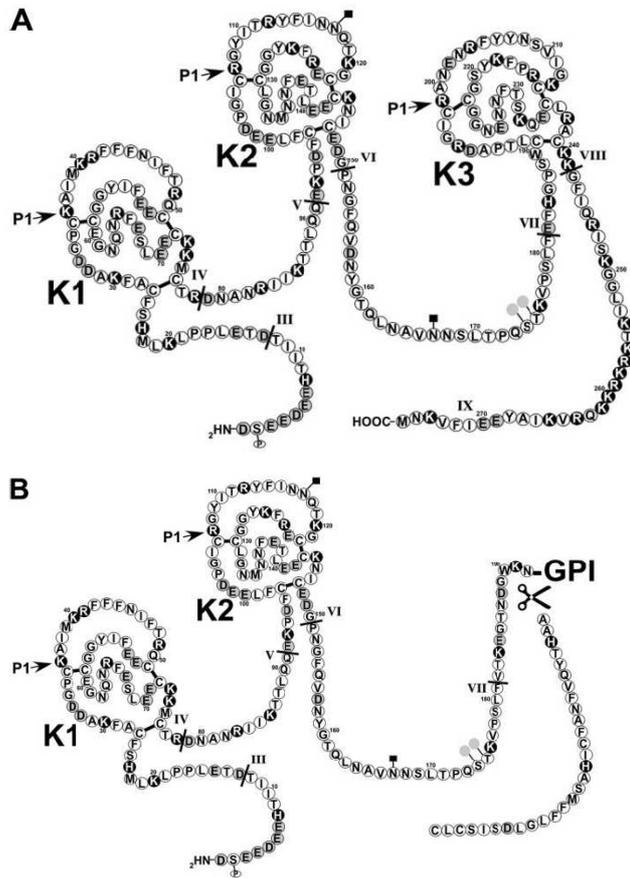


Figure 2 : Structure du TFPI

(d'après Crawley J. et al [63])

(A) TFPI α : 3 régions Kunitz

(B) TFPI β : 2 régions Kunitz et un site d'ancrage GPI

❖ TFPI-2

Le TFPI-2 (ou Placental Protein 5) est un inhibiteur de sérine-protéase de 32 kD comportant une courte région N-terminale, 3 domaines Kunitz (K1, K2, K3) en tandem et une queue C-terminale chargée positivement. Il a été identifié en abondance dans de nombreux tissus humains (vésicules séminales, colon, estomac, cerveau, pancréas, œsophage et foie) [64, 65]. C'est un homologue structural du TFPI (TFPI α décrit précédemment). Il inhibe de nombreuses protéases (trypsine, plasmine, complexe facteur VIIa - facteur tissulaire) le plus souvent grâce à son domaine K1 et jouerait un rôle

important dans le remodelage de la matrice extracellulaire. Plusieurs études indiquent que le TFPI-2 serait inactivé ou absent au cours de la progression tumorale [66, 67].

3) Inhibition de la coagulation par le TFPI

L'inhibition physiologique du complexe ténase extrinsèque par le TFPI comporte deux étapes (figure 3).

Lors de la première étape, le domaine K2 (Arg 107) du TFPI fixe de façon stoechiométrique et réversible le site catalytique du facteur Xa [57]. Cette étape ne nécessite pas de calcium en l'absence de phospholipides [68]. En revanche, en présence de phospholipides membranaires, les ions calcium assurent la fixation du domaine Gla du facteur Xa aux phospholipides et facilite l'interaction du facteur Xa avec le TFPI dont la queue C-terminale chargée positivement se fixe aux phospholipides. Les ions calcium augmentent donc les capacités d'inhibition du facteur Xa par le TFPI en présence de phospholipides.

La seconde étape implique la liaison du complexe facteur Xa - TFPI au complexe facteur tissulaire - facteur VIIa. Le domaine K1 (Lys36) du TFPI fixe le site actif du facteur VIIa [57]. Cette étape requiert des ions Ca^{2+} pour la fixation des domaines Gla des facteurs Xa et VIIa aux phospholipides. La formation du complexe quaternaire facteur Xa - TFPI - facteur VIIa - facteur tissulaire bloque l'activation du facteur IX et du facteur X par le facteur VIIa.

Bien que l'inhibition physiologique du complexe ténase extrinsèque soit souvent représentée en deux étapes impliquant d'abord la formation du complexe facteur Xa - TFPI, puis sa fixation au complexe facteur tissulaire - facteur VIIa, les données cinétiques sont plutôt en faveur d'une fixation directe du TFPI sur le complexe ternaire facteur tissulaire - facteur VIIa - facteur Xa, formé lors de l'activation du facteur X avant que le facteur Xa ne se détache de la membrane [63] (figure 3).

L'inactivation du complexe facteur tissulaire - facteur VIIa implique une interaction optimale entre le facteur X et le complexe facteur tissulaire - facteur VIIa, conditionnée par le domaine Gla du facteur X et les acides aminés Lys165 et Lys166 du facteur tissulaire [69].

L'inactivation du facteur Xa par le TFPI n'est en revanche plus possible quand le facteur Xa intègre le complexe prothrombinase où il se lie à la prothrombine et au facteur Va [70].

Plus récemment, il a été montré que la protéine S pourrait jouer le rôle de cofacteur du TFPI pour augmenter l'inhibition du facteur Xa [71]. La protéine S interagirait au niveau des régions K3 et C-terminale du TFPI, renforçant ainsi la fixation du TFPI aux surfaces phospholipidiques. Grâce à son domaine Gla chargé négativement, la protéine S pourrait

augmenter l'affinité du TFPI pour les surfaces phospholipidiques, notamment plaquettaires.

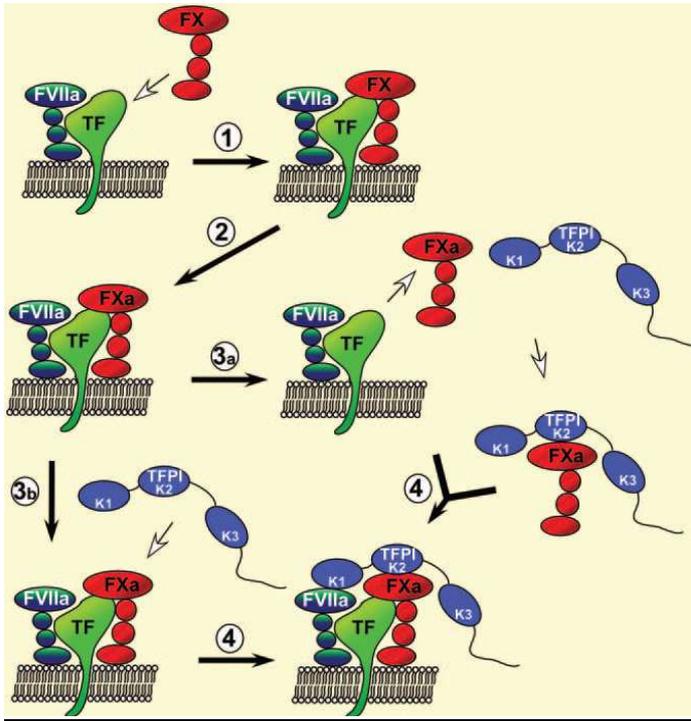


Figure 3 : Inhibition du complexe facteur tissulaire-facteur VIIa par le complexe TFPI - facteur Xa

(d'après Crawley J. et al [63])

Le facteur X se lie au complexe facteur tissulaire - facteur VIIa qui l'active. Le facteur Xa peut se dissocier du complexe et se fixer au TFPI (plasmatique ou ancré) et se réassocier au complexe facteur tissulaire - facteur VIIa pour l'inhiber. Le TFPI peut aussi fixer directement le facteur Xa resté au contact du complexe VIIa - facteur tissulaire après l'activation du facteur X.

4) Inhibition enzymatique du facteur Xa par le TFPI

Le TFPI est un inhibiteur réversible lent et compétitif du facteur Xa de type « Slow tight-binding inhibitor ». L'inhibition du facteur Xa par le TFPI se passe en deux étapes [68] (figure 4) :

- une fixation rapide du TFPI au facteur Xa sans que le domaine catalytique du facteur Xa ne soit neutralisé. Cette étape correspond à la formation d'un complexe TFPI - facteur Xa « lâche ».
- suivie d'une isomérisation lente du complexe TFPI - facteur Xa vers un complexe « resserré » où l'activité du facteur Xa est neutralisée. L'état d'équilibre est atteint beaucoup plus lentement que pour un inhibiteur enzymatique classique.

Ces considérations sont importantes à prendre en compte pour la détermination des constantes d'inhibition enzymatique pour lesquelles les formules habituellement utilisées pour les inhibiteurs classiques ne sont pas applicables.

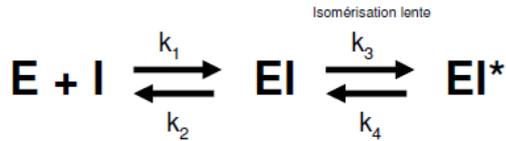


Figure 4 : Mécanisme cinétique des inhibiteurs enzymatiques de type « Slow tight-binding inhibitor »

La fixation de l'inhibiteur à l'enzyme E aboutit à la formation rapide d'un complexe intermédiaire EI ($K_i \text{ initial} = k_2 / k_1$), suivie d'une isomérisation lente pour former le complexe « tendu » isomérisé EI* ($K_i \text{ (final)} = k_4 / (k_3 + k_4)$)

1.1.3.2. Antithrombine

L'antithrombine est un inhibiteur physiologique capital de la coagulation plasmatique, capable d'inhiber de façon stoechiométrique de nombreuses sérine-protéases : facteurs IIa, Xa, IXa, XIa, XIIa. Elle inhibe les sérines protéases de façon irréversible en se comportant comme un substrat suicide. C'est une glycoprotéine de 58 kD synthétisée par le foie et dont la concentration plasmatique est de l'ordre de 2 μM [72]. La protéine existe sous deux formes : 90% sous forme α et 10% sous forme β [73]. La forme α est glycosylée au niveau des 4 sites de glycosylation Asn96, Asn135, Asn155 et Asn192 alors que la forme β n'est pas glycosylée en position Asn135 [74].

L'antithrombine appartient à la superfamille des serpinés qui sont des inhibiteurs de protéases. L'acronyme SERPIN correspond en anglais à « SERine Protease INhibitors ». 36 serpinés humaines ont été identifiées à ce jour [75]. Elles sont caractérisées structurellement par 3 feuillets β , 9 hélices α et une boucle RCL « Reactive Center Loop », longue boucle (20-24 acides aminés) flexible mimant la boucle du substrat [76, 77]. Lors de la neutralisation de sérine-protéases par l'antithrombine, cette boucle RCL interagit avec le site actif de ces dernières pour former un complexe michaelien. Le site actif de la sérine-protéase clive alors la boucle RCL au niveau de la liaison P1-P1' (nomenclature de Schechter et Berger) pour former un complexe acyl intermédiaire dans lequel la liaison est clivée et le résidu P1 fixe de façon covalente la sérine du site catalytique de la protéase. Le clivage de la boucle RCL s'accompagne d'importantes modifications conformationnelles de la serpine : la boucle RCL clivée est alors incorporée comme un nouveau brin dans le feuillet β A au centre de la molécule [78], entraînant la sérine-protéase à l'autre pôle de la serpine et son changement conformationnel. Le complexe ainsi formé a une structure conformationnelle très stable. Dans cette conformation, la sérine-protéase se trouve « écrasée » contre l'antithrombine déformant la triade catalytique.

A l'état basal, l'antithrombine se caractérise par le fait que la boucle RCL est partiellement incorporée au feuillet β A et que le résidu P1 est orienté vers le corps de la molécule. De ce fait, la boucle RCL est peu accessible au clivage protéolytique par les sérine-protéases. L'expulsion de la boucle RCL du feuillet β est cependant favorisée par la fixation de l'héparine à l'antithrombine [79] ou de substances heparin-like à l'antithrombine. L'activité de l'antithrombine est donc régulée *in vivo* par l'héparane sulfate des cellules endothéliales [80, 81] ou l'héparine libérée par les mastocytes. L'augmentation de l'activité de l'antithrombine peut donc être majorée au niveau des sites de blessures vasculaires où de l'héparane sulfate est libéré par les cellules endothéliales. La fixation de la structure pentasaccharidique de l'héparine à l'hélice α D de l'antithrombine implique des interactions entre les charges négatives du pentasaccharide et les charges positives de l'hélice α D qui subit alors un réarrangement avec maximalisation des interactions pentasaccharide - antithrombine, suivie d'une expulsion de la boucle RCL du feuillet β A. Ce mécanisme permet l'inhibition du facteur Xa. La séquence pentasaccharidique de l'héparine par elle-même est capable d'induire le changement de conformation de l'antithrombine, permettant l'accélération de l'inhibition enzymatique du facteur Xa mais pas de la thrombine [82].

Contrairement à l'inhibition du facteur Xa, il a longtemps été cru que l'inhibition de la thrombine par l'antithrombine était indépendante du changement de conformation de l'antithrombine et qu'elle ne nécessitait pas l'expulsion de la boucle RCL [77]. Il semblerait en fait que l'inhibition de la thrombine par l'antithrombine soit indépendante de l'extension de la portion N-terminale de la boucle RCL mais nécessite en revanche l'extension de la portion C-terminale [77, 83]. De plus, l'inhibition de la thrombine par l'antithrombine en présence d'héparine nécessite des chaînes hépariniques d'au moins 18 résidus glucidiques [84] dont les charges négatives interagissent avec les exosites chargés positivement de la molécule de thrombine, stabilisant l'interaction entre les deux molécules par un phénomène de pontage.

Par ailleurs, la neutralisation du facteur Xa et du facteur IXa pourrait également être accrue par des chaînes hépariniques de plus de 36 saccharides pontant l'antithrombine à ces protéases [79, 83].

Le rôle de l'antithrombine est primordial, comme peuvent l'attester les déficits constitutionnels hétérozygotes en antithrombine dont le caractère thrombogène est bien connu. Le déficit quantitatif homozygote en antithrombine est d'ailleurs létal puisque des souris knock-out pour l'antithrombine meurent *in utero* [85].

1.1.3.3. Système protéines C/S

Le dernier système inhibiteur est le système des protéines C et S : une partie de la thrombine générée au cours de la coagulation plasmatique se lie à la thrombomoduline, cofacteur présent de façon constitutive à la surface des cellules endothéliales, puis active la protéine C fixée sur son récepteur endothélial EPCR (Endothelial Protein C Receptor). Une fois activée, la protéine C clive et inactive les facteurs V/Va et VIII/VIIIa en présence de son cofacteur la protéine S [86, 87]. Ce système bloque donc l'amplification de la coagulation plasmatique. Nous ne détaillerons pas davantage ce système car les protéines mises en jeu n'interagissent pas directement avec le facteur Xa.

1.1.4. Fibrinolyse

La fibrinolyse est un processus lent à l'état physiologique qui permet la dégradation progressive du caillot de fibrine formé, le temps que la paroi endothéliale du vaisseau lésé soit réparée. Dans certaines circonstances pathologiques où se forment des thrombi, la fibrinolyse assure la reperméation des vaisseaux. Ce processus met en jeu plusieurs acteurs dont le principal est la plasmine, enzyme capable de dégrader la fibrine du caillot en petits fragments. La plasmine résulte de l'activation du plasminogène dont l'activateur principal (dans le plasma) est le t-PA sécrété par les cellules endothéliales. Cette activation requiert la fixation du t-PA et du plasminogène à la surface de la fibrine du caillot. La fibrinolyse est également soumise à une régulation négative au moyen d'inhibiteurs directs de la plasmine comme l' α 2-antiplasmine ou le TAFI (Thrombin Activable Fibrinolysis Inhibitor) qui bloque l'activation du plasminogène et au moyen d'inhibiteurs indirects comme le PAI (Plasminogen Activator Inhibitor) qui inhibe le t-PA [88].

1.2. Hémophilie

1.2.1. Définition

L'hémophilie est une maladie constitutionnelle rare de la coagulation liée à un déficit en facteur VIII ou facteur IX, responsable d'un déficit du complexe ténase intrinsèque, indispensable à l'amplification de la coagulation plasmatique. L'hémophilie A, caractérisée par un déficit en facteur VIII, représente les trois quarts des formes, et l'hémophilie B, caractérisée par un déficit en facteur IX représente le quart restant. En 2010, on recensait 5300 hémophiles en France, et on estime qu'un nouveau-né masculin sur 10.000 est atteint d'hémophilie A et 1/30.000 d'hémophilie B.

1.2.2. Génétique

L'hémophilie est une maladie héréditaire liée à l'X, consécutive à une mutation sur le gène du facteur VIII (ou du facteur IX) porté par le bras long du chromosome X. C'est la raison pour laquelle cette maladie touche quasi exclusivement les hommes. Les femmes dites conductrices portent un gène défectueux sur l'un de leurs deux chromosomes X qu'elles peuvent transmettre à leurs fils. Deux tiers des hémophilies sont transmises de façon héréditaire dans la descendance masculine par leur mère. Un tiers des formes sont des cas sporadiques dus à des mutations *de novo* où la mutation survient alors qu'aucun des parents ne la possède dans son patrimoine génétique : ces mutations surviennent habituellement dans un gamète d'un des deux parents, et plus rarement au niveau de l'œuf fécondé (mutation post-zygotique) [89-91].

Bien que la majorité des cas d'hémophilies concerne des individus de sexe masculin, certaines femmes conductrices peuvent avoir des taux bas de facteur VIII ou de facteur IX. En effet, au cours des premiers stades de la vie embryonnaire, l'inactivation aléatoire sous forme d'un corpuscule de Barr de l'un des deux chromosomes X dans chacune des cellules (également appelé phénomène de Lyonisation) aboutit en moyenne à l'inactivation du chromosome X portant le gène normal dans la moitié des cellules et l'inactivation du chromosome X portant le gène anormal dans l'autre moitié. De ce fait, les conductrices ont en moyenne des taux de facteur VIII ou facteur IX aux alentours de 50%. Toutefois, ce phénomène de Lyonisation peut être défavorable et conduire à l'inactivation du chromosome X normal dans la majorité des cellules, ce qui induit un défaut de synthèse du facteur VIII ou du facteur IX. Le phénomène de Lyonisation défavorable

explique que certaines conductrices d'hémophilie aient des taux abaissés de facteur VIII ou de facteur IX [92].

Plusieurs types d'anomalies génétiques du facteur VIII sont impliqués dans l'hémophilie A sévères : 50% d'entre elles sont dues à l'inversion de l'intron 22 [93] ; les autres anomalies sont des mutations non sens, faux sens, des petites ou des larges délétions ou l'inversion de l'intron 1.

Pour l'hémophilie B, les anomalies impliquées dans l'hémophilie sévère sont les mutations faux sens au niveau d'un acide aminé stratégique, les insertions ou délétions avec décalage du cadre de lecture, les mutations du promoteur du gène du facteur IX et les larges délétions du gène [94].

1.2.3. Histoire

Les maladies hémorragiques héréditaires sont connues depuis l'Antiquité. A cette époque, on ne pratiquait pas de circoncision chez un jeune garçon si deux de ses frères étaient déjà morts de cette procédure [95].

John Conrad Otto (1774-1844), médecin américain, rapporte pour la première fois dans la littérature moderne un cas d'hémophilie qu'il décrit comme une disposition hémorragique existant dans certaines familles et affectant les garçons. Le nom d'hémophilie fut donné plus tard en 1839 par Schonlein [95].

L'hémophilie fut longtemps appelée « maladie royale » car la reine Victoria d'Angleterre (1837-1901) était conductrice d'hémophilie. Le huitième fils de la reine Victoria, Léopold, atteint d'hémophilie, mourut d'une hémorragie cérébrale à l'âge de 31 ans. Deux de ses filles, étaient également conductrices de la maladie. Trois de ses petits fils et sept de ses arrière-petits-fils étaient affectés par la « maladie royale ». Le jeu des alliances répandit la maladie dans plusieurs familles royales européennes, notamment dans la maison royale de Prusse, dans la maison impériale de Russie et dans la maison royale d'Espagne.

Des analyses ADN furent réalisées en 1991 [96] sur la tombe supposée des Romanov (Maison impériale de Russie), exécutés par Lénine (dont le Tsar Nicolas II). L'analyse de l'ADN mitochondrial, transmis par la mère, confirma qu'il s'agissait bien de leur tombeau. La découverte d'une deuxième tombe en 2007 a permis d'identifier les restes du corps d'Alexis Nikolaïevitch de Russie (1904-1918), fils de Nicolas II et arrière-petit-fils de la Reine Victoria d'Angleterre; l'analyse ADN d'Alexis qui était porteur de la « maladie royale » a mis en évidence une mutation dans le site d'épissage de l'exon 4 du gène du facteur IX [97]. L'étude de l'ARN messager correspondant était compatible avec une forme sévère d'hémophilie B.

1.2.4. Diagnostic biologique

Le diagnostic biologique est évoqué devant la mise en évidence de l'allongement d'un test de coagulation *in vitro* appelé temps de céphaline activée (TCA). Le diagnostic est ensuite confirmé par un dosage abaissé du facteur VIII ou du facteur IX. La détermination du taux de facteur permet de classer les hémophilies selon une échelle de sévérité : il existe en effet une très bonne corrélation entre le taux de facteur et l'intensité des signes cliniques hémorragiques. Les hémophilies sont ainsi classées en formes sévères, modérées et mineures en fonction des taux de facteur VIII ou IX.

Les hémophiles sévères ont des taux de facteur VIII ou IX inférieur à 1 %. Les hémophiles dits modérés ont des taux compris entre 1 % et 5% tandis que les hémophiles mineurs ont des taux de facteur compris entre 6% et 40%. Les formes sévères et mineures représentent chacune 40% des formes d'hémophilie, les formes modérées constituant les 20% restants.

1.2.5. Signes cliniques

La symptomatologie clinique dépend beaucoup du taux de facteur.

Chez les hémophiles mineurs, les saignements ne sont jamais spontanés et font suite en général à un traumatisme grave ou à une intervention chirurgicale.

Chez les hémophiles modérés, des saignements peuvent survenir après des traumatismes peu importants.

Enfin, chez les hémophiles sévères, les hémorragies sont fréquentes. Les hémophiles sévères sont notamment sujets à des saignements intra-articulaires (appelés hémarthroses) qui peuvent survenir sans notion de traumatisme évident. Des hématomes intramusculaires peuvent également survenir à l'occasion de traumatismes minimes. Les premiers saignements surviennent généralement dans la première année de vie. Les hémarthroses touchent préférentiellement les articulations des genoux, des coudes et des chevilles. Des hémarthroses répétées sur la même articulation entraînent progressivement une destruction cartilagineuse pouvant conduire à une authentique arthropathie après plusieurs années. Par ailleurs, certains hématomes, de localisation dangereuse (hématomes intracrâniens, péri-laryngés, du plancher buccal, péri-orbitaires, ou comprimant un paquet vasculo-nerveux), peuvent mettre en péril le pronostic fonctionnel ou vital. L'espérance de vie d'un hémophile A sévère en l'absence de traitement est de seulement 16 ans. Les traitements disponibles dans les pays riches permettent d'atteindre

une espérance de vie de 63 ans dans le cas des formes sévères (patients non contaminés par le VIH) et de 75 ans pour les formes mineures à modérées [98].

1.2.6. Diagnostic prénatal

En France, un diagnostic prénatal est proposé aux femmes enceintes conductrices d'hémophilie A ou B sévère et porteuses d'un fœtus de sexe masculin. Le sexe fœtal peut être déterminé à 10 semaines d'aménorrhée sur le sang veineux maternel puis confirmé plus tard par les données échographiques. S'il s'agit d'un fœtus de sexe masculin, un diagnostic prénatal est proposé aux parents : il consiste à déterminer si le fœtus masculin est porteur d'hémophilie sévère, le plus souvent au moyen d'un diagnostic génotypique qui consiste à rechercher l'anomalie génétique déjà identifiée dans la famille et chez la mère, sur un prélèvement de villosités choriales effectué vers 12 semaines d'aménorrhée. Si aucune anomalie génétique n'avait été identifiée auparavant dans la famille (famille dite « non informative ») mais que la mère est conductrice obligatoire d'hémophilie sévère (fille d'hémophile A sévère), le diagnostic prénatal impose le dosage du facteur VIII ou du facteur IX sur un prélèvement de sang de cordon à 22 semaines d'aménorrhée : cette situation reste toutefois exceptionnelle [99]. Dans le cas où le fœtus masculin est porteur d'une hémophilie sévère, une interruption thérapeutique de grossesse est proposée à la mère.

1.2.7. Complications

Les patients hémophiles sont bien entendu exposés à des complications hémorragiques dont la survenue est en grande partie conditionnée par le degré de sévérité de l'hémophilie.

1.2.7.1. Arthropathie hémophilique

Les hémophiles sévères sont exposés au développement d'une arthropathie (dite hémophilique), conséquence inéluctable d'hémarthroses répétées. Elle peut aboutir à une impotence fonctionnelle et à d'importantes déformations articulaires. La répétition des hémarthroses constitue un véritable cercle vicieux où les saignements intra-articulaires itératifs libèrent du fer, responsable d'une destruction cartilagineuse et d'une inflammation de la membrane synoviale. La membrane synoviale inflammatoire et hyper-vascularisée re-saigne alors plus facilement.

Dans les pays riches, les patients hémophiles sévères bénéficient, dans l'enfance et l'adolescence, d'une prophylaxie par concentrés de facteurs VIII ou IX consistant en des injections intraveineuses de ces concentrés de facteur VIII ou de facteur IX plusieurs fois par semaine. L'objectif est de maintenir un taux de facteur VIII (ou facteur IX) résiduel supérieur à 1% pour prévenir les hémarthroses. Cette prophylaxie est mise en place tôt dans l'enfance, généralement dès la survenue de la ou des premières hémarthroses vers l'âge de un ou deux ans, et poursuivie pendant la croissance articulaire où le risque d'hémarthrose est accru. A l'âge adulte, cette prophylaxie n'est généralement envisagée que de façon séquentielle devant des hémarthroses répétées survenant sur une articulation cible.

1.2.7.2. VIH et Hépatites virales

La communauté des hémophiles a payé un lourd tribut avec de nombreux cas de contamination virale par le VIH [100] et par les hépatites B et C survenues avant 1987 dues à l'injection de concentrés de facteur d'origine plasmatique et aux transfusions de produits sanguins labiles. Depuis, les procédés de fabrication, de purification et de sécurisation (sélection des donneurs, traitement par solvant détergent ou par la chaleur et nano-filtration) ont augmenté la sécurité d'utilisation des concentrés de facteur d'origine plasmatique. A ce jour, aucun cas de transmission virale par concentrés de facteur VIII ou IX d'origine plasmatique n'a été rapporté depuis 1987.

1.2.7.3. Inhibiteurs anti-facteurs

1) Définition

La survenue d'inhibiteurs au décours d'un traitement substitutif complique énormément la prise en charge puisque ces inhibiteurs neutralisent les facteurs VIII ou IX « médicaments » administrés. Ce sont des immunoglobulines G dirigées contre les domaines des chaînes légères ou des chaînes lourdes du facteur VIII (ou facteur IX). De tels anticorps se développent chez 10 à 30 % des hémophiles A sévères [4] et chez 1 à 3% des hémophiles B sévères [5]. Bien que cela soit beaucoup plus rare, des inhibiteurs peuvent également apparaître chez des hémophiles modérés ou mineurs [101].

On peut aussi observer des inhibiteurs de type auto-anticorps anti-facteur VIII qui apparaissent chez des patients non hémophiles, indépendamment de tout traitement substitutif : ils sont responsables d'une pathologie auto-immune appelée hémophilie acquise au cours de laquelle le facteur VIII endogène est neutralisé.

2) Mécanisme d'action

Les inhibiteurs anti-facteur VIII et anti-facteur IX peuvent neutraliser le facteur VIII ou le facteur IX par trois grands mécanismes : soit par hydrolyse catalytique (50 % des cas) [102], soit par encombrement stérique, soit en formant des complexes immuns qui accroissent la clairance du facteur VIII ou du facteur IX (anticorps non neutralisants) [103]. Compte tenu du caractère polyclonal des anticorps, les différents mécanismes peuvent être intriqués.

3) Détection et titration

Le titre d'inhibiteur est déterminé par la méthode Bethesda ou méthode Nijmegen (méthode Bethesda modifiée tamponnée) : la méthode Bethesda mesure la neutralisation de l'activité pro-coagulante du facteur VIII ou du facteur IX d'un plasma normal par le plasma du patient hémophile. Une unité Bethesda (UB) correspond à la quantité d'anticorps capable d'inhiber 50% de l'activité pro-coagulante des facteurs. Les inhibiteurs non neutralisants ne sont donc pas détectés par cette méthode mais peuvent être mis en évidence au moyen de dosages immunologiques par ELISA ou immuno-précipitation. La titration de l'inhibiteur permet de classer les patients en « faibles répondeurs » ou « forts répondeurs » en fonction de la réponse anamnesticque à la réintroduction de facteur VIII. Un patient est dit « faible répondeur » si le titre d'inhibiteurs reste inférieur ou égal à 5 UB/ml et « fort répondeur » si le titre est supérieur 5 UB/ml à la réintroduction du facteur VIII [104].

4) Facteurs de risque

La survenue d'inhibiteurs est régie par des facteurs de risque propres au patient et d'autres liés à son environnement. Ces facteurs de risque sont surtout connus pour l'hémophilie A bien plus fréquente que l'hémophilie B.

Les facteurs liés au patient pour l'hémophilie A sont nombreux : le caractère sévère de l'hémophilie [101], l'existence d'antécédents familiaux d'inhibiteurs [105], certaines anomalies génétiques (larges délétions, mutations non sens et inversions), l'origine ethnique (fréquence 2 à 4 fois plus élevée chez les populations noires [106]). Certains polymorphismes sur les gènes du système HLA de classe II et certaines cytokines (TNF alpha, IL-10) pourraient également influencer ce risque [107].

Les facteurs de risque extrinsèques au patient sont une substitution intensive en contexte inflammatoire [108], un traitement intensif par concentrés de facteur VIII au décours d'une

chirurgie. A l'inverse, une prophylaxie régulière diminuerait de 60% le risque de survenue (Etude CANAL) [108] par anergie périphérique des lymphocytes T.

Le type de concentré de facteur (plasmatique ou recombinant) donne toujours lieu à un vaste débat quant au risque de développer des inhibiteurs chez les hémophiles A sévères. Certains auteurs rapportent une incidence plus faible avec les produits plasmatiques [109]. Certains auteurs avancent un effet bénéfique du facteur Willebrand [110] ou de molécules immuno-régulatrices comme le TGF beta [111] contenues dans les concentrés d'origine plasmatiques. D'autres équipes n'ont en revanche mis en évidence aucune différence significative avec les deux types de concentrés [108, 112, 113].

Pour l'hémophilie B, le choix du type de concentré de facteur IX fait moins débat [114, 115] dans la mesure où il n'a jamais été rapporté de différence de fréquence de survenue d'inhibiteurs entre les deux types de concentrés de facteur IX.

La période la plus à risque pour développer des inhibiteurs correspond aux 50 premiers JCPA (jours cumulés de présence de l'antigène) qui correspondent aux 50 premiers jours pendant lesquels le patient hémophile reçoit une ou plusieurs injections de concentrés de facteur. Le risque diminue de façon très importante au-delà du 200^{ème} JCPA. L'âge moyen de survenue d'un inhibiteur chez un hémophile sévère est de un à deux ans (après 9 à 12 mois de traitement [116]).

5) Induction de tolérance immune

L'éradication d'un inhibiteur fait appel à des protocoles d'induction de tolérance immune. Cette stratégie, pratiquée depuis plus de trente ans [5] consiste à administrer des concentrés de facteur VIII ou IX de façon très régulière et dont les doses varient selon les protocoles. L'objectif est d'induire une anergie immunitaire pour que le système immunitaire finisse par tolérer le facteur VIII (ou facteur IX) « médicament » administré.

Pour l'hémophilie A, le choix des protocoles est orienté par des recommandations (AFSSAPS 2006, [5]). Les schémas comprennent 3 à 14 injections intraveineuses par semaine de concentrés de facteur VIII pendant plusieurs mois. Une fois l'inhibiteur disparu, les doses de facteurs administrés sont progressivement diminuées.

Pour l'hémophilie B, il n'y a pas de recommandation et les réponses à l'induction de tolérance immune sont le plus souvent mauvaises. De plus, compte tenu des risques allergiques et du risque de syndrome néphrotique associés, le rapport bénéfice / risque doit être méthodiquement évalué [5].

6) Impact médical

Jusqu'au début des années 1990, la mortalité globale des hémophiles avec inhibiteurs était deux fois plus élevée que celle des hémophiles sans inhibiteurs et non contaminés par le VIH. Cette mortalité plus élevée était essentiellement liée à la survenue d'accidents hémorragiques [98, 117].

Grâce à une utilisation plus large du FEIBA[®] puis à la mise sur le marché du facteur VII activé en 1996 et à la mise en place de protocoles d'induction de tolérance immune, cette différence de mortalité s'est atténuée dans les pays développés. Cependant, les traitements par facteurs de la coagulation activés (FEIBA[®] et facteur VIIa recombinant) ne fonctionnent pas sur tous les épisodes hémorragiques et nécessitent souvent de répéter les injections là où une seule injection de concentré de facteur VIII aurait suffi à traiter un épisode hémorragique simple chez un hémophile A sévère sans inhibiteur [118]. Les durées d'hospitalisation sont également plus longues (1,7 fois) chez les patients hémophiles avec inhibiteurs par rapport aux hémophiles sans inhibiteurs [119].

7) Impact économique

Une nette progression des coûts de prise en charge des patients hémophiles avec inhibiteurs a été observée depuis 1996. Cette date correspond à la mise sur le marché du facteur VII activé recombinant et à la mise en œuvre plus large de protocoles d'induction de tolérance immune [120].

D'une part, les protocoles d'induction de tolérance immune sont extrêmement coûteux du fait de l'administration répétée de facteur VIII ou facteur IX sur des périodes prolongées. Auerswald rapporte des coûts annuels allant de 1,15 million d'euros pour un enfant à 5,75 millions d'euros pour un adulte [110]. Le succès d'une induction de tolérance immune permettrait en revanche d'augmenter l'espérance de vie de plusieurs années [121].

D'autre part, les thérapeutiques court-circuitantes (FEIBA[®] et facteur VIIa recombinant) sont très onéreuses et on sait que les coûts de prise en charge des patients hémophiles avec inhibiteurs sont essentiellement liés aux traitements hémostatiques. Gringeri et al rapportent dans l'étude COCIS que 99 % des dépenses sont liées aux traitements hémostatiques, dont 48% sont liées à l'utilisation du facteur VIIa recombinant et 17% liées à l'utilisation du FEIBA[®] [3]. Le coût des traitements hémostatiques pour des patients avec inhibiteurs est globalement trois fois supérieur à celui de patients sans inhibiteurs [120]. Cependant, il faut prendre en compte qu'une petite proportion de patients avec inhibiteurs a des coûts de prise en charge beaucoup plus élevés que la moyenne :

Chang et al rapportaient déjà en 1999 que le traitement des patients avec inhibiteurs coûtait en moyenne 2,25 fois plus cher que le traitement de patients sans inhibiteur [122] mais la médiane se situait seulement à 1,13 fois plus cher. Une autre étude plus récente, prospective sur 18 mois, menée chez 52 patients, révélait des coûts moyens de l'ordre de 18 000 euros/mois alors que 46% des patients avaient des coûts bien inférieurs à 5 000 euros/mois et qu'un patient (2%) avait un coût cinq fois supérieur à la moyenne aux alentours de 100 000 euros/mois [3]. L'évaluation du coût de traitement d'un patient avec inhibiteurs est donc individuellement extrêmement difficile [123].

