



HAL
open science

Production et caractérisation de nouveaux facteurs IX recombinants améliorés dans le cadre du traitement de l'hémophilie B

Eloïse Perot

► **To cite this version:**

Eloïse Perot. Production et caractérisation de nouveaux facteurs IX recombinants améliorés dans le cadre du traitement de l'hémophilie B. Ingénierie biomédicale. Université Claude Bernard - Lyon I, 2014. Français. NNT : 2014LYO10342 . tel-01421838

HAL Id: tel-01421838

<https://theses.hal.science/tel-01421838v1>

Submitted on 23 Dec 2016

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.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES SANTE

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

Discipline : Ingénierie biologique et médicale, biotechnologie

Soutenue publiquement le 22 décembre 2014

par

Eloïse PEROT

Production et caractérisation de nouveaux
facteurs IX recombinants améliorés
dans le cadre du traitement de l'hémophilie B

Directrice de thèse : Pr Yesim DARGAUD

Co-encadrante de la thèse : Dr Nathalie ENJOLRAS

Jury : Pr Claude NEGRIER, président du jury

Pr Yves GRUEL, rapporteur

Pr Philippe NGUYEN, rapporteur

Pr Yesim DARGAUD, examinateur

Rapporteur hors jury : Dr Peter LENTING, rapporteur

Invitée : Dr Nathalie ENJOLRAS

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Directeur Général des Services

M. François-Noël GILLY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme Caroline FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

Production et caractérisation de nouveaux facteurs IX recombinants améliorés dans le cadre du traitement de l'hémophilie B.

Résumé

Introduction : L'hémophilie B (HB) est une maladie hémorragique héréditaire due à un défaut en facteur IX (FIX) de la coagulation. Le traitement substitutif est efficace mais pose deux problèmes : la fréquence des injections intraveineuses de concentrés de FIX et leurs coûts. La production d'un FIX recombinant à activité améliorée et à demi-vie prolongée est un enjeu important du traitement.

Matériel et méthodes : Afin d'améliorer l'activité du FIX, l'étude s'est portée sur un résidu impliqué dans l'interaction du FIX activé avec son cofacteur, le facteur VIII activé (FVIIIa). Quatre FIX mutés au niveau de l'acide aminé E410 ont été développés. Afin de prolonger la demi-vie, un ADN complémentaire de FIX chimérique a été généré de façon à produire la protéine correspondante par la lignée cellulaire humaine Huh-7. **Résultats :** L'activité coagulante *in vitro* des FIX-E410 était 3 à 5 fois plus élevée que celle du FIX *wild-type* (FIX-WT). De plus, le FIX-E410H induisait une génération de thrombine 5,2 fois plus élevée comparée à celle du FIX-WT. Chez la souris HB, l'activité coagulante et la capacité de génération de thrombine du FIX-E410H *in vivo* étaient significativement plus élevées que celles du FIX-WT. La protéine chimérique a présenté une activité molaire spécifique 10 fois augmentée *in vitro* et une demi-vie jusqu'à 2,8 fois plus allongée, par rapport à celles du FIX-WT.

Conclusion : Nous avons développé et caractérisé quatre molécules de FIX ayant une activité améliorée *in vitro* et *in vivo*, ainsi qu'un FIX modifié à activité augmentée et à demi-vie prolongée *in vivo*. Ces nouvelles molécules pourraient ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques de traitement de l'HB.

Mots-clés : facteur IX recombinant (rFIX), lignée cellulaire Huh-7, activité coagulante augmentée, demi-vie allongée, souris hémophiles B.

Production and characterization of novel recombinant factor IX molecules with enhanced properties in the treatment of hemophilia B.

Abstract

Introduction: Hemophilia B (HB) is an inherited X-linked recessive bleeding disorder, due to a defect in human factor IX (FIX). Replacement therapy, in severe HB is very effective but is limited by FIX concentrates injections frequency and cost issues. Production of a recombinant FIX with enhanced clotting activity and prolonged half-life is one of the current challenges for HB treatment. **Materials and Methods:** To improve activity, we focused on an important residue known to be involved in the interaction of activated FIX with its cofactor, activated factor VIII (FVIIIa), and four mutated FIX-E410 were developed. To prolong stability, a new chimeric FIX cDNA was constructed too. Recombinant FIX molecules were produced by the human hepatoma cell line Huh-7. **Results:** The *in-vitro* clotting activity of FIX-E410 was 3 to 5-fold higher than wild-type FIX (FIX-WT) and this improvement was confirmed using thrombin generation assay. FIX-E410H induced 5.2-fold higher thrombin generation than FIX-WT. In HB mice, we observed significantly higher *in-vivo* clotting activity and thrombin generating capacity with FIX-E410H compared to FIX-WT, mainly explained by 2.5-fold enhanced affinity of the mutant for FVIIIa. Chimeric FIX showed a 10-fold increase in the *in-vitro* molar specific activity and a significantly increased half-life in mice (up to 2.8-fold), compared to FIX-WT. **Conclusion:** We have engineered and characterized four improved FIX proteins with enhanced *in-vitro* and *in-vivo* activity, and a new chimeric FIX with *in-vivo* increased activity and prolonged half-life. These results suggest that these new molecules could optimize protein replacement therapy for HB treatment.