8) Hémophilie acquise

L'apparition d'auto-anticorps anti-facteur VIII responsable de cas d'hémophilie A acquise reste relativement rare avec une incidence de l'ordre de 1,5 cas pour un million d'habitants chaque année [124]. Les cas d'auto-anticorps anti-facteur IX sont encore bien plus exceptionnels [125]. L'âge moyen de survenue est supérieur à 75 ans. La plupart sont des formes idiopathiques mais on identifie aussi des formes associées à des maladies auto-immunes, à des néoplasies, à des hémopathies, au post-partum et des formes iatrogéniques liées à la prise de certains médicaments [126]. Les manifestations hémorragiques sont habituellement brutales et sévères et avant tout situées au niveau cutané et musculaire sous forme d'ecchymoses et d'hématomes extensifs. Des hémorragies viscérales peuvent également toucher le tube digestif, les voies urinaires ou le système nerveux central. La mortalité globale est de l'ordre de 15 à 20%, dont 9% pour la mortalité liée au syndrome hémorragique. Le diagnostic biologique est évoqué devant un allongement isolé du temps de céphaline activée et la mise en évidence d'une baisse du facteur VIII. Le diagnostic est confirmé par la mise en évidence d'inhibiteur anti-facteur VIII. Le traitement hémostatique fait appel aux thérapeutiques court-circuitantes : FEIBA[®] et Novoseven[®] [127], tandis que le traitement étiologique fait appel à l'utilisation de corticoïdes associés ou non à des immunosuppresseurs.

1.2.8. Traitements hémostatiques

Actuellement, il n'existe aucun traitement curatif de l'hémophilie. Les mesures thérapeutiques reposent avant tout sur la prévention et le traitement des accidents hémorragiques en administrant un traitement à visée hémostatique. Il consiste en premier lieu en l'administration intra-veineuse de concentrés de facteur VIII ou de facteur IX ou en l'utilisation de la desmopressine. D'autres traitements comme les anti-fibrinolytiques (acide tranexamique) peuvent être utilisés de façon adjuvante ou parfois seuls.

Lorsque l'hémophilie est compliquée d'inhibiteurs anti-facteur VIII ou anti-facteur IX, le recours à des agents thérapeutiques court-circuitants (FEIBA[®], Novoseven[®]) est requis pour rétablir la coagulation. Dans l'hémophilie B, compte tenu du risque de relance anamnestic d'un inhibiteur lié à la présence de facteur IX dans le FEIBA[®], le facteur VIIIa recombinant est privilégié (AFSSAPS 2006).

1.2.8.1. Traitement de l'hémophilie sans inhibiteurs

1) Concentrés de facteur VIII et IX

Le traitement substitutif fait appel à deux types de concentrés de facteurs : les facteurs d'origine plasmatique purifiés à partir du plasma de donneurs sains, et les facteurs d'origine recombinante produits par génie génétique. Ces traitements s'administrent exclusivement par voie intraveineuse et sont extrêmement onéreux.

Avant 1964, les concentrés de facteurs n'existaient pas encore et les patients hémophiles devaient être traités par transfusion de plasmas nécessitant des volumes transfusionnels très importants. En 1964, Judith Graham Pool (1914-1975) découvre un moyen de séparer le facteur VIII du plasma : c'est la « cryoprécipitation » : quand du plasma frais congelé est réchauffé doucement à 4°C, il se divise en deux phases séparables par centrifugation ; la couche inférieure, plus dense, appelée cryoprécipité, contient dix fois plus de facteur VIII que le surnageant de plasma. Ce cryoprécipité est riche en facteur VIII, en facteur Willebrand, en fibrinogène et en facteur XIII et peut être conservé après congélation. Il sera utilisé directement comme médicament après perfusion notamment dans les programmes thérapeutiques de l'hémophilie en Italie et aux Etats Unis dans les années 1970 [128]. A cette époque, dans d'autres pays européens (France, Suède, Royaume Uni, Pays Bas), ce cryoprécipité n'était pas utilisé directement mais servait à la fabrication de facteur VIII dont la pureté était relativement faible à l'époque.

Pour l'hémophilie B, on utilisait des concentrés de complexe prothrombinique : les méthodes de purification nécessaires à l'obtention de ces concentrés étaient basées sur l'adsorbabilité spécifique des facteurs vitamine K dépendants, initialement sur résine échangeuse d'ions [129].

En 1975, on décrit chez des patients hémophiles des cas d'hépatites chroniques dont on ignore alors qu'il s'agit de cas d'hépatite C, transmise par des produits dérivés du sang. En 1982, on rapporte les premiers cas de SIDA chez des patients hémophiles [130]. Par la suite, des milliers d'hémophiles sont morts du SIDA dans les années 80 et 90. Devant ces cas de transmission virale, l'industrie pharmaceutique a développé des méthodes physiques (chauffage à sec en 1983, nano-filtration au début des années 90) et chimiques

(inactivation virale par solvant détergent) de sécurisation des concentrés d'origine plasmatisque. Les concentrés produits après 1987 deviennent alors beaucoup plus sûrs. Depuis cette date, aucun cas de transmission virale n'a été rapporté avec l'utilisation des concentrés de facteurs d'origine plasmatisque. De nos jours, les donneurs sont en plus minutieusement sélectionnés, les plasmas sont testés (sérologies et détection virale par PCR) et déleucocytés. De plus, les étapes de purification des facteurs comprennent des étapes d'inactivation virale par solvant détergent, une étape de nanofiltration et plusieurs étapes chromatographiques [131].

Les années 80 sont marquées par des progrès importants dans le domaine de la génétique : les ADN complémentaires des facteurs VIII et IX sont clonés respectivement en 1984 et 1982. Ces facteurs seront produits en culture cellulaire après transfection de cellules mammifères par des plasmides où sont insérés les gènes du facteur VIII ou du facteur IX. C'est en 1989 que des patients hémophiles bénéficient pour la première fois d'un traitement par concentrés de facteur VIII d'origine recombinante [132] ; il faudra attendre 1997 pour le facteur IX recombinant [133]. Le génie génétique a permis d'augmenter l'accès aux thérapies substitutives : ce fut un progrès majeur dans la prise en charge des patients. Compte tenu des besoins mondiaux conséquents et non satisfaits en facteur VIII, le facteur VIII pourrait être également produit à large échelle par des animaux génétiquement modifiés [134] qui sécrètent directement le facteur VIII dans leur lait, que l'on purifierait ensuite.

2) Desmopressine

La desmopressine (1-déamino-8-D-argino vasopressine ou DDAVP) est un traitement hémostatique envisageable chez l'hémophile A mineur. La desmopressine a d'abord été mise sur le marché pour ses propriétés anti-diurétiques dans le traitement du diabète insipide. Le développement de la desmopressine s'est basé sur des modifications structurales de l'hormone naturelle AVP (Argino-vasopressine ou hormone anti-diurétique) : la déamination de la cystéine en position 1 et la substitution de la L-Arginine par une D-Arginine ont permis d'augmenter la durée d'action anti-diurétique et de diminuer ses propriétés vasopressives [135]. Il a ensuite été montré que la desmopressine augmentait les taux circulants de facteur VIII et de facteur Willebrand en mobilisant les stocks endothéliaux. La desmopressine fut alors utilisée pour la première fois avec succès en 1977 [136] pour prévenir des saignements post-opératoires lors d'interventions chirurgicales réalisées chez des patients hémophiles A mineurs ou porteurs d'une maladie de Willebrand.

La desmopressine peut s'administrer aussi bien par voies intraveineuse, nasale ou sous-cutanée (bien que cette dernière voie ne soit guère utilisée). Ses propriétés anti-diurétiques imposent une restriction hydrique. Son effet hémostatique s'épuise dans le temps après quelques administrations répétées et rapprochées. Enfin, étant incapable d'augmenter les taux de facteur IX, la desmopressine n'est guère efficace chez les patients hémophiles B.

3) Antifibrinolytiques

L'acide tranexamique est un médicament antifibrinolytique qui ne joue pas directement sur la coagulation plasmatique proprement dite mais protège le caillot constitué de l'action fibrinolytique de la plasmine. L'acide tranexamique se fixe au plasminogène et bloque son activation en plasmine. Il peut être utilisé seul lorsque le risque hémorragique est très faible, ou de façon adjuvante pour obtenir une action synergique avec les concentrés de facteurs.

1.2.8.2. *Traitement de l'hémophilie avec inhibiteurs*

La présence d'inhibiteurs anti-facteur VIII ou anti-facteur IX complique grandement la prise en charge des patients hémophiles puisque les inhibiteurs neutralisent les concentrés de facteur VIII ou IX administrés. Lorsque le titre d'inhibiteurs est faible, il est possible d'administrer des doses élevées de concentrés de facteurs VIII ou IX pour saturer l'inhibiteur. Cependant, cette stratégie n'est plus guère adoptée compte tenu des risques de relance de l'inhibiteur en présence de l'antigène et des quantités importantes nécessaires de facteur VIII. Une autre stratégie consiste à administrer des concentrés de facteur VIII porcin dont la séquence peptidique est différente : celui-ci est plus résistant à la neutralisation par les inhibiteurs développés chez l'Homme [137]. Cette stratégie est cependant abandonnée du fait de la disponibilité d'autres traitements hémostatiques court-circuitants qui ont prouvé leur efficacité : le facteur VII activé recombinant (Novoseven[®]) commercialisé par la société Novonordisk et les concentrés de complexe prothrombinique activé, FEIBA[®] (Factor Eight Inhibitor Bypassing Activity) commercialisé par la société Baxter. Ces médicaments court-circuitent le complexe ténase intrinsèque, déficitaire chez l'hémophile : ils sont donc capables de restaurer la génération de thrombine indépendamment des facteurs VIII et IX (constituant le complexe ténase intrinsèque). Ces deux thérapeutiques s'administrent par voie intraveineuse. Cinq à dix pour cent des épisodes hémorragiques ne répondent malheureusement pas à ces traitements [8].

1) Concentrés de complexe prothrombinique activé (FEIBA®)

Le FEIBA® (Factor Eight Inhibitor Bypassing Activity) est d'origine plasmatique et obtenu à partir du cryosurnageant. Il contient les facteurs vitamine K dépendants sous forme de zymogène et en partie sous forme activée (surtout le facteur VII, tableau1) [138].

	U de facteur par U de FEIBA® (± DS)
II	1,3 ± 0,3
VII	0,9 ± 0,1
IX	1,4 ± 0,2
X	1,1 ± 0,2
PC	1,1 ± 0,2
IIa	0,01 ± 0.004
VIIa	1,5 ± 0,2
IXa	0,0006
Xa	0,06 ± 0.002

Tableau 1 : Composition du FEIBA®
(d'après Luu H et al [138])

A la fin des années 1970, on a rapporté des cas de patients hémophiles avec inhibiteurs, traités avec succès par concentrés de complexe prothrombinique non activé (PPSB) [139, 140]. Une étude menée par le comité international de la thrombose et de l'hémostase menée entre 1978 et 1979 montra cependant que l'efficacité du PPSB chez un hémophile avec inhibiteurs était moindre que celle des concentrés de facteur VIII [141] chez un hémophile sans inhibiteurs. Les concentrés de complexe prothrombinique contenant des fractions activées (FEIBA®) devinrent disponibles en 1981 [128]. Des études ont comparé l'efficacité du FEIBA® au PPSB dans le traitement des hémarthroses et des hémorragies intramusculaires : l'une d'entre elles montra une efficacité de 64% pour le FEIBA® contre 52% pour le PPSB [142] ; une autre ne retrouvait pas de différence d'efficacité entre ces deux traitements [143]. Des études prospectives plus récentes [8, 144] ont retrouvé une efficacité comprise entre 65% et 96% pour le FEIBA® dans le traitement des hémarthroses.

L'utilisation du FEIBA® présente cependant certaines limites. Son administration pourrait relancer un inhibiteur [145] à cause du facteur IX ou des traces de facteur VIII qu'il contient. De plus, de par son origine plasmatique, il persiste un risque, au moins théorique de nos jours, de transmission infectieuse notamment virale pour les virus du VIH, de l'hépatite B et de l'hépatite C. Enfin, de rares cas de thromboses, notamment d'infarctus du myocarde, ont été rapportés [146].

2) Facteur VII activé recombinant (Novoseven®)

Le facteur VII activé recombinant est obtenu par génie génétique. Son efficacité serait liée d'une part à l'augmentation de la concentration du complexe ténase extrinsèque, en se combinant au facteur tissulaire relargué au niveau de la brèche vasculaire ; d'autre part, il serait capable d'activer directement les facteurs X et IX à la surface des plaquettes activées, indépendamment du facteur tissulaire [147, 148].

En 1981, l'équipe d'Hedner teste pour la première fois et avec succès du facteur VII activé d'origine plasmatique dans un modèle d'hémophilie canine [149]. Ce facteur VIIa avait été obtenu par purification du facteur VII humain plasmatique qui avait été ensuite activé par du facteur XII activé humain. Peu de temps après, il avait été administré avec succès à un patient hémophile avec inhibiteurs pour une hémorragie musculaire [150]. Devant de bons résultats observés chez plusieurs patients, la preuve d'efficacité fut établie.

Dans les années 80, grâce à l'avènement du génie génétique, du facteur VII activé est produit pour la première fois de façon recombinante dans des cellules BHK (Baby Hamster Kidney) [151, 152]. En 1985, les compagnies Bio Tech ZymoGenetics et Novonordisk collaborent pour développer un facteur VII activé recombinant. Des études de pharmacologie montrent que le facteur VII activé recombinant est capable de normaliser le temps de saignement de souris et de normaliser le temps de Quick de rats traités à la warfarine. Il a permis aussi de rétablir l'hémostase dans un modèle d'hémophilie canine [153]. En 1988, le développement clinique du facteur VIIa recombinant est lancé : un premier patient hémophile avec inhibiteur est traité avec succès au cours d'une synovectomie [154]. La phase I du développement commence en 1989. Un programme d'utilisation du facteur VIIa recombinant est alors proposé aux Etats-Unis dans les situations d'échec du traitement usuel lors de saignements menaçant le pronostic vital ou fonctionnel chez l'hémophile avec inhibiteurs. Les autorisations de mise sur le marché sont obtenues en 1996 en Europe, en 1999 aux Etats-Unis et en 2000 au Japon [149].

L'efficacité hémostatique est satisfaisante dans 90% des cas pour les chirurgies majeures (PTH, PTG) [155] et dans plus de 80% des épisodes hémorragiques [8, 156, 157]. De plus, la production par génie génétique rend le risque de transmission virale liée au sang théoriquement nul. Tout comme pour le FEIBA®, de rares cas de thrombose ont été rapportés avec une incidence de 25 pour 100.000 perfusions de Novoseven® [146] : la plupart des épisodes rapportés sont des thromboses artérielles qui siègent majoritairement au niveau cérébral. La limite principale du Novoseven® est sa demi-vie courte d'environ trois heures qui nécessite des injections intraveineuses souvent nombreuses et répétées.

1.3. Nouvelles approches thérapeutiques dans l'hémophilie

La lourdeur des traitements chez l'hémophile avec ou sans inhibiteur a incité au développement de nouvelles thérapeutiques. Les prochaines innovations concernent le développement de facteurs VIII et IX recombinants à demi-vie prolongée qui permettront d'alléger la prise en charge des hémophiles, en particulier sévères, en diminuant la fréquence des injections intraveineuses. D'autres innovations vont concerner la thérapie génique qui a fait des progrès considérables ces dernières années, en particulier dans l'hémophilie B pour laquelle des premiers essais cliniques ont été récemment publiés.

Le développement d'inhibiteurs constitue une complication majeure avec des impacts médicaux et économiques importants. Dans ce secteur, il existe une réelle nécessité de développer de nouvelles alternatives puisque 5 à 10% des épisodes hémorragiques chez les patients hémophiles avec inhibiteurs ne répondent pas de façon satisfaisante aux thérapeutiques court-circuitantes actuelles (FEIBA[®] et facteur VIIa recombinant) et que ces traitements sont extrêmement onéreux.

Il y a actuellement plusieurs axes de développement dans le domaine des thérapies hémostatiques des patients hémophiles avec ou sans inhibiteur, qui reposent sur l'optimisation du facteur VIIa (facteur VIIa à demi-vie prolongée, facteur VIIa à haute activité, traitement combiné), sur la neutralisation des inhibiteurs physiologiques de la coagulation (TFPI, Protéine C activée) et sur des approches basées sur le facteur Xa ou sur la génération de microparticules circulantes procoagulantes.

1.3.1. Facteurs VIII et IX optimisés

1.3.1.1. Facteur VIII à longue durée d'action

Les traitements substitutifs prophylactiques au long cours chez les hémophiles sévères imposent de renouveler les injections intraveineuses une à trois fois par semaine. Cette fréquence d'administration est directement liée aux demi-vies du facteur VIII (12 heures) et du facteur IX (20 heures). Différentes stratégies visent à allonger la demi-vie du facteur VIII et du facteur IX. La plupart de ces approches consistent à conjuguer les facteurs VIII ou IX à des molécules de haut poids moléculaire comme le polyéthylène glycol (PEG).

Une première approche a consisté à développer un facteur VIII sous une forme liposomale pégylée, où une molécule de facteur VIII recombinant était liée de façon non covalente à la surface d'un liposome pégylé [158]. Les concepteurs pensaient que le PEG

fixé au liposome augmenterait la demi-vie du facteur VIII et que les liposomes pourraient apporter le facteur VIII à la surface pro-coagulante des plaquettes. Malheureusement, ni la demi-vie ni l'efficacité n'ont été augmentées et cette voie de développement a été abandonnée [159].

Une deuxième approche a consisté à pégyler directement le facteur VIII de façon dirigée. Les méthodes de pégylation aléatoire (non dirigée) de protéines peuvent altérer leur fonction par encombrement stérique en gênant les interactions avec leurs ligands naturels. La « pégylation dirigée » consiste à introduire des cystéines dans la séquence du facteur VIII au niveau de zone n'interagissant pas avec les ligands physiologiques (facteur Willebrand, facteur IX, facteur X, thrombine) : ces cystéines, réduites, sont ensuite pégylées. Cette méthode augmente la probabilité de ne pas altérer les propriétés naturelles du facteur VIII. Elle a été utilisée pour lier de façon covalente le PEG à un facteur VIII dépourvu du domaine B (rBDD-FVIII). Cette approche laissait espérer que la demi-vie allait être augmentée de façon importante. Or, il s'avère que les tests réalisés en modèle murin n'ont montré qu'une augmentation de deux fois de la demi-vie. Cela s'explique par le fait que l'élimination du facteur VIII est hautement dépendante de la clairance du facteur Willebrand auquel il est lié dans le milieu plasmatique. Dans un modèle d'hémorragie murine, le facteur VIII pégylé a cependant montré une efficacité prolongée par rapport au facteur VIII non pégylé [160].

Une troisième approche pour augmenter la demi-vie du facteur VIII consiste à fusionner le facteur VIII avec le fragment Fc des immunoglobulines humaines IgG. Cette protéine hybride a été produite de façon recombinante. Le fragment Fc des IgG1 se fixe aux récepteurs FcRn qui protègent les protéines d'une dégradation catalytique. La fusion Fc n'affecte pas l'activité du facteur VIII qui est comparable à celle du facteur VIII lors de tests de section de queue réalisés chez des souris. La demi-vie en modèle murin est doublée. La protéine FVIII-Fc a également été bien tolérée lors d'essais en modèle canin [161].

1.3.1.2. Facteur IX à longue durée d'action

La société Novornodisk développe actuellement un facteur IX recombinant glyco-pégylé à demi-vie longue. Les essais cliniques de pharmacocinétique ont montré une demi-vie multipliée par 5 (93 heures en moyenne contre 19 heures pour le facteur IX recombinant non pégylé et 18h pour le facteur IX d'origine plasmatique) [162]. Un essai de phase 3 est actuellement en cours.

De même que pour le facteur VIII, la stratégie de fusion du fragment effecteur Fc des immunoglobulines IgG1 [163] a été utilisée avec le facteur IX. La demi-vie de la

protéine chimérique FIX-Fc a été accrue de 3 à 4 fois dans différents modèles animaux (souris, rats, chiens et singes). La liaison de la protéine de fusion FIX-Fc au récepteur FcRn des immunoglobulines la protège du catabolisme et permet de conserver l'activité du facteur IX de façon durable.

1.3.1.3. Facteur IX à activité catalytique accrue

Le facteur IXa possède une très faible capacité d'activation du facteur X en l'absence de son cofacteur, le facteur VIIIa, qui augmente l'activation du facteur X par un facteur 10^4 [164]. L'une des voies actuelles de développement est la conception de variants du facteur IX dont l'efficacité catalytique, une fois qu'ils ont été activés, est accrue en l'absence de facteur VIII. Naturellement, le facteur IX possède une boucle (dite boucle 99) dont la conformation bloque l'accès des substrats au site catalytique en l'absence de facteur VIIIa [165]. Sichler et al (2003) avaient montré que la substitution de certains acides aminés du facteur IX (Y94F, K98T et Y177 F) permettait d'augmenter le clivage du substrat D-NLe-Gly-Arg-pNA de 7000 fois [166]. Ces mutations ont été reprises (avec d'autres) pour créer des variants « hyperactifs » du facteur IX y compris en l'absence de facteur VIII dans l'espoir de les utiliser un jour chez des patients hémophiles avec inhibiteurs. Les résultats publiés se limitent pour l'instant à des investigations *in vitro*.

1.3.2. Thérapie génique

L'hémophilie a longtemps été considérée comme incurable. Les récents essais cliniques de thérapie génique dans l'hémophilie B (phase I) et les essais précliniques dans l'hémophilie A ont fait naître un énorme espoir de guérison, ou du moins l'espoir d'atténuer de façon durable les manifestations hémorragiques dans les formes sévères.

La thérapie génique avec les gènes du facteur VIII et du facteur IX pourrait de plus être associée à une diminution de l'incidence des inhibiteurs, puisqu'elle vise à induire un état prophylactique permanent, connu pour être associé à une fréquence moindre de survenue d'inhibiteurs anti-facteur VIII. Par ailleurs, certaines approches cellulaires ont même envisagé d'introduire un gène codant pour le facteur VII sous sa forme déjà activée.

La thérapie génique est basée sur le transfert *in vivo* ou *ex vivo* de gènes (codant pour le facteur VIII ou le facteur IX) dans le génome d'un hôte pour permettre l'expression *in vivo* des protéines codées, c'est-à-dire les facteurs de coagulation dans l'hémophilie. Les vecteurs viraux AAV (Adenovirus Associated Virus) et les lentivirus sont aujourd'hui les vecteurs les plus prometteurs.

Des premiers résultats encourageants ont récemment été obtenus chez l'Homme dans l'hémophilie B sévère [167]. Pour l'hémophilie A, les progrès sont moins avancés mais des résultats intéressants ont été observés dans des modèles murins et canins [168].

Les premières tentatives réussies de thérapie génique dans l'hémophilie B datent des années 1990. La stratégie était alors basée sur la transduction *ex vivo* de fibroblastes humains au moyen d'un rétrovirus contenant l'ADN complémentaire du facteur IX. Ces fibroblastes étaient ensuite injectés au niveau sous-cutané [169]. Pour le facteur IX, ces stratégies de thérapie cellulaire *ex vivo* ont finalement cédé leur place aux approches de thérapies géniques *in vivo*, plus pratiques. L'hémophilie B est en effet une candidate idéale pour ce type d'approche : d'une part, l'ADN complémentaire du facteur IX, relativement court (1,5 kb), peut être facilement inséré dans les vecteurs plasmidiques de type AAV qui sont des vecteurs de choix car non pathogènes et pouvant cibler le foie, lieu de synthèse du facteur IX ; d'autre part, les concentrations physiologiques requises de facteur IX sont assez faibles. Enfin, il existe de bons modèles animaux et la réponse thérapeutique est facilement mesurable. Après de bons résultats obtenus chez l'animal, une correction à long terme du phénotype d'hémophilie B a été observée chez l'Homme [167]. Six patients hémophiles sévères ont bénéficié de ce traitement au cours d'un essai clinique : leur taux de facteur IX, initialement inférieur à 1% a augmenté entre 2 et 10% ; bien que ces taux restent insuffisants en cas de traumatisme ou de chirurgie, ils permettent d'atténuer le phénotype hémorragique de façon très significative. Deux de ces patients ont présenté un effet secondaire à type de cytolyse hépatique cédant sous corticoïdes, en rapport avec une réponse immunitaire lymphocytaire T dirigée contre les cellules hépatiques modifiées génétiquement par les virus AAV.

Pour l'hémophilie A, les voies actuelles de développement envisagent à la fois les approches *in vivo* et les modifications cellulaires *ex vivo* suivies d'une greffe. L'ADN complémentaire du gène du facteur VIII est relativement long (7 kb) et pose des problèmes d'insertion dans les vecteurs viraux AAV dont la capacité est limitée à 4,5 kb. Un moyen de contourner cette limite est de cloner l'ADN complémentaire du facteur VIII dépourvu de domaine B, dont l'efficacité coagulante est identique au facteur VIII entier. Sa taille atteint tout de même 4,37 kb, ce qui laisse peu de place pour les éléments régulateurs tels que les promoteurs ou les séquences polyA [170]. Le clonage impose donc d'utiliser un promoteur très court. L'utilisation d'un AAV chez la souris et le chien a permis d'obtenir une expression persistante de facteur VIII permettant d'atteindre des taux entre 2 et 5% [168].

Certaines équipes utilisent un « dual vector » c'est-à-dire deux vecteurs AAV contenant chacun l'ADN complémentaire de la chaîne lourde et de la chaîne légère du facteur VIII. En effet, si les chaînes lourdes et légères sont produites avec le bon ratio, elles sont

capables de s'associer pour former le facteur VIII fonctionnel [171-173]. Enfin, d'autres équipes ont utilisé des rétrovirus avec succès dans des modèles murins et canins.

D'autres approches menées en modèle murin sont basées sur une thérapie cellulaire *ex vivo* où des cellules endothéliales sont transfectées *ex vivo* avant d'être réinjectées par voie intraveineuse et de se greffer dans la moelle osseuse et dans la rate [168].

D'autres équipes ont adopté des stratégies similaires en greffant des cellules souches hématopoïétiques transformées *ex vivo* par un vecteur rétroviral contenant l'ADN complémentaire du gène du facteur VIII [174] : cette approche basée sur l'utilisation de cellules souches présente l'avantage de s'affranchir du risque d'immunisation contre le facteur VIII.

Enfin, une dernière approche pourrait s'appliquer à la fois aux hémophiles A et B avec ou sans inhibiteur. Elle consiste à introduire un transgène codant pour un facteur VII modifié dans le génome hôte via un AAV (AAV2-mFVIIa). Ce facteur VII modifié est protéolysé en facteur VIIa au niveau intracellulaire, pour être sécrété directement sous forme activée [175]. Pour ce faire, l'ADN complémentaire du facteur VII a d'abord été cloné dans un plasmide. La séquence nucléotidique a ensuite été modifiée par mutagenèse dirigée pour insérer une séquence peptidique 2RKR (Arg-Lys-Arg-Arg-Lys-Arg) à la place du site de coupure physiologique des facteurs VIIa et IXa. Cette séquence 2RKR est clivée par les furines, protéases cellulaires situées dans l'appareil de Golgi. Les clivages de cette séquence 2RKR (insérée en aval du peptide d'activation) et du site RKR physiologique (situé en amont du peptide d'activation) libèrent le peptide d'activation pour générer du facteur VII activé directement sécrété vers le secteur plasmatique. La modification génétique de souris hémophiles B par ce vecteur permet une expression stable de facteur VII activé plasmatique : les pertes sanguines sont diminuées de 40% lors de tests de section de queue. Malheureusement, l'expression continue de facteur VII activé à une concentration supérieure à 2 µg/ml (correspondant à des doses thérapeutiques de 90 µg/kg de facteur VIIa chez l'Homme) est associée à des thromboses (cardiaques et pulmonaires) et à une diminution de l'espérance de vie des souris [176].

1.3.3. Facteurs VIIa recombinants optimisés

1.3.3.1. Administration combinée de facteur VIIa et de facteur X

Une équipe japonaise propose d'administrer du facteur X conjointement au facteur VII activé. *In vitro*, la génération de thrombine induite par le mélange facteur VIIa / facteur X dans des plasmas déficients en facteurs VIII ou IX est supérieure à celle induite uniquement par le VIIa à la même dose. *In vivo*, les tests effectués sur des singes

hémophiles B (hémophilie induite par perfusion d'anticorps anti-facteur IX) ont montré que l'association du facteur X au facteur VII permettait d'augmenter le potentiel pro-coagulant : les temps de saignement et les paramètres thrombo-élastographiques (temps de coagulation, amplitude du caillot) étaient davantage corrigés en présence d'une combinaison de facteur VIIa et de facteur X qu'en présence de facteur VIIa seul [177].

La même équipe a décrit plus récemment un processus standardisé de fabrication de concentrés de facteur VIIa / facteur X d'origine plasmatique, comprenant une étape d'inactivation virale et de nanofiltration. Le mélange était préparé en ajoutant du facteur VIIa à du facteur X avec un ratio massique de 1:10. Ce mélange a montré sa supériorité par rapport au facteur VII activé seul pour raccourcir le temps de céphaline activée et accélérer la génération de thrombine de plasmas d'hémophiles [178]. Un essai clinique de phase 1 a montré une bonne tolérance [179].

1.3.3.2. Facteur VIIa recombinant à activité accrue

Le facteur VIIa recombinant a une efficacité reconnue chez les patients hémophiles avec inhibiteurs. Bien qu'il soit rapporté qu'une seule dose de facteur VIIa soit efficace et sans danger, l'efficacité reste insuffisante pour certains épisodes hémorragiques [180]. Parfois, des re-saignements surviennent et nécessitent de prolonger ou de modifier le traitement.

Un analogue du facteur VIIa, dénommé NN1731 (vatreptacog alpha) a été développé pour améliorer l'efficacité catalytique du facteur VIIa, en substituant trois acides aminés au niveau du domaine sérine-protéase de la chaîne lourde : V158D/E296V/M298Q. Ces mutations confèrent à la molécule NN1731, y compris en l'absence de facteur tissulaire, une conformation similaire au facteur VIIa natif lié au facteur tissulaire, qui correspond à sa configuration tridimensionnelle pleinement active pour activer le facteur X. Cette astuce permet d'accroître l'activité du facteur VIIa (NN1731) à la surface des plaquettes alors que la génération de facteur Xa médiée en présence de facteur tissulaire est inchangée [181, 182].

NN1731 serait 20 fois plus efficace que le facteur VIIa pour restaurer la génération de thrombine de plasmas de patients hémophiles A : alors que 500 nM et 100 nM de facteur VIIa sont nécessaires pour normaliser la génération de thrombine de plasmas d'hémophiles A sévères ou de plasmas d'hémophilie A modérée, 25 nM et 5 nM de NN1731 sont suffisants pour obtenir le même effet [183]. De même, NN1731 normalisait les paramètres de caillots de patients hémophiles A sévères alors que le facteur VIIa ne permettait qu'une correction partielle de ces paramètres [184].

Les études animales ont confirmé sa plus grande efficacité dans un modèle hémorragique murin de section de queue, 15 mg/kg de NN1731 réduit de plus de 90% les pertes sanguines alors que la même dose de facteur VIIa ne les diminue que de 50% [185]. Une étude clinique de phase I a récemment évalué les propriétés pharmacocinétiques et la sécurité de NN1731 chez six volontaires sains [186] : la demi-vie terminale était identique à celle de facteur VIIa (3,1 h pour la demi-vie terminale) et le NN1731 était bien toléré aux doses testées (jusqu'à 30 µg/kg).

Tout récemment, en août 2012, malgré une bonne efficacité du NN1731, la société Novonordisk a annoncé qu'elle arrêta le développement du NN1731 suite à l'apparition d'anticorps anti-facteur VII chez plusieurs patients lors d'une étude de phase III (essai adept tm2) ; chez l'un des patients, les anticorps étaient neutralisants [187].

La société BAYER développe également un facteur VIIa hyperactif, dénommé BAY86-6150, non pas basé sur l'optimisation du site catalytique, mais sur l'optimisation de sa liaison aux surfaces membranaires pro-coagulantes. Pour concevoir un tel analogue du facteur VIIa, quatre mutations ponctuelles (P10Q, K32E, A34E, R36E) ont été introduites, permettant d'insérer trois acides glutamiques supplémentaires au niveau du domaine Gla et d'augmenter le nombre de sites de γ -carboxylation. En parallèle, deux mutations ponctuelles supplémentaires ont été ajoutées (T160N et V25N) de façon à introduire deux acides aminés asparagine sur lesquelles seront greffés des chaînes de glycanes (deux N-glycosylations) pour augmenter la demi-vie. BAY86-6150 aurait ainsi une affinité supérieure au facteur VIIa natif pour la fixation aux plaquettes activées. Les essais précliniques chez des souris ont montré une efficacité identique à des doses inférieures et une demi-vie supérieure comparativement au facteur VIIa. Les essais de phase I ont mis en évidence une bonne tolérance et une demi-vie d'environ 5 à 7 heures [188].

1.3.3.3. Facteur VIIa recombinant à longue durée d'action

Le point faible du facteur VIIa est sa demi-vie relativement courte (environ 3 heures). Son effet limité dans le temps nécessite le plus souvent des injections intraveineuses répétées toutes les 2 à 3 heures. Diverses approches visent à optimiser l'efficacité du facteur VIIa en prolongeant sa demi-vie plasmatique.

La société CSL Behring développe un facteur VIIa fusionné à son extrémité C-terminale à l'albumine grâce à une liaison glycine-sérine. La demi-vie de cette protéine de fusion est multipliée par six chez le rat sans altérer l'efficacité hémostatique [189]. D'autres

paramètres pharmacocinétiques sont améliorés puisque le taux de récupération est doublé et l'aire sous la courbe multipliée par 14 par rapport au facteur VIIa non fusionné.

La société Novonordisk développait également un facteur VIIa recombinant glycoPEGylé (N7-GP) dont la demi-vie est augmentée : une étude clinique de pharmacocinétique chez l'homme a montré que l'addition de chaînes de polyéthylène-glycol permettait de multiplier la demi-vie plasmatique par 5 (15 heures) [190]. Lors d'un essai clinique de phase 2, il n'a pas pu être établi de relation dose-réponse et le développement a été arrêté [191].

1.3.4. Approches basées sur le facteur Xa

1.3.4.1. Facteur Xa

En 1988, une équipe canadienne a testé sur des chiens hémophiles et des chiens normaux l'administration intraveineuse de facteur Xa combiné à des vésicules phospholipidiques [192]. A faibles doses, le facteur Xa (6.5×10^{-12} moles/kg) combiné aux phospholipides ne parvenait pas à corriger la diathèse hémorragique des chiens hémophiles; ces mêmes doses induisaient une diathèse hémorragique chez les chiens normaux. On avait mis en évidence une activation de la protéine C et un effet anticoagulant lié à la chute du facteur V et du facteur VIII médiée par la protéine C activée. A doses supérieures (2.6×10^{-11} moles/kg), le mélange facteur Xa / phospholipides produisait un effet hémostatique immédiat à la fois chez les chiens hémophiles et les chiens non hémophiles avec arrêt du saignement en 15 à 30 secondes mais la protéine C était malheureusement à nouveau activée. Compte tenu du risque d'induire une coagulopathie de consommation et du risque d'activation de la protéine C, cette voie de développement a visiblement été abandonnée.

1.3.4.2. Facteur Xa activable par la thrombine

Une approche très originale a été d'élaborer un facteur X chimérique comportant un fibrinopeptide A à la place du peptide d'activation [193]. L'hypothèse formulée par les auteurs est que les traces de thrombine générées lors de l'étape d'initiation de la coagulation clivant les fibrinopeptides A du fibrinogène doivent également pouvoir cliver des fibrinopeptides A insérés dans la structure d'un facteur X chimérique exogène : le clivage des fibrinopeptides libère alors les deux chaînes constituant le facteur Xa. Ce facteur X est donc activable par la thrombine, ce qui renforce la boucle d'amplification de la coagulation. Les auteurs ont montré que, bien qu'étant moins facilement clivés que les fibrinopeptides A des molécules de fibrinogène, le facteur X_{FPA} permettait l'amplification *in*

in vitro de la production de thrombine de plasmas déficients en facteur VIII ou facteur IX. La demi-vie du facteur X chimérique pourrait être de 30 heures, semblable à celle du facteur X natif. Bien que cette approche semble séduisante, aucun essai *in vivo* n'a été rapporté depuis les premiers résultats *in vitro* publiés en 2005.