Keywords: recombinant factor IX (rFIX), Huh-7 cell line, enhanced clotting activity, prolonged half-life, hemophilia B mice.

« Quand on veut, on peut ! »

Eloïse, 6 ans

REMERCIEMENTS

Au terme de ce long travail, c'est avec une grande émotion que je tiens à remercier tous ceux qui ont contribué à la bonne réalisation de ce projet. Mes remerciements vont :

Au *Professeur Claude Negrier* qui m'a offert l'opportunité de travailler au sein de son laboratoire. *Claude*, je tiens à vous remercier de m'avoir donné ma chance lors de mon master et de m'avoir permis de continuer sur ce travail de thèse.

Au *Professeur Yesim Dargaud* qui a dirigé cette thèse. *Yesim*, je souhaite te remercier de m'avoir accordé ta confiance pour mener à bien ce projet. Ce fût un peu plus long que prévu mais l'équipe tient maintenant le début d'un nouveau beau projet. Merci pour ta patience et tes conseils.

Aux rapporteurs et membres du jury ; je voudrais remercier le *Professeur Yves Gruel*, le *Professeur Philippe Nguyen* et le *Docteur Peter Lenting* d'avoir accepté d'évaluer mon travail. C'est un réel honneur que vous me faites.

Au *Dr Nathalie Enjolras* qui a co-encadré cette thèse. *Nathalie*, merci pour ta disponibilité sans faille et ta patience à toute épreuve, pour les réponses à mes innombrables questions au cours de ces cinq années passées à travailler ensemble. Merci pour ton soutien aussi bien scientifique que moral. Je suis heureuse d'avoir fait partie de la team du facteur IX.

A mes collègues :

A *Pauline* et *Muriel*, jadis, quand je suis arrivée au labo, vous m'avez tellement bien accueillie que je me suis toute de suite sentie intégrée et à ma place dans la vie de l'équipe, pour cela et tout le reste : merci. *Alice* et *Jonathan*, merci de vous être autant impliqués dans ce projet, merci pour les manips, merci pour les fous rires et les craquages, merci de m'avoir supportée. Travailler avec vous fût un réel plaisir et va beaucoup me manquer ! *Vladimir*, le petit nouveau, merci pour ton soutien également et pour ta bonne humeur, merci d'habiter en Presqu'île ! A *Sandra*, pour son énergie légendaire. La relève est assurée ! A *Florine* qui m'a appris à manipuler avec rigueur et qui a grandement contribué aux débuts du projet. A *Lutfi*, je te souhaite une belle réussite pour la fin. Au *Dr Jean-Claude Bordet*, merci d'avoir toujours pris le temps pour répondre à mes questions qu'elles soient informatiques, phospholipidaires ou plaquettaires ! Merci également à *Anouar*, *Sarah* et *Yohann* pour ces bons moments passés ensemble.

Ce projet aurait été impossible sans le soutien de Groupama Rhône-Alpes Auvergne, de la Société Française d'Hématologie ainsi que la société CSL Behring. Je tiens notamment à remercier *Sandrine Picaud*, *Gabriel Demontfort*, *Sophie Dancygier* et *Hasan Catovic* pour leur aide.

A ma Famille,

A mes parents, *Mamounette* et *Papounet* chéris, qui sont les parents les plus cool du monde, qui m'ont faite telle que je suis : curieuse et équilibrée (enfin presque), qui sont toujours là pour moi, qui m'ont toujours soutenue quels que soient mes choix et qui ont permis ces longues, très longues études. Voilà, je peux difficilement aller plus loin !

A mon (petit) frère, *Doudou*, qui par sa volonté et sa détermination me rend tellement fière et me motive encore et toujours à faire « plus, mieux et plus loin ». Je te souhaite une vie palpitante à parcourir le monde, *let's keep our fingers crossed* !

A mes *grands-parents* qui ont bercé mon enfance des vagues du bassin et qui m'ont inculqué une certaine rigueur, qualité indispensable lors de la réalisation d'une thèse.

A *ma tata* qui me gâte encore et toujours plus que nécessaire.

A ma copine, *Bichette*, merci pour ton amitié, d'être là dans les moments les plus agréables, les plus difficiles, mais aussi les plus simples : le thé, le marché, les sorties sont des petites choses qui sont précieuses à mes yeux.

A mon Amour, *Nico*, le destin ne pouvait pas mieux faire lorsqu'il m'a fait atterrir dans l'appartement à côté du tien. Tu as partagé avec moi toutes les étapes de cette thèse, les hauts comme les bas, et du début à la fin. Merci de m'avoir conseillée dans mes doutes et mes choix durant ces dernières années. Amour, complicité, soutien, force, voyages, fierté, confiance, patience sont les mots qui me viennent quand je pense à toi, à nous... Pour toutes ces raisons, je peux dire que j'ai entièrement confiance en notre avenir.

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES	18
LISTE DES TABLEAUX	19
LISTE DES ABREVIATIONS	20
PARTIE I : INTRODUCTION	23
CHAPITRE I : LA PHYSIOLOGIE DE L'HEMOSTASE	23
<i>1.1- Définition</i>	<i>23</i>
<i>1.2- L'hémostase primaire</i>	<i>24</i>
1.2.1- Les acteurs cellulaires de l'hémostase primaire	24
1.2.1.1- Les cellules endothéliales.....	24
1.2.1.2- Les plaquettes	24
1.2.2- La physiologie de l'hémostase primaire	25
1.2.3- Les pathologies de l'hémostase primaire	27
1.2.3.1- Les troubles plaquettaires	27
1.2.3.2- La maladie de Willebrand	28
<i>1.3- La coagulation</i>	<i>29</i>
1.3.1- La synthèse des facteurs de la coagulation.....	30
1.3.2- La physiologie de la coagulation	31
1.3.2.1- Initiation de la coagulation	32
1.3.2.2- Amplification de la coagulation	32
1.3.2.3- Propagation de la coagulation	33
1.3.2.4- La fibrinof formation	34
1.3.3- Régulation de la coagulation	35
1.3.3.1- L'antithrombine	35
1.3.3.2- La protéine C et la protéine S.....	36
1.3.3.3- Le TFPI (<i>Tissue Factor Pathway Inhibitor</i>)	36
1.3.3.4- L'inhibiteur dépendant de la protéine Z (ZPI)	37
1.3.4- Les pathologies de la coagulation	37
1.3.4.1- Les troubles hémorragiques	37
1.3.4.2- Les troubles thrombotiques.....	38
<i>1.4- La fibrinolyse</i>	<i>38</i>
1.4.1- La physiologie de la fibrinolyse	39
1.4.2- Les pathologies de la fibrinolyse.....	40
CHAPITRE II : L'HEMOPHILIE	41
<i>II.1- Définitions de l'hémophilie</i>	<i>41</i>
1.1.1- Généralités.....	41
1.1.2- Génétique	41
1.1.3- Sévérité de la maladie.....	42

II.2- Diagnostic.....	42
II.3- Manifestations cliniques	43
II.4- Complications de l'hémophilie	43
II.4.1- Complications ostéoarticulaires	43
II.4.2- Complication immunologique.....	43
II.4.3- Complications infectieuses	44
II.5- Le traitement de l'hémophilie B	45
II.5.1- Traitement des patients hémophiles B sans inhibiteurs.....	45
II.5.1.1- Concentrés de FIX : plasmatiques / recombinants.....	45
II.5.1.2- Traitement à la demande et prophylaxie.....	47
II.5.2- Traitement des patients hémophiles B présentant des inhibiteurs.....	47
CHAPITRE III : LE FACTEUR IX DE LA COAGULATION	49
III.1- Le gène du facteur IX (F9).....	49
III.1.1- Localisation sur le chromosome X et structure du gène F9	49
III.1.2- Régulation de la séquence promotrice du gène F9	50
III.2- Le facteur IX (FIX)	52
III.2.1- Sécrétion du FIX par les hépatocytes.....	52
III.2.1.1- Synthèse dans le réticulum endoplasmique rugueux et premières modifications	53
III.2.1.2- Transfert et maturation dans l'appareil de Golgi.....	54
III.2.1.3- Sécrétion.....	54
III.2.2- Structure du zymogène circulant.....	55
III.3- Le rôle du FIX dans la coagulation et ses interactions.....	56
III.3.1- Récepteurs au FIX	57
III.3.1.1- Liaison FIX et plaquettes	57
III.3.1.2- Liaison FIX et cellules endothéliales.....	57
III.3.1.3- Liaison FIX et LRP (<i>Lipoprotein receptor-related protein</i>)	57
III.3.2- Activation du FIX.....	58
III.3.2.1- Activation du FIX par le complexe <i>tenase</i> extrinsèque	59
III.3.2.2- Activation du FIX par le FXIa	60
III.3.3- Formation du complexe <i>tenase</i> intrinsèque	61
III.3.4- Activation du FX.....	65
CHAPITRE IV : AMELIORATIONS RECENTES APPORTEES AU TRAITEMENT DE L'HEMOPHILIE B ET PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES ..	67
IV.1- Améliorations récentes concernant l'allongement de la demi-vie du facteur IX.....	68
IV.1.1- La PEGylation.....	68
IV.1.1.1- Principe de la PEGylation	68
IV.1.1.2- Le rFIX PEGylé	69
IV.1.1.3- Les liposomes PEGylés.....	70
IV.1.2- Protéines de fusion.....	70
IV.1.2.1- La protéine de fusion rFIX-Fc	72
IV.1.2.2- La protéine de fusion rFIX-FP.....	73
IV.1.2.3- La protéine de fusion rFIX-CTP.....	75