1.3.4.3. Variants Xa « zymogen like »

Les variants Xa « zymogen-like » [194] constituent une approche plus récente, reposant sur la conception de facteurs Xa avec une mutation ponctuelle d'un acide aminé au niveau de la chaîne lourde en position 16 (I16L) ou en position 17 (V17A) du côté N-terminal. Cette mutation maintient la conformation tridimensionnelle du zymogène malgré l'absence du peptide d'activation : cette conformation empêche la molécule d'avoir son site catalytique fonctionnel en l'absence de facteur V. Cependant, en présence de concentration saturante de facteur Va, les variants zymogen-like prennent la configuration tridimensionnelle du facteur Xa, ce qui démasque leur site catalytique. Une fois intégrés dans le complexe prothrombinase, les variants Xa sont donc pleinement actifs. Les propriétés conférées par cette stratégie sont une faible capacité d'activation directe de la coagulation et *de facto* un risque moindre d'induire une coagulopathie de consommation. De plus, la conformation « zymogène-like » protège les variants d'une neutralisation par les inhibiteurs de protéases, ce qui permet d'avoir une demi-vie plasmatique (environ une heure) bien plus longue que celle du facteur Xa (1 à 2 minutes pour le facteur Xa). Les deux variants I16L et V17A sont ainsi capables de restaurer la génération de thrombine de plasma d'hémophile A. Des essais murins ont montré que le variant facteur Xa I16L [195] restaure l'hémostase chez des souris hémophiles après une blessure vasculaire induite par section de la queue. Cinquante µg/kg du variant murin mFXa I16L réduisent par cinq les pertes sanguines quand 5 000 µg/kg de facteur VIIa murin recombinant ne les diminue que 2,5 fois.

1.3.5. Antagonistes anti-TFPI

L'inhibition physiologique rapide du complexe ténase extrinsèque par le TFPI rend indispensable l'amplification de la coagulation par le complexe ténase intrinsèque impliquant les facteurs VIII et IX. Neutraliser le TFPI pour lever l'inhibition du complexe ténase extrinsèque apparaît une stratégie intéressante pour prévenir ou traiter les hémorragies chez les patients hémophiles déficitaires en facteur VIII ou IX dont le complexe ténase intrinsèque est bloqué.

En 1991, Nordfang et al ont montré que l'inhibition du TFPI raccourcissait les temps de coagulation de plasmas d'hémophiles [10]. En 1995, Erhardsten et al ont mis en évidence que le blocage du TFPI par des anticorps neutralisants anti-TFPI permettait de raccourcir le temps de saignement dans un modèle d'hémophilie A lapine induite [11]. Depuis quelques années, d'autres approches neutralisant le TFPI se sont développées.

1.3.5.1. Anticorps monoclonal anti-TFPI

La société Novonordisk développe actuellement un anticorps monoclonal, dénommé mAb 2021, dirigé contre le domaine K2 du TFPI [196]. Cet anticorps monoclonal empêche l'inhibition par le TFPI du complexe facteur VIIa - facteur tissulaire - facteur Xa et raccourcit *in vitro* le temps de formation du caillot du sang de patients hémophiles. Il permet également d'augmenter la génération de thrombine de plasmas déficitaires en facteur VIII. Dans un modèle d'hémophilie lapine, une dose intraveineuse ou sous-cutanée de cet anticorps diminue de façon significative les pertes sanguines. Une administration intraveineuse permettrait de diminuer les pertes sanguines de façon importante et significative pendant au moins 7 jours. L'administration sous-cutanée de médicaments serait également possible, ce qui constituerait une grande évolution qui permettrait d'alléger la prise en charge des formes sévères d'hémophilie. Une étude clinique de phase I est actuellement en cours [197].

1.3.5.2. Aptamères anti-TFPI

Les aptamères sont des oligonucléotides synthétiques, le plus souvent des ARN, capables de fixer un ligand. ARC 19499 est un aptamère qui a été généré par la technique SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) qui est une méthode de sélection *in vitro*, à partir de banques combinatoires d'oligonucléotides synthétiques. Des étapes successives de sélection ont permis d'identifier un oligonucléotide de 84 mères dont l'affinité est très élevée pour le TFPI [198]. Ce précurseur de 84 nucléotides a été minimisé à 32 nucléotides pour donner des aptamères plus courts, notamment ARC 19499. En fixant fortement et spécifiquement le TFPI, ARC19499 neutralise le TFPI, l'empêchant d'inhiber le facteur Xa et d'inhiber le complexe ténase extrinsèque. La biodisponibilité des aptamères, en particulier celle d'ARC 19499, permet d'envisager une administration sous-cutanée. Leur demi-vie d'environ 2 heures pourrait être prolongée par conjugaison avec du polyéthylène-glycol. Trente à cent nanomolaires d'ARC19499 sont suffisants pour restaurer la génération de thrombine de plasmas d'hémophiles [198]. *In vivo*, ARC19499 diminue le temps de saignement dans un modèle d'hémophilie induite

chez le singe. Une étude clinique de phase I menée par les laboratoires Baxter en collaboration avec la société Archemix est actuellement en cours.

1.3.5.3. Polysaccharides sulfatés non anticoagulants (NASP)

Les NASP (Non-Anticoagulant Sulfated Polysaccharides) sont des polysaccharides sulfatés quasi dépourvus de propriété anticoagulante et possédant une activité inhibitrice du TFPI. Parmi eux, on trouve les pentosanes polysulfates et les fucoïdanes [13]. Les fucoïdanes sont des polysaccharides sulfatés branchés de taille hétérogène et d'origine végétale (algue brune *L. japonica*, *F. vesiculosus*, and *U. pinnatifida*), principalement composés de L-Fucose ; le pentosane polysulfate est lui d'origine animale ou végétale.

In vivo, l'administration sous-cutanée prophylactique de 60 µg/kg deux fois par jour de fucoïdane augmente la survie de souris hémophiles A et B de 25 % à 44 % [13] lors d'un challenge hémostatique par section de queue. Le fucoïdane AV513 a été testé *in vivo* et *ex vivo* dans un modèle canin [12] : son administration sous-cutanée ou orale a permis de corriger les paramètres thromboélastographiques et le temps de saignement. La demi-vie est de 1,25 heure. Le développement est actuellement en fin de phase pré-clinique.

L'effet hémostatique constaté avec ces polysaccharides sulfatés pourrait ne pas être dû uniquement à l'inhibition du TFPI : les polysaccharides sulfatés pourraient également influencer la liaison du fibrinogène aux plaquettes [199] et le relargage de t-PA [200].

1.3.5.4. Peptides synthétiques anti-TFPI

Une autre voie de développement d'antagonistes anti-TFPI est la conception de peptides leurres du TFPI. Des peptides spécifiques présentant une forte affinité pour le TFPI ont été obtenus par la technique « Phage Display ». Cette technique consiste à screener une banque de phages (particules virales) codant chacun pour une séquence peptidique précise dont on va tester l'interaction avec le ligand TFPI. Les phages fixés au TFPI sont ensuite lavés et élués avant d'être amplifiés et séquencés. Ces étapes ont permis d'identifier un peptide capable de fixer et de neutraliser le TFPI : ce peptide a ensuite été optimisé par des substitutions itératives d'acides aminés. Son affinité pour le TFPI a été évaluée par résonance plasmonique de surface et par ELISA. Des études par résonance magnétique nucléaire ont mis en évidence l'interaction de ce peptide avec le domaine K1 du TFPI.

Ce peptide est capable de restaurer la génération de thrombine de plasmas déficients en facteur VIII. Pour diminuer sa clairance rénale et augmenter sa demi-vie, il fut conjugué à du polyéthylène glycol, permettant d'obtenir une demi-vie de 21 heures par voie

intraveineuse et de 20 heures par voie sous-cutanée avec une biodisponibilité de 73% par voie sous-cutanée.

In vivo, ce peptide conjugué au PEG s'est montré efficace aussi bien par voie sous-cutanée que par voie intraveineuse pour améliorer la survie de souris hémophiles soumises à un test de section de queue [201].

1.3.6. Inhibiteurs peptidomimétiques de la protéine C activée

Plusieurs études cliniques et animales [202-204] ont suggéré que le phénotype hémorragique des hémophiles pouvait être atténué par la coexistence d'une résistance à la protéine C activée en rapport avec la mutation Leiden du facteur V, anomalie thrombophile relativement fréquente à l'état hétérozygote dans la population générale française.

En se basant sur ce postulat, Butenas et al [205] ont mis au point des inhibiteurs synthétiques peptidomimétiques de la protéine C activée qui miment les résidus P4-P4' entourant le site de clivage par la protéine C activée au niveau de l'Arg 306 du facteur V. Ces inhibiteurs sont spécifiques et réversibles de la protéine C activée. Le plus efficace d'entre eux permet une correction partielle de la génération de thrombine d'un protéome synthétique déficitaire en facteur VIII et contenant les autres facteurs et inhibiteurs physiologiques de la coagulation plasmatique.

1.3.7. Anticorps bi-spécifique anti-facteur IXa et anti-facteur X

Tout récemment, une équipe japonaise [206] a mis au point un anticorps spécifique, dénommé hBS23, qui reconnaît la chaîne légère du facteur IXa et la chaîne légère du facteur X. Cet anticorps permettrait de placer, comme le fait le facteur VIIIa, les facteurs IXa et facteur X dans la bonne configuration spatiale pour amplifier l'activation du facteur X par le facteur IXa. L'efficacité catalytique (k_{cat}/K_m) du facteur IXa pour l'activation du facteur X par le facteur IXa est toutefois 14 fois moindre avec hBS23 qu'avec le facteur VIIIa. Cet anticorps a par ailleurs plusieurs avantages : il ne peut être neutralisé par un inhibiteur anti-facteur VIII, sa demi-vie est longue (14 jours par voie intraveineuse), sa biodisponibilité par voie sous cutanée est élevée (84%), il permet la restauration la génération de thrombine de plasmas déficients en facteur VIII avec ou sans inhibiteur. Les essais *in vivo* chez le singe ont montré une diminution de la perte sanguine dans un modèle d'hémophilie A induite pendant au moins trois jours.

1.3.8. Génération de microparticules exprimant du facteur tissulaire

Il est aussi possible d'augmenter la génération de thrombine en augmentant la quantité de facteur tissulaire disponible au niveau du site de la blessure vasculaire. L'équipe d'Hrachovinova [207] a développé une protéine chimérique P-sélectine-immunoglobuline (P-sel-Ig) capable en se liant au PSGL-1 (P-selectin Glycoprotein Ligand 1), ligand naturel de la p-sélectine, d'induire *in vivo* une augmentation de la formation de microparticules procoagulantes exprimant en surface du facteur tissulaire. La perfusion de P-sel-Ig à des souris hémophiles A augmente de vingt fois la concentration de microparticules circulantes exprimant du facteur tissulaire ce qui améliore les cinétiques de fibrinoformation et normalise les temps de saignement lors de tests de section de queue. Le risque thrombotique d'une telle approche n'a cependant pas été évalué. Alors que les premiers essais chez l'animal datent de 2003, aucune étude clinique n'a encore été publiée.

1.4. Facteur X

1.4.1. Introduction

Le facteur X occupe une place centrale dans la cascade de la coagulation [208]. D'une part, il est à la fois le substrat du complexe ténase extrinsèque (facteur VIIa - facteur tissulaire - calcium - phospholipides) et du complexe ténase intrinsèque (facteur VIIIa - facteur IXa - calcium - phospholipides). D'autre part, une fois activé, le facteur X est capable d'activer la prothrombine au sein du complexe prothrombinase.

Sa structure primaire a été décrite en 1986 [209] et sa structure tridimensionnelle a été déterminée pour la première fois par cristallographie aux rayons X en 1993 [210].

Le facteur X est également connu sous le nom de facteur « Stuart-Prower » correspondant aux noms des deux premiers patients chez qui furent rapportés les premiers déficits constitutionnels en facteur X dans les années 50 [211]. Ce déficit est autosomique récessif et les formes homozygotes, touchant un individu sur un million, sont associées à un risque hémorragique accru [212].

La concentration plasmatique normal du facteur X est comprise entre 7 et 17 mg/l [213], soit environ entre 100 et 300 nM.

1.4.2. Structure du facteur X

Le gène du facteur X est situé au niveau du bras long du chromosome 13 (13q34). Le Facteur X est une protéine zymogène de 448 acides aminés (59 kD), vitamine K dépendante synthétisée dans le foie. Il circule dans le plasma sous forme de deux chaînes peptidiques (une chaîne légère et une chaîne lourde) reliées par un pont disulfure [214] entre la Cys132 de la chaîne légère et la Cys302 de la chaîne lourde.

La chaîne légère (139 acides aminés, 17 kD) comporte trois domaines différents [209] (figures 5 et figure 6) :

- un domaine Gla (Ala1-Lys45) comportant onze résidus aminés γ -carboxy-glutamiques,
- deux domaines EGF : EGF1 (Asp46-Phe84) et EGF2 (Thr85-Gly128),
- et une zone de jonction (Pro129-Arg 139) avec la chaîne lourde

La chaîne lourde (306 acides aminés, 42 kD) comporte :

- un peptide d'activation de 52 acides aminés (Ser143-Arg194) : le facteur X circulant ne comporte pas la séquence d'acides aminés RKR (Arg140-Lys141-Arg142) située à l'extrémité N-terminale du peptide d'activation. Ce tri-peptide est normalement clivé lors de la maturation protéique intracellulaire dans l'appareil de Golgi par des endopeptidases appelées furines [215].
- un domaine catalytique sérine-protéase de 254 acides aminés (Ile195-Lys448) qui comporte la triade catalytique (His236-Asp282-Ser379).
- un site de clivage Arg194-Ile195 par les facteurs VIIa et IXa, situé à l'extrémité C-terminale du peptide d'activation en amont du domaine catalytique. Son clivage est nécessaire à la libération du peptide d'activation et à l'activation du facteur X en facteur Xa (forme Xa α)
- un site de clivage au niveau de l'Arg429-Gly430. Ce site est clivé lors d'une autoprotéolyse du facteur Xa. Son clivage entraîne le départ d'un peptide C-terminal et convertit le facteur Xa α en forme Xa β [216]. La fonction catalytique de ces formes du facteur Xa (Xa α et Xa β) est cependant identique [217].

Le facteur X est synthétisé dans les hépatocytes sous forme d'un précurseur qui comporte une séquence préproleader (figure 6). Ce propeptide pourrait être impliqué dans le processus de γ -carboxylation du domaine Gla situé en aval. Le clivage du propeptide a lieu dans le trans-Golgi [218].

Avant sa sécrétion dans le plasma, le facteur X subit des modifications post-traductionnelles :

- onze γ -carboxylations de résidus acides glutamiques (en positions 6, 7, 14, 16, 19, 20, 25, 26, 29, 32, 39) au niveau de la chaîne légère
- une β hydroxylation d'un acide aspartique (Asp63) au niveau de la chaîne légère
- des glycosylations de 2 asparagines (Asn181 et Asn191) [219] et possiblement de deux thréonines (Thr159 et Thr171) (au niveau du peptide d'activation) [220].

La structure du facteur Xa (figure 6) correspond à la structure du facteur X dépourvu du peptide d'activation. Le facteur Xa a donc une structure bicaténaire avec une chaîne légère et une chaîne lourde reliées entre elles par un pont disulfure [209]. Son poids moléculaire est de 46 kD.

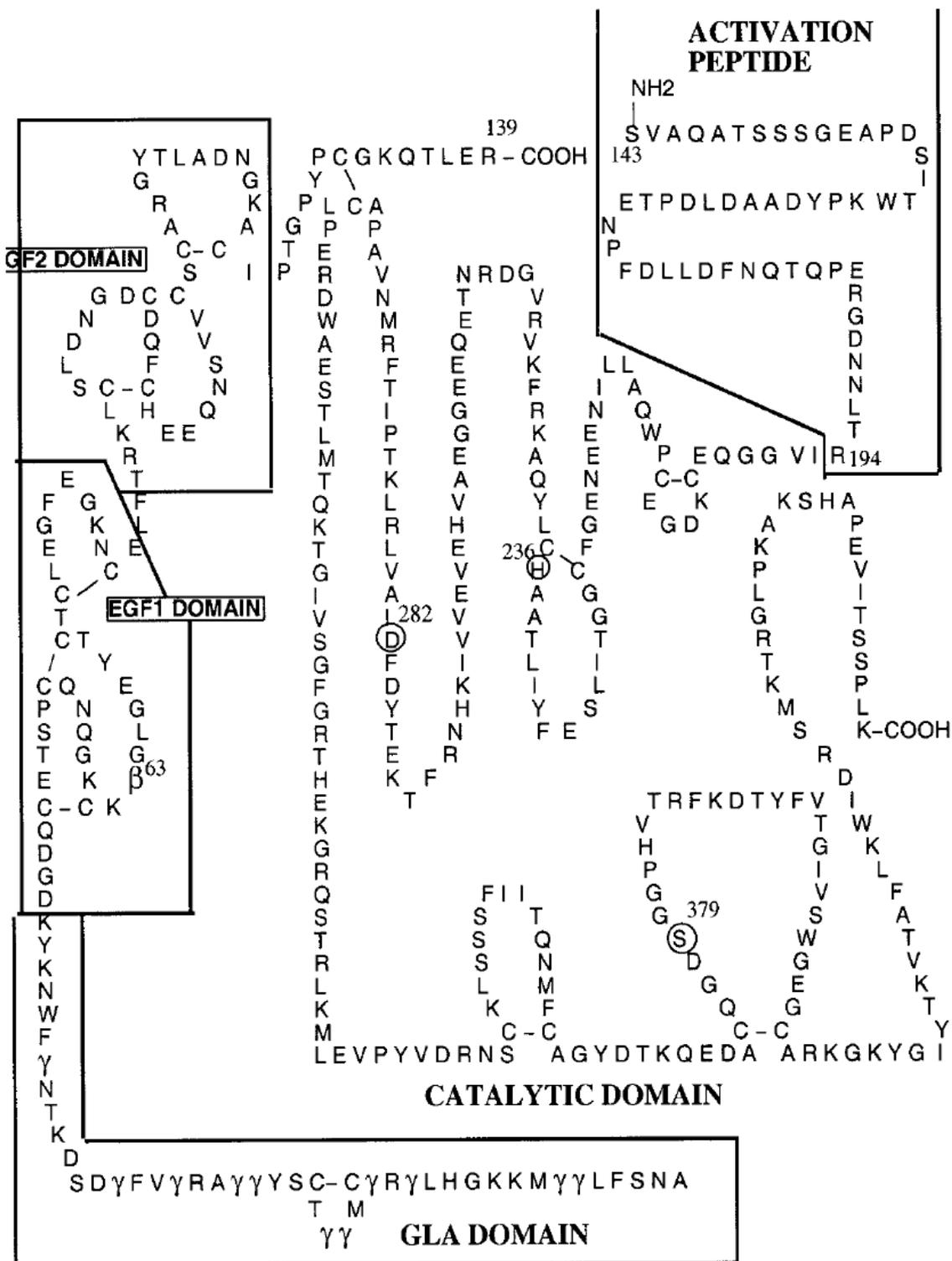


Figure 5 : Structure primaire du facteur X

(d'après Venkateswarlu D et al [219])

La séquence tripeptidique Arg140-Lys141-Arg142 correspondant au site des clivages des furines n'est pas représentée. Les domaines sont encadrés. Les acides aminés correspondant à la triade catalytique (His236, Asp282, Ser379) sont entourés.

1.4.3. Fonction des différents domaines du facteur X

❖ Rôle du domaine GLA :

Le domaine GLA intervient dans :

- la liaison aux surfaces phospholipidiques procoagulantes :

Les fonctions carboxyliques ionisées des résidus Gla, chargées négativement, interagissent par le biais d'ions calcium avec les phosphatidylsérines des membranes phospholipidiques, elles aussi électronégatives [221, 222].

- l'interaction avec le complexe ténase extrinsèque [69] :

Des études de mutagenèse ont également montré que le domaine Gla a un site de reconnaissance pour les résidus Lys165 et Lys166 [223] et l'Arg200 [224] du facteur tissulaire. Il a également été montré que le domaine Gla du facteur X interagit avec le domaine Gla (Arg36) du facteur VIIa. [224]

❖ Rôle des domaines EGF :

Les domaines EGF interviennent dans :

- l'interaction avec le complexe ténase extrinsèque [69, 225].

Les domaines EGF du facteur X interagissent avec le facteur tissulaire. Des données cristallographiques suggèrent une interaction possible entre des résidus hydrophiles et basiques du facteur tissulaire (partie C-terminale) et le domaine EGF du facteur X [226, 227]. Une étude de docking [228], suivie d'expériences de mutagenèses, a mis en évidence une interaction des résidus Glu51 et Asn57 (domaine EGF1) et des résidus Asp92 et Asp 95 (EGF2) avec le complexe ténase extrinsèque [224, 228].

Les domaines EGF joueraient aussi le rôle d'espaceur ou « spacer » permettant de maintenir le site de clivage du peptide d'activation du facteur X à distance correcte au dessus de la surface membranaire phospholipidique et un « emboîtement » optimal du facteur X dans la poche catalytique du facteur VIIa du complexe ténase extrinsèque [225].

- l'interaction avec le complexe ténase intrinsèque (VIIIa-IXa).

Les domaines EGF feraient également fonction de « spacer » pour maintenir le site de clivage du X en bonne position par rapport au site catalytique du facteur IXa du complexe ténase intrinsèque [225].

- l'interaction avec le facteur Va en présence de phospholipides [69].

Un modèle moléculaire dynamique retrouve une interaction possible entre le domaine EGF2 du facteur X et le domaine A2 du facteur Va [229].

- l'interaction avec la prothrombine.

Le même modèle moléculaire dynamique suggère que les domaines EGF pourraient interagir avec les régions K1 et K2 de la prothrombine [229].

❖ Rôle de la zone de jonction (Pro129-Arg139)

La Lys134 du facteur X interagit avec le domaine sérine-protéase du facteur VIIa [224].

❖ Rôle du peptide d'activation

Il est libéré lors de l'activation du facteur X. L'activation résulte du clivage entre l'Arg194 et l'Ileu195 de la chaîne lourde par le facteur VIIa (dans le complexe ténase extrinsèque) ou par le facteur IXa (dans le complexe ténase intrinsèque) qui permet la libération du peptide d'activation. Les facteurs VIIa et IXa ont besoin de leur co-facteur respectif (facteur tissulaire et facteur VIIIa) car, seuls, ils ne sont pas capables d'activer de façon significative le facteur X. *In vitro*, un moyen efficace d'activer le facteur X est de le soumettre à une protéolyse par le venin de vipère Russel (*Vipera russellii*) en présence d'ions calcium [230]. Le site de clivage est le même que celui des facteurs VIIa et IXa.

❖ Rôle du domaine catalytique

Le domaine catalytique intervient dans :

- l'activation de la prothrombine en thrombine.

La poche catalytique du facteur Xa, nécessaire à l'activation de la prothrombine, est démasquée lorsque le peptide d'activation est libéré.

- la stabilisation de la prothrombine dans le complexe prothrombinase.

Les résidus 415-429 du facteur Xa pourraient interagir avec la prothrombine au sein du complexe prothrombinase [231].

- l'interaction avec le domaine catalytique facteur VIIa du complexe ténase extrinsèque [182, 229].

- l'interaction avec le facteur Va dans le complexe prothrombinase [224, 232], notamment au niveau de l'hélice α 345-352 [233].

	Facteur tissulaire		VIIa		Va	
Xa (Gla)		FT-Lys165 FT-Lys166 FT-Arg200		VIIa (Gla)- Arg36		
Xa (EGF1)	Xa (EGF1)- Glu51					
Xa (EGF2)			Xa (EGF1)- Asp92 Xa(EGF2)- Asp95			
Xa (jonction Pro129- Arg139)			Xa-Lys 134	VIIa (SP)		
X (SP)			X(SP)- Lys186	VIIa (SP)- Glu154 VIIa (SP)- Val21 VIIa (SP)- Arg147	Xa (SP)- Glu310 Xa (SP)- Arg306 Xa (SP)- Lys351	Va-Arg321 Va-Glu323 Va-Phe325 Va-Arg505 Va-Arg506 Va-Arg510 Va-Asp578 Va-Lys655

Tableau 2. Acides aminés impliqués dans les interactions du facteur X avec le facteur tissulaire, le facteur VIIa et le facteur Va.

D'après des données expérimentales publiées par Lee CJ et al [224, 229]. SP correspond au domaine catalytique sérine-protéase.

1.4.4. Facteur Xa dépourvu du domaine Gla

Le facteur Xa (GDxa) dépourvu de son domaine Gla (figure 6) n'existe pas physiologiquement. Il comporte la même séquence d'acides aminés que le facteur Xa en dehors des 44 premiers acides aminés qui sont absents. Il a été utilisé comme modèle d'exploration des propriétés conférées au facteur Xa par le domaine Gla. Le GDxa est obtenu *in vitro* par protéolyse limitée par l' α -chymotrypsine du facteur Xa [14], le facteur Xa étant généralement obtenu *in vitro* au préalable après activation par du venin de vipère

Russel puis purifié ensuite sur colonne de benzamidine sépharose, suivie d'une gel-filtration [234].

Il a ainsi été montré que le GDXXa conserve les mêmes propriétés de catalyse des substrats chromogéniques que le facteur Xa (K_m et k_{cat} identiques pour S2222) [14, 235], que le domaine Gla est essentiel à la fixation des phospholipides procoagulants et à l'intégration dans le complexe prothrombinase [14]. En présence d'ions calcium, de vésicules phospholipidiques et de concentrations saturantes de facteur Va (c'est-à-dire dans des conditions de formation du complexe prothrombinase), l'activation de la prothrombine par le GDXXa est 200 fois inférieure à celle du facteur Xa [14].

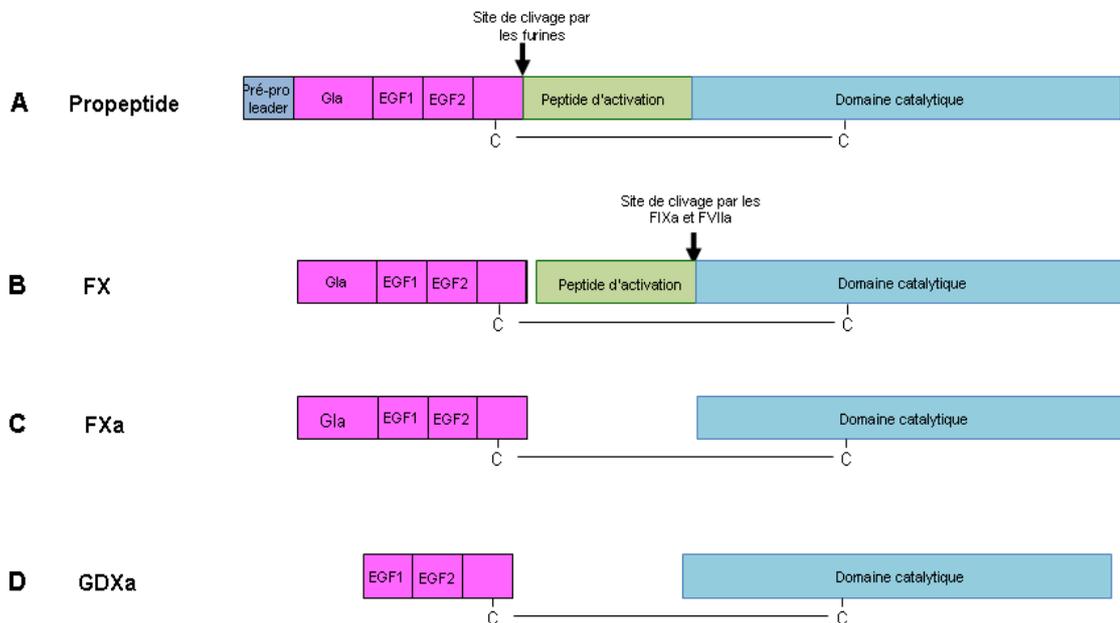


Figure 6 : Structure du propeptide du facteur X, des facteurs X, Xa et du GDXXa

(A) Propeptide du facteur X, (B) Facteur X, (C) Facteur Xa, (D) GDXXa.

1.4.5. Partenaires physiologiques du facteur X et interactions entre facteurs

Les partenaires du facteur X et du facteur Xa sont nombreux : facteur VIIa et facteur tissulaire au sein du complexe ténase extrinsèque, facteur VIIIa et facteur IXa au sein du complexe ténase intrinsèque, et facteur Va et prothrombine au sein du complexe prothrombinase. Le facteur Xa interagit également avec des inhibiteurs physiologiques de

la coagulation comme le TFPI et l'antithrombine : cette interaction a été décrite dans le chapitre « inhibiteurs physiologiques de la coagulation ».

1.4.5.1. Au sein du complexe ténase extrinsèque

1) Facteur VIIa

Le facteur VII est une glycoprotéine vitamine K dépendante de 50 kD [236], constitué d'une chaîne comportant un domaine Gla, deux domaines EGF et un domaine catalytique. Son activation résulte d'un clivage après l'Arg152 par les facteurs IIa, IXa, Xa ou VIIa. L'activation génère du facteur VIIa constitué de deux chaînes peptidiques reliées par un pont disulfure.

Le facteur VIIa (50 kD) se combine au facteur tissulaire à la surface de membranes lipidiques procoagulantes en présence d'ions calcium pour former le complexe ténase extrinsèque, capable d'activer le facteur X. Dans ce complexe, les domaines Gla des facteurs VIIa et X interagissent. De même, les domaines catalytiques de chacune des deux facteurs sont en contact (tableau 2).

2) Facteur tissulaire

Le facteur tissulaire est une protéine transmembranaire de 47 kD composée de 263 acides aminés. Il se lie au facteur VIIa. L'interaction avec le facteur X se fait au niveau du domaine Gla. Le domaine extracellulaire comprend 219 acides aminés, le domaine trans-membranaire comporte 23 acides aminés et la queue cytosolique est constituée de 21 acides aminés [237]. Les Lys165, Lys166 et l'Arg200 du facteur tissulaire interagissent avec le domaine Gla du facteur Xa.

1.4.5.2. Au sein du complexe ténase intrinsèque

1) Facteur VIIIa

Le facteur VIII est une glycoprotéine de 300 kD (2332 acides aminés) constituée de deux chaînes peptidiques reliées par un pont disulfure. Son activation nécessite trois clivages protéolytiques au niveau des arginines Arg372, Arg740 et Arg1689. Ces clivages sont assurés préférentiellement par la thrombine mais également par le facteur Xa. Le facteur Xa, en plus de la protéine C activée, participe également à l'inactivation du facteur VIII en clivant les Lys36 et Arg336 [238, 239] au niveau de la sous-unité A1 du facteur VIII.

Le facteur VIIIa se combine au facteur IXa à la surface de membranes phospholipidiques procoagulantes pour former le complexe ténase intrinsèque dans laquelle il agit comme cofacteur du facteur IXa pour activer le facteur X. Dans ce complexe, le domaine catalytique du facteur X interagit avec les sub-unités A1 [240] et C2 du facteur VIII [239]. La chaîne légère et la sous-unité A2 du facteur VIIIa interagissent respectivement avec la chaîne légère et la chaîne lourde du facteur IXa.

2) Facteur IXa

Le facteur IX est une glycoprotéine monocaténaire vitamine K dépendante de 55 kD comportant un domaine Gla, deux domaines EGF, un peptide d'activation et un domaine catalytique. Le facteur Xa est capable de cliver le facteur IX au niveau de l'arginine 145 pour donner du facteur IX α qui subit ensuite un deuxième clivage par le complexe facteur VIIa - facteur tissulaire au niveau de l'arginine 180 pour donner du facteur IX activé [23]. Le facteur IX est toutefois pleinement activé uniquement par le facteur XIa ou le facteur VIIa (du complexe ténase extrinsèque) après protéolyse en deux sites et libération du peptide d'activation. Le facteur IXa (45 kD) est constitué de deux chaînes reliées par un pont disulfure [214]. Il interagit avec le facteur VIIIa pour former le complexe ténase.

Naturellement, le facteur IX possède une boucle (dite boucle 99) au niveau du domaine catalytique dont la conformation bloque l'accès des substrats au site catalytique en l'absence de facteur VIIIa [241]. La fixation du facteur VIIIa modifie la conformation pour faciliter l'interaction du domaine catalytique du facteur IXa avec son substrat naturel le facteur X.

1.4.5.3. Au sein de la prothrombinase

1) Facteur Va

Le facteur V est une glycoprotéine monocaténaire de 330 kD [242] dont l'activation par la thrombine résulte du clivage protéolytique de trois sites donnant quatre chaînes dont deux vont s'associer de façon non covalente pour former le facteur Va. Bien que moins efficace que la thrombine, le facteur Xa peut également activer le facteur V. Le facteur Va s'associe au facteur Xa au sein du complexe prothrombinase pour activer la prothrombine. Dans ce complexe, le facteur Va interagit avec le domaine Kringle 1 de la prothrombine [243]. Le facteur Va interagit aussi avec le domaine catalytique du facteur X (tableau 2).

2) Prothrombine

La prothrombine est une glycoprotéine monocaténaire de 62 kD, vitamine K dépendante de 72 kD composé d'un domaine Gla, deux domaines Kringle et un domaine catalytique. L'activation de la prothrombine en thrombine est soumise au clivage de deux sites (Arg273-Thr274 et Arg322-Ile323) par le facteur Xa au sein du complexe prothrombinase [244]. Le clivage du second site Arg322-Ile323 a lieu en premier temps et sépare la protéine en deux chaînes reliées par un pont disulfure. Le clivage du site Arg273-Thr274 a ensuite lieu et laisse partir un fragment N-terminal. La thrombine générée (α thrombine, 37 kD) est donc constituée de deux chaînes peptidiques (A et B) reliées par un pont disulfure. Au sein du complexe prothrombinase, le facteur Xa interagit avec une séquence linéaire du domaine Kringle 2 de la prothrombine [245].

1.4.6. Fonctions de signalisation cellulaire du facteur Xa

Le facteur Xa est bien connu pour son rôle dans la cascade de la coagulation plasmatique. En revanche, ce n'est que depuis une quinzaine d'années que l'on a découvert qu'il pouvait exercer des effets sur différents types cellulaires en se fixant à ses deux principaux récepteurs PAR-1 et PAR-2. Le facteur Xa seul est capable d'activer le récepteur PAR-2 alors que, lorsqu'il est au sein du complexe facteur tissulaire - facteur VIIa - facteur Xa, il est non seulement capable d'activer PAR-2 mais également PAR-1 [246]. PAR-1 est un récepteur commun au facteur Xa et à la thrombine [247]. L'activation des récepteurs PAR est médiée par le clivage protéolytique de PAR au niveau de son extrémité N-terminale extracellulaire, entraînant le départ d'un peptide N-terminal qui démasque une séquence ligand qui s'attache à la seconde boucle extracellulaire du récepteur pour induire une signalisation via les protéines G [248]. Plusieurs études ont montré que les domaines Gla et EGF1 ne sont pas indispensables à l'activité de signalisation du facteur Xa, contrairement aux Arg86 et Lys87 du domaine EGF2 [249]. Les deux récepteurs (PAR-1 et PAR-2) ont une expression ubiquitaire. La signalisation intracellulaire médiée par le facteur Xa est observée dans de nombreuses cellules [250] (endothéliales, épithéliales, leucocytes, fibroblastes, neurones,...). Classiquement, la fixation du facteur Xa aux récepteurs PAR couplés à des protéines G induit une hydrolyse des phospho-inositides membranaires par une phospholipase C [251], qui vont déclencher des mouvements calciques intracellulaires responsables de la phosphorylation de plusieurs protéines : MAPK (Mitogen-Activated-Protein Kinases), ERK (Extracellular signal Related Kinase) et JNK (c-Jun N-terminal Kinase) conduisant à

l'induction de programmes transcriptionnels favorisant la croissance, la différenciation et la migration cellulaire. Ces programmes transcriptionnels peuvent aboutir à la sécrétion de cytokines (telles que IL-1, IL-6 et IL-8), de récepteurs chimiotactiques, de molécules d'adhésion et des protéines de matrice extracellulaire. L'ensemble de ces réponses est hautement spécifique de la nature de la cellule activée : la signalisation intra-cellulaire médiée par le facteur Xa est donc dépendante du type cellulaire. Par exemple, le facteur Xa induit la prolifération de fibroblastes ou de cellules mésangiales mais pas des cellules endothéliales ou des leucocytes [252].