IV.2- Perspectives thérapeutiques	76
IV.2.1- Amélioration de la sécrétion du facteur IX	76
IV.2.2- Amélioration de l'activité coagulante du traitement.	77
IV.2.2.1- Augmentation de l'activité spécifique du rFIX	77
IV.2.2.2- Agents ciblant les inhibiteurs de la coagulation	81
IV.2.2.2.1- Inhibition du TFPI	81
IV.2.2.2.2- Inhibition de la PCa et de l'AT par des ARN interférents	81
IV.2.3- Thérapie génique.....	82
CHAPITRE V : LE FACTEUR XIII DE LA COAGULATION (FXIII)	85
V.1- Les gènes du facteur XIII (F13A1 et F13B)	85
V.2- Le facteur XIII : structure et fonction.....	86
V.2.1- Structures du FXIII-A et du FXIII-B.....	86
V.2.2- Le FXIII plasmatique.....	87
V.2.3- Activation du FXIII plasmatique	87
V.2.4- Fonctions dans la coagulation	88
V.2.5- La sous-unité FXIII-B	88
PARTIE II : OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	89
PARTIE III : MATERIEL ET METHODES	91
CHAPITRE I : BIOLOGIE MOLECULAIRE	91
I.1- Obtention des pcDNA-FIX-E410.....	91
I.1.1- Expériences de mutagenèse dirigée	91
I.1.2- Contrôle des minipréparations des plasmides mutés.....	93
I.1.3- Clonage de l'ADNc des FIX-E410	93
I.1.3.1- Digestion enzymatique	94
I.1.3.2- Migration sur gel d'agarose et extraction de l'ADNc des FIX-E410.....	94
I.1.3.3- Ligation de l'insert dans le pcDNA d'origine	94
I.1.3.4- Transformation bactérienne	94
I.1.4- Amplification des pcDNA-FIX-E410 (maxipréparations)	94
I.2- Obtention des pcDNA-FIX-FXIIIB.....	95
I.2.1- Synthèse commerciale de l'ADNc de FIX-FIIa-FXIIIB	95
I.2.2- Obtention du pcDNA FIX-FIIa-FXIIIBØPS	96
I.2.3- Obtention du plasmide pcDNA FIX-FXa-FXIIIBØPS.....	97
I.2.3.1- Synthèse du <i>linker</i> clivable par le FXa	97
I.2.3.2- Etapes de sous-clonages	97
CHAPITRE II : CULTURE CELLULAIRE	98
II.1- Lignée cellulaire Huh-7 et entretien de la lignée	98
II.2- Transfections transitoires.....	99
II.3- Sélection de clones cellulaires stables	99
II.4- Production en roller-bottles.....	100
CHAPITRE III : ETAPES DE PURIFICATIONS.....	101

III.1- Chromatographie sur colonne échangeuse d'ions	101
III.2- Chromatographie sur colonne héparine.....	101
CHAPITRE IV : DOSAGE ET VISUALISATION DU FIX	102
IV.1- Dosage du FIX par test ELISA.....	102
IV.2- Visualisation du FIX.....	102
IV.2.1- Composition des gels et des tampons	102
IV.2.2- Migration du FIX par électrophorèse SDS PAGE	103
IV.2.3- Transfert liquide sur membrane de nitrocellulose	103
IV.2.4- Visualisation du FIX par western blot	103
CHAPITRE V : TESTS FONCTIONNELS	104
V.1- Evaluation de l'activité.....	104
V.1.1- Mesure de l'activité par méthode chronométrique	104
V.1.2- Mesure de l'activité par méthode chromogénique	105
V.2- Détermination de la capacité de génération de thrombine	105
V.3- Activation du FIX	105
V.4- Titration du FIXa par l'antithrombine	106
V.5- Générations de FXa par FIXa – Détermination des paramètres cinétiques in vitro.....	106
V.5.1- Génération de FXa en absence de FVIIIa	106
V.5.2- Génération de FXa en présence de FVIIIa.....	107
V.5.2.1- Concentrations variables en FX	107
V.5.2.2- Concentrations variables en FIXa.....	107
V.6- Clivage de la protéine de fusion FIX-FXIIIBØPS.....	107
CHAPITRE VI : TESTS IN VIVO	108
VI.1- Lignées murines.....	108
VI.2- Préparation des échantillons avant injection.....	108
VI.3- Protocole d'expérimentation in vivo	108
VI.4- Traitement des échantillons.....	108
CHAPITRE VII : ETUDE DES INTERACTIONS DU FIX	109
VII.1- Interaction FIX/A2(FVIII) par SPR	109
VII.2- Interaction FIX/plaquettes ex vivo	109
VII.3- Interaction FIX/cellules endothéliales	110
CHAPITRE VIII : ANALYSES DES DONNEES.....	110
PARTIE IV : RESULTATS ET DISCUSSION	111
CHAPITRE I : EXPRESSION ET CARACTERISATION DU FIX RECOMBINANT SYNTHETISE PAR LA LIGNEE CELLULAIRE D'HEPATOCARCINOME HUMAIN HUH-7.....	111
CHAPITRE II : AMELIORATION IN VITRO ET IN VIVO DE L'ACTIVITE COAGULANTE DU FACTEUR IX HUMAIN RECOMBINANT. CARACTERISATION DES MUTANTS FIX-E410.	135
II.1- Production des molécules de FIX par la lignée cellulaire Huh-7	135

<i>II.2- Amélioration in vitro de l'efficacité du FIX</i>	137
<i>II.3- Amélioration in vivo de l'efficacité du FIX</i>	137
<i>II.4- Etude de la concentration du FIX-E410H dans le plasma murin</i>	139
<i>II.5- Caractérisation biochimique des FIX mutants. Explication de l'augmentation d'activité observée.</i> ...	141
II.5.1- Etude de l'activation des FIX-E410.....	141
II.5.2- Détermination des paramètres cinétiques	143
II.5.3- Etude de l'affinité FIXa/FVIIIa par résonance des plasmons de surface (SPR)	145
<i>II.6- Conclusion et perspectives</i>	145
CHAPITRE III : AMELIORATION DE LA DEMI-VIE ET DE L'EFFICACITE DU FACTEUR IX RECOMBINANT. TRAVAUX PRELIMINAIRES DE CARACTERISATION DE LA PROTEINE DE FUSION FIX-FXIIIB.	173
<i>III.1- Production des molécules de FIX par la lignée cellulaire Huh-7</i>	173
<i>III.2- Caractérisation in vitro du FIX-FXa-FXIIIBØPS</i>	175
III.2.1- Fonctionnalité du linker clivable par le FXa	175
III.2.2- Amélioration de l'activité spécifique	175
III.2.3- Etude de l'activation du FIX-FXa-FXIIIBØPS.....	177
<i>III.3- Détermination des paramètres pharmacocinétiques in vivo</i>	178
<i>III.4- Conclusion et perspectives</i>	180
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	183

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Acteurs impliqués lors de l'hémostase primaire.....	24
Figure 2. Représentation schématique d'une plaquette et de ses principaux constituants.....	25
Figure 3. Schéma global de la coagulation.....	29
Figure 4. γ -carboxylation des acides glutamiques des facteurs de la coagulation vitamine-K dépendants	31
Figure 5. Schématisation des phases d'initiation, d'amplification et de propagation de la coagulation.....	33
Figure 6. Schéma du processus de fibrinof ormation	34
Figure 7. Schéma de la régulation de la coagulation	35
Figure 8. Schéma du processus de fibrinolyse	40
Figure 9. Le gène F9 : localisation dans le chromosome X, structure et régulation de la séquence promotrice..	49
Figure 10. Structure primaire du FIX	51
Figure 11. Modifications post-traductionnelles dans la voie de sécrétion du FIX	52
Figure 12. Activation du FIX en FIXa.....	59
Figure 13. Structure du FVIIIa après clivage par la thrombine.....	62
Figure 14. Evolution de la représentation des interactions FIXa/FVIIIa.....	62
Figure 15. Représentation schématique de la formation du complexe <i>tenase</i> intrinsèque.....	66
Figure 16. Profils des activités plasmatiques lors des essais cliniques de phase I du rFIX PEGylé (N9-GP)	70
Figure 17. Représentation du mécanisme de recyclage pH-dépendant de l'albumine et de l'IgG.....	71
Figure 18. Représentation de la protéine de fusion rFIX-Fc.....	73
Figure 19. Concept de la protéine de fusion rFIX-FP.....	74
Figure 20. Taux d'activité observés après traitement des patients par la protéine de fusion rFIX-FP	75
Figure 21. Efficacité comparée des FIX-R338L, FIX-Triple, FIX-TripleL et FIX <i>wild-type</i>	79
Figure 22. Suivi de l'activité spécifique des FIX R338L, FIX-Triple, FIX-TripleL et FIX <i>wild-type</i>	80
Figure 23. Localisation et structure du gène F13A1 codant pour la sous-unité A du FXIII.....	85
Figure 24. Localisation et structure du gène F13B codant pour la sous-unité B du FXIII.....	86
Figure 25. Schéma de la structure primaire du FXIII-B.....	87
Figure 26. Modèle proposé pour l'homodimère FXIII-B ₂	88
Figure 27. Constructions plasmidiques utilisées	91
Figure 28. Etapes du clonage de l'ADNc des FIX-E410	93
Figure 29. Carte plasmidique du pcDNA FIX-FIIa-FXIIIB	95
Figure 30. Séquence des 1100 premières paires de bases du FXIII-B	96
Figure 31. Plan de clonage pour l'obtention du pcDNA FIX-FXa-FXIIIBØPS	98
Figure 32. Profils de migration des deux marqueurs de taille utilisés	103
Figure 33. Sécrétion des molécules de FIX par les cellules Huh-7.....	136
Figure 34. Alignement des séquences des régions carboxy-terminales des protéines FIX, FVII, PC et FX.....	137
Figure 35. Comparaison des activités coagulante (UI/dl) et spécifique (UI/mg)	138

Figure 36. Molécules de FIX présentes dans le plasma 2 min après injection	139
Figure 37. Liaison du FIX aux plaquettes murines et humaines.....	141
Figure 38. Cinétique d'activation du FIX-WT et du FIX-E410H par le complexe FVIIa-FT.....	142
Figure 39. Pleine activation du FIX-WT et des mutants FIX-E410	142
Figure 40. Titration des sites actifs des FIXa en présence d'AT	143
Figure 41. Activations du FX par FIXa-WT et FIXa-E410. Détermination des constantes cinétiques	144
Figure 42. Association des FIXa avec le domaine A2 isolé du FVIIIa	145
Figure 43. Taux de FIX-WT et des chimères sécrétés par les cellules Huh-7.....	174
Figure 44. Sécrétion du FIX-WT et des chimères par les cellules Huh-7 après transfection transitoire	174
Figure 45. Etude du clivage du FIX-FXa-FXIII $\text{B}\emptyset$ PS en fonction de la concentration en FXa	175
Figure 46. Comparaison des techniques de dosage du FIX-FXa-FXIII $\text{B}\emptyset$ PS	177
Figure 47. Etude de l'activation du FIX-FXa-FXIII $\text{B}\emptyset$ PS par le complexe FVIIa-FT.....	178
Figure 48. Etude pharmacocinétique des taux de molécules de FIX dans le plasma murin	179