Déclencher des effets cellulaires impose au facteur Xa d'être présent dans le secteur extravasculaire : le facteur Xa peut quitter le secteur vasculaire lors d'une brèche vasculaire, il pourrait également atteindre les milieux extravasculaires grâce aux macrophages qui, après avoir fixé le facteur Xa dans les vaisseaux, pourraient le libérer dans le milieu extravasculaire après diapédèse [253]. Enfin, il peut s'agir d'une synthèse ectopique de facteur X (microglie, neurones, cellules épithéliales, macrophages, poumons) [254] qui pourrait aussi être induite au cours de processus néoplasiques [255] [64].

A l'inverse, il a plus récemment été montré que le facteur Xa inhibait la migration de cellules cancéreuses (poumon, sein, colon) par un mécanisme PAR-1 dépendant qui impliquerait les voies de signalisation Rho- et Src- dépendantes, sans que les mécanismes exacts mis en jeu n'aient été élucidés [256].

Enfin, le facteur X pourrait également être synthétisé dans d'autres circonstances pathologiques comme cela a pu être démontré dans des modèles murins de maladie de Parkinson [257] ou de glomérulonéphrite [258].

En conclusion, le rôle du facteur X n'est pas limité à la coagulation : le facteur Xa est capable d'induire l'activation de nombreux types cellulaires et d'avoir un rôle dans le remodelage tissulaire.

2. OBJECTIFS DU TRAVAIL

2.1. Preuve de concept : restauration de la génération de thrombine de plasmas d'hémophiles par le GDxa

Nous proposons une nouvelle approche pour court-circuiter le complexe ténase intrinsèque. Contrairement au facteur Xa, une forme tronquée du facteur Xa, dépourvue du domaine Gla (GDxa) est incapable de se lier aux phospholipides procoagulants et est donc dépourvue d'activité procoagulante directe [14]. Cependant, le GDxa conserve la capacité de lier le TFPI [15] et le complexe GDxa - TFPI est incapable d'inhiber le complexe ténase extrinsèque (facteur tissulaire - facteur VIIa), initiateur de la coagulation.

Dans la première partie de ce travail, nous avons d'abord évalué la capacité du GDxa à restaurer la génération de thrombine de plasmas d'hémophiles A ou B sévères avec ou sans inhibiteurs, en présence de faible concentration de facteur tissulaire. Nous avons ensuite comparé les profils de restauration de génération de thrombine de plasmas d'hémophiles obtenus avec le GDxa à ceux obtenus avec des anticorps neutralisants anti-TFPI et anti-antithrombine. Nous nous sommes intéressés à la capacité du TFPI à neutraliser le GDxa et l'avons comparé à la neutralisation du facteur Xa. Enfin, nous avons étudié la cinétique d'action du GDxa.

Les résultats de la première partie du travail expérimental renforcent notre hypothèse mécanistique selon laquelle le GDxa agirait par un mécanisme TFPI dépendant en entrant en compétition avec le facteur Xa pour fixer le TFPI (figure 7).

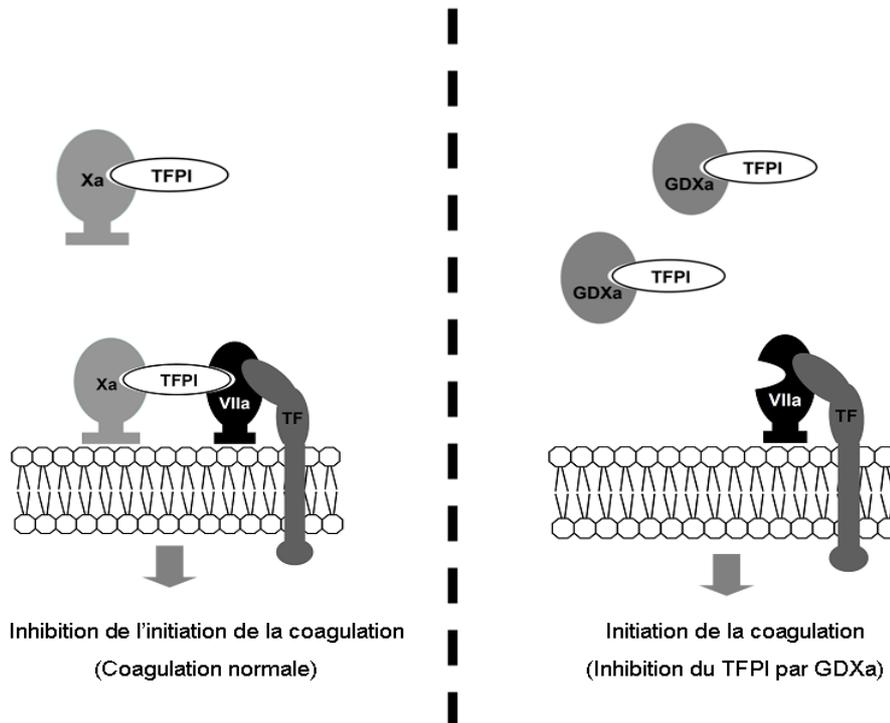


Figure 7 : Hypothèse du mécanisme d'action du GDXa

(A) Le complexe facteur Xa - TFPI est l'inhibiteur physiologique du complexe ténase extrinsèque (facteur tissulaire - facteur VIIa), initiateur de la coagulation.

(B) Le GDXa entre en compétition avec le facteur Xa pour se lier au TFPI, empêchant la formation du complexe quaternaire facteur Xa - TFPI - facteur VIIa - facteur tissulaire pour restaurer l'initiation de la coagulation.

2.2. Conception rationnelle de variants du GDXa à affinité augmentée pour le TFPI

La deuxième partie de ce travail a pour objectif de concevoir des variants du GDXa dont l'affinité est augmentée pour le TFPI. Augmenter l'affinité du GDXa pour le TFPI permettrait d'en faire un leurre « parfait » capable de détourner davantage le TFPI du facteur Xa : le complexe TFPI - GDXa se formerait alors plus facilement et empêcherait la formation du complexe inhibiteur TFPI - facteur Xa avec une plus grande efficacité.

Pour réaliser ce projet, nous avons collaboré avec l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble (Dr Aline Thomas) et réalisé au préalable une étude *in silico* des interactions entre le TFPI et le facteur Xa. Cette étude a permis d'identifier des acides aminés potentiellement candidats à une mutagenèse dirigée dans le but d'améliorer l'interaction entre les deux ligands. Sur cette base rationnelle, nous avons produit de façon recombinante en cellules HEK293E différents variants du GDXa dont nous avons testé

l'activité chromogénique et la capacité à générer de la thrombine au cours d'une étape de screening sur des dialysats de surnageants de culture.

3. MATERIEL ET METHODES

3.1. PARTIE 1

3.1.1. Matériel

Les plasmas congelés (pool de plasmas normaux, plasmas d'hémophiles A et B sévères), les phospholipides TGT, le Prionex, le CTI (Corn Trypsin Inhibitor), le substrat chromogénique PNAPEP 1025, le facteur Xa humain, le facteur Xa humain délété du domaine Gla (GDXa) et les anticorps anti-TFPI proviennent de chez Cryopep (Montpellier, France). Le TFPI humain recombinant provient de chez Sino Biological Incorporation (Pékin, Chine). Le facteur tissulaire (Innovin) provient de chez Siemens Healthcare Diagnostics (Puteaux, France). Pour les tests de génération de thrombine, nous avons utilisé les réactifs Thrombin Calibrator, FluCakit et des plaques 96 puits fond rond de chez Diagnostica Stago (Asnières, France). Pour les expériences d'enzymologie, nous avons utilisé des plaques 96 puits à fond plat provenant de chez Greiner (Frickenhausen, Allemagne). Les anticorps anti-antithrombine proviennent de chez Affinity Biologicals (Sandhill Drive, Canada). Pour la mesure de l'activité du TFPI, le kit Actichrom TFPI Activity Assay provenant de chez American Diagnostica (Stamford, USA) a été utilisé. Le dosage de l'activité antithrombine a été réalisé avec les réactifs STA-Stachrom Antithrombin III de chez Diagnostica Stago sur un automate STA-R. Les calculs enzymatiques ont été réalisés avec le logiciel PRISM 5.0.

3.1.2. Méthodes

3.1.2.1. *Tests fonctionnels*

1) Tests de fluorescence

a) Test de génération de thrombine

Les mesures de génération de thrombine sont réalisées selon la méthode décrite par Hemker en utilisant 1 pM de facteur tissulaire [259] en présence de 4 µM de phospholipides et de 30 µg/ml de CTI pour inhiber la phase contact de la coagulation durant le temps d'incubation [260]. Le facteur tissulaire est préparé à partir d'Innovin : un flacon d'Innovin (Siemens) est reconstitué selon les instructions du fabricant avec 10 ml d'eau stérile pour obtenir une concentration de facteur tissulaire à 6 000 pM [261] puis aliquotée et congelée à -80°C. Les expériences sont ensuite menées en diluant cette solution mère d'Innovin dans du tampon Prionex 1%, 18 mM HEPES, 135 mM chlorure de sodium, pH 7.35.

Pour réaliser le test, 20 µl d'un mélange contenant du facteur tissulaire et des phospholipides et 80 µl de plasma sont pipetés en triplicat dans les puits d'une plaque 96 puits. Pour la calibration, 20 µl du calibrant Thrombin calibrator (contenant le complexe α 2-macroglobuline – thrombine) et 80 µl de plasma sont également pipetés en triplicat dans d'autres puits. Ensuite, la plaque est introduite dans un lecteur de fluorescence (Varioskan, Illkirch, France), réglé à une longueur d'onde d'excitation de 390 nm, à une longueur d'émission de 460 nm et à une largeur de bande de 10 nm. 20 µl de FluCaKit (2.5 mM de substrat fluorogénique Z-Gly-Gly-Arg-Aminométhylcoumarine (ZGGR-AMC) avec 0.1M CaCl₂) sont distribués automatiquement dans chacun des puits pour démarrer la réaction. Le signal de fluorescence est lu et enregistré toutes les 20 secondes pendant 60 minutes. Les valeurs brutes de fluorescence sont ensuite exportées dans le logiciel Sigmaplot 9.0 pour les calculs mathématiques selon la méthode des 3 vagues précédemment décrite [262]. L'ETP (Endogenous Thrombin Potential) correspond au potentiel endogène de thrombine, c'est-à-dire à l'aire sous la courbe. Le PH (Peak Height) correspond à la hauteur du pic c'est-à-dire le taux maximal de thrombine ; le LT (Lag Time) correspond au temps de latence c'est-à-dire le temps pour atteindre 2 nM de thrombine. Enfin, le PT (Peak Time) correspond au temps nécessaire pour atteindre le pic de thrombine.

b) Mesure du clivage du substrat ZGGR-AMC par le GDXa

Pour tester le clivage potentiel du substrat fluorogénique ZGGR-AMC par le GDXa lors des tests de génération de thrombine, du plasma normal est testé en présence de 1 pM de facteur tissulaire, 4 µM de phospholipides et 30 µg/ml de CTI avec et sans Lépirudine 6 µg/ml en présence de différentes concentrations de GDXa (50, 100 et 250 nM). Le signal brut de fluorescence est enregistré. La Lépirudine ajoutée à une concentration supra-thérapeutique neutralise de façon irréversible toute thrombine générée. Le signal de fluorescence obtenu ne provient donc pas du clivage du substrat ZGGR-AMC par la thrombine et provient donc du clivage du substrat par le GDXa.

2) Tests chromogéniques

a) Détermination des constantes enzymatiques de GDXa et du facteur Xa

Pour la détermination de l'activité enzymatique du GDXa et du facteur Xa, 200 µl d'enzyme (0,3 nM concentration finale) sont incubés pendant 5 minutes à 37°C dans du tampon A : Prionex 1%, 18 mM HEPES, 135 mM chlorure de sodium, pH 8,4. Ensuite, 100

µl de substrat PNAPEP 1025 sont ajoutés en excès à différentes concentrations finales (0.33, 0.50, 1.00 et 1.50 mM). La variation d'absorbance est enregistrée à 405 nm pendant 20 minutes.

b) *Inhibition enzymatique du GDXa et du facteur Xa par le TFPI*

L'inhibition de l'activité du GDXa et du facteur Xa par le TFPI est analysée en incubant 0,25 nM d'enzyme pendant 3 heures à 25°C dans le tampon A en présence de concentrations croissantes de TFPI (0 à 30 nM pour le GDXa et 0 à 10 nM pour le facteur Xa) dans un volume final de 200 µl. Ensuite, 50 µl de substrat chromogénique PNAPEP 1025 sont ajoutés. La variation d'absorbance est enregistrée à 405 nm pendant 15 minutes. Le K_i^* a été déterminé conformément au mécanisme décrit à la figure 4 en appliquant les équations décrites par Baugh et al et Bunce et al. [194, 263] détaillées ci-dessous (chapitre 4.1.6.1).

c) *Inhibition enzymatique du GDXa et du facteur Xa par l'antithrombine*

Pour l'inhibition par l'antithrombine, le facteur Xa ou le GDXa (1.25 nM) sont incubés à 37°C dans le tampon A en présence de concentrations croissantes d'antithrombine (0 à 500 nM). Des aliquots de 200 µl sont prélevés à différents intervalles de temps jusqu'à 90 minutes puis 50 µl de substrat chromogénique PNAPEP 1025 6 mM sont ajoutés. La variation d'absorbance est enregistrée à 405 nm.

d) *Détermination de la demi-vie plasmatique du GDXa et du facteur Xa*

La détermination de la demi-vie du GDXa et du facteur Xa est réalisée en surchargeant un plasma normal avec 50 nM de GDXa ou de facteur Xa. Le mélange est incubé à 37°C. Des aliquots de 25 µl sont prélevés au cours du temps et dilués immédiatement au 1/25 dans du tampon A avant l'addition de 1,5 mM de substrat chromogénique 1025. La variation de l'absorbance est enregistrée à 405 nm.

3) *Inhibition du complexe facteur tissulaire – facteur VIIa par le TFPI*

L'activité du complexe ténase extrinsèque (facteur tissulaire - facteur VII activé – phospholipides) est évaluée par mesure du clivage du facteur IX.

Un premier mélange contenant 1 nM de facteur VIIa et 1 nM de facteur tissulaire est incubé pendant 30 minutes à 37 °C en présence de 16 µM de phospholipides et de CaCl₂

16,7 mM. En parallèle, un second mélange contenant 80 nM de TFPI et 80 nM de facteur Xa ou de GDXa est incubé pendant 30 minutes à 37°C. Ces deux mélanges sont ensuite ajoutés à volume égal et incubés pendant 30 minutes à 37°C avant d'ajouter 900 nM de facteur IX.

Après 90 minutes d'incubation à 37°C, le mélange est repris par du tampon de dénaturation en conditions non réductrices (Tris HCL 60 mM, SDS 2%, bleu de bromophénol 0.01%, glycérol 10%) puis incubé pendant 5 minutes à 95°C pour dénaturer les protéines avant migration SDS-PAGE sur un gel de polyacrymide en gradient 10-20%.

3.1.2.2. Neutralisation du TFPI et de l'antithrombine par des anticorps

Pour la neutralisation par l'antithrombine, différentes concentrations d'anticorps de mouton anti-antithrombine humaine (1.8, 3, 5 et 7.5 g/l) sont ajoutées à un plasma d'hémophile A sévère et incubées pendant 1 heure à 25°C. Le plasma est ensuite testé pour la mesure de la génération de thrombine. En parallèle, l'activité antithrombine résiduelle est déterminée sur un automate STA-R (Diagnostica Stago) avec les réactifs STA-Stachrom antithrombine III.

Pour la neutralisation par le TFPI, différentes concentrations d'anticorps de mouton anti TFPI humain (2.5, 5, 10 et 50 mg/l) sont ajoutées au même plasma d'hémophile A sévère et incubées pendant 1 heure à 25°C. En parallèle, l'activité TFPI est mesurée avec le kit Actichrom TFPI Assay selon les instructions du fabricant. Schématiquement, 20 µl d'une dilution au 1/20 du plasma sont incubés en présence de 20 µl de facteur tissulaire - facteur VIIa pendant 30 minutes à 37°C. Puis, 20 µl de facteur X sont ajoutés et incubés pendant 15 minutes à 37°C avant d'ajouter de l'EDTA et du substrat chromogénique Spectrozyme FXa. La réaction est stoppée 5 minutes plus tard en ajoutant de l'acide acétique glacial. L'absorbance est lue à 405 nm.

3.1.2.3. Electrophorèse des protéines

Les protéines sont reprises avec du tampon de dénaturation (Tris HCL 60 mM, dithiothréitol 5%, SDS 2%, bleu de bromophénol 0.01%, glycérol 10%). Le SDS charge négativement les protéines proportionnellement à leur taille, les charges négatives introduites se repoussent et rompent la structure secondaire de la protéine. Le dithiothréitol rompt les ponts disulfures. Avant migration par électrophorèse SDS-PAGE, une dernière étape de dénaturation par la chaleur est réalisée pendant 5 minutes à 95°C. La migration des protéines se fait sur gel vertical de polyacrylamide 12% ou gradient 10-

20% sous une tension de 120 V dans un tampon de migration Tris Glycine SDS. On procède ensuite à une coloration au bleu de Coomassie.

3.2. PARTIE 2

3.2.1. Matériel

L'étude *in silico* a été effectuée avec le logiciel CHARMM (Département de Chimie et de Biochimie, Harvard, USA). Le plasmide de pTT5 est un don du Dr Yves Durocher (Centre national de recherches du Canada, Institut de recherche des Biotechnologies). Le gène TIMX, dont nous avons défini la séquence nucléotidique (figure 9), a été synthétisé à notre demande par la société Genscript Corporation (Piscataway, USA) et livré dans le plasmide PUC (PUC57-TIMX). Les différentes amorces (tableau 4) ont été synthétisées par la société Metabion GmbH (Martinsried, Allemagne). Les différents séquençages ont été réalisés par la société Agowa (Berlin, Allemagne). Les kits d'extraction de l'ADN plasmidique QIA Spin Miniprep, High Speed Maxi kit et QIA Quick GelExtraction Kit proviennent de chez Qiagen (Courtaboeuf, France). Le kit de ligation Rapid DNA ligation kit et la phosphatase alcaline Schrimp alcaline Phosphatase proviennent de la société Fermentas (Saint Leon-Rot, Allemagne). Les bactéries *E. Coli* compétentes proviennent de chez Invitrogen (California, USA). Les kits de mutagenèse dirigée Quick Change Site Directed Mutagenesis Kit proviennent de chez Stratagene (USA). Les enzymes de restriction *BamHI* et *XbaI* proviennent de chez Roche Diagnostics (Meylan, France). Le kit ELISA Asserachrom X:Ag provient de chez Diagnostica Stago (Asnières, France). Les membranes de dialyse Spectra/Por 25 kD proviennent de chez Spectrumlabs.com.

3.2.2. Méthodes

3.2.2.1. Etude *in silico* des interactions TFPI – facteur Xa

L'étude *in silico* a été réalisée par le Dr Aline Thomas (Institut de Biologie Structurale de Grenoble). Cette étude permet d'évaluer informatiquement l'affinité d'une macromolécule pour une autre en étudiant les énergies d'interaction en dynamique moléculaire.

Une étude des interactions entre le domaine K2 du TFPI humain (hK2 TFPI) et le facteur Xa humain (hFXa) avait déjà été réalisée par Burgering et al [264]. Les auteurs proposaient un modèle tridimensionnel du complexe hK2 TFPI - hFXa en se basant sur la structure du complexe hTFPI K2 - trypsine porcine et sur la structure du hFXa. Comme il

n'existait pas de modèle tridimensionnel entre le hTFPI et le hFXa, nous avons entrepris de modéliser le complexe hFXa - TFPI de la même façon que l'avait fait Burgering en se basant sur un complexe hK2 TFPI - trypsine porcine, dont la structure est connue : à la différence de Burgering, nous sommes partis des structures publiées dans la littérature présentes dans la base PDB (2J95 pour le hFXa) et de la Brookhaven Protein Data Bank pour le complexe TFPI K2 - trypsine porcine (code 1TFX) dont la résolution est meilleure que les structures utilisées par Burgering.

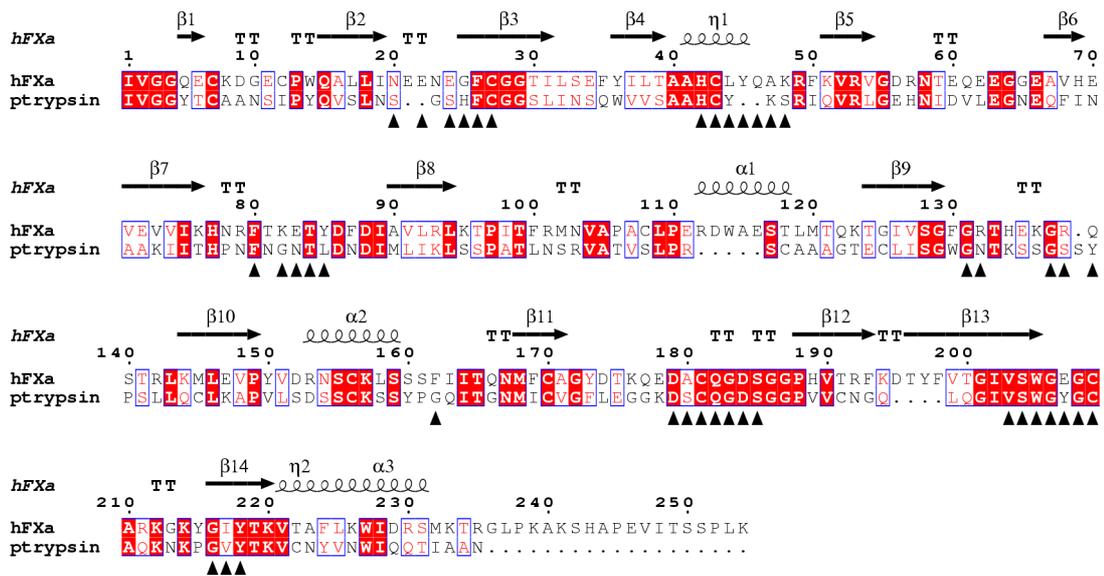


Figure 8 : Alignement des séquences du domaine catalytique du facteur Xa humain et de la trypsine porcine

La structure secondaire (hélice α ou feuillet β) correspondant aux différentes régions est indiquée au dessus de la séquence.

Le squelette de la chaîne lourde du facteur Xa a donc été superposé sur le squelette de la trypsine porcine (figure 8). Les problèmes de congruence ont nécessité quelques réorganisations. Ces réorganisations ont été faites en s'appuyant notamment sur la structure du complexe formé entre la kallikréine porcine, une autre sérine-protéase, et le BPTI (Bovin Pancreatic Trypsin Inhibitor, code PDB 2KA1), un autre inhibiteur à domaine de type Kunitz.

En effet, l'acide aminé en position 99 du hFXa est une tyrosine (Y99) alors qu'il s'agit d'une leucine (L99) plus petite dans la trypsine : l'introduction d'une chaîne latérale plus grande avec la tyrosine implique une réorganisation locale. Dans la structure du cristal du facteur Xa libre, la chaîne latérale de la tyrosine est orientée vers le site catalytique alors que dans la structure cristalline du complexe formé entre la kallikréine porcine et le BPTI,

la chaîne latérale de Tyr99 est orientée vers le solvant. Nous avons tenu compte dans notre modèle de la position de Tyr99 telle qu'elle est présente dans le modèle kallicréine - BPTI. Le modèle résultant (hFXa - hK2 TFPI) a ensuite été neutralisé par l'addition de deux contre-ions avec le logiciel SODIUM [265], et tous les calculs ont été réalisés avec le logiciel CHARMM. Pour estimer l'affinité de liaison du domaine K2 du TFPI pour la chaîne lourde du facteur Xa, nous avons analysé en détail les énergies d'interaction entre les deux systèmes macromoléculaires.

3.2.2.2. *Biologie Moléculaire*

1) Conception et structure du gène synthétique TIMX

Le gène synthétique a été conçu sur la base de la structure du facteur X mais avec plusieurs modifications. Pour la conception de la séquence TIMX (figure 9), le peptide signal du facteur X a été remplacé par le peptide signal des inhibiteurs de métalloprotéases (TIMP) puisqu'il avait déjà été montré que ce peptide signal pouvait augmenter la sécrétion de certaines protéines [266]. Le site de clivage par les furines Arg-Lys-Arg (RKR) présent en amont du peptide d'activation a été conservé. Le domaine Gla a été supprimé.

La séquence nucléotidique comporte également de part et d'autre les séquences nécessaires à l'insertion de la séquence TIMX dans le vecteur plasmidique pTT5 au niveau des sites de restriction *XbaI* et *BamHI*.



Figure 9 : Séquence nucléotidique du gène TIMX

Cette séquence est insérée dans le plasmide pTT5 au niveau des sites de restrictions *XbaI* et *BamHI*.

Le codon ATG (en bleu) correspond au codon start et code pour une méthionine.

Le codon TGA (en gris) correspond au codon stop.

La région en jaune correspond au peptide signal de TIMP.

Les régions en vert et rouge correspondent respectivement aux domaines EGF1 et EGF2.

La région en violet correspond au peptide d'activation.

La région en rose correspond à la chaîne lourde (sans le peptide d'activation).

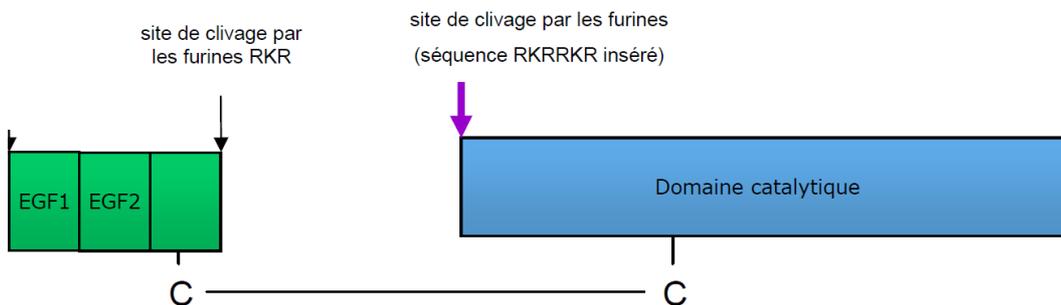


Figure 10 : Structure de la protéine 2RKR-TIMX après clivage par les furines

La protéine 2RKR-TIMX comporte un signal peptide TIMP, 2 domaines EGF et un domaine catalytique.

Le domaine d'activation est normalement clivé par les furines au niveau des sites RKR et 2RKR.

2) Clonage du gène TIMX dans pTT5

❖ Le plasmide pTT5

Le plasmide pTT5 (figure 11) est conçu pour transfecter des cellules HEK 293-EBNA1 [267]. Les cellules HEK 293 sont issues des cellules HEK 293 créées dans les années 70 par transformation de cellules de rein embryonnaire humaines avec des fragments d'ADN d'adénovirus [268]. Elles expriment de façon constitutionnelle les gènes adénovirus E1A et E1B. La lignée HEK293E provient des cellules HEK 293 transformées pour exprimer de façon constitutionnelle la protéine EBNA1 qui favorise la réplication de plasmides au niveau d'une origine de réplication EBV.

Le plasmide pTT5 comporte :

- un promoteur CMV (Cytomegalovirus) :

Ce promoteur permet une amplification de l'expression protéique [269] grâce à une protéine adénovirale synthétisée de façon constitutive par les cellules de lignée HEK293.

- une origine de réplication EBV (Ebstein Bar Virus) :

La réplication est alors favorisée par la sécrétion de la protéine virale EBNA1 par les cellules HEK293E .

- une origine de réplication bactérienne pMB1 :

Elle permet la réplication du plasmide dans les bactéries transformées.

- un gène de résistance à l'ampicilline :

Il confère aux bactéries contenant le plasmide une résistance à l'ampicilline qui permet de sélectionner les bactéries ayant intégré le plasmide en présence d'ampicilline.

- un site de clonage multiple MCS (Multicloning Site) :

Ce site présente de nombreux sites de restriction uniques pour permettre d'y insérer un gène d'intérêt.

- un site de polyadénylation :

Ce site est nécessaire à la maturation des ARN messagers.

- une séquence adénovirus TPL (tripartite leader) :

Elle permet elle aussi d'augmenter l'expression protéique.

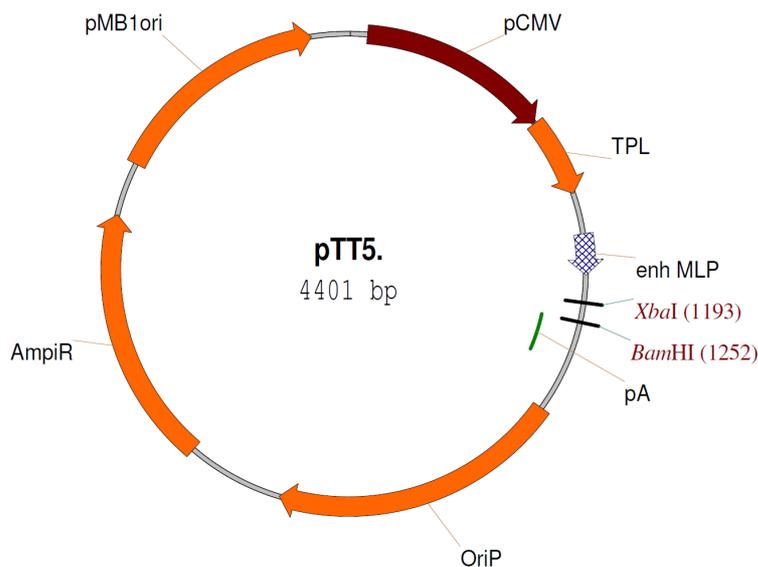


Figure 11 : Plasmide pTT5

Ce plasmide comporte un promoteur CMV, une origine de réplication EBV, une origine de réplication bactérienne pMB1, un gène de résistance à l'ampicilline, un site de clonage multiple, un site de polyadénylation, une séquence tripartite leader.

❖ Les étapes du clonage

Elles comprennent :

- la digestion enzymatique du plasmide receveur et de l'insert :

Le plasmide pTT5 (3 µg) et le plasmide PUC57-TIMX (3 µg) contenant l'insert TIMX, sont digérés par les enzymes *XbaI* et *BamHI* dans le tampon approprié pendant 3h à 37°C puis séparés sur gel d'agarose 1%.

- la migration électrophorétique en gel d'agarose des produits de digestion :

Cette migration se fait dans du tampon TAE (Tris Acétate EDTA) sur un gel horizontal d'agarose 1% contenant 50 ng/mL de bromure d'éthidium, agent intercalant fluorescent permettant de visualiser les produits de digestion sous rayons ultraviolets. Les échantillons sont mélangés avec 1/5 de tampon de charge. Sous une tension de 100 V, les différents segments d'ADN chargés négativement migrent pendant une heure de façon inversement proportionnelle à leur taille. L'utilisation d'un marqueur de poids moléculaire sert d'échelle pour identifier les fragments par leur taille.

- le découpage des bandes d'intérêt du gel d'agarose et l'extraction de l'ADN :

Les bandes correspondantes à pTT5 et à l'insert TIMX sont visualisées et découpées au scalpel sur une table à ultraviolets. L'extraction de l'ADN des bandes est réalisée avec le kit QIA Quick Gel Extraction Kit (Qiagen) selon les instructions du fabricant.

- la déphosphorylation du plasmide pTT5 (extrait du gel d'agarose) :

L'utilisation de phosphatase alcaline de crevette grise permet la déphosphorylation en 5' et en 3' du plasmide. Cette déphosphorylation empêche le plasmide de se refermer sur lui-même en cas de digestion enzymatique incomplète du plasmide, responsable de la persistance d'extrémités cohésives.

- la ligation du plasmide et de l'insert par une ligase avec le kit DNA Ligation Kit (Fermentas®)

- la transformation de bactéries *E.coli* compétentes par choc thermique :

Cinquante microlitres de bactéries *E.coli* compétentes DH5α (Invitrogen) et 25 ng de plasmide sont incubés pendant 30 minutes sur de la glace afin de permettre l'adhésion du plasmide à la membrane bactérienne. Un choc thermique de 30 secondes à 42°C est ensuite appliqué. Les bactéries sont ensuite mises en culture en milieu liquide LB (500 µl) en agitation pendant une heure à 37°C avant d'être étalées et cultivées sur une gélose sélective LB contenant de l'ampicilline (100 µg/ml) pendant 16 à 24 heures à 37°C. Quelques colonies sont alors prélevées et repiquées en milieu liquide LB contenant de l'ampicilline. La culture est centrifugée 24h plus tard pour récupérer le culot bactérien dont l'ADN sera extrait.

- l'extraction de l'ADN plasmidique des bactéries *E coli* transformées :

Elle est réalisée à partir d'un culot bactérien frais grâce au kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen®) selon les instructions du fabricant (figure 12). Cette extraction est basée sur une lyse alcaline des bactéries suivie d'une adsorption de l'ADN plasmidique sur une membrane de silice en présence d'une forte concentration en sels.

- la digestion enzymatique de l'ADN plasmidique :

L'ADN plasmidique extrait est digéré par les mêmes enzymes de restriction ayant servi à l'insertion du gène, suivie d'une migration sur gel d'agarose pour vérification de l'insertion du gène.

- l'envoi de l'ADN plasmidique pour séquençage :

Le résultat de séquençage est vérifié en alignant les séquences obtenues avec la séquence théorique dans le logiciel Vector NTI®.

- le souchage des bactéries :

Les colonies bactériennes pour lesquelles le résultat du séquençage est correct sont remises en culture puis conservées sur billes en milieu cryoprotecteur à -20°C.

3) Amplification de l'ADN plasmidique

L'amplification de l'ADN plasmidique est obtenue grâce à la mise en culture des bactéries *E.coli* souchées qui vont répliquer le plasmide d'intention, au cours des divisions

cellulaires dans un milieu de culture LB sélectif contenant de l'ampicilline 100 µg/ml. L'extraction de l'ADN plasmidique du culot bactérien est alors réalisée avec le kit Plasmid Maxi Kit (Qiagen) selon les instructions du fabricant. Cette extraction est basée sur une lyse alcaline des bactéries suivie d'une adsorption de l'ADN plasmidique sur une membrane de silice en présence d'une forte concentration saline. Ce dispositif permet d'obtenir environ 20 µg d'ADN à partir d'un culot bactérien obtenu à partir de 200 ml de culture bactérienne fraîche mise en culture pendant la nuit.

4) **Mutagenèses dirigées**

❖ Principe

La mutagenèse dirigée d'un plasmide est réalisée avec le Kit Site-Directed Mutagenesis Quick Change (Stratagene, USA). Elle consiste en une PCR (tableau 3) où les deux amorces, complémentaires, présentent le site mutationnel.

La PCR (Polymerase Chain Reaction) consiste à amplifier de façon exponentielle une séquence d'ADN encadrée par une paire d'amorces grâce à une enzyme thermostable : la Pfu polymérase. Elle comporte plusieurs étapes qui se déroulent à des températures différentes contrôlées par un thermocycleur (dénaturation de l'ADN double brin, hybridation des amorces, élongation).

Dans le cas de la mutagenèse dirigée : à chaque cycle de PCR, chaque brin du plasmide est répliqué avec une très haute fidélité par la Pfu turbo polymérase qui allonge les amorces. L'incorporation des amorces (après hybridation et élongation à chaque cycle de PCR) présentant le site mutationnel génère un plasmide muté (figure 12). Le produit de PCR obtenu est digéré pendant 3 heures à 37°C par l'enzyme *DpnI*, endonucléase qui digère l'ADN plasmidique matriciel d'origine bactérienne, qui est méthylé et ne contient pas la mutation désirée. Le produit de PCR sera utilisé pour transformer des bactéries *E. coli* XL1-Blue supercompétentes. Les bactéries transformées sont sélectionnées sur gélose LB ampicilline. Les colonies sont repiquées et cultivées pendant 16 heures dans 1,5 ml de milieu LB liquide (contenant de l'ampicilline) à 37°C. Le culot bactérien est récupéré après centrifugation avant de subir une extraction de l'ADN plasmidique.