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Principales caractéristiques et fonctions des facteurs de la coagulation.....	30
Tableau 2. Paramètres pharmacocinétiques du rFIX et du pdFIX.....	46
Tableau 3. Localisation et taille des exons et des introns au sein du gène du FIX humain.....	49
Tableau 4. Les différentes caractéristiques des rFIX-FP en fonction du linker et du type cellulaire	75
Tableau 5. Paramètres cinétiques in vitro des différents FIX lors de l'étude du FIX-Triple et du FIX-TripleL	79
Tableau 6. Amorces utilisées lors de l'expérience de mutagenèse	92
Tableau 7. Paramètres expérimentaux de l'étape de PCR lors de l'expérience de mutagenèse dirigée.....	92
Tableau 8. Séquence des oligonucléotides utilisés lors de la synthèse du linker clivable par le FXa	97
Tableau 9. Composition des gels utilisés lors de l'électrophorèse SDS PAGE.....	102
Tableau 10. Anticorps primaires et secondaires utilisés lors de la visualisation des différents FIX et FIX-FXIII B	104
Tableau 11. Etude de l'activité spécifique du FIX-WT et du FIX-FXa-FXIII $\text{B}\emptyset$ PS	176
Tableau 12. Demi-vies du FIX-WT et du FIX-FXa-FXIII $\text{B}\emptyset$ PS.....	179
Tableau 13. Comparaison des améliorations de demi-vies observées pour les FIX fusionnés	180

LISTE DES ABREVIATIONS

AAV :	<i>Adeno Associated Virus</i>			
ACD :	<i>Acid-citrate-dextrose</i>			
ADNc :	Acide Désoxyribonucléique complémentaire			
ADP :	Adénosine Diphosphate			
AMM :	Autorisation de Mise sur le Marché			
ANSM :	Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé			
AR :	<i>Androgen Receptor</i>			
ARN :	Acide Ribonucléique			
ARNi :	ARN interférant			
ARNm :	ARN messenger			
AT :	Antithrombine			
ATP :	Adénosine Triphosphate			
BGH :	<i>Bovine Growth Hormone</i>			
BIX :	Benefix®			
BSA :	<i>Bovine Serum Albumine</i>			
C/EBP α :	<i>CCAAT/Enhancer – Binding Protein</i>			
CHEF-1 :	<i>Chinese Hamster Elongation Factor 1</i>			
CHO :	<i>Chinese Hamster Ovary</i>			
CIVD :	Coagulation Intravasculaire Disséminée			
CMV :	Cytomégalovirus			
CTP :	Peptide C-Terminal			
DICS :	Déficit Immunitaire Combiné Sévère			
DMEM :	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>			
DMSO :	Diméthylsulfoxyde			
E.coli :	<i>Escherichia coli</i>			
EGF :	<i>Epidermal Growth Factor</i>			
EMA :	<i>European Medicines Agency</i>			
EPCR :	<i>Endothelial Protein C Receptor</i>			
FcRn :	<i>neonatal Fc Receptor</i>			
FIX :	Facteur IX	-	FIXa :	Facteur IX activé
FIX-FXIIIB \emptyset PS :	Proteine de fusion entre le FIX et le FXIIIB dépourvu de peptide signal			
FT :	Facteur Tissulaire			
FV :	Facteur V	-	FVa :	Facteur V activé
FVII :	Facteur VII	-	FVIIa :	Facteur VII activé
FVIII :	Facteur VIII	-	FVIIIa :	Facteur VIII activé
FX :	Facteur X	-	FXa :	Facteur X activé
FXI :	Facteur XI	-	FXIa :	Facteur XI activé
FXII :	Facteur XII	-	FXIIa :	Facteur XII activé
FXIII :	Facteur XIII	-	FXIIIa :	Facteur XIII activé
FXIII-A :	sous-unité A du FXIII			
FXIII-B :	sous-unité B du FXIII			
G-CK :	Caséine Kinase Golgienne			
GP :	Glycoprotéine			
hGH :	<i>human Growth Hormone</i>			
HNF :	<i>Hepatocyte Nuclear Factor</i>			
I1 :	Intron 1			
IgG :	Immunoglobuline G			

ISTH :	<i>International Society on Thrombosis and Haemostasis</i>
ITI :	Induction de Tolérance Immune
IV :	Intraveineuse
kcat :	Constante catalytique
Kd :	Constante de dissociation
kDa :	kilo Dalton
KHPM :	Kininogène de Haut Poids Moléculaire
Km :	Constante de Michaelis-Menten
KO :	<i>Knock-Out</i>
LB :	<i>Lysogeny Broth</i>
LRP :	<i>Lipoprotein receptor-related protein</i>
MIX :	Mononine®
PA :	Peptide d'Activation
PACE :	<i>Paired basic Amino acid Cleaving Enzyme</i>
PAI-1 :	<i>Plasminogen Activator Inhibitor 1</i>
PC:PS :	Phosphatidylcholine : Phosphatidylsérine
PCa :	Protéine C activée
PCR :	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDF :	Produit de Dégradation de Fibrine
pdFIX :	Facteur IX plasmatique
PEG :	Polyéthylène Glycol
PIVKA :	<i>Protein Induced by Vitamine K Absence or Antagonist</i>
PK :	Prékallitréine
PPP :	Plasma Pauvre en Plaquettes
PRP :	Plasma Riche en Plaquettes
RCL :	<i>Reactive Center Loop</i>
RER :	Réticulum Endoplasmique Rugueux
rFIX :	Facteur IX recombinant
rFVIII :	Facteur VIII recombinant
rpm :	rotation par minute
SDS :	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SPR :	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
SV40 :	<i>Simian virus 40</i>
SVF :	Sérum de Veau Foetal
TAFI :	<i>Thrombin Activable Fibrinolysis Inhibitor</i>
TBS :	<i>Tris Buffer Saline</i>
TCA :	Temps de Céphaline avec Activateur
TFPI :	<i>Tissue Factor Pathway Inhibitor</i>
t-PA :	<i>tissue Plasminogen Activator</i>
TPO :	Thrombopoïétine
u-PA :	<i>urokinase Plasminogen Activator</i>
UB :	Unité Biologique
UI :	Unité Internationale
VIH :	Virus de l'Immunodéficience Humaine
Vit K :	Vitamine K
vWF :	Facteur von Willebrand
ZPI :	<i>protein Z-related Protease Inhibitor</i>
α2AP :	Alpha 2 Antiplasmine
β-hCG :	<i>Beta subunit of human Chorionic Gonadotropin</i>

Partie I : INTRODUCTION

Chapitre I : La physiologie de l'hémostase

I.1- Définition

L'hémostase se définit par un ensemble de processus physiologiques qui permet de maintenir l'intégrité des vaisseaux sanguins. Ces mécanismes sont sollicités lors de l'apparition d'une brèche vasculaire et conduisent à la formation d'un caillot sanguin composé de plaquettes et de fibrine qui maintient les cellules sanguines dans son maillage. Bien qu'elles soient initiées simultanément, on distingue classiquement trois étapes :

- ✓ L'hémostase primaire qui ralentit le flux sanguin par vasoconstriction et met en jeu les plaquettes et le sous-endothélium afin de colmater la brèche vasculaire par la formation d'un « clou plaquettaire ».
- ✓ La coagulation qui consolide le thrombus plaquettaire en constituant un réseau de fibrine insoluble, formant ainsi un caillot sanguin.
- ✓ La fibrinolyse qui dégrade ultérieurement le caillot au fur et à mesure que la paroi vasculaire se réimperméabilise.

I.2- L'hémostase primaire

L'hémostase primaire comporte un composant cellulaire (les cellules endothéliales et les plaquettes) et des protéines plasmatiques dont les deux principales sont le facteur von Willebrand (vWF) et le fibrinogène.

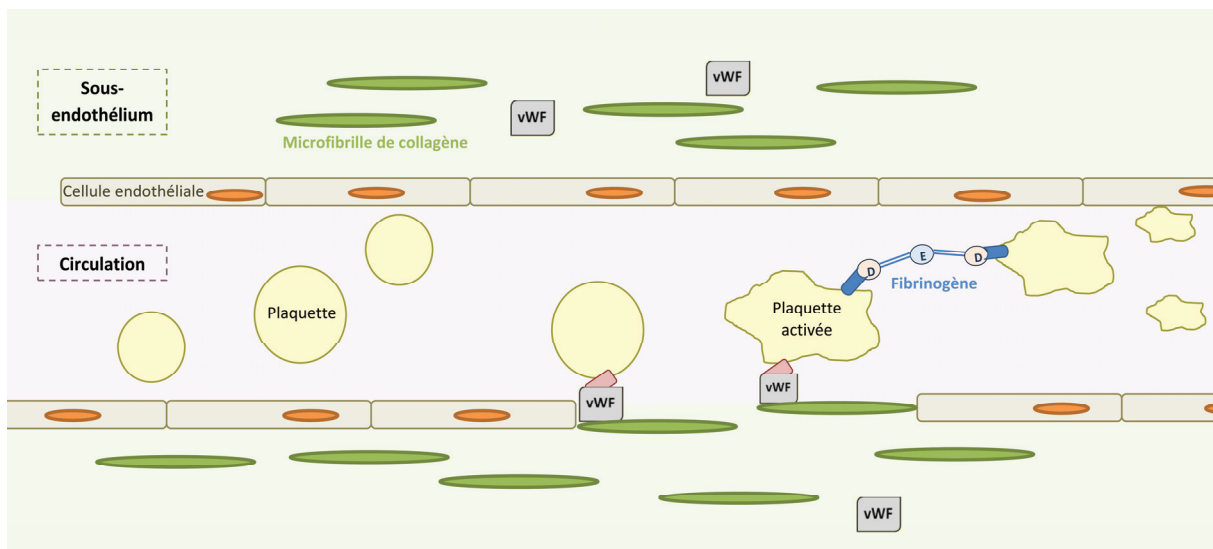


Figure 1. Acteurs impliqués lors de l'hémostase primaire. Lors d'une brèche vasculaire, le facteur von Willebrand (vWF) se lie au collagène du sous-endothélium et aux plaquettes, contribuant ou participant indirectement à l'activation plaquettaire. Les plaquettes activées s'agrègent entre elles via l'interaction entre la GP IIb-IIIa plaquettaire et le fibrinogène.