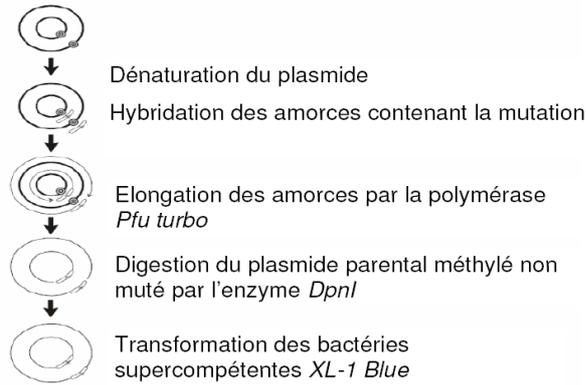


Figure 12 : Principales étapes de la mutagenèse dirigée

Etape	Nombre de cycles	Température	Durée
1	1	95 °C (dénaturation initiale)	30 sec
2	18	95 °C (dénaturation)	30 sec
		55 °C (hybridation)	1 min
		68 °C (élongation)	1 min/kb de plasmide soit 8 min

Tableau 3 : Protocole PCR de mutagenèse dirigée

❖ Séquence des amorces

Les amorces doivent mesurer entre 25 et 45 bases et le site mutationnel doit être entouré de 15 bases de part et d'autre. Le contenu en bases nucléotidiques GC (Guanine, Cytosine) doit être au moins de 40% et les extrémités 5' et 3' de l'amorce doivent comporter une ou plusieurs bases G ou C. Le T_m , correspondant à la température de demi-dénaturation du double d'ADN, est donné par la formule suivante : $T_m = 81,5 + 0.41 (\%GC) - 675/N - \% \text{ séquence mésappariée}$ (où N = le nombre de bases constituant l'amorce) ; elle doit être supérieure à 78 °C.

Dans notre cas, la mutagenèse dirigée sert à modifier l'acide aminé en position R138 sur la chaîne lourde du facteur Xa (correspondant à la position 332 du facteur X) et K82 (correspondant à la position 276 du facteur X) (figures 14). Une mutagenèse dirigée a également permis d'insérer une séquence 2RKR de clivage par les furines (figures 10 et 13).

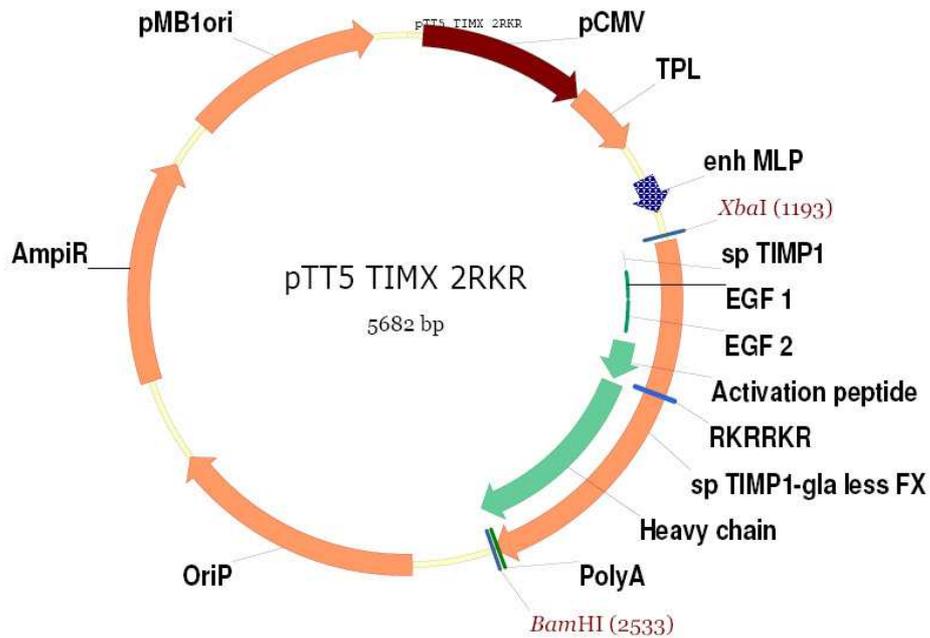


Figure 13 : Plasmide pTT5 2RKR-TIMX

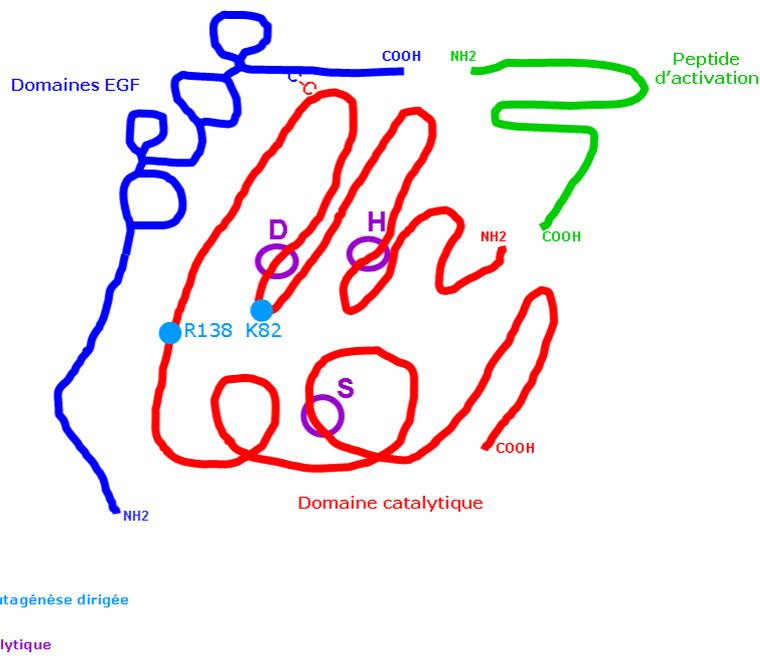


Figure 14 : Sites de mutagenèse dirigée du facteur X

La triade catalytique est formée par les acides aminés His42, Asp88 et Ser185. Les sites de mutagenèse correspondent à l'Arg138 et à la Lys82. La numérotation des acides aminés démarre à l'extrémité N-terminale du domaine catalytique (représenté en rouge).

No	Amorce	Sequence 5'-3'
1	2 RKR-F	CAACCTCACCAGGAGGAAGAGGAGGAAGAGGATCGTGGGAGGC
2	2 RKR-R	GCCTCCCACGATCCTCTTCTTCCTCCTCTTCCTCCTGGTGAGGTTG
2	R138F-F	CGCACCCACGAGAAGGGC <u>TTT</u> CAGTCCACCAGGCTCAAG
3	R138F-R	CTTGAGCCTGGTGGACTGAAAGCCCTTCTCGTGGGTGCG
4	R138G-F	CGCACCCACGAGAAGGGC <u>GCC</u> CAGTCCACCAGGCTCAAG
5	R138G-R	CTTGAGCCTGGTGGACTG <u>GCC</u> CCCTTCTCGTGGGTGCG
6	R138I-F	CGCACCCACGAGAAGGGC <u>ATT</u> CAGTCCACCAGGCTCAAG
7	R138I-R	CTTGAGCCTGGTGGACTGAA <u>T</u> GCCCTTCTCGTGGGTGCG
8	K82Y-F	GCACAACCGGTTACATATGAGACCTATGACTTCGAC
11	K82Y-R	GTCGAAGTCATAGGTCTCATATGTGAACCGGTTGTGC

Tableau 4 : Séquence des amorces de mutagenèse dirigée

Les amorces sens sont désignées par -F (Forward) et les amorces anti-sens sont désignées par -R (Reverse). Les séquences nucléotidiques correspondant aux acides aminés mutés (ou insérés) sont soulignées.

3.2.2.3. *Transfection cellulaire*

Les premiers essais de transfection transitoire par le plasmide pTT5-2RKR TIMX ont été effectués par nos soins en cellules HEK293E avec adaptation progressive des cellules en milieu sans sérum de veau fœtal. Pour cela, les cellules sont mises en culture dans des boîtes de culture de 75 cm² contenant un milieu DMEM 4.5g/l de glucose en présence de 50 mg/l de généticine et 10% de sérum de veau fœtal. Elles sont progressivement adaptées à un milieu sans sérum de veau fœtal en les cultivant pendant deux passages dans un milieu à 5% de sérum de veau fœtal puis à nouveau pendant deux passages dans un milieu à 2.5% de sérum de veau foetal. La transfection transitoire est réalisée avec du jet-PEI (Polyéthylénimine) (Polypus Transfection, Illkirch, France) dans un milieu à 2.5% de sérum de veau fœtal alors que les cellules sont à 30-40% de confluence. Douze heures plus tard, le milieu de culture est changé pour un milieu

identique sans sérum de veau fœtal. Cinq jours plus tard, le surnageant cellulaire est récupéré, centrifugé puis congelé à -80 °C.

Des productions de 2RKR-TIMX et des variants R138G, R138F, R138I ont ensuite été réalisées avec des volumes de culture de 50 ml par la société Protein Core Facility (Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Suisse). Les cellules utilisées sont également des cellules humaines HEK293E et la transfection a été réalisée au polyphosphate de calcium.

3.2.2.4. Dialyse des surnageants de culture cellulaire

Après décongélation à 37 °C, les surnageants (20 ml) sont dialysés à 4 °C pendant 8 heures trois fois consécutives à travers une membrane de dialyse de 25 kD dans un bécher avec agitation contenant 500 ml du tampon HEPES 20 mM 150 mM NaCl. Les dialysats sont aliquotés et congelés à -80 °C.

3.2.2.5. Electrophorèse des protéines

Les électrophorèses sont faites sur SDS-PAGE en gradient 10-20%.

3.2.2.6. Quantification des variants GDXa (ELISA)

Le dosage des différents variants a été réalisé avec le kit Asserachrom X : Ag (Diagnostica Stago).

3.2.2.7. Tests fonctionnels des variants

1) Activité chromogénique des différents variants

L'activité chromogénique des variants des dialysats de surnageant cellulaire est testée avec chaque variant à une concentration de 1nM en présence de substrat PNAPEP 1025 en excès (1 mM). La variation d'absorbance est enregistrée à 405 nm.

2) Test de génération de thrombine

Les tests de génération de thrombine sont faits dans les mêmes conditions que celles décrites dans la Partie 1 du chapitre Matériels et Méthodes.

4. RESULTATS

4.1. Partie 1 : Validation du concept

4.1.1. Caractérisation SDS-PAGE du GDXa

L'analyse électrophorétique SDS-PAGE du facteur Xa et du GDXa (Cryopep) dans des conditions dénaturantes non réductrices montre respectivement deux bandes pour le facteur Xa : Xa α et Xa β (figure 15) : Le facteur Xa β provient de l'auto-protéolyse limitée du facteur Xa α [270].

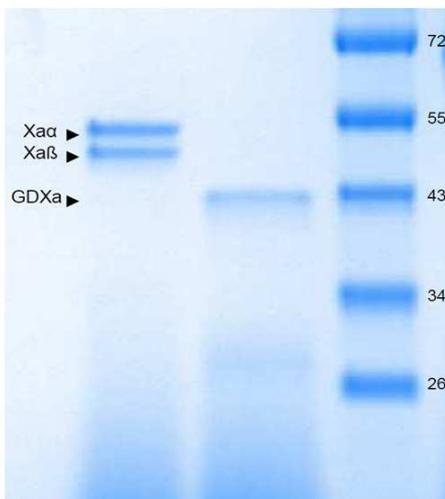


Figure 15 : SDS-PAGE du GDXa et du facteur Xa

La migration a été effectuée en conditions dénaturantes non réductrices.

Piste 1 : facteur Xa, piste 2 : GDXa, piste 3 : marqueur de poids moléculaire (en kD)

4.1.2. Impact du GDXa et du facteur Xa sur la génération de thrombine

En l'absence de facteur tissulaire, le GDXa n'augmente pas la génération de thrombine des plasmas d'hémophiles A sévères testés (figure 16). En revanche, en présence de facteur tissulaire (1pM), on observe une nette restauration de la génération de thrombine (figure 16) : le GDXa normalise alors tous les paramètres de génération de thrombine (temps de latence, temps au pic, hauteur de pic et potentiel endogène de thrombine). Cette augmentation de la génération de thrombine n'est pas liée à un effet direct du GDXa sur la prothrombine puisque celui-ci est incapable de restaurer la génération de thrombine en l'absence de facteur tissulaire (figure 16). Ces résultats sont observés dans tous les plasmas de patients hémophiles A sévères testés. Contrairement

au GDXa, le facteur Xa natif déclenche une génération de thrombine rapide et intense, même en l'absence de facteur tissulaire (figure 16), puisqu'il est capable de convertir directement la prothrombine en thrombine.

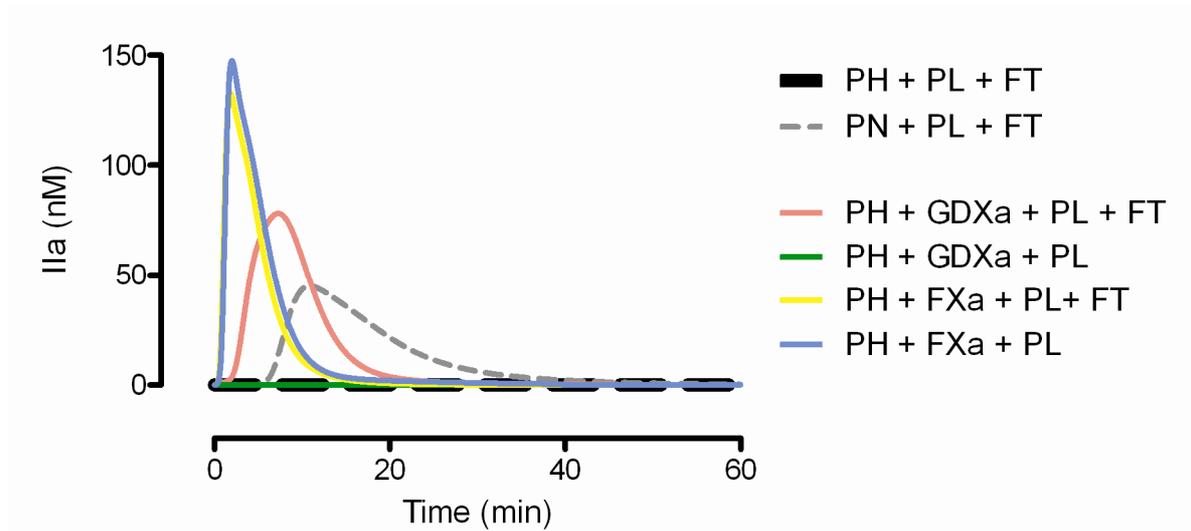


Figure 16 : Effet du GDXa et du facteur Xa sur la génération de thrombine d'un plasma hémophile A sévère

Plasma contrôle (pool de plasmas normaux (en traits pointillés gris)) et plasma d'hémophile A sévère (trait pointillé gras et noir) en présence de 1 pM de facteur tissulaire et 4 μ M de phospholipides. Le plasma d'hémophile (en trait pointillé) est surchargé en GDXa (50 nM) en présence de facteur tissulaire (trait plein rouge) et en l'absence de facteur tissulaire (trait plein vert). Le plasma d'hémophile est surchargé avec du facteur Xa en l'absence (trait plein bleu) et en présence de facteur tissulaire (trait plein jaune). PN correspond au plasma contrôle normal, PH au plasma d'hémophile, PL aux phospholipides et FT au facteur tissulaire.

Nous avons testé deux concentrations de GDXa (20 et 50 nM) sur les plasmas de cinq patients hémophiles A sévères différents (dont un plasma avec inhibiteurs titrés à 50 unités Bethesda) et d'un patient hémophile B sévère. La génération de thrombine était nulle ou faible pour les six patients testés en présence de 1 pM de facteur tissulaire et de 4 μ M de phospholipides en l'absence de GDXa. L'addition de 20 nM ou de 50 nM de GDXa permettait d'augmenter la génération de thrombine de façon dose-dépendante. En présence de 20 nM de GDXa, l'ETP est de 374 ± 128 nM et la hauteur du pic est de 22 ± 11 nM. Le temps de latence et le temps au pic sont respectivement de $5,0 \pm 1,5$ et de $13,9 \pm 3,8$ min (tableau 2).

En présence de 50 nM de GDXa, l'ETP atteint 533 ± 132 nM, la hauteur de pic 46 ± 20 nM, le temps de latence $2,8 \pm 0,7$ min et le temps au pic $9,2 \pm 2,7$ min (tableau 2). Ces valeurs sont donc corrigées avec une dose de 50 nM de GDXa.

ETP (nM.min)	GDXa 0 nM	GDXa 20 nM	GDXa 50 nM
PN	611	-	-
P1 (HA)	0	536	530
P2 (HA)	0	268	420
P3 (HA)	0	207	330
P4 (HA)	0	466	610
P5 (HA)	215	331	629
P6 (HA + I)	254	425	539
P7 (HB)	282	546	668
Moyenne \pm DS	125 \pm 139	374 \pm 128	533 \pm 132

PH (nM)	GDXa 0 nM	GDXa 20 nM	GDXa 50 nM
PN	43	-	-
P1 (HA)	0	33	40
P2 (HA)	0	15	26
P3 (HA)	0	13	25
P4 (HA)	0	41	78
P5 (HA)	8	14	43
P6 (HA + I)	15	28	55
P7 (HB)	13	23	46
Moyenne \pm DS	6 \pm 7	22 \pm 11	46 \pm 20

LT (min)	HP	GDXa 20 nM	GDXa 50 nM
PN	5.7	-	-
P1 (HA)	-	3.1	2.3
P2 (HA)	-	5.7	3.0
P3 (HA)	-	4.5	2.9
P4 (HA)	-	2.7	1.6
P5 (HA)	16.0	7.3	3.4
P6 (HA + I)	8.0	4.5	2.5
P7 (HB)	17.0	5.5	3.3
Moyenne \pm DS	ND	5.0 \pm 1.5	2.8 \pm 0.7

PT (min)	GDXa 0 nM	GDXa 20 nM	GDXa 50 nM
PN	12.3	-	-
P1 (HA)	-	13.3	11.1
P2 (HA)	-	17.6	14.1
P3 (HA)	-	12.9	10.4
P4 (HA)	-	8.6	7.3
P5 (HA)	30.3	18.9	8.6
P6 (HA + I)	24.4	12.4	7.4
P7 (HB)	28.9	12.8	7.3
Moyenne \pm DS	-	13.9 \pm 3,8	9.2 \pm 2,7

Tableau 5 : Effet du GDXa sur la génération de thrombine de différents plasmas d'hémophiles

5 plasmas d'hémophiles A sévères sans inhibiteurs (HA), 1 plasma d'hémophile A avec inhibiteurs (HA+I) et 1 plasma d'hémophile B (HB) ont été testés.

Les plasmas d'hémophiles sont surchargés avec 20 ou 50 nM de GDXa puis immédiatement testés avec un test de génération de thrombine. ETP, PH, LT et PT correspondent respectivement au potentiel endogène de thrombine, à la hauteur du pic, au temps de latence et au temps au pic de thrombine. HP correspond aux plasmas d'hémophiles.

HA correspond aux plasmas d'hémophiles A. HA+I correspond aux plasmas d'hémophiles A avec inhibiteurs et HB correspond au plasma d'hémophile normal.

Nous avons également comparé l'effet du facteur VIIa recombinant au GDxa et nous avons observé que 10 nM de GDxa génèrent davantage de thrombine que 200 nM de facteur VIIa (figure 17) dans un plasma d'hémophile A sévère.

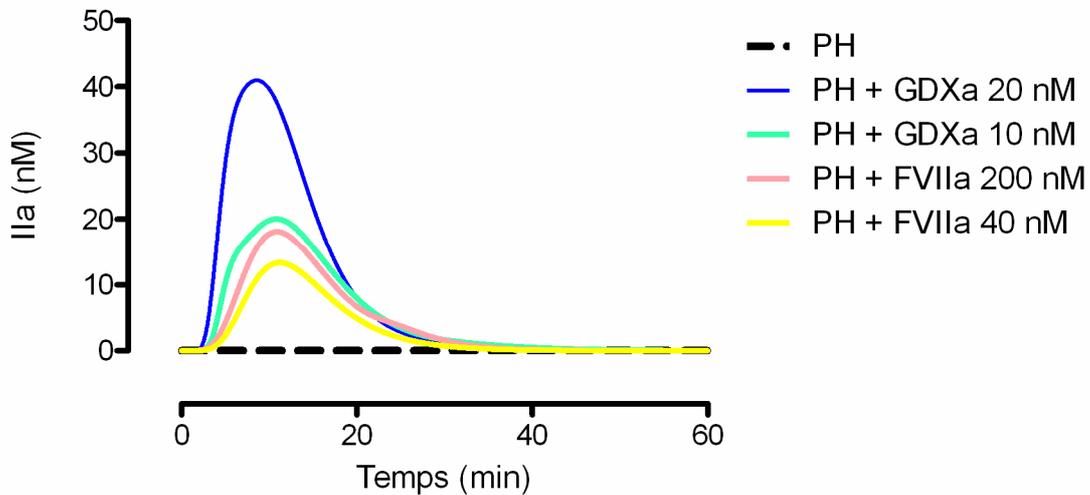


Figure 17 : Effet du GDxa et du facteur VIIa recombinant sur la génération de thrombine d'un plasma d'hémophile A sévère

Le plasma est surchargé avec du 10 nM de GDxa (trait plein bleu ciel), 20 nM de GDxa (trait plein bleu foncé), 40 nM de facteur VIIa 40 nM (trait plein jaune) et 200 nM de facteur VIIa (trait plein rose). Les tests sont réalisés en présence de facteur tissulaire et de phospholipides.

4.1.3. Clivage du substrat ZGGR-AMC par le GDxa

Pour quantifier une éventuelle interférence liée à un clivage du substrat ZGGR-AMC par le GDxa (et non par la thrombine), des concentrations croissantes de GDxa sont ajoutées à un mélange de plasmas normaux, en présence d'une concentration saturante (6 $\mu\text{g/ml}$) de Lépirudine (figure 18) : à cette concentration très élevée, la Lépirudine, inhibiteur direct et irréversible de la thrombine, inhibe toute thrombine générée. Dans ces conditions, le GDxa présent dans le milieu réactionnel clive le substrat ZGGR-AMC proportionnellement à sa concentration. A la concentration de 50 nM de GDxa, le signal final mesuré en fluorescence représente 8% de celui généré dans un plasma normal en l'absence de Lépirudine (en présence de 1 pM de facteur tissulaire et de 4 μM de phospholipides). A la concentration de 250 nM, le signal est d'environ 40% de la fluorescence totale. Cependant, comme le signal de fluorescence mesuré est linéaire, il est mathématiquement inclus dans le signal correspondant au complexe α 2-macroglobuline / thrombine, calculé avec la méthode des trois vagues utilisée pour calculer les courbes de génération de thrombine. Le signal fluorescent généré par le clivage du ZGGR-AMC par le GDxa n'impacte donc pas les résultats de génération de thrombine aux concentrations de GDxa utilisées [262].

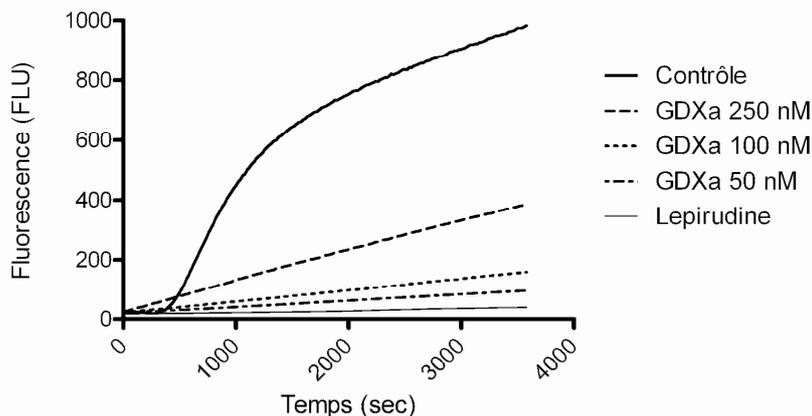


Figure 18 : Effet du GDXa sur le clivage du substrat ZGGR-AMC

Une concentration saturante de Lépirudine (6 $\mu\text{g/ml}$) est ajoutée à un plasma normal en absence (trait fin et plein) et en présence de différentes concentrations de GDXa (traits gras et pointillés). Le signal brut de fluorescence est enregistré au cours du temps. La courbe contrôle correspond au signal brut de fluorescence obtenu lors d'un test de génération de thrombine effectué avec un plasma normal en présence de 1 μM de facteur tissulaire et de 4 μM de phospholipides sans Lépirudine.

4.1.4. Inhibition du complexe facteur tissulaire – facteur VIIa par le TFPI

L'activité du complexe facteur tissulaire - facteur VIIa - phospholipides est évaluée par la mesure du clivage du facteur IX. En l'absence de TFPI, le complexe ténase extrinsèque active le facteur IX sous sa forme IX $_{a\beta}$ (45 kD) (figure 19). L'addition d'un mélange TFPI - facteur Xa diminue l'activation du facteur IX comme en témoigne la forte diminution de l'intensité de la bande correspondant au facteur IX $_{a\beta}$ (figure 19). En revanche, l'addition d'un mélange TFPI - GDXa aux mêmes concentrations n'empêche pas l'activation du facteur IX en facteur IX $_{a\beta}$ par le complexe ténase extrinsèque.

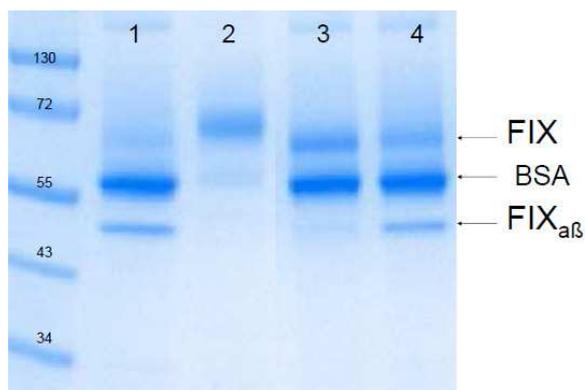


Figure 19 : Effet du facteur Xa et du GDXa sur l'inhibition par le TFPI du complexe (facteur tissulaire / facteur VIIa).

L'activité du complexe facteur tissulaire - facteur VIIa - phospholipides est évaluée par mesure du clivage du facteur IX. Un mélange facteur VIIa - facteur tissulaire – phospholipides - CaCl_2 est incubé pendant 30 minutes, soit avec du tampon (piste 1), soit avec un mélange pré-incubé TFPI (80 nM) + Xa (80 nM) (piste 3), soit avec un mélange TFPI (80 nM) + GDXa (80 nM) (piste 4). Ces mélanges sont ensuite ajoutés à du facteur IX (900 nM de concentration finale) pendant 90 minutes. Des aliquots sont prélevés et ajoutés à du tampon de dénaturation en conditions non réductrices avant migration sur gel SDS-PAGE. La piste de gauche correspond au marqueur de poids moléculaire. La piste 2 correspond au facteur IX seul. FIX désigne le FIX non activé, FIX $_{a\beta}$ désigne la forme pleinement active du facteur IX.

4.1.5. Propriétés enzymatiques du GDXa

Avant d'analyser l'effet du GDXa et du facteur Xa sur la génération de thrombine, nous avons déterminé leur activité enzymatique avec le substrat PNAPEP 1025. Le GDXa montre une affinité similaire ($K_m = 0.75 \pm 0.05$ mM) au facteur Xa ($K_m = 0.64 \pm 0.03$) et des propriétés catalytiques proches ($k_{cat} = 290 \pm 5$ sec⁻¹) de celles du facteur Xa ($k_{cat} = 375 \pm 8$ sec⁻¹). Le k_{cat} et le K_m ont été déterminés par la méthode de Lineweaver Burk.

	$K_m \pm DS$ (mM)	$k_{cat} \pm DS$ (s ⁻¹)	Antithrombine $k_2 \pm DS$ (10 ³ .M ⁻¹ .s ⁻¹)	TFPI $K_i^* \pm DS$ (nM)
Xa	0.64 ± 0.03	375 ± 5	1.57 ± 0.08	0.17 ± 0.031
GDXa	0.75 ± 0.05	290 ± 8	1.50 ± 0.04	0.31 ± 0.04

Tableau 6 : Propriétés enzymatiques du GDXa et du facteur Xa.

Les données sont représentatives de deux mesures indépendantes, réalisées chacune en triplicat avec le substrat chromogénique PNAPEP 1025.

4.1.6. Inhibition enzymatique du GDXa et du facteur Xa

4.1.6.1 *Inhibition enzymatique du GDXa et du facteur Xa par le TFPI*

Le TFPI est un inhibiteur compétitif réversible [194, 263] du facteur Xa de type « Slow tight-binding inhibitor ». Nous avons comparé les profils d'inhibition du GDXa et du facteur Xa par le TFPI et déterminé leurs constantes d'inhibition (figure 20, tableau 6). GDXa a une affinité moindre pour le TFPI ($K_i^* = 0,31 \pm 0,04$ nM (figure 20 A)), par rapport au facteur Xa ($K_i^* = 0.17 \pm 0.03$ nM, (figure 20 B)). Pour la détermination de ces valeurs, le TFPI et le GDXa (ou facteur Xa) ont été incubés au préalable pendant 3 heures. Les courbes obtenues après 18 heures d'incubation sont semblables à celles obtenues après 3 heures, ce qui indique que l'équilibre était déjà atteint après 3 heures d'incubation.

Le K_i^* est déterminé selon les deux équations suivantes :

$$v_{obs} = v_{\infty} \cdot E_i + v_0 \cdot (E - E_i) \quad (\text{Eq. 1})$$

$$E_i = \frac{(nI + E + K_i^*) - \sqrt{(nI + E + K_i^*)^2 - 4 \cdot nI \cdot E}}{2} \quad (\text{Eq. 2})$$

Où E et I représentent les concentrations totales d'enzyme et d'inhibiteur, E_i la concentration d'enzyme inhibée, n le nombre de molécules d' I qui se combinent par molécule d' E (ici $n = 1$), K_i^* est la constante de dissociation apparente, v_{obs} est la vitesse

de réaction observée pour chaque concentration d'enzyme libre, v_0 est la vitesse de l'enzyme libre et v_∞ la vitesse résiduelle de l'enzyme saturé par l'inhibiteur.

Ces deux équations sont utilisées pour ajuster les courbes expérimentales présentées à la figure 20, ce qui permet de calculer la valeur du K_i^* comme décrit par Morrisson [271].

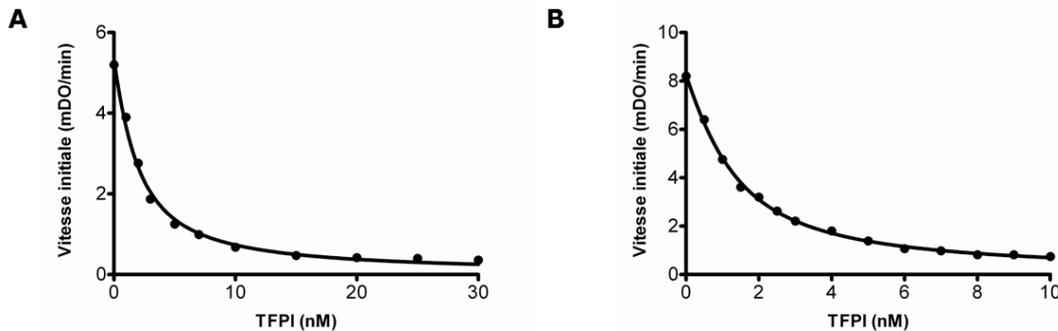


Figure 20 : Inhibition enzymatique du GDxα et du facteur Xa par le TFPI

0,25 nM de GDxα (A) ou de facteur Xa (B) sont incubés avec du TFPI pendant 3 heures à 37°C en présence de concentrations croissantes de TFPI (0 à 30 nM pour le GDxα et 0 à 10 nM pour le facteur Xa). Les données sont représentatives de 2 expériences différentes.

4.1.6.2 Inhibition enzymatique du GDxα et du facteur Xa par l'antithrombine

L'antithrombine est un inhibiteur irréversible du facteur Xa. Elle présente un seul site saturable et réagit de façon stoechiométrique avec le facteur Xa. Elle agit comme un « substrat suicide ». Nous avons mesuré l'inhibition du GDxα et du facteur Xa par différentes concentrations d'antithrombine au cours du temps (figures 21A et 21B). Les profils obtenus pour l'inhibition du GDxα et du facteur Xa sont identiques.

Dans nos expériences, l'antithrombine est mise en excès par rapport à l'enzyme (facteur Xa ou GDxα) : la perte d'activité de l'enzyme suit donc une cinétique de premier ordre. L'activité A au cours du temps t pour chaque concentration d'antithrombine testée diminue selon une constante de vitesse k telle que par $A / A_0 = e^{-kt}$. Nous avons donc déterminé pour chaque concentration testée d'antithrombine les constantes de vitesse (k) de formation du complexe Xa - antithrombine selon la formule $k = -\ln(A/A_0)/t$. Les différentes constantes de vitesse observées k correspondent aux pentes des droites obtenues avec les différentes concentrations d'antithrombine sur les figures 21 C et 21 D.

La réaction suit l'équation :



avec $K_I = k_{-1} / k_1$

K_{inact} est la constante de vitesse maximale d'inactivation et K_I la concentration d'antithrombine qui donne la moitié de la vitesse d'inactivation.

K_I et K_{inact} peuvent être déterminés en traçant la droite de $1/k_{\text{obs}}$ en fonction de $1/[\text{AT}]$:

$$1/k_{\text{obs}} = 1/k_{\text{inact}} + (K_I/k_{\text{inact}}) (1/[\text{AT}])$$

Nous avons ainsi déterminé les valeurs de K_I/k_{inact} qui correspondent à la pente de la droite des figures 21 E et 21 F.

Les valeurs de k_{inact} / K_I désignées par le terme k_2 dans le tableau 6 sont identiques pour le GDxa ($1.50 \pm 0.04 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) et pour le facteur Xa ($1.57 \pm 0.08 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

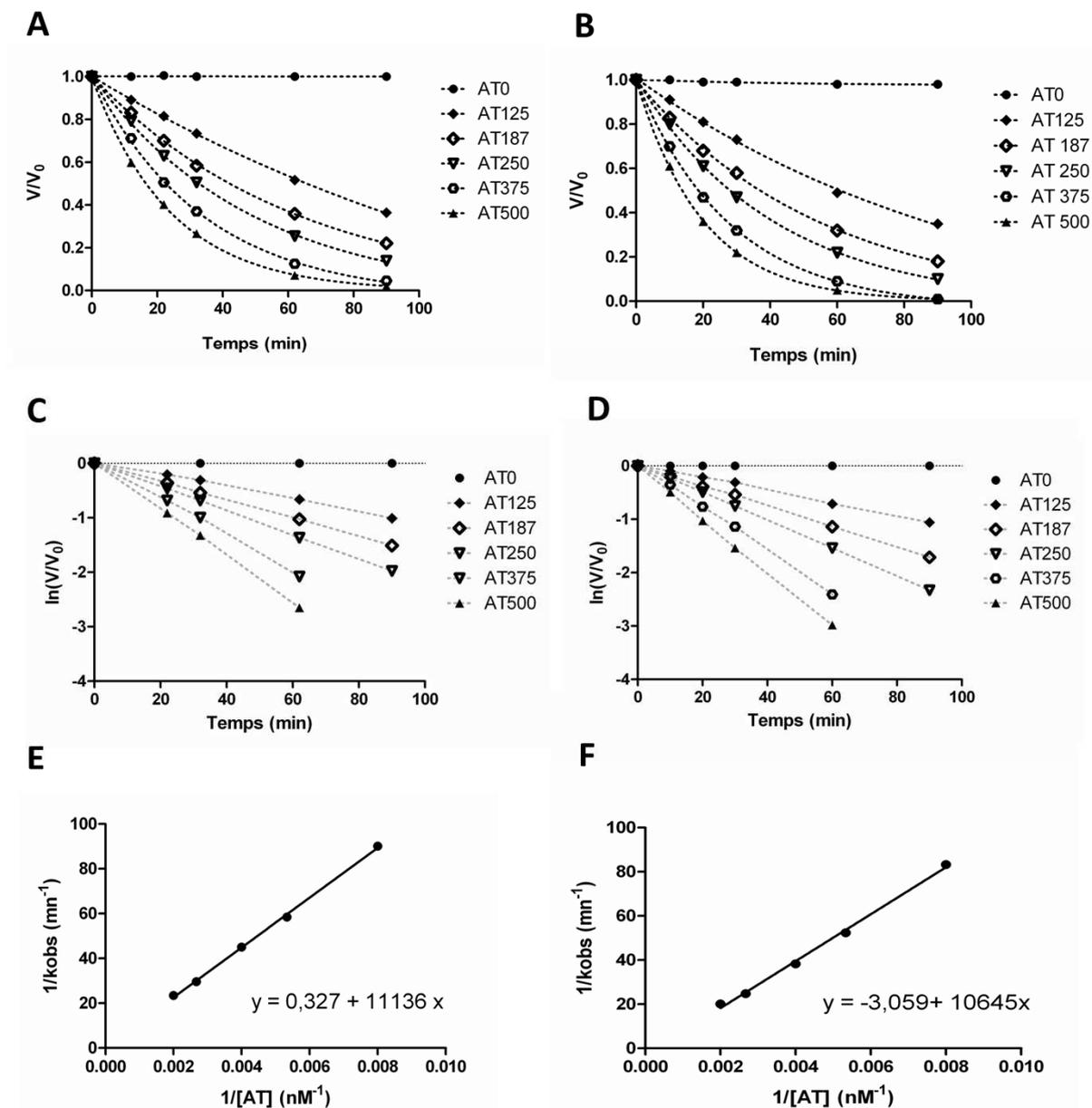


Figure 21 : Inhibition enzymatique du GDXa et du facteur Xa par l'antithrombine.

1,25 nM de facteur Xa ou de GDXa sont incubés en présence de concentrations croissantes d'antithrombine (0 à 500 nM) à 37°C. Des aliquots sont prélevés à différents temps (0 à 90 minutes) et ajoutés au substrat chromogénique PNAPEP 1025 pour détermination de la vitesse initiale.

V_0 désigne la vitesse initiale en l'absence d'antithrombine. V désigne la vitesse initiale en présence d'antithrombine.

(A-B) Les profils d'inhibition du GDXa (A) et du FXa (B) sont représentés par le ratio (V/V_0) en fonction du temps.

(C-D) La représentation logarithmique de l'inhibition de GDXa (A) et de FXa (B) permet de déterminer les constantes de vitesse (k_{obs}) correspondant à la pente des droites obtenues pour chaque concentration d'antithrombine.

(E-F) La représentation graphique de $1/k_{obs}$ en fonction de $1/[AT]$ pour le GDXa (A) et pour le facteur Xa (B) permet de déterminer le ratio K_i/K_{inact} correspondant à la pente de la courbe.

4.1.7. Neutralisation de l'antithrombine et du TFPI d'un plasma d'hémophile par des anticorps spécifiques

4.1.7.1. *Neutralisation de l'antithrombine d'un plasma d'hémophile*

La neutralisation de l'antithrombine d'un plasma d'hémophile A sévère par des anticorps anti-antithrombine augmente l'ETP d'une façon importante alors que l'impact est moindre sur les paramètres cinétiques (tableau 7 et figure 22). A une concentration d'anticorps anti-antithrombine de 7.5 g/l (qui correspond à 9% de l'activité antithrombine résiduelle mesurée, l'ETP augmente de façon très importante jusqu'à 2716 nM.min (plasma contrôle à 643 nM.min) tandis que les paramètres cinétiques (temps de latence à 6.6 min (plasma contrôle à 4.9 min), temps au pic à 31.3 min (plasma contrôle à 11.3 min)) sont corrigés de façon incomplète et contraste avec les valeurs considérables de l'ETP (figure 22 et tableau 7).

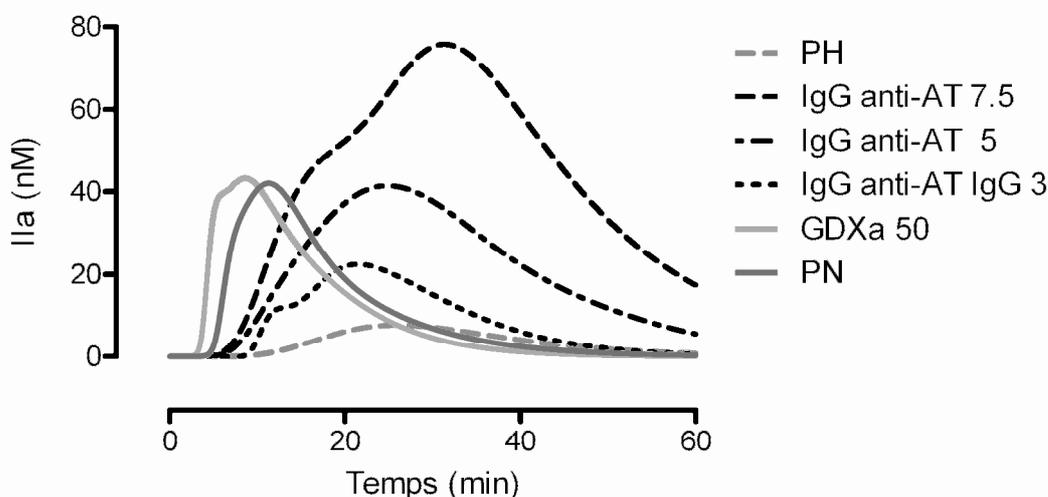


Figure 22 : Effet de la neutralisation de l'antithrombine sur la génération de thrombine de plasma d'hémophile.

Un plasma d'hémophile A sévère est surchargé avec différentes concentrations d'anticorps anti-antithrombine avant de réaliser un test de génération de thrombine. Les concentrations d'anticorps anti-antithrombine sont exprimées en g/l.

4.1.7.2. Neutralisation du TFPI d'un plasma d'hémophile

Comme cela a déjà été rapporté par Erhardtsen et al [11], l'addition d'un anticorps anti-TFPI permet de restaurer la coagulation d'un plasma d'hémophile A. Pour des concentrations d'anticorps supérieures à 10 mg/l (correspondant à une activité résiduelle de TFPI < 30%), tous les paramètres sont corrigés dans le plasma d'hémophile A sévère testé (tableau 7 et figure 23). A 10 mg/l, l'ETP et la hauteur de pic augmentent respectivement de 209 à 702 nM.min et de 8 à 79 nM. Le temps de latence et le temps au pic diminuent respectivement de 13.6 à 3.5 min et de 25.9 à 7.2 min.

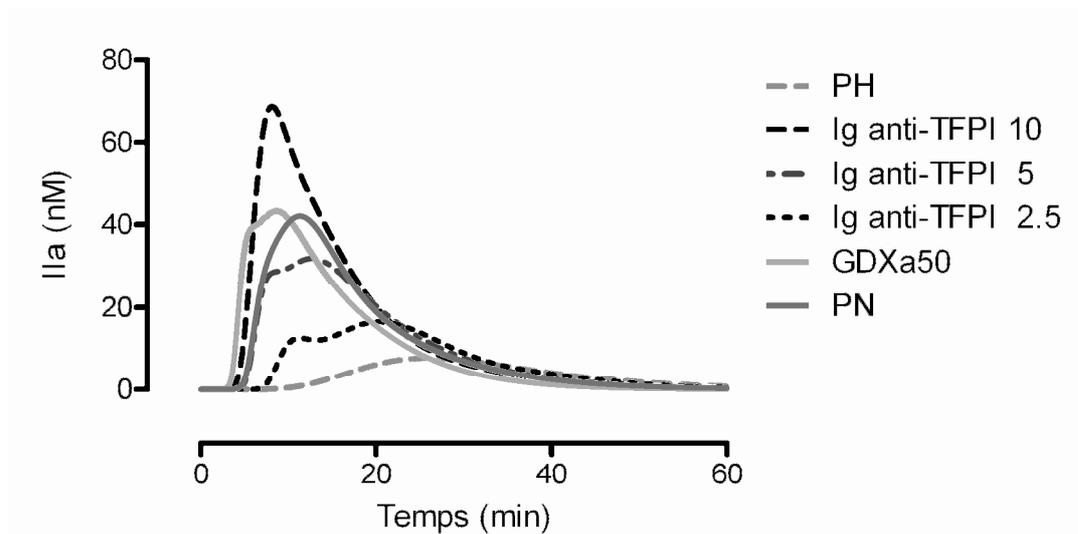


Figure 23 : Effet de la neutralisation du TFPI sur la génération de thrombine de plasma d'hémophile.

Un plasma d'hémophile A sévère est surchargé avec différentes concentrations d'anticorps anti-TFPI avant de réaliser un test de génération de thrombine. Les concentrations d'anticorps anti-TFPI sont exprimées en mg/l.

	PN	PH	GDXa 50 nM
Activité AT (%)	-	97	-
Activité TFPI (%)	-	98	-
ETP (nM.min)	643	209	629
PH (nM)	42	8	43
LT (min)	4.9	13.6	3.4
PT (min)	11.3	25.9	8.6

Concentration IgG anti-AT (g/l)	IgG anti-AT 7.5	anti-AT IgG 5	anti-AT IgG 3	anti-AT IgG 1.8
Activité Antithrombine résiduelle (%)	9	24	47	66
ETP (nM.min)	2716	1279	502	360
PH (nM)	76	41	23	16
LT (min)	6.6	7.2	9.4	9.8
PT (min)	31.3	24.8	21.5	23.8

Concentration Ig anti-TFPI Ig (mg/l)	anti-TFPI Ig 50	anti-TFPI Ig 10	anti-TFPI Ig 5	anti-TFPI Ig2.5
Activité TFPI résiduelle (%)	<20	29	53	80
ETP (nM.min)	732	762	593	383
PH (nM)	70	79	32	17
LT (min)	3.5	3.5	5	7.7
PT (min)	7.5	7.2	12.7	20.3

Tableau 7 : Effet de la neutralisation de l'antithrombine et du TFPI sur la génération de thrombine de plasmas d'hémophiles

Un plasma d'hémophile A sévère est surchargé avec différentes concentrations d'anticorps anti-antithrombine et anti-TFPI avant d'être évalué avec un test de génération de thrombine. PH correspond au plasma d'hémophile, PN au plasma normal. Les activités résiduelles de l'antithrombine et du TFPI sont mesurées selon la méthode décrite dans le chapitre « matériel et méthodes ». GDXa correspond au plasma d'hémophile surchargé avec 50 nM de GDXa. Les concentrations des anticorps anti-AT sont exprimées en g/l. Celles des anticorps anti-TFPI sont exprimées en mg/l.

4.1.8. Demi-vie plasmatique et durée d'action du GDXa

4.1.8.1. Activité amidolytique résiduelle

Puisque le GDXa est inhibé par le TFPI et l'antithrombine, nous avons évalué l'activité amidolytique résiduelle au cours du temps sur le substrat chromogénique PNAPEP 1025, pour le GDXa (50 nM) et le facteur Xa (50 nM) incubés dans un plasma normal à 37°C. Les activités du GDXa et du facteur Xa décroissent rapidement (figures 24A et 24B) avec une demi-vie d'environ 1 min 30 sec, ce qui correspond aux données de la littérature pour le facteur Xa [194].

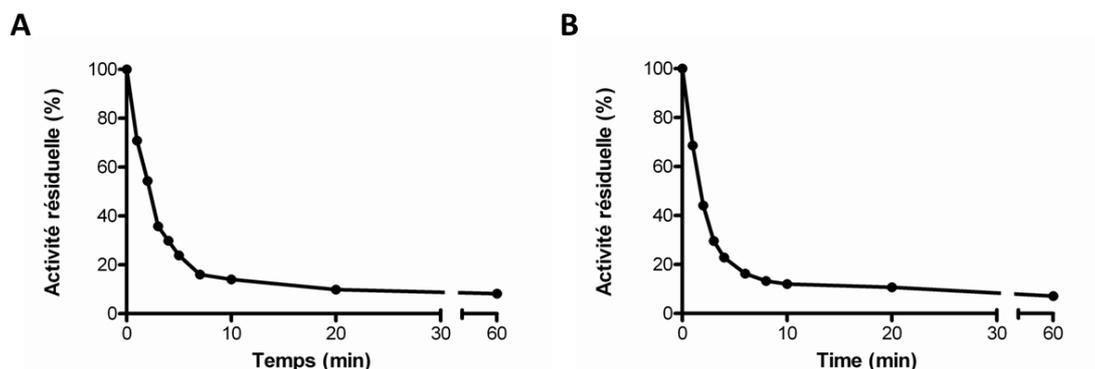


Figure 24 : Détermination de la demi-vie plasmatique du GDx et du facteur Xa

Un plasma normal est surchargé avec 50 nM de facteur GDx (A) et 50 nM de FXa (B) puis incubé pendant une heure à 37 °C. Des aliquots sont prélevés à différents intervalles et dilués immédiatement 25 fois dans du tampon A pour déterminer l'activité amydolytique résiduelle sur le substrat PNAPEP 1025. Les demi-vies sont 1.4 min ± 0.1 min pour le facteur Xa et 1.8 min ± 0.1 min pour le GDx. Les données sont représentatives de deux expériences indépendantes.

Cependant, bien que la demi-vie plasmatique du GDx soit très courte, l'effet sur la génération de thrombine est maintenu bien plus longtemps puisqu'après 60 minutes d'incubation à 37°C dans le plasma d'un patient hémophile A sévère, la restauration de la génération de thrombine est maintenue. L'ETP du plasma d'hémophile testé augmente de 0 à 610 nM après seulement 1 minute d'incubation et reste à 478 nM après 60 minutes (tableau 8). La correction est également observée après 60 minutes d'incubation pour la hauteur du pic de thrombine (75 nM à 1 min et 38 nM à 60 min) et pour les paramètres cinétiques.

	1 min	60 min
ETP (nM.min)	610	478
PH (nM)	75	38
PT (sec)	6.6	8.8
LT (sec)	1.4	2.1

Tableau 8 : Effet du GDx sur la génération de thrombine d'un plasma d'un patient hémophile A sévère après 60 minutes d'incubation à 37°C.

Le plasma d'un patient hémophile A sévère est surchargé avec 50 nM de GDx puis incubé pendant 1 heure à 37°C. Des aliquots sont prélevés immédiatement et 1 heure après pour mesurer la thrombine générée. Les valeurs d'ETP et de PH du plasma hémophile étaient nulles en l'absence de GDx.

4.2. Partie 2 : Conception rationnelle de variants GDx_a

4.2.1. Etude *in silico* de l'interaction entre le facteur X_a et le TFPI

4.2.1.1. *Etude des interactions entre chaîne lourde du facteur X_a et domaine K2 du TFPI*

La figure 25 montre la distribution de l'énergie d'interaction de chaque acide aminé du facteur X_a avec les acides aminés du domaine K2 du TFPI. Cette analyse met en évidence des interactions favorables (correspondant aux énergies d'interaction négatives) et des interactions défavorables (correspondant aux énergies d'interaction positives).

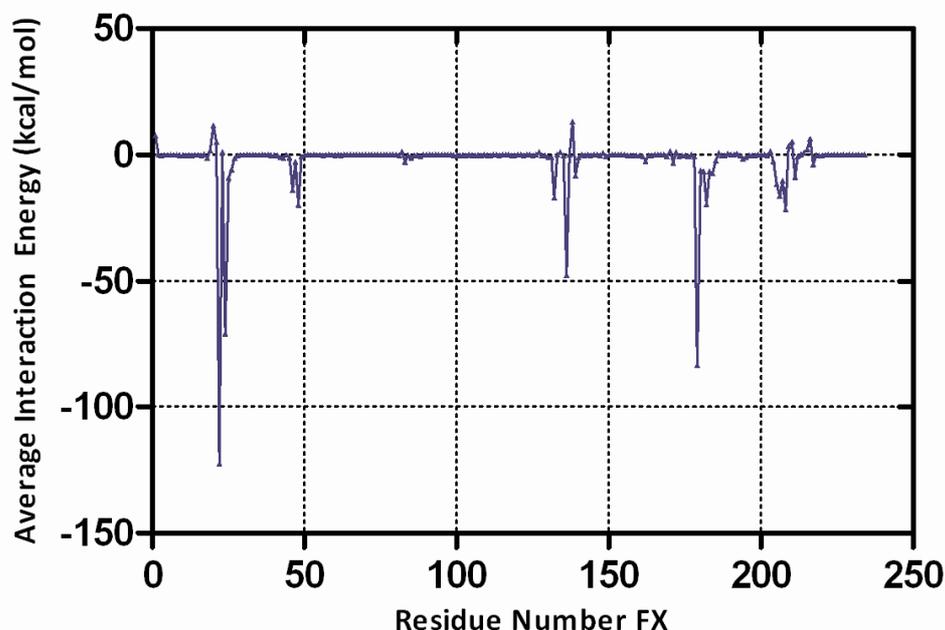


Figure 25 : Etude *in silico* des énergies d'interactions entre les acides aminés de la chaîne lourde du facteur X_a et le domaine K2 du TFPI.

La numérotation des acides aminés démarre à l'extrémité N-terminale du domaine sérine-protéase du facteur X.

Les résidus de la chaîne lourde du facteur X_a responsables d'une interaction favorable stabilisant le complexe X_a-K2 sont les acides aminés suivants :

- E22 qui présente la plus faible énergie d'interaction. Il établit une liaison hydrogène quasi-constante avec R32 de K2.
- K48 qui établit une liaison hydrogène avec R15 de K2
- K136 qui interagit avec E9 de K2 durant 20% du temps
- D179 qui interagit avec R15 de K2 par le biais de deux liaisons hydrogènes

Les résidus de la chaîne lourde de facteur Xa humain responsables d'une interaction défavorable sont les acides aminés :

- I1 ($7,79 \pm 1,60$ kcal/mol)
- N20 ($11,53 \pm 4,07$ kcal/mol)
- R138 ($13,03 \pm 13,78$ kcal/mol)
- G216 ($6,46 \pm 1,08$ kcal/mol)
- K82 ($1,17 \pm 1,65$ kcal/mol)

Lequel de ces résidus faut-il muter en espérant diminuer l'énergie d'interaction ? Il est plus logique de suggérer de muter certains d'entre eux plutôt que d'autres.

- I1 est enfoui dans la chaîne du facteur Xa et est trop loin du domaine K2 pour être un bon candidat à la mutagenèse dirigée pour permettre de diminuer l'énergie d'interaction.
- N20 est situé entre deux interactions très favorables (E24FX-K34K2 et E22FX-R32K2) qui doivent être maintenues : ce n'est donc pas un bon candidat à la mutagenèse.
- K82 donne lieu à une petite interaction défavorable. Il est retenu comme site potentiel à la mutagenèse dirigée car il est situé à côté de L39 du domaine K2.
- R138 a sa chaîne latérale qui n'est impliquée dans aucune interaction spécifique mais Y17K2 regarde dans sa direction. On peut donc penser que remplacer l'arginine en position 138 par un acide aminé aromatique pourrait induire des interactions hydrophobes favorables.
- G216 est juste en face de R15 de K2 mais il est trop proche du site catalytique pour proposer de le substituer.

4.2.1.2. Etude *in silico* des interactions entre la chaîne lourde du facteur Xa mutée en position R138 ou K82 et le domaine K2 du TFPI

La mutation K82Y du facteur Xa produit un système dans lequel Y82 reste proche de C38 du domaine K2 pendant les deux tiers de la simulation, tandis qu'en l'absence de cette mutation K82, le facteur Xa n'interagit pas du tout avec K2. K82Y induit une diminution de l'énergie d'interaction en position 82. En revanche, elle induit aussi une interaction défavorable en position 135 (figure 26) qui se trouve loin du site mutationnel. Cette interaction défavorable est donc difficile à expliquer.

Pour la mutation R138F, la chaîne aromatique de la phénylalanine interagit de façon proche avec la chaîne latérale de Y17 du domaine K2. R138F annule l'interaction défavorable en position 138 (figure 26). Elle induit quelques modifications des énergies d'interaction le long de la chaîne lourde du facteur Xa. L'interaction est multipliée par 2,2 et

4,2 en position 24 et 48 alors qu'elle est réduite de 2,9 et 2,2 fois au niveau des acides aminés 136 et 211. L'augmentation de l'interaction en position 48 située à l'opposé du F138 muté serait donc due à l'effet à distance de la mutation.

Pour ces deux mutations (K82Y et R138F), les simulations *in silico* retrouvent des interactions interfaciales significativement stables.

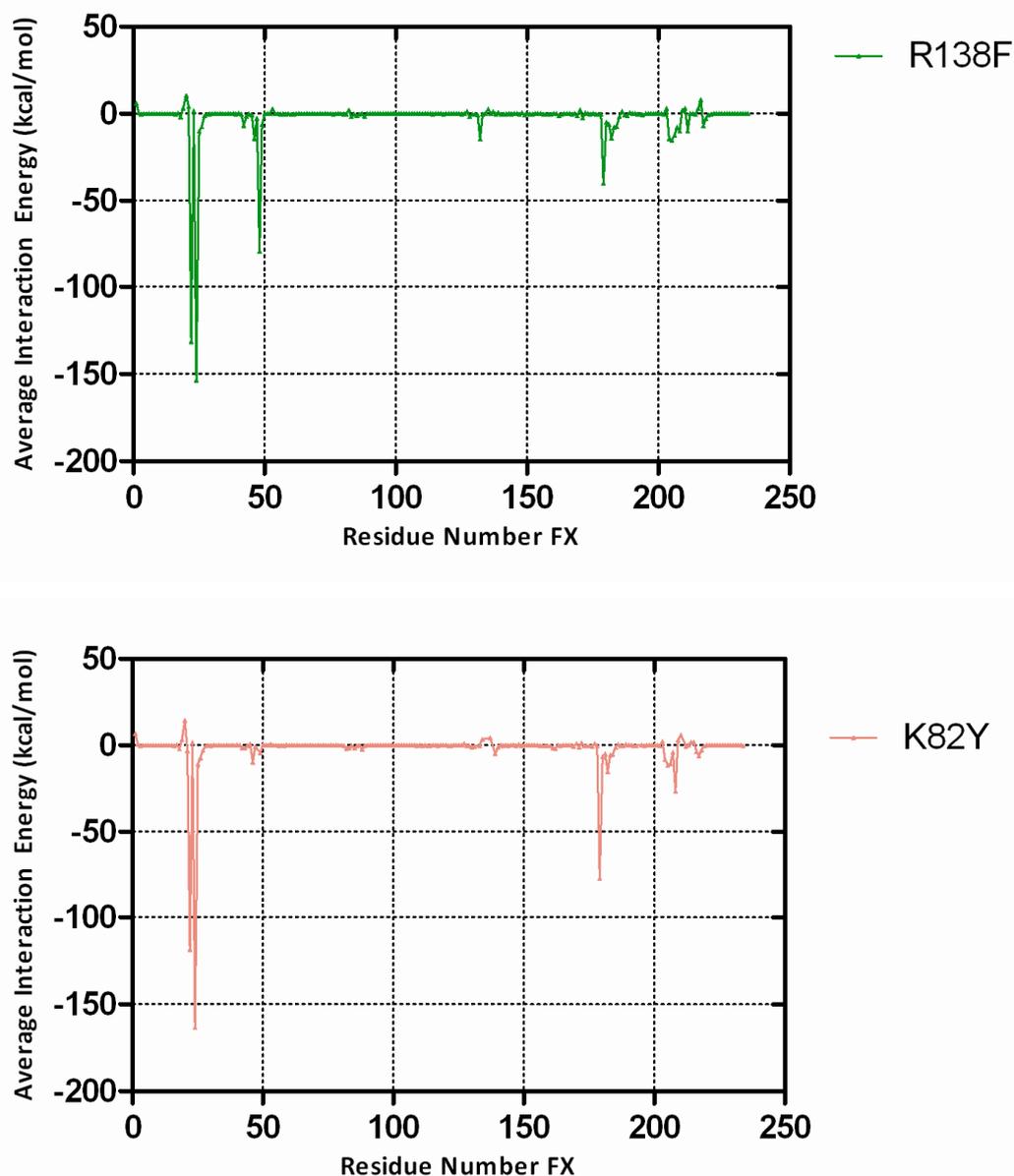


Figure 26 : Etude des énergies d'interactions entre le TFPI et les mutants R138F et K82Y

La numérotation des acides aminés démarre à l'extrémité N-terminale du domaine sérine-protéase du facteur X.

4.2.2. Variants produits

Après que l'étude *in silico* nous ait permis d'identifier les acides aminés potentiels à muter sur la séquence de la chaîne lourde du facteur Xa pour diminuer les énergies d'interactions, nous avons initialement sélectionné l'arginine en position 138. Nous avons produit des variants protéiques où l'arginine 138 est substituée par des acides aminés hydrophobes comme le suggère l'étude *in silico*.

Nous avons procédé à trois mutations en position 138 (tableau 9) par des acides aminés hydrophobes :

- Mutation R138F, suggérée et étudiée *in silico*
- Mutation R138G, où l'arginine est remplacée par un acide aminé hydrophobe plus petit que la phénylalanine
- Mutation R138I, où l'arginine est remplacée par un acide aminé hydrophobe à longue chaîne aliphatique.

Dans un second temps, nous avons conçu le mutant K82Y suggéré par l'étude *in silico* mais non testé dans ce travail.

VARIANT PRODUIT	TEST FONCTIONNEL
R138F	OUI
R138G	OUI
R138I	OUI
K82Y	NON

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des différents variants.

4.2.3. Tests des dialysats de surnageant cellulaire

4.2.3.1. *Western Blot*

Le surnageant de culture cellulaire (HEK293E) est déposé pour migration sur gel de polyacrylamide 12% en conditions réductrices et dénaturantes. Le gel est ensuite transféré pour réaliser un western blot. Les faibles quantités produites de protéine n'ont pas permis de visualiser les variants avec une coloration au bleu de Coomassie. Le western blot (figure 27) révèle un clivage incomplet au niveau du deuxième site de clivage

par les furines qui a été introduit par mutagenèse dirigée en aval du peptide d'activation. Les variants ne sont donc produits que partiellement sous forme activée.

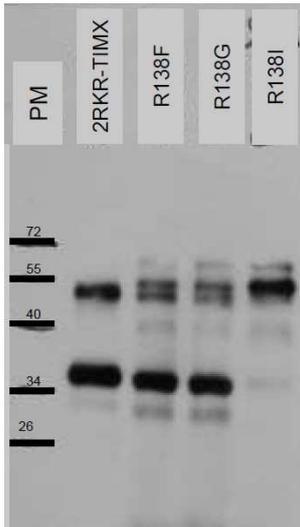


Figure 27 : Western Blot des surnageants de culture des différents variants.

La piste 1 correspond aux marqueurs de poids moléculaire, la piste 2 au 2RKR TIMX, les pistes 3, 4 et 5 aux variants R138F, R138G, R138I. Migration SDS-PAGE 12% en conditions dénaturantes et réductrices.

4.2.3.2. Dosage quantitatif des variants

Après dialyse des surnageants, les concentrations des différents variants ont été mesurées par ELISA anti-facteur X. Le kit utilisé était cependant dédié à la reconnaissance de molécules de facteur X entières, utilisant des anticorps anti-facteur X. Les concentrations étaient comprises entre 1 mg/l et 5 mg/l selon les variants : 6.9 mg/l pour 2RKR-TIMX, 4.9 mg/l pour R138F, 4.7 mg/l pour R138G, et 0.6 mg/l pour R138I.

4.2.3.3. Activité chromogénique des variants

Après quantification par ELISA des différents variants contenus dans les dialysats de surnageant cellulaire et re-quantification du GDXa commercial par ELISA, nous avons comparé leur activité amidolytique respective avec le substrat PNAPEP 1025. Comparativement au GDXa (Cryopep), les activités chromogéniques des dialysats de surnageants de 2RKR-TIMX, R138F, R138G et R138I sont respectivement à 16%, 13%, 20% et 6% de celle du GDXa. Les activités chromogéniques sont donc bien inférieures à celle du GDXa (figure 28).

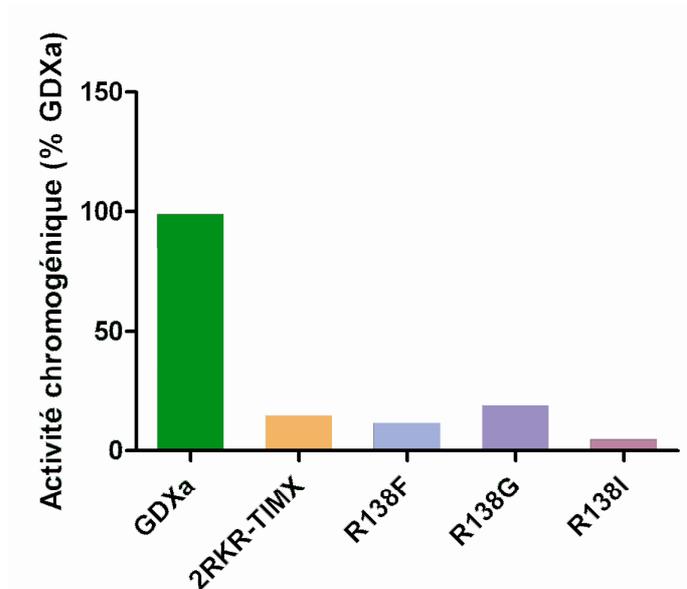


Figure 28 : Activité chromogénique des différents variants dialysés.

Après dialyse, les différents variants des surnageants cellulaires (HEK293E) sont quantifiés par ELISA. 1 nM de chaque enzyme est ajouté au substrat PNAPEP1025 1 mM.

4.2.3.4. Effet des variants sur la génération de thrombine d'un plasma d'hémophile A sévère

Les dialysats de surnageants de culture cellulaire (HEK293E) ont été testés avec un test de génération de thrombine. Un plasma d'hémophile A sévère a été surchargé avec le GDxa, 2RKR-TIMX et les variants R138F, R138G et R138I à une concentration finale de 7.5 nM.

GDxa et 2RKR-TIMX donnent des résultats comparables : à la dose de 7.5 nM, ils corrigent incomplètement l'ETP et la hauteur du pic (figure 29B).

Le variant R138F suggéré par l'analyse *in silico* corrige tous les paramètres à la concentration de 7.5 nM (figure 29) : en particulier, il augmente l'ETP à 100% de la normale, la hauteur du pic à 72% de la normale et ramène le temps de latence et le temps au pic respectivement à 45% et 72% de la normale. Le variant R138G donne les meilleurs résultats avec une augmentation de l'ETP à 200% de la normale, une hauteur du pic à 144% et un temps de latence et un temps au pic respectivement à 61% et 75% de la normale. Enfin, R138I est également efficace avec des ETP, hauteur du pic, temps de latence et temps au pic respectivement à 118%, 85%, 61% et 62% de la normale.

D'une façon globale, les trois variants testés donnent de meilleurs résultats que les contrôles GDxa et que 2RKR-TIMX. De plus, alors que 50 nM de GDxa sont nécessaires pour corriger complètement les paramètres de génération de thrombine (tableau 5), une concentration 7 fois moindre (7.5 nM) donne des résultats comparables avec les différents variants (R138F, R138G, R138I, figure 29).

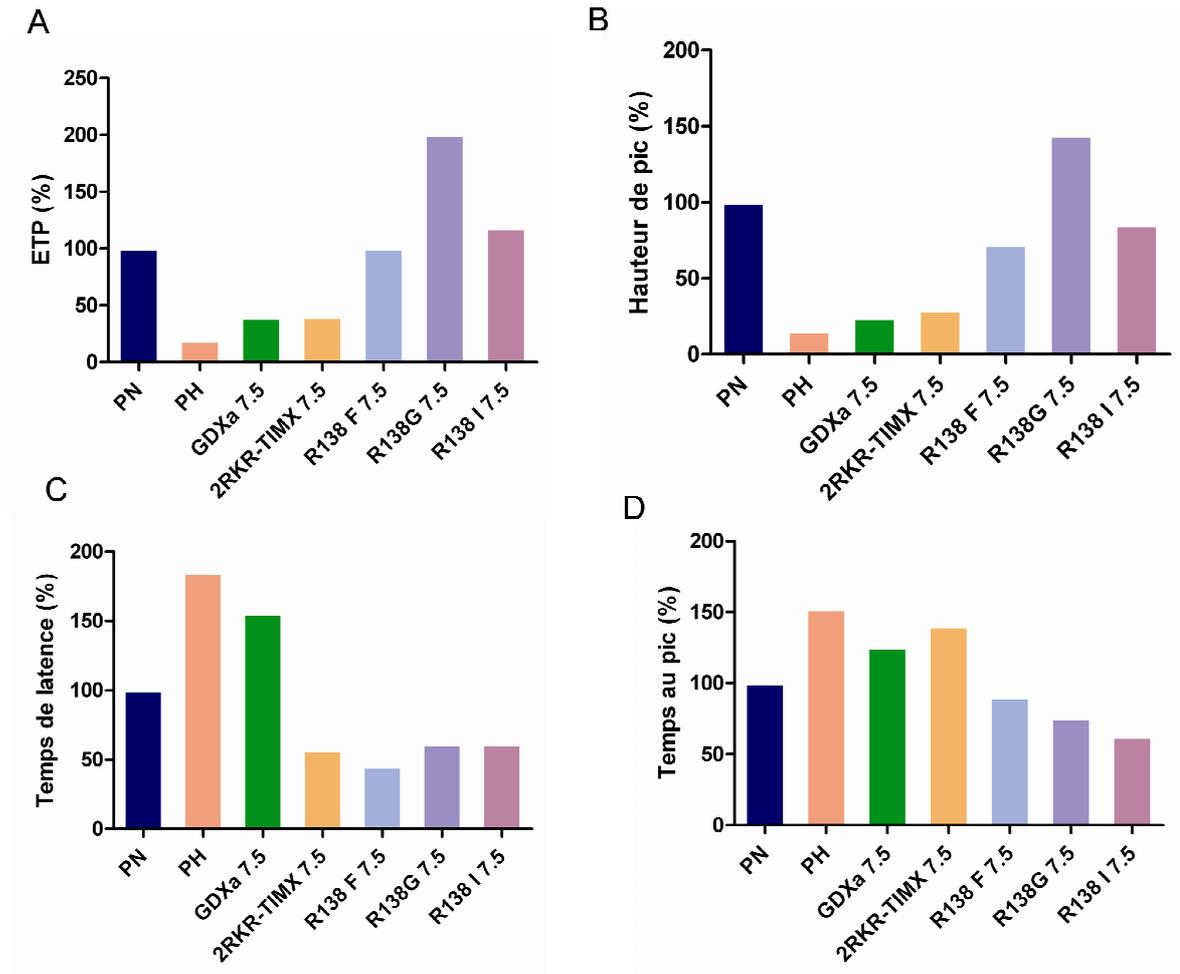


Figure 29 : Impact des différents variants du GDxα sur la génération de thrombine d'un plasma de patient hémophile A sévère.

7.5 nM de chaque variant sont ajoutés à un plasma d'hémophile A sévère avant de mesurer sa génération de thrombine. Les expériences ont été réalisées en triplicat.

5. DISCUSSION

5.1. PARTIE 1

L'avènement du génie génétique a permis une grande avancée dans le domaine de l'hémophilie en permettant la production des facteurs VIII et IX recombinants. Malheureusement, les traitements substitutifs exposent au risque de développer des inhibiteurs neutralisant les facteurs VIII ou IX administrés.

Le traitement hémostatique des patients hémophiles présentant des inhibiteurs a longtemps constitué un véritable challenge. La mise à disposition du FEIBA® en 1981, puis du facteur VII activé recombinant en 1996 a grandement amélioré la prise en charge de ces patients. Toutefois, ces traitements sont extrêmement onéreux et 5 à 10% des épisodes hémorragiques n'y répondent pas. Il y a donc un réel besoin de développer des alternatives thérapeutiques. De nouvelles stratégies sont en cours de développement et certaines d'entre elles convergent vers le lever de l'inhibition du complexe ténase extrinsèque par le TFPI. Cibler un inhibiteur physiologique de la coagulation constitue une approche totalement différente de toutes celles développées jusqu'à récemment. Le TFPI est une cible intéressante : Nordfang et Erhadsten avaient d'ailleurs déjà montré dans les années 1990 l'efficacité d'une telle approche au moyen d'anticorps anti-TFPI dans un modèle d'hémophilie lapine [10, 11]. Beaucoup plus récemment, cette approche basée sur l'utilisation d'anticorps monoclonal anti-TFPI a été reprise [196]. Trois autres approches de développement d'antagonistes du TFPI sont également en cours de développement, basées sur l'utilisation de polysaccharides non sulfatés, d'aptamères ou de peptides anti-TFPI. L'émulation des différentes équipes de recherche pour le développement d'inhibiteurs anti-TFPI confirme l'intérêt de cette cible pour restaurer une coagulation normale chez des patients hémophiles avec ou sans inhibiteurs.

Le travail présenté dans ce manuscrit s'articule autour du développement d'une nouvelle stratégie anti-TFPI qui diffère cependant des quatre méthodes précédemment citées. Elle s'appuie sur l'utilisation d'une forme tronquée d'un partenaire physiologique du TFPI : le facteur Xa dépourvu de son domaine Gla (GD_{Xa}). Contrairement au facteur Xa natif, le GD_{Xa} est incapable de se lier aux phospholipides procoagulants et est incapable d'activer directement la coagulation puisqu'il est pratiquement dépourvu de capacité d'activation de la prothrombine en thrombine comme cela a déjà été montré [14]. L'administration de facteur Xa, capable d'activer la prothrombine en thrombine, avait déjà été testée dans un modèle animal et mettait en évidence une activation de la coagulation faisant craindre des complications à type d'activation systémique de la coagulation et/ou de type thrombotique [192]. Le GD_{Xa}, dépourvu d'activité procoagulante directe, pourrait

donc bénéficier d'une fenêtre thérapeutique plus large que les fractions activées de facteurs de la coagulation, comme le facteur VIIa recombinant ou telles qu'elles existent dans le FEIBA[®]. Dans ce travail, nous montrons d'ailleurs que l'action du GDxa est facteur tissulaire dépendante (figure 16), contrairement à celle du facteur Xa. Le GDxa ne doit donc permettre de restaurer la coagulation qu'aux endroits où le facteur tissulaire est libéré, c'est-à-dire au niveau des sites de brèche vasculaire où la coagulation est requise, tandis que les fractions de facteur activées ou non activées exercent une action plus disséminée.

Nous avons également démontré que le GDxa normalise la génération de thrombine de patients hémophiles à des concentrations inférieures à celles du facteur VIIa recombinant (figure 17). En effet, 10 nM de GDxa sont légèrement plus efficaces que 200 nM de facteur VIIa recombinant dans nos conditions expérimentales en plasma pauvre en plaquettes en présence d'une faible concentration de facteur tissulaire. Nos données suggèrent donc que le GDxa est 20 fois plus efficace que le facteur VIIa pour restaurer la génération de thrombine dans ces conditions.

Comme le facteur Xa, le GDxa interagit avec le TFPI et l'antithrombine. La neutralisation du GDxa par l'antithrombine pourrait expliquer sa demi-vie plasmatique courte (environ deux minutes), constatée en utilisant des substrats chromogéniques du GDxa. Malgré cette demi-vie courte, nous avons observé que l'efficacité du GDxa pour restaurer la génération de thrombine de plasmas d'hémophiles A sévères était maintenue bien plus longtemps (tableau 8) puisque après soixante minutes d'incubation à 37°C, le potentiel endogène de thrombine représente encore 80% du potentiel observé initialement et que tous les paramètres du test de génération de thrombine sont encore corrigés après 60 minutes d'incubation du GDxa dans un plasma d'hémophile A sévère : les temps de latence et la hauteur du pic restent même inférieurs à ceux constatés avec le contrôle normal. Le maintien de cette efficacité malgré la demi-vie plasmatique courte pourrait s'expliquer par la persistance du complexe GDxa-TFPI qui limite la quantité formée du complexe Xa-TFPI, inhibiteur de la coagulation. De plus, l'affinité du GDxa pour le TFPI étant moindre que celle pour le facteur Xa (tableau 6), l'administration de GDxa pourrait entraîner une augmentation de la concentration du facteur Xa libre (non lié au TFPI) qui pourrait à son tour activer la prothrombine en thrombine.

Dans le cas de l'utilisation du GDxa (non optimisé et non muté), l'utilisation d'un fragment d'une protéine physiologiquement présente dans le plasma pourrait être moins immunogène que d'autres molécules non physiologiques qui, elles, pourraient être naturellement immunogènes ou le devenir en se liant à une autre molécule physiologique, tel qu'on peut l'observer dans le cas des thrombopénies induites à l'héparine où le facteur 4 plaquettaire se lie à l'héparine.

Les mécanismes d'action du GDXa et du TFPI sont représentés schématiquement sur la figure 7. Chez un sujet normal, le complexe ténase extrinsèque (facteur tissulaire – facteur VIIa) est inhibé physiologiquement par le complexe TFPI - facteur Xa. Le complexe quaternaire ainsi formé (facteur Xa - TFPI - facteur VIIa - facteur tissulaire) empêche l'activation des facteurs X et IX par le complexe ténase extrinsèque. Chez le sujet normal, cela est normalement compensé par l'action du complexe ténase intrinsèque (facteur VIIIa - facteur IXa) qui amplifie la coagulation. Cependant, chez les patients hémophiles, le complexe ténase intrinsèque est bloqué : l'amplification de la coagulation est donc altérée. L'inhibition du TFPI par le GDXa, en limitant la formation du complexe quaternaire, pourrait prolonger la génération de facteur Xa par le complexe ténase extrinsèque et normaliser la génération de thrombine de plasmas de patients hémophiles.

Nous avons également constaté que le GDXa corrigeait les profils de génération de thrombine d'un plasma d'hémophile A sévère de façon comparable à des anticorps anti-TFPI neutralisants (figure 23). En revanche, le profil obtenu après addition du GDXa dans un plasma d'hémophile A sévère est très différent de celui observé après addition d'anticorps anti-antithrombine (figure 22), ce qui suggère que le mécanisme d'action du GDXa n'est pas médié par la neutralisation de l'antithrombine. Cette hypothèse est renforcée par le fait que les concentrations utilisées de GDXa sont 100 à 200 fois moindres (20 et 50 nM) que les concentrations plasmatiques d'antithrombine (environ 5 μ M). A l'inverse, la concentration plasmatique de TFPI (environ 3 nM) est nettement plus faible et compatible avec une saturation du TFPI par le GDXa : cela supporte l'hypothèse mécanistique décrite sur la figure 7.

Au final, l'ensemble des données suggère que le GDXa pourrait être une alternative sûre et efficace aux traitements hémostatiques court-circuitants actuellement sur le marché et cela aussi bien chez des patients hémophiles A ou B sévères avec ou sans inhibiteurs.

5.2. PARTIE 2

Selon notre hypothèse mécanistique, l'optimisation de l'affinité du GDXa pour le TFPI permettrait d'augmenter l'efficacité du GDXa pour restaurer la génération de thrombine de plasmas d'hémophiles en diminuant davantage la formation du complexe facteur Xa-TFPI.

Nous avons cherché à élaborer des variants du GDXa à affinité accrue pour le TFPI au moyen d'une approche rationnelle basée sur l'étude *in silico* des énergies d'interaction entre le facteur Xa et le TFPI. Cette étude *in silico* a notamment permis d'identifier deux acides aminés (Arg138 et Lys82) de la chaîne lourde du facteur Xa (figure 25) pour

lesquels les interactions sont défavorables avec le TFPI. La substitution par un acide aminé adéquat pourrait abaisser ces énergies d'interactions et renforcer l'interaction entre les deux ligands. L'étude *in silico* des interactions entre le TFPI et la chaîne lourde du facteur Xa mutée présentant les mutations R138F ou K82Y a d'ailleurs mis en évidence une diminution des énergies d'interaction qui reflète une augmentation de l'affinité entre les ligands.

En prenant en compte ces considérations, nous avons produit de façon recombinante au moyen de cellules HEK293E différents variants protéiques (R138F, R138G, R138I) que nous avons ensuite testés *in vitro*. Nous avons ainsi testé l'activité des surnageants cellulaires dialysés contenant 2RKR-TIMX et les différents variants protéiques R138F, R138G et R138I. Les premiers résultats obtenus (figure 29) sont encourageants.

A quantité égale de GDXa (Cryopep), les protéines 2RKR-TIMX et les autres variants ont une activité chromogénique (avec le substrat PNAPEP 1025) bien inférieure à celle du GDXa (figure 28). De tels résultats s'expliquent au moins en partie par un clivage incomplet par les furines du site RKRRKR (figure 27), inséré en aval de la séquence du peptide d'activation : ce clivage incomplet est responsable d'une production partielle des différents variants sous forme activée; le variant R138I ne semble pas avoir été clivé.

Par ailleurs, lorsqu'on compare la capacité des différents variants testés (R138G, R138F et R138I) à celle de 2RKR-TIMX pour restaurer la génération de thrombine d'un plasma d'hémophile A sévère (figure 29), on constate que les surnageants de culture dialysés des variants R138F, R138G et R138I ont une efficacité supérieure à 2RKR-TIMX et au GDXa (Cryopep). La différence d'efficacité peut vraisemblablement être attribuée aux mutations ponctuelles en position 138, d'autant plus que les variants génèrent davantage de thrombine que le GDXa alors qu'ils ne sont que partiellement activés (sans peptide d'activation). La substitution de l'arginine chargée positivement par des acides aminés hydrophobes (phénylalanine, glycine, isoleucine) semble efficace comme le suggérait l'étude *in silico* des dynamiques moléculaires. La substitution de l'arginine en position 138 par une glycine donne ici les meilleurs résultats. Ces données méritent cependant d'être confirmées avec des protéines purifiées.

La deuxième partie de ce travail n'est qu'un travail préliminaire puisque les tests fonctionnels d'activité chromogénique et de génération de thrombine ont été effectués sur des surnageants cellulaires dialysés et non sur des protéines purifiées. Compte tenu de la taille des pores de la membrane de dialyse utilisée, de nombreuses protéines contaminantes (<25 kD) ont toutefois été éliminées mais les protéines « activées » (sans peptide d'activation) n'ont pas été séparées des fractions non clivées (avec peptide

d'activation). Cependant, les résultats montrent une capacité à restaurer la génération de thrombine de plasma d'hémophile bien meilleure que le GDx_a et que le 2RKRTIMX.

Enfin, un écueil possible avec l'utilisation de tels variants optimisés présentant des mutations ponctuelles est l'apparition possible d'inhibiteurs anti-facteur X neutralisants comme cela a déjà été récemment rapporté avec l'apparition d'anticorps anti-facteur VII lors de l'utilisation d'un facteur VIIa à activité catalytique accrue, développé par Novonordisk, présentant trois mutations ponctuelles d'acides aminés au niveau du domaine catalytique [187].

6. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'hémophilie est une maladie chronique caractérisée par un déficit de l'amplification de la coagulation plasmatique. Le développement d'inhibiteurs anti-facteur VIII ou anti-facteur IX constitue une complication majeure et coûteuse qui nécessite le recours à des thérapeutiques court-circuitantes comme le facteur VIIa et le FEIBA®. Certains épisodes hémorragiques ne répondent pas à ces traitements. Les nombreuses approches actuellement en développement, notamment les approches anti-TFPI, montrent l'intérêt majeur de découvrir de nouvelles alternatives thérapeutiques efficaces.

L'ensemble de nos données suggèrent que le GDxa pourrait limiter la formation du complexe TFPI - facteur Xa et être une alternative sûre et efficace aux agents hémostatiques court-circuitants actuels. La première partie de ce travail sur la validation du concept a fait l'objet d'une publication (Gla domain-less factor Xa : a molecular bait to bypass blocked tenase complex. Marlu R and Polack B. Haematologica 2012 ; 97(8):1165-72).

L'efficacité du GDxa pourrait être amplifiée en augmentant son affinité pour le TFPI. Notre approche rationnelle basée sur une étude *in silico* des interactions entre le TFPI et la chaîne lourde du facteur Xa a guidé nos choix de mutagenèse pour produire différents variants protéiques recombinants du GDxa à affinité accrue pour le TFPI. Les essais préliminaires réalisés avec les surnageants de culture cellulaire montrent des résultats encourageants avec une plus grande capacité des différents variants (par rapport au GDxa) à restaurer la thrombine de plasmas d'hémophiles.

Ces travaux ont fait l'objet d'un dépôt de brevet (N° FR1151637) en mars 2011 publié en septembre 2012 et fait l'objet d'une collaboration avec un industriel pharmaceutique.

Les objectifs à venir sont :

- Produire les différents variants en quantité suffisante (y compris le variant K82Y non testé dans ce travail)
- Séparer la fraction activée de la fraction non activée des différents variants
- Tester la capacité des différents variants purifiés à restaurer la génération de thrombine de plasmas d'hémophiles avec ou sans inhibiteurs
- Remplacer le site 2RKR par celui de la prothrombine qui est clivé par le facteur Xa pour permettre une autoactivation des variants lors de la production
- Quantifier l'interaction variants - TFPI par résonance plasmonique de surface
- Déterminer les constantes d'inhibition enzymatique du TFPI vis-à-vis des différents variants

- Sélectionner le meilleur variant et le tester *in vivo* en modèle murin d'hémophile

7. BIBLIOGRAPHIE

1. Bolton-Maggs, P.H., *Haemophilia--paucity of evidence, ways forward?* Blood Coagul Fibrinolysis, 2003. **14 Suppl 1**: p. S7-9.
2. Manco-Johnson, M.J., et al., *Prophylaxis versus episodic treatment to prevent joint disease in boys with severe hemophilia.* N Engl J Med, 2007. **357**(6): p. 535-44.
3. Gringeri, A., et al., *Cost of care and quality of life for patients with hemophilia complicated by inhibitors: the COCIS Study Group.* Blood, 2003. **102**(7): p. 2358-63.
4. Iorio, A., et al., *Rate of inhibitor development in previously untreated hemophilia A patients treated with plasma-derived or recombinant factor VIII concentrates: a systematic review.* J Thromb Haemost, 2010. **8**(6): p. 1256-65.
5. DiMichele, D., *Inhibitor development in haemophilia B: an orphan disease in need of attention.* Br J Haematol, 2007. **138**(3): p. 305-15.
6. Kempton, C.L. and G.C. White, 2nd, *How we treat a hemophilia A patient with a factor VIII inhibitor.* Blood, 2009. **113**(1): p. 11-7.
7. Barthels, M., *Clinical efficacy of prothrombin complex concentrates and recombinant factor VIIa in the treatment of bleeding episodes in patients with factor VII and IX inhibitors.* Thromb Res, 1999. **95**(4 Suppl 1): p. S31-8.
8. Astermark, J., et al., *A randomized comparison of bypassing agents in hemophilia complicated by an inhibitor: the FEIBA NovoSeven Comparative (FENOC) Study.* Blood, 2007. **109**(2): p. 546-51.
9. Tuddenham, E.G., *Ways to bypass a blocked tenase complex.* Thromb Haemost, 2006. **95**(1): p. 1-2.
10. Nordfang, O., et al., *Inhibition of extrinsic pathway inhibitor shortens the coagulation time of normal plasma and of hemophilia plasma.* Thromb Haemost, 1991. **66**(4): p. 464-7.
11. Erhardtsen, E., et al., *Blocking of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) shortens the bleeding time in rabbits with antibody induced haemophilia A.* Blood Coagul Fibrinolysis, 1995. **6**(5): p. 388-94.
12. Prasad, S., et al., *Efficacy and safety of a new-class hemostatic drug candidate, AV513, in dogs with hemophilia A.* Blood, 2008. **111**(2): p. 672-9.
13. Liu, T., et al., *Improved coagulation in bleeding disorders by Non-Anticoagulant Sulfated Polysaccharides (NASP).* Thromb Haemost, 2006. **95**(1): p. 68-76.
14. Skogen, W.F., C.T. Esmon, and A.C. Cox, *Comparison of coagulation factor Xa and des-(1-44)factor Xa in the assembly of prothrombinase.* J Biol Chem, 1984. **259**(4): p. 2306-10.
15. Broze, G.J., Jr., et al., *The lipoprotein-associated coagulation inhibitor that inhibits the factor VII-tissue factor complex also inhibits factor Xa: insight into its possible mechanism of action.* Blood, 1988. **71**(2): p. 335-43.
16. Kazama, Y., *The importance of the binding of factor Xa to phospholipids in the inhibitory mechanism of tissue factor pathway inhibitor: the transmembrane and cytoplasmic domains of tissue factor are not essential for the inhibitory action of tissue factor pathway inhibitor.* Thromb Haemost, 1997. **77**(3): p. 492-7.

17. Nuyttens, B.P., et al., *Platelet adhesion to collagen*. Thromb Res, 2010. **127 Suppl 2**: p. S26-9.
18. Offermanns, S., *Activation of platelet function through G protein-coupled receptors*. Circ Res, 2006. **99**(12): p. 1293-304.
19. Nurden, A.T. and P. Nurden, *A review of the role of platelet membrane glycoproteins in the platelet-vessel wall interaction*. Baillieres Clin Haematol, 1993. **6**(3): p. 653-90.
20. Hemker, H.C., et al., *Platelet membrane involvement in blood coagulation*. Blood Cells, 1983. **9**(2): p. 303-17.
21. Butenas, S. and K.G. Mann, *Blood coagulation*. Biochemistry (Mosc), 2002. **67**(1): p. 3-12.
22. Komiyama, Y., A.H. Pedersen, and W. Kisiel, *Proteolytic activation of human factors IX and X by recombinant human factor VIIa: effects of calcium, phospholipids, and tissue factor*. Biochemistry, 1990. **29**(40): p. 9418-25.
23. Lawson, J.H. and K.G. Mann, *Cooperative activation of human factor IX by the human extrinsic pathway of blood coagulation*. J Biol Chem, 1991. **266**(17): p. 11317-27.
24. Brummel, K.E., et al., *Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation*. Blood, 2002. **100**(1): p. 148-52.
25. Pieters, J., T. Lindhout, and H.C. Hemker, *In situ-generated thrombin is the only enzyme that effectively activates factor VIII and factor V in thromboplastin-activated plasma*. Blood, 1989. **74**(3): p. 1021-4.
26. Naito, K. and K. Fujikawa, *Activation of human blood coagulation factor XI independent of factor XII. Factor XI is activated by thrombin and factor XIa in the presence of negatively charged surfaces*. J Biol Chem, 1991. **266**(12): p. 7353-8.
27. Matafonov, A., et al., *Activation of factor XI by products of prothrombin activation*. Blood. **118**(2): p. 437-45.
28. Mann, K.G., S. Butenas, and K. Brummel, *The dynamics of thrombin formation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(1): p. 17-25.
29. Coughlin, S.R., *Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(8): p. 1800-14.
30. Liebman, H.A., B.C. Furie, and B. Furie, *Hepatic vitamin K-dependent carboxylation of blood-clotting proteins*. Hepatology, 1982. **2**(4): p. 488-94.
31. Schapira, M., et al., *High molecular weight kininogen or its light chain protects human plasma kallikrein from inactivation by plasma protease inhibitors*. Biochemistry, 1982. **21**(3): p. 567-72.
32. Scott, C.F., et al., *Inactivation of factor XIa by plasma protease inhibitors: predominant role of alpha 1-protease inhibitor and protective effect of high molecular weight kininogen*. J Clin Invest, 1982. **69**(4): p. 844-52.
33. Pauer, H.U., et al., *Targeted deletion of murine coagulation factor XII gene-a model for contact phase activation in vivo*. Thromb Haemost, 2004. **92**(3): p. 503-8.
34. Renne, T., et al., *Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII*. J Exp Med, 2005. **202**(2): p. 271-81.
35. Matsumoto, K., et al., *Pathogenesis of serratal infection: activation of the Hageman factor-prekallikrein cascade by serratal protease*. J Biochem, 1984. **96**(3): p. 739-49.

36. Molla, A., et al., *Activation of hageman factor and prekallikrein and generation of kinin by various microbial proteinases.* J Biol Chem, 1989. **264**(18): p. 10589-94.
37. Herwald, H., et al., *Activation of the contact-phase system on bacterial surfaces--a clue to serious complications in infectious diseases.* Nat Med, 1998. **4**(3): p. 298-302.
38. Ferry, J.D., *The Mechanism of Polymerization of Fibrinogen.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1952. **38**(7): p. 566-9.
39. Schroeder, V., et al., *Factor XIII activation peptide is released into plasma upon cleavage by thrombin and shows a different structure compared to its bound form.* Thromb Haemost, 2007. **97**(6): p. 890-8.
40. Muszbek, L., V.C. Yee, and Z. Hevessy, *Blood coagulation factor XIII: structure and function.* Thromb Res, 1999. **94**(5): p. 271-305.
41. Sanders, N.L., et al., *Inhibition of tissue factor/factor VIIa activity in plasma requires factor X and an additional plasma component.* Blood, 1985. **66**(1): p. 204-12.
42. Colburn, P. and V. Buonassisi, *Identification of an endothelial cell product as an inhibitor of tissue factor activity.* In Vitro Cell Dev Biol, 1988. **24**(11): p. 1133-6.
43. Broze, G.J., Jr., *The rediscovery and isolation of TFPI.* J Thromb Haemost, 2003. **1**(8): p. 1671-5.
44. Caplice, N.M., et al., *Presence of tissue factor pathway inhibitor in human atherosclerotic plaques is associated with reduced tissue factor activity.* Circulation, 1998. **98**(11): p. 1051-7.
45. Kereveur, A., et al., *Production of tissue factor pathway inhibitor in cardiomyocytes and its upregulation by interleukin-1.* Thromb Haemost, 2001. **86**(5): p. 1314-9.
46. Osterud, B., M.S. Bajaj, and S.P. Bajaj, *Sites of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) and tissue factor expression under physiologic and pathologic conditions. On behalf of the Subcommittee on Tissue factor Pathway Inhibitor (TFPI) of the Scientific and Standardization Committee of the ISTH.* Thromb Haemost, 1995. **73**(5): p. 873-5.
47. Petit, L., et al., *Tissue factor pathway inhibitor is expressed by human monocyte-derived macrophages : relationship to tissue factor induction by cholesterol and oxidized LDL.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(2): p. 309-15.
48. Novotny, W.F., et al., *Plasma antigen levels of the lipoprotein-associated coagulation inhibitor in patient samples.* Blood, 1991. **78**(2): p. 387-93.
49. Sevinsky, J.R., L.V. Rao, and W. Ruf, *Ligand-induced protease receptor translocation into caveolae: a mechanism for regulating cell surface proteolysis of the tissue factor-dependent coagulation pathway.* J Cell Biol, 1996. **133**(2): p. 293-304.
50. Ho, G., et al., *Receptor-mediated endocytosis of coagulation factor Xa requires cell surface-bound tissue factor pathway inhibitor.* J Biol Chem, 1996. **271**(16): p. 9497-502.
51. Warshawsky, I., et al., *The low density lipoprotein receptor-related protein can function independently from heparan sulfate proteoglycans in tissue factor pathway inhibitor endocytosis.* J Biol Chem, 1996. **271**(42): p. 25873-9.

52. Girard, T.J., D. Gailani, and G.J. Broze, Jr., *Complementary DNA sequencing of canine tissue factor pathway inhibitor reveals a unique nanomeric repetitive sequence between the second and third Kunitz domains*. *Biochem J*, 1994. **303 (Pt 3)**: p. 923-8.
53. Chang, J.Y., et al., *TFPIbeta, a second product from the mouse tissue factor pathway inhibitor (TFPI) gene*. *Thromb Haemost*, 1999. **81(1)**: p. 45-9.
54. Tang, H., et al., *Sepsis-induced coagulation in the baboon lung is associated with decreased tissue factor pathway inhibitor*. *Am J Pathol*, 2007. **171(3)**: p. 1066-77.
55. Maroney, S.A., et al., *A GPI-anchored co-receptor for tissue factor pathway inhibitor controls its intracellular trafficking and cell surface expression*. *J Thromb Haemost*, 2006. **4(5)**: p. 1114-24.
56. Wun, T.C., et al., *Cloning and characterization of a cDNA coding for the lipoprotein-associated coagulation inhibitor shows that it consists of three tandem Kunitz-type inhibitory domains*. *J Biol Chem*, 1988. **263(13)**: p. 6001-4.
57. Girard, T.J., et al., *Functional significance of the Kunitz-type inhibitory domains of lipoprotein-associated coagulation inhibitor*. *Nature*, 1989. **338(6215)**: p. 518-20.
58. Petersen, L.C., et al., *Inhibitory properties of separate recombinant Kunitz-type-protease-inhibitor domains from tissue-factor-pathway inhibitor*. *Eur J Biochem*, 1996. **235(1-2)**: p. 310-6.
59. Piro, O. and G.J. Broze, Jr., *Comparison of cell-surface TFPIalpha and beta*. *J Thromb Haemost*, 2005. **3(12)**: p. 2677-83.
60. Mine, S., et al., *Structural mechanism for heparin-binding of the third Kunitz domain of human tissue factor pathway inhibitor*. *Biochemistry*, 2002. **41(1)**: p. 78-85.
61. Wesselschmidt, R., et al., *Tissue factor pathway inhibitor: the carboxy-terminus is required for optimal inhibition of factor Xa*. *Blood*, 1992. **79(8)**: p. 2004-10.
62. Lockett, J.M. and A.E. Mast, *Contribution of regions distal to glycine-160 to the anticoagulant activity of tissue factor pathway inhibitor*. *Biochemistry*, 2002. **41(15)**: p. 4989-97.
63. Crawley, J.T. and D.A. Lane, *The haemostatic role of tissue factor pathway inhibitor*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. **28(2)**: p. 233-42.
64. Wojtukiewicz, M.Z., et al., *Immunohistochemical localization of tissue factor pathway inhibitor-2 in human tumor tissue*. *Thromb Haemost*, 2003. **90(1)**: p. 140-6.
65. Wahlstrom, T., H. Bohn, and M. Seppala, *Immunohistochemical demonstration of placental protein 5 (PP5) -like material in the seminal vesicle and the ampullar part of vas deferens*. *Life Sci*, 1982. **31(24)**: p. 2723-5.
66. Wang, S., et al., *TFPI-2 is a putative tumor suppressor gene frequently inactivated by promoter hypermethylation in nasopharyngeal carcinoma*. *BMC Cancer*. **10**: p. 617.
67. Wong, C.M., et al., *Tissue factor pathway inhibitor-2 as a frequently silenced tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma*. *Hepatology*, 2007. **45(5)**: p. 1129-38.
68. Huang, Z.F., T.C. Wun, and G.J. Broze, Jr., *Kinetics of factor Xa inhibition by tissue factor pathway inhibitor*. *J Biol Chem*, 1993. **268(36)**: p. 26950-5.

69. Thiec, F., G. Cherel, and O.D. Christophe, *Role of the Gla and first epidermal growth factor-like domains of factor X in the prothrombinase and tissue factor-factor VIIa complexes*. J Biol Chem, 2003. **278**(12): p. 10393-9.
70. Mast, A.E. and G.J. Broze, Jr., *Physiological concentrations of tissue factor pathway inhibitor do not inhibit prothrombinase*. Blood, 1996. **87**(5): p. 1845-50.
71. Hackeng, T.M., et al., *Protein S stimulates inhibition of the tissue factor pathway by tissue factor pathway inhibitor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(9): p. 3106-11.
72. Conard, J., et al., *Molar antithrombin concentration in normal human plasma*. Haemostasis, 1983. **13**(6): p. 363-8.
73. Quinsey, N.S., et al., *Antithrombin: in control of coagulation*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(3): p. 386-9.
74. McCoy, A.J., et al., *Structure of beta-antithrombin and the effect of glycosylation on antithrombin's heparin affinity and activity*. J Mol Biol, 2003. **326**(3): p. 823-33.
75. Law, R.H., et al., *An overview of the serpin superfamily*. Genome Biol, 2006. **7**(5): p. 216.
76. Stein, P.E., et al., *Crystal structure of ovalbumin as a model for the reactive centre of serpins*. Nature, 1990. **347**(6288): p. 99-102.
77. Huntington, J.A., *Serpin structure, function and dysfunction*. J Thromb Haemost, 2011. **9 Suppl 1**: p. 26-34.
78. Stratikos, E. and P.G. Gettins, *Formation of the covalent serpin-proteinase complex involves translocation of the proteinase by more than 70 Å and full insertion of the reactive center loop into beta-sheet A*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(9): p. 4808-13.
79. Huntington, J.A., et al., *Mechanism of heparin activation of antithrombin. Evidence for reactive center loop preinsertion with expulsion upon heparin binding*. Biochemistry, 1996. **35**(26): p. 8495-503.
80. Marcum, J.A., et al., *Cloned bovine aortic endothelial cells synthesize anticoagulant active heparan sulfate proteoglycan*. J Biol Chem, 1986. **261**(16): p. 7507-17.
81. Mertens, G., et al., *Cell surface heparan sulfate proteoglycans from human vascular endothelial cells. Core protein characterization and antithrombin III binding properties*. J Biol Chem, 1992. **267**(28): p. 20435-43.
82. Olson, S.T., et al., *Role of the antithrombin-binding pentasaccharide in heparin acceleration of antithrombin-proteinase reactions. Resolution of the antithrombin conformational change contribution to heparin rate enhancement*. J Biol Chem, 1992. **267**(18): p. 12528-38.
83. Rezaie, A.R., *Partial activation of antithrombin without heparin through deletion of a unique sequence on the reactive site loop of the serpin*. J Biol Chem, 2002. **277**(2): p. 1235-9.
84. Lane, D.A., et al., *Anticoagulant activities of heparin oligosaccharides and their neutralization by platelet factor 4*. Biochem J, 1984. **218**(3): p. 725-32.
85. Ishiguro, K., et al., *Complete antithrombin deficiency in mice results in embryonic lethality*. J Clin Invest, 2000. **106**(7): p. 873-8.
86. Eaton, D., H. Rodriguez, and G.A. Vehar, *Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity*. Biochemistry, 1986. **25**(2): p. 505-12.

87. Kalafatis, M., M.D. Rand, and K.G. Mann, *The mechanism of inactivation of human factor V and human factor Va by activated protein C*. J Biol Chem, 1994. **269**(50): p. 31869-80.
88. Bodary, P.F., K.J. Wickenheiser, and D.T. Eitzman, *Recent advances in understanding endogenous fibrinolysis: implications for molecular-based treatment of vascular disorders*. Expert Rev Mol Med, 2002. **4**(7): p. 1-10.
89. Leuer, M., et al., *Somatic mosaicism in hemophilia A: a fairly common event*. Am J Hum Genet, 2001. **69**(1): p. 75-87.
90. Thompson, A.R. and S.H. Chen, *Germ line origins of de novo mutations in hemophilia B families*. Hum Genet, 1994. **94**(3): p. 299-302.
91. Oldenburg, J., et al., *De novo factor VIII gene intron 22 inversion in a female carrier presents as a somatic mosaicism*. Blood, 2000. **96**(8): p. 2905-6.
92. Favier, R., et al., *Unbalanced X-chromosome inactivation with a novel FVIII gene mutation resulting in severe hemophilia A in a female*. Blood, 2000. **96**(13): p. 4373-5.
93. Lakich, D., et al., *Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A*. Nat Genet, 1993. **5**(3): p. 236-41.
94. Giannelli, F., et al., *Haemophilia B (sixth edition): a database of point mutations and short additions and deletions*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(1): p. 103-18.
95. Rosner, F., *Medicine in the Bible and the Talmud*. Collection : Library of Jewish law and ethics. Edition Hoboken 1995. **5**.
96. Gill, P., et al., *Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis*. Nat Genet, 1994. **6**(2): p. 130-5.
97. Rogaev, E.I., et al., *Genotype analysis identifies the cause of the "royal disease"*. Science, 2009. **326**(5954): p. 817.
98. Darby, S.C., et al., *Mortality rates, life expectancy, and causes of death in people with hemophilia A or B in the United Kingdom who were not infected with HIV*. Blood, 2007. **110**(3): p. 815-25.
99. ORPHANET, *Hémophilie*. 2012. **ORPHA448**(www.orphanet.com).
100. Kroner, B.L., et al., *HIV-1 infection incidence among persons with hemophilia in the United States and western Europe, 1978-1990. Multicenter Hemophilia Cohort Study*. J Acquir Immune Defic Syndr, 1994. **7**(3): p. 279-86.
101. Hay, C.R., et al., *Factor VIII inhibitors in mild and moderate-severity haemophilia A. UK Haemophilia Centre Directors Organisation*. Thromb Haemost, 1998. **79**(4): p. 762-6.
102. Lacroix-Desmazes, S., et al., *Catalytic activity of antibodies against factor VIII in patients with hemophilia A*. Nat Med, 1999. **5**(9): p. 1044-7.
103. Kazatchkine, M.D., et al., *Circulating immune complexes containing anti-VIII antibodies in multi-transfused patients with haemophilia A*. Clin Exp Immunol, 1980. **39**(2): p. 315-20.
104. White, G.C., 2nd, et al., *Definitions in hemophilia. Recommendation of the scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis*. Thromb Haemost, 2001. **85**(3): p. 560.
105. Astermark, J., et al., *The Malmo International Brother Study (MIBS): further support for genetic predisposition to inhibitor development in hemophilia patients*. Haemophilia, 2001. **7**(3): p. 267-72.

106. Hay, C.R., *The epidemiology of factor VIII inhibitors*. Haemophilia, 2006. **12 Suppl 6**: p. 23-8; discussion 28-9.
107. Pavlova, A., et al., *Impact of polymorphisms of the major histocompatibility complex class II, interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 genes on inhibitor development in severe hemophilia A*. J Thromb Haemost, 2009. **7**(12): p. 2006-2015.
108. Gouw, S.C., J.G. van der Bom, and H. Marijke van den Berg, *Treatment-related risk factors of inhibitor development in previously untreated patients with hemophilia A: the CANAL cohort study*. Blood, 2007. **109**(11): p. 4648-54.
109. Goudemand, J., Y. Laurian, and T. Calvez, *Risk of inhibitors in haemophilia and the type of factor replacement*. Curr Opin Hematol, 2006. **13**(5): p. 316-22.
110. Auerswald, G., et al., *Treatment patterns and cost-of-illness of severe haemophilia in patients with inhibitors in Germany*. Haemophilia, 2004. **10**(5): p. 499-508.
111. Hodge, G. and P. Han, *Effect of intermediate-purity factor VIII (FVIII) concentrate on lymphocyte proliferation and apoptosis: transforming growth factor-beta is a significant immunomodulatory component of FVIII*. Br J Haematol, 2001. **115**(2): p. 376-81.
112. Chambost, H., *Assessing risk factors: prevention of inhibitors in haemophilia*. Haemophilia, 2010. **16 Suppl 2**: p. 10-5.
113. Astermark, J., et al., *Non-genetic risk factors and the development of inhibitors in haemophilia: a comprehensive review and consensus report*. Haemophilia. **16**(5): p. 747-66.
114. Shapiro, A.D., et al., *The safety and efficacy of recombinant human blood coagulation factor IX in previously untreated patients with severe or moderately severe hemophilia B*. Blood, 2005. **105**(2): p. 518-25.
115. Parquet, A., et al., *Incidence of factor IX inhibitor development in severe haemophilia B patients treated with only one brand of high purity plasma derived factor IX concentrate*. Thromb Haemost, 1999. **82**(4): p. 1247-9.
116. www.wfh.org, *Inhibitors in Haemophilia : a primer*. WFH 2008.
117. Darby, S.C., et al., *The incidence of factor VIII and factor IX inhibitors in the hemophilia population of the UK and their effect on subsequent mortality, 1977-99*. J Thromb Haemost, 2004. **2**(7): p. 1047-54.
118. Key, N.S., et al., *Home treatment of mild to moderate bleeding episodes using recombinant factor VIIa (Novoseven) in haemophiliacs with inhibitors*. Thromb Haemost, 1998. **80**(6): p. 912-8.
119. Gautier, P., et al., *Cost related to replacement therapy during hospitalization in haemophiliacs with or without inhibitors: experience of six French haemophilia centres*. Haemophilia, 2002. **8**(5): p. 674-9.
120. Goudemand, J., *Hemophilia. Treatment of patients with inhibitors: cost issues*. Haemophilia, 1999. **5**(6): p. 397-401.
121. Colowick, A.B., et al., *Immune tolerance induction in hemophilia patients with inhibitors: costly can be cheaper*. Blood, 2000. **96**(5): p. 1698-702.
122. Chang, H., et al., *The impact of inhibitors on the cost of clotting factor replacement therapy in Haemophilia A in Canada*. Haemophilia, 1999. **5**(4): p. 247-52.
123. Di Minno, M.N., et al., *Cost of care of haemophilia with inhibitors*. Haemophilia, 2009. **16**(1): p. e190-201.

124. Franchini, M., et al., *Acquired hemophilia A: a concise review*. Am J Hematol, 2005. **80**(1): p. 55-63.
125. Jedidi, I., et al., [*Acquired haemophilia B: a case report and literature review*]. Ann Biol Clin (Paris), 2012. **69**(6): p. 685-8.
126. Levesque, H., et al., [*Acquired hemophilia: current diagnostic and therapeutic approaches*]. Rev Med Interne, 2001. **22**(9): p. 854-66.
127. Huth-Kuhne, A., et al., *International recommendations on the diagnosis and treatment of patients with acquired hemophilia A*. Haematologica, 2009. **94**(4): p. 566-75.
128. Mannucci, P.M., *Back to the future: a recent history of haemophilia treatment*. Haemophilia, 2008. **14 Suppl 3**: p. 10-8.
129. Menache, D., *Prothrombin complex concentrates: clinical use*. Ann N Y Acad Sci, 1981. **370**: p. 747-56.
130. CDC, *Pneumocystis carini pneumonia among person with hemophilia*. Mortality and Morbidity Weekly Reports, 1982. **31**: p. 365-367.
131. Danic, B., M. El Ghouzzi, and B. Flan, *Sécurité des médicaments dérivés du plasma*. Transfusion en hématologie, 2010.
132. White, G.C., 2nd, et al., *Use of recombinant antihemophilic factor in the treatment of two patients with classic hemophilia*. N Engl J Med, 1989. **320**(3): p. 166-70.
133. White, G.C., 2nd, A. Beebe, and B. Nielsen, *Recombinant factor IX*. Thromb Haemost, 1997. **78**(1): p. 261-5.
134. Pipe, S.W. and L.A. Valentino, *Optimizing outcomes for patients with severe haemophilia A*. Haemophilia, 2007. **13 Suppl 4**: p. 1-16; quiz 3 p following 16.
135. Mannucci, P.M., *Desmopressin: a nontransfusional form of treatment for congenital and acquired bleeding disorders*. Blood, 1988. **72**(5): p. 1449-55.
136. Mannucci, P.M., et al., *1-Deamino-8-d-arginine vasopressin: a new pharmacological approach to the management of haemophilia and von Willebrands' diseases*. Lancet, 1977. **1**(8017): p. 869-72.
137. Gribble, J. and M.B. Garvey, *Porcine factor VIII provides clinical benefit to patients with high levels of inhibitors to human and porcine factor VIII*. Haemophilia, 2000. **6**(5): p. 482-5.
138. Luu, H. and B. Ewenstein, *FEIBA safety profile in multiple modes of clinical and home-therapy application*. Haemophilia, 2004. **10 Suppl 2**: p. 10-6.
139. Kelly, P. and J.A. Penner, *Antihemophilic factor inhibitors. Management with prothrombin complex concentrates*. Jama, 1976. **236**(18): p. 2061-4.
140. Price, D.A., S. d'Souza, and H. Ekert, *The use of non-activated prothrombin concentrate in the management of haemophilia A with factor VIII antibodies*. Aust N Z J Med, 1977. **7**(3): p. 286-90.
141. Blatt, P.M., D. Menache, and H.R. Roberts, *A survey of the effectiveness of prothrombin complex concentrates in controlling hemorrhage in patients with hemophilia and anti-Factor VIII antibodies*. Thromb Haemost, 1980. **44**(1): p. 39-42.
142. Sjamsoedin, L.J., et al., *The effect of activated prothrombin-complex concentrate (FEIBA) on joint and muscle bleeding in patients with hemophilia A and antibodies to factor VIII. A double-blind clinical trial*. N Engl J Med, 1981. **305**(13): p. 717-21.

143. Lusher, J.M., et al., *Autoplex versus proplex: a controlled, double-blind study of effectiveness in acute hemarthroses in hemophiliacs with inhibitors to factor VIII*. *Blood*, 1983. **62**(5): p. 1135-8.
144. Young, G., et al., *Single 270 microg kg(-1)-dose rFVIIa vs. standard 90 microg kg(-1)-dose rFVIIa and APCC for home treatment of joint bleeds in haemophilia patients with inhibitors: a randomized comparison*. *Haemophilia*, 2008. **14**(2): p. 287-94.
145. Stenbjerg, S. and J. Jorgensen, *Activated F IX concentrate (FEIBA) used in the treatment of haemophilic patients with antibody to F VIII*. *Acta Med Scand*, 1978. **203**(6): p. 471-6.
146. Aledort, L.M., *Comparative thrombotic event incidence after infusion of recombinant factor VIIa versus factor VIII inhibitor bypass activity*. *J Thromb Haemost*, 2004. **2**(10): p. 1700-8.
147. Hoffman, M., D.M. Monroe, 3rd, and H.R. Roberts, *Activated factor VII activates factors IX and X on the surface of activated platelets: thoughts on the mechanism of action of high-dose activated factor VII*. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1998. **9 Suppl 1**: p. S61-5.
148. Hoffman, M. and D.M. Monroe, 3rd, *The action of high-dose factor VIIa (FVIIa) in a cell-based model of hemostasis*. *Dis Mon*, 2003. **49**(1): p. 14-21.
149. Hedner, U. and C.A. Lee, *First 20 years with recombinant FVIIa (NovoSeven)*. *Haemophilia*, 2012. **17**(1): p. e172-82.
150. Hedner, U. and W. Kisiel, *Use of human factor VIIa in the treatment of two hemophilia A patients with high-titer inhibitors*. *J Clin Invest*, 1983. **71**(6): p. 1836-41.
151. Jurlander, B., et al., *Recombinant activated factor VII (rFVIIa): characterization, manufacturing, and clinical development*. *Semin Thromb Hemost*, 2001. **27**(4): p. 373-84.
152. Hedner, U., *Factor VIIa in the treatment of haemophilia*. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1990. **1**(3): p. 307-17.
153. Brinkhous, K.M., et al., *Effect of recombinant factor VIIa on the hemostatic defect in dogs with hemophilia A, hemophilia B, and von Willebrand disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(4): p. 1382-6.
154. Hedner, U., et al., *Successful use of recombinant factor VIIa in patient with severe haemophilia A during synovectomy*. *Lancet*, 1988. **2**(8621): p. 1193.
155. Shapiro, A.D., et al., *Prospective, randomised trial of two doses of rFVIIa (NovoSeven) in haemophilia patients with inhibitors undergoing surgery*. *Thromb Haemost*, 1998. **80**(5): p. 773-8.
156. Arkin, S., et al., *Human coagulation factor FVIIa (recombinant) in the management of limb-threatening bleeds unresponsive to alternative therapies: results from the NovoSeven emergency-use programme in patients with severe haemophilia or with acquired inhibitors*. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2000. **11**(3): p. 255-9.
157. Hay, C.R., *Hemophilia treatment. Immune tolerance induction: prospective clinical trials*. *Haematologica*, 2000. **85**(10 Suppl): p. 52-5; discussion 55-6.
158. Di Minno, G., et al., *Longer-acting factor VIII to overcome limitations in haemophilia management: the PEGylated liposomes formulation issue*. *Haemophilia*, 2010. **16 Suppl 1**: p. 2-6.
159. Powell, J., et al., *Efficacy and safety of prophylaxis with once-weekly BAY 79-4980 compared with thrice-weekly rFVIII-FS in haemophilia A patients*. *A*

- randomised, active-controlled, double-blind study.* Thromb Haemost, 2012. **108**(5): p. 913-922.
160. Mei, B., et al., *Rational design of a fully active, long-acting PEGylated factor VIII for hemophilia A treatment.* Blood, 2010. **116**(2): p. 270-9.
 161. Dumont, J.A., et al., *Prolonged activity of a recombinant factor VIII-Fc fusion protein in hemophilia A mice and dogs.* Blood, 2012. **119**(13): p. 3024-30.
 162. Collins, P.W., et al., *Population pharmacokinetic modeling for dose setting of nonacog beta pegol (N9-GP), a glycoPEGylated recombinant factor IX.* J Thromb Haemost.
 163. Peters, R.T., et al., *Prolonged activity of factor IX as a monomeric Fc fusion protein.* Blood. **115**(10): p. 2057-64.
 164. van Dieijen, G., et al., *The role of phospholipid and factor VIIIa in the activation of bovine factor X.* J Biol Chem, 1981. **256**(7): p. 3433-42.
 165. Kolkman, J.A. and K. Mertens, *Insertion loop 256-268 in coagulation factor IX restricts enzymatic activity in the absence but not in the presence of factor VIII.* Biochemistry, 2000. **39**(25): p. 7398-405.
 166. Hartmann, R., et al., *Factor IX mutants with enhanced catalytic activity.* J Thromb Haemost, 2009. **7**(10): p. 1656-62.
 167. Tuddenham, E., *Gene therapy for haemophilia B.* Haemophilia, 2012. **18 Suppl 4**: p. 13-7.
 168. Gan, S.U. and R.Y. Calne, *Gene therapy for hemophilia A.* Discov Med, 2006. **6**(35): p. 198-202.
 169. Palmer, T.D., A.R. Thompson, and A.D. Miller, *Production of human factor IX in animals by genetically modified skin fibroblasts: potential therapy for hemophilia B.* Blood, 1989. **73**(2): p. 438-45.
 170. Sarkar, R., et al., *Total correction of hemophilia A mice with canine FVIII using an AAV 8 serotype.* Blood, 2004. **103**(4): p. 1253-60.
 171. Scallan, C.D., et al., *Phenotypic correction of a mouse model of hemophilia A using AAV2 vectors encoding the heavy and light chains of FVIII.* Blood, 2003. **102**(12): p. 3919-26.
 172. Burton, M., et al., *Coexpression of factor VIII heavy and light chain adeno-associated viral vectors produces biologically active protein.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(22): p. 12725-30.
 173. Chen, L., et al., *Enhanced factor VIII heavy chain for gene therapy of hemophilia A.* Mol Ther, 2009. **17**(3): p. 417-24.
 174. Kuether, E.L., et al., *Lentivirus-mediated platelet gene therapy of murine hemophilia A with pre-existing anti-FVIII immunity.* J Thromb Haemost.
 175. Margaritis, P., et al., *Novel therapeutic approach for hemophilia using gene delivery of an engineered secreted activated Factor VII.* J Clin Invest, 2004. **113**(7): p. 1025-31.
 176. Aljamali, M.N., et al., *Long-term expression of murine activated factor VII is safe, but elevated levels cause premature mortality.* J Clin Invest, 2008. **118**(5): p. 1825-34.
 177. Tomokiyo, K., et al., *A novel therapeutic approach combining human plasma-derived Factors VIIa and X for haemophiliacs with inhibitors: evidence of a higher thrombin generation rate in vitro and more sustained haemostatic activity in vivo than obtained with Factor VIIa alone.* Vox Sang, 2003. **85**(4): p. 290-9.
 178. Nakatomi, Y., et al., *Combining FVIIa and FX into a mixture which imparts a unique thrombin generation potential to hemophilic plasma: an in vitro*

- assessment of FVIIa/FX mixture as an alternative bypassing agent.* Thromb Res, 2010. **125**(5): p. 457-63.
179. Shirahata, A., et al., *Clinical pharmacological study of a plasma-derived factor VIIa and factor X mixture (MC710) in haemophilia patients with inhibitors--phase I trial.* Haemophilia, 2011. **18**(1): p. 94-101.
 180. Santagostino, E., et al., *A prospective randomized trial of high and standard dosages of recombinant factor VIIa for treatment of hemarthroses in hemophiliacs with inhibitors.* J Thromb Haemost, 2006. **4**(2): p. 367-71.
 181. Ghosh, S., et al., *Activity and regulation of factor VIIa analogs with increased potency at the endothelial cell surface.* J Thromb Haemost, 2007. **5**(2): p. 336-46.
 182. Persson, E., M. Kjalke, and O.H. Olsen, *Rational design of coagulation factor VIIa variants with substantially increased intrinsic activity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(24): p. 13583-8.
 183. Aljamali, M.N., et al., *Thrombin generation and platelet activation induced by rFVIIa (NovoSeven) and NN1731 in a reconstituted cell-based model mimicking haemophilia conditions.* Haemophilia, 2009. **15**(6): p. 1318-26.
 184. Sorensen, B., E. Persson, and J. Ingerslev, *Factor VIIa analogue (V158D/E296V/M298Q-FVIIa) normalises clot formation in whole blood from patients with severe haemophilia A.* Br J Haematol, 2007. **137**(2): p. 158-65.
 185. Holmberg, H.L., et al., *Faster onset of effect and greater efficacy of NN1731 compared with rFVIIa, aPCC and FVIII in tail bleeding in hemophilic mice.* J Thromb Haemost, 2009. **7**(9): p. 1517-22.
 186. Moss, J., et al., *Evaluation of the safety and pharmacokinetics of a fast-acting recombinant FVIIa analogue, NN1731, in healthy male subjects.* J Thromb Haemost, 2009. **7**(2): p. 299-305.
 187. Pharmainfo.net, *Novo Nordisk A/S: Novo Nordisk discontinues development of vatreptacog alfa following analysis of phase 3 results.* 2012. <http://www.pharmainfo.net/news/10/26/2012/novo-nordisk-novo-nordisk-discontinues-development-vatreptacog-alfa-following-analys>.
 188. Mahlangu, J.N., et al., *Phase I, randomized, double-blind, placebo-controlled, single-dose escalation study of the recombinant factor VIIa variant BAY 86-6150 in hemophilia.* J Thromb Haemost, 2012. **10**(5): p. 773-80.
 189. Schulte, S., *Use of albumin fusion technology to prolong the half-life of recombinant factor VIIa.* Thromb Res, 2008. **122 Suppl 4**: p. S14-9.
 190. Moss, J., A. Rosholm, and A. Lauren, *Safety and pharmacokinetics of a glycoPEGylated recombinant activated factor VII derivative: a randomized first human dose trial in healthy subjects.* J Thromb Haemost, 2011. **9**(7): p. 1368-74.
 191. http://www.novonordisk.com/images/investors/investor_presentations/2011/Q3/PR111027_9M_2011_UK.pdf. 2011.
 192. Giles, A.R., K.G. Mann, and M.E. Nesheim, *A combination of factor Xa and phosphatidylcholine-phosphatidylserine vesicles bypasses factor VIII in vivo.* Br J Haematol, 1988. **69**(4): p. 491-7.
 193. Louvain-Quintard, V.B., et al., *Thrombin-activable factor X re-establishes an intrinsic amplification in tenase-deficient plasmas.* J Biol Chem, 2005. **280**(50): p. 41352-9.

194. Bunce, M.W., R. Toso, and R.M. Camire, *Zymogen-like factor Xa variants restore thrombin generation and effectively bypass the intrinsic pathway in vitro*. *Blood*, 2011. **117**(1): p. 290-8.
195. Ivanciu, L., et al., *A zymogen-like factor Xa variant corrects the coagulation defect in hemophilia*. *Nat Biotechnol*, 2012. **29**(11): p. 1028-33.
196. Hilden, I., et al., *Hemostatic effect of a monoclonal antibody mAb 2021 blocking the interaction between FXa and TFPI in a rabbit hemophilia model*. *Blood*, 2012. **119**(24): p. 5871-8.
197. Petersen, L.C., *Hemostatic properties of a TFPI antibody*. *Thromb Res*, 2012. **129 Suppl 2**: p. S44-5.
198. Waters, E.K., et al., *Aptamer ARC19499 mediates a procoagulant hemostatic effect by inhibiting tissue factor pathway inhibitor*. *Blood*, 2011. **117**(20): p. 5514-22.
199. Dunn, F., et al., *Fibrinogen binding on human platelets. Influence of different heparins and of pentosane polysulfate*. *Thromb Res*, 1983. **29**(2): p. 141-8.
200. Klocking, H.P. and F. Markwardt, *Release of plasminogen activator by pentosan polysulphate*. *Thromb Res*, 1986. **41**(5): p. 739-44.
201. Dockal, M., et al., *24 Peptides Inhibiting Tissue Factor Pathway Inhibitor Improve Hemostasis in Mice*. *ISTH Abstract*, 2011.
202. Vianello, F., et al., *Mild bleeding diathesis in a boy with combined severe haemophilia B (C(10400)-->T) and heterozygous factor V Leiden*. *Haemophilia*, 2001. **7**(5): p. 511-4.
203. Lee, D.H., et al., *Effect of the factor V Leiden mutation on the clinical expression of severe hemophilia A*. *Thromb Haemost*, 2000. **83**(3): p. 387-91.
204. Schlachterman, A., et al., *Factor V Leiden improves in vivo hemostasis in murine hemophilia models*. *J Thromb Haemost*, 2005. **3**(12): p. 2730-7.
205. Butenas, S., et al., *Peptidomimetic inhibitors for activated protein C: implications for hemophilia management*. *J Thromb Haemost*, 2006. **4**(11): p. 2411-6.
206. Kitazawa, T., et al., *A bispecific antibody to factors IXa and X restores factor VIII hemostatic activity in a hemophilia A model*. *Nat Med*. **18**(10): p. 1570-4.
207. Hrachovinova, I., et al., *Interaction of P-selectin and PSGL-1 generates microparticles that correct hemostasis in a mouse model of hemophilia A*. *Nat Med*, 2003. **9**(8): p. 1020-5.
208. Davie, E.W., et al., *The role of serine proteases in the blood coagulation cascade*. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 1979. **48**: p. 277-318.
209. Leytus, S.P., et al., *Gene for human factor X: a blood coagulation factor whose gene organization is essentially identical with that of factor IX and protein C*. *Biochemistry*, 1986. **25**(18): p. 5098-102.
210. Padmanabhan, K., et al., *Structure of human des(1-45) factor Xa at 2.2 Å resolution*. *J Mol Biol*, 1993. **232**(3): p. 947-66.
211. Telfer, T.P., K.W. Denson, and D.R. Wright, *A new coagulation defect*. *Br J Haematol*, 1956. **2**(3): p. 308-16.
212. Uprichard, J. and D.J. Perry, *Factor X deficiency*. *Blood Rev*, 2002. **16**(2): p. 97-110.
213. Samama, M., *Hémorragies et thromboses : du diagnostic au traitement*. *Abrégés Masson*, 2004.

214. Di Scipio, R.G., M.A. Hermodson, and E.W. Davie, *Activation of human factor X (Stuart factor) by a protease from Russell's viper venom*. *Biochemistry*, 1977. **16**(24): p. 5253-60.
215. Bresnahan, P.A., et al., *Human fur gene encodes a yeast KEX2-like endoprotease that cleaves pro-beta-NGF in vivo*. *J Cell Biol*, 1990. **111**(6 Pt 2): p. 2851-9.
216. Mertens, K. and R.M. Bertina, *Pathways in the activation of human coagulation factor X*. *Biochem J*, 1980. **185**(3): p. 647-58.
217. Pryzdial, E.L. and G.E. Kessler, *Kinetics of blood coagulation factor Xalpha autoproteolytic conversion to factor Xbeta. Effect on inhibition by antithrombin, prothrombinase assembly, and enzyme activity*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(28): p. 16621-6.
218. Stanton, C. and R. Wallin, *Processing and trafficking of clotting factor X in the secretory pathway. Effects of warfarin*. *Biochem J*, 1992. **284** (Pt 1): p. 25-31.
219. Venkateswarlu, D., et al., *Structure and dynamics of zymogen human blood coagulation factor X*. *Biophys J*, 2002. **82**(3): p. 1190-206.
220. Inoue, K. and T. Morita, *Identification of O-linked oligosaccharide chains in the activation peptides of blood coagulation factor X. The role of the carbohydrate moieties in the activation of factor X*. *Eur J Biochem*, 1993. **218**(1): p. 153-63.
221. Suttie, J.W., *Oral anticoagulant therapy: the biosynthetic basis*. *Semin Hematol*, 1977. **14**(3): p. 365-74.
222. Stenflo, J. and J.W. Suttie, *Vitamin K-dependent formation of gamma-carboxyglutamic acid*. *Annu Rev Biochem*, 1977. **46**: p. 157-72.
223. Huang, Q., et al., *Substrate recognition by tissue factor-factor VIIa. Evidence for interaction of residues Lys165 and Lys166 of tissue factor with the 4-carboxyglutamate-rich domain of factor X*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(36): p. 21752-7.
224. Lee, C.J., et al., *Recent estimates of the structure of the factor VIIa (FVIIa)/tissue factor (TF) and factor Xa (FXa) ternary complex*. *Thromb Res*, 2010. **125 Suppl 1**: p. S7-S10.
225. Kittur, F.S., C. Manithody, and A.R. Rezaie, *Role of the N-terminal epidermal growth factor-like domain of factor X/Xa*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(23): p. 24189-96.
226. Kirchhofer, D., et al., *The tissue factor region that interacts with substrates factor IX and Factor X*. *Biochemistry*, 2000. **39**(25): p. 7380-7.
227. Banner, D.W., et al., *The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor*. *Nature*, 1996. **380**(6569): p. 41-6.
228. Norledge, B.V., et al., *The tissue factor/factor VIIa/factor Xa complex: a model built by docking and site-directed mutagenesis*. *Proteins*, 2003. **53**(3): p. 640-8.
229. Lee, C.J., et al., *Proposed structural models of human factor Va and prothrombinase*. *J Thromb Haemost*, 2008. **6**(1): p. 83-9.
230. Furie, B.C. and B. Furie, *Coagulant protein of Russell's viper venom*. *Methods Enzymol*, 1976. **45**: p. 191-205.
231. Yegneswaran, S., R.M. Mesters, and J.H. Griffin, *Identification of distinct sequences in human blood coagulation factor Xa and prothrombin essential*

- for substrate and cofactor recognition in the prothrombinase complex. *J Biol Chem*, 2003. **278**(35): p. 33312-8.
232. Autin, L., et al., *Proposed structural models of the prothrombinase (FXa-FVa) complex*. *Proteins*, 2006. **63**(3): p. 440-50.
 233. Levigne, S., et al., *Role of the alpha-helix 163-170 in factor Xa catalytic activity*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(43): p. 31569-79.
 234. Mann, K., *Methods in Enzymology*, 1976: p. 45,156.
 235. Lindhout, T., et al., *Kinetics of the inhibition of human factor Xa by full-length and truncated recombinant tissue factor pathway inhibitor*. *Biochem J*, 1994. **297 (Pt 1)**: p. 131-6.
 236. Bajaj, S.P., S.I. Rapaport, and S.F. Brown, *Isolation and characterization of human factor VII. Activation of factor VII by factor Xa*. *J Biol Chem*, 1981. **256**(1): p. 253-9.
 237. Spicer, E.K., et al., *Isolation of cDNA clones coding for human tissue factor: primary structure of the protein and cDNA*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(15): p. 5148-52.
 238. Nogami, K., H. Wakabayashi, and P.J. Fay, *Mechanisms of factor Xa-catalyzed cleavage of the factor VIIIa A1 subunit resulting in cofactor inactivation*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(19): p. 16502-9.
 239. Nogami, K., et al., *Role of factor VIII C2 domain in factor VIII binding to factor Xa*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(43): p. 31000-7.
 240. Lapan, K.A. and P.J. Fay, *Localization of a factor X interactive site in the A1 subunit of factor VIIIa*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(4): p. 2082-8.
 241. Kolkman, J.A., et al., *Surface loop 199-204 in blood coagulation factor IX is a cofactor-dependent site involved in macromolecular substrate interaction*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(41): p. 29087-93.
 242. Nesheim, M.E. and K.G. Mann, *The kinetics and cofactor dependence of the two cleavages involved in prothrombin activation*. *J Biol Chem*, 1983. **258**(9): p. 5386-91.
 243. Deguchi, H., et al., *Prothrombin kringle 1 domain interacts with factor Va during the assembly of prothrombinase complex*. *Biochem J*, 1997. **321 (Pt 3)**: p. 729-35.
 244. Krishnaswamy, S., et al., *Activation of human prothrombin by human prothrombinase. Influence of factor Va on the reaction mechanism*. *J Biol Chem*, 1987. **262**(7): p. 3291-9.
 245. Taneda, H., et al., *Blood coagulation factor Xa interacts with a linear sequence of the kringle 2 domain of prothrombin*. *J Biochem*, 1994. **116**(3): p. 589-97.
 246. Ruf, W., et al., *Cofactor residues lysine 165 and 166 are critical for protein substrate recognition by the tissue factor-factor VIIIa protease complex*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(9): p. 6375-81.
 247. Rao, L.V. and U.R. Pendurthi, *Tissue factor-factor VIIIa signaling*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(1): p. 47-56.
 248. Macfarlane, S.R., et al., *Proteinase-activated receptors*. *Pharmacol Rev*, 2001. **53**(2): p. 245-82.
 249. Rana, S., et al., *Determinants of the specificity of protease-activated receptors 1 and 2 signaling by factor Xa and thrombin*. *J Cell Biochem*, 2012. **113**(3): p. 977-84.

250. Ossovskaya, V.S. and N.W. Bunnett, *Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease*. *Physiol Rev*, 2004. **84**(2): p. 579-621.
251. Ruf, W., A. Dorfleutner, and M. Riewald, *Specificity of coagulation factor signaling*. *J Thromb Haemost*, 2003. **1**(7): p. 1495-503.
252. Borensztajn, K., M.P. Peppelenbosch, and C.A. Spek, *Factor Xa: at the crossroads between coagulation and signaling in physiology and disease*. *Trends Mol Med*, 2008. **14**(10): p. 429-40.
253. Pejler, G., C. Lunderius, and B. Tomasini-Johansson, *Macrophages synthesize factor X and secrete factor X/Xa-containing prothrombinase activity into the surrounding medium*. *Thromb Haemost*, 2000. **84**(3): p. 429-35.
254. Shikamoto, Y. and T. Morita, *Expression of factor X in both the rat brain and cells of the central nervous system*. *FEBS Lett*, 1999. **463**(3): p. 387-9.
255. Borensztajn, K., et al., *Factor Xa stimulates proinflammatory and profibrotic responses in fibroblasts via protease-activated receptor-2 activation*. *Am J Pathol*, 2008. **172**(2): p. 309-20.
256. Borensztajn, K., M.P. Peppelenbosch, and C.A. Spek, *Coagulation Factor Xa inhibits cancer cell migration via LIMK1-mediated cofilin inactivation*. *Thromb Res*, 2010. **125**(6): p. e323-8.
257. Hamill, C.E., et al., *Exacerbation of dopaminergic terminal damage in a mouse model of Parkinson's disease by the G-protein-coupled receptor protease-activated receptor 1*. *Mol Pharmacol*, 2007. **72**(3): p. 653-64.
258. Nomura, K., et al., *Roles of coagulation pathway and factor Xa in rat mesangioproliferative glomerulonephritis*. *Lab Invest*, 2007. **87**(2): p. 150-60.
259. Hemker, H.C., et al., *Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system*. *Thromb Haemost*, 2006. **96**(5): p. 553-61.
260. van Veen, J.J., et al., *Corn trypsin inhibitor in fluorogenic thrombin-generation measurements is only necessary at low tissue factor concentrations and influences the relationship between factor VIII coagulant activity and thrombogram parameters*. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2008. **19**(3): p. 183-9.
261. Sorensen, B., et al., *Whole blood coagulation thrombelastographic profiles employing minimal tissue factor activation*. *J Thromb Haemost*, 2003. **1**(3): p. 551-8.
262. De Smedt, E., *Advanced Thrombinoscopy*. PhD thesis, 2007.
263. Baugh, R.J., G.J. Broze, Jr., and S. Krishnaswamy, *Regulation of extrinsic pathway factor Xa formation by tissue factor pathway inhibitor*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(8): p. 4378-86.
264. Burgering, M.J., et al., *The second Kunitz domain of human tissue factor pathway inhibitor: cloning, structure determination and interaction with factor Xa*. *J Mol Biol*, 1997. **269**(3): p. 395-407.
265. Balaeff, A., *SODIUM: A program for arranging ions around biological macromolecules*. NIH Resource for Macromolecular Modeling and Bioinformatics 2000. **Version 1.5.1. 2000.** p. <http://iop.vast.ac.vn/theor/conferences/smp/1st/kaminuma/UIUCTheoreticalBiophysicsGroup/index-142.htm>.

266. Crombez, L., et al., *High level production of secreted proteins: example of the human tissue inhibitor of metalloproteinases 1*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **337**(3): p. 908-15.
267. Durocher, Y., S. Perret, and A. Kamen, *High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells*. *Nucleic Acids Res*, 2002. **30**(2): p. E9.
268. Graham, F.L., et al., *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. *J Gen Virol*, 1977. **36**(1): p. 59-74.
269. Foecking, M.K. and H. Hofstetter, *Powerful and versatile enhancer-promoter unit for mammalian expression vectors*. *Gene*, 1986. **45**(1): p. 101-5.
270. Fujikawa, K., K. Titani, and E.W. Davie, *Activation of bovine factor X (Stuart factor): conversion of factor X α to factor X β* . *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1975. **72**(9): p. 3359-63.
271. Morrison, J., *The slow-binding and slow, tight-binding inhibition of enzyme-catalysed reactions*. *Trends in Biochemical Sciences*, 1982. **7**:102-5.

Conception rationnelle de nouvelles protéines thérapeutiques dans l'hémophilie : variants du facteur Xa dépourvus du domaine Gla

RESUME EN FRANCAIS

Introduction :

L'hémophilie est une maladie génétique de la coagulation due à un déficit en facteur VIII ou en facteur IX. Ces déficits sont responsables d'un déficit du complexe ténase intrinsèque (VIIIa-IXa). De plus, le complexe ténase extrinsèque (facteur tissulaire - VIIa) est physiologiquement rapidement inhibé par le TFPI lié au facteur Xa. Nous avons évalué la capacité d'une forme tronquée du facteur Xa (GDxa), dépourvue de domaine Gla à se lier au TFPI et à soulager l'inhibition physiologique du complexe ténase extrinsèque.

Matériel et Méthodes :

Dans une première partie, nous avons évalué la capacité du GDxa à restaurer la génération de thrombine de plasmas d'hémophiles A et B sévères sans et avec inhibiteurs. Nous avons également comparé les profils de génération de thrombine obtenus après addition du GDxa à ceux obtenus en présence d'anticorps neutralisants anti-TFPI ou anti-antithrombine. Enfin, nous avons comparé les cinétiques enzymatiques de neutralisation du facteur Xa et du GDxa par le TFPI et l'antithrombine.

Dans une seconde partie, nous avons étudié *in silico* les interactions entre la chaîne lourde du facteur Xa et le TFPI pour détecter les zones d'interaction défavorables. Cette étude a identifié des acides aminés du facteur Xa qui pourraient être substitués pour optimiser l'interaction avec le TFPI. Les résultats *in silico* ont orienté nos choix de mutagenèse dirigée pour concevoir différents variants moléculaires du GDxa (R138F, R138G, R138I) où l'arginine 138 est substituée. Ces variants protéiques ont été produits de façon recombinante dans des cellules HEK293E. La capacité des différents variants à restaurer la génération de thrombine de plasmas d'hémophiles a été testée avec les surnageants de culture cellulaires correspondants.

Résultats :

Dans la première partie, nous avons montré que le GDxa est capable de restaurer la génération de thrombine de plasmas d'hémophiles A et B sans et avec inhibiteurs. Comparativement au facteur Xa, le GDxa montre une affinité moindre pour le TFPI tandis que les affinités du GDxa et du facteur Xa pour l'antithrombine sont identiques. Enfin, malgré une demi-vie courte, l'effet du GDxa sur la génération de thrombine est maintenu pendant au moins une heure.

Dans la seconde partie, nous avons produit les différents variants R138F, R138G et R138I en cellules HEK293E et montré que les surnageants de culture cellulaire étaient capables de restaurer la génération de thrombine de plasmas d'hémophiles de façon plus efficace que le GDxa.

Conclusion :

Comme le GDxa est capable de restaurer la génération de thrombine de plasmas d'hémophiles, nos résultats suggèrent que le GDxa pourrait être une alternative efficace aux thérapeutiques hémostatiques court-circuitantes actuelles chez les hémophiles sans ou avec inhibiteurs. Les résultats obtenus renforcent l'hypothèse que l'activité pro-coagulante du GDxa serait liée à la formation d'un complexe GDxa-TFPI limitant la formation du complexe Xa-TFPI nécessaire à l'inhibition physiologique du complexe ténase extrinsèque.

De plus, notre approche rationnelle basée sur une étude *in silico* visant à augmenter l'affinité du TFPI pour le GDxa a permis de produire différents variants moléculaires du GDxa dont l'activité procoagulante *in vitro* est augmentée par rapport au GDxa.

Rational Design of new haemostatic drugs in haemophilia: Gla domain less factor Xa variants

RESUME EN ANGLAIS

Background:

Hemophilia is caused by deficiencies in coagulation factor VIII or IX, resulting in direct blockade of the intrinsic tenase complex and indirect blockade of the extrinsic tenase complex which is rapidly inhibited upon binding of factor Xa to tissue factor pathway inhibitor (TFPI). We evaluated the ability of Gla-domainless factor Xa (GDxa), a truncated form of factor Xa devoid of procoagulant properties, to bind to TFPI and to alleviate the physiological inhibition of the extrinsic tenase.

Design and Methods:

In the first part of this work, we evaluated the ability of GDxa to restore coagulation in plasmas from hemophilia A and B patients without and with inhibitors, using a thrombin generation assay triggered by a low concentration of tissue factor. We then compared its efficacy to generate thrombin to depletion of antithrombin or TFPI by specific antibodies. Finally, we compared the kinetics of neutralization of factor Xa and GDxa by antithrombin and TFPI.

In the second part of this work, we realized an *in silico* study of the interactions between factor Xa heavy chain and TFPI. The aim was to detect unfavorable interactions and to identify amino-acid candidates for mutagenesis in order to increase affinity for TFPI. Taking into account the results of this *in silico* study, we produced by genic engineering different molecular variants of GDxa (R138F, R138G, R138I) where Arg138 was substituted by site directed mutagenesis. Proteins were produced in HEK293E cells. We tested dialyzed cell culture supernatants containing each variant to restore thrombin generation in plasmas from severe hemophilia patients.

Results:

In the first part of this work, we showed that GDxa was able to restore thrombin generation in plasma samples from hemophiliacs. This effect was observed for plasma from hemophilia A patients without or with inhibitors and for plasma from hemophilia B patients. GDxa had a lower affinity than factor Xa for TFPI whereas the affinities of both proteins for antithrombin were similar. Finally, despite a short half-life in plasma, the effect of GDxa on thrombin generation was sustained for at least one hour.

In the second part of this work, we produced the different variants R138F, R138G et R138I in HEK293E cells and showed that cell culture supernatants were able to restore thrombin generation in a more efficient way than GDxa.

Conclusions:

As GDxa was able to restore thrombin generation in plasma from hemophilia patients, our results suggest that it may be an effective alternative to current treatments for hemophilia with or without inhibitors. Results sustained the hypothesis that GDxa coagulant activity is through TFPI binding and competition with factor Xa to bind TFPI resulting in limiting factor Xa-TFPI formation, which is essential for inhibition of extrinsic tenase complex.

Furthermore, rational design of GDxa variants based on an *in silico* study lead to production of proteins whose coagulant activity is increased compared to GDxa.