1.2.1- Les acteurs cellulaires de l'hémostase primaire

1.2.1.1- Les cellules endothéliales

L'endothélium vasculaire est constitué d'une monocouche de cellules endothéliales qui est la couche la plus interne des vaisseaux sanguins et directement au contact du sang (Figure 1). Les cellules endothéliales sont des cellules polarisées : leur face apicale est orientée vers la lumière du vaisseau alors que leur face basale est associée à la lame basale constituée de microfibrilles et de collagène fortement thrombogène. Ainsi, les cellules endothéliales forment une monocouche de cellules continues s'interposant entre le sang et le sous-endothélium procoagulant et ayant une fonction antithrombotique à l'état basal. Lors de lésions de la paroi du vaisseau, les cellules endothéliales acquièrent, à l'inverse, une fonction prothrombotique en servant de support à certaines réactions de la coagulation et en synthétisant des protéines telles que le vWF ou le facteur tissulaire (FT).

1.2.1.2- Les plaquettes

Les plaquettes jouent un rôle majeur dans la physiologie de l'hémostase, que ce soit lors de l'hémostase primaire ou lors de la coagulation. Elles représentent les plus petits éléments figurés du sang et sont des fragments cellulaires anucléés provenant des mégacaryocytes. Elles ont une demi-vie d'environ 8 à 10 jours qui se raccourcit considérablement lors de leur activation.

A l'état basal, les plaquettes ont une forme discoïde et portent à leur surface des glycoprotéines (GP) de membranes telles que la GP Ib-IX-V et la GP IIb-IIIa, et d'autres récepteurs comme les récepteurs à la thrombine. A l'intérieur des plaquettes, on observe trois types de granulations : les granules denses qui contiennent de l'ATP, de l'ADP, de la sérotonine et du calcium ; les granules α qui contiennent entre autres le vWF, le fibrinogène et le facteur V (FV) ; et enfin les lysosomes qui renferment des hydrolases et des phosphatases. La structure simplifiée des plaquettes est schématisée dans la Figure 2. Lors de l'activation des plaquettes, celles-ci émettent des pseudopodes et subissent un réarrangement intracellulaire. Il y a alors augmentation de la concentration intracytoplasmique du calcium, sécrétion du contenu des granules denses et α , et activation des GP membranaires.

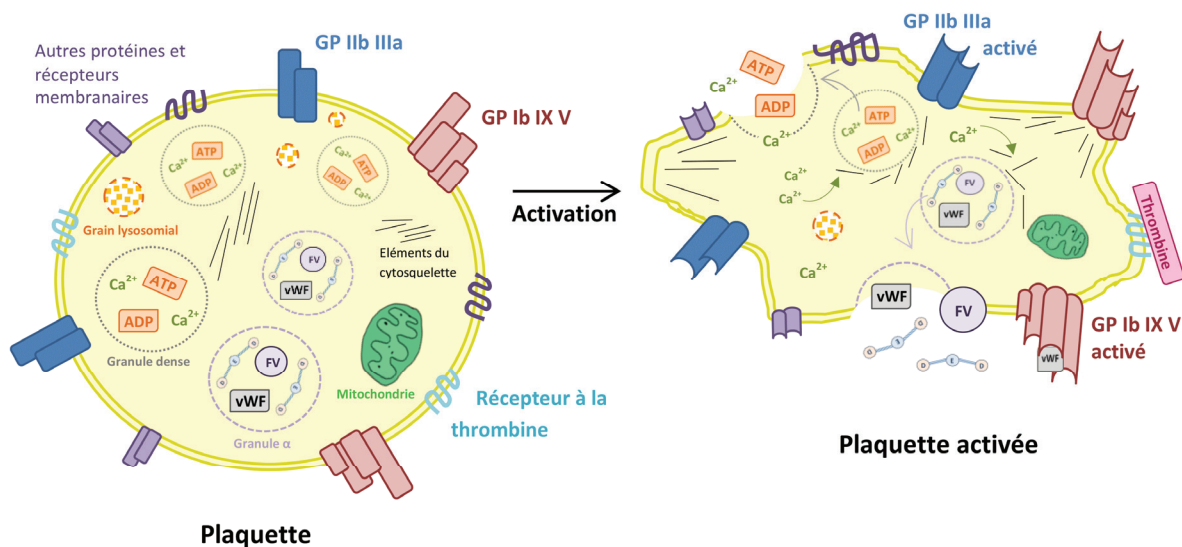


Figure 2. Représentation schématique d'une plaquette et de ses principaux constituants avant ou après activation plaquettaire.

1.2.2- La physiologie de l'hémostase primaire

Dès que la paroi vasculaire est endommagée, l'hémostase primaire entre rapidement en action selon quatre mécanismes successifs :

- Le temps vasculaire : il correspond à une vasoconstriction localisée qui permet de limiter l'hémorragie en diminuant le débit sanguin. Ce phénomène a pour conséquence de faire évoluer les conditions hémodynamiques du flux sanguin, notamment en favorisant les échanges cellulaires et moléculaires.
- L'adhésion des plaquettes : les plaquettes sont les actrices principales de l'hémostase primaire. Elles circulent à l'état non activé. Elles portent à leur surface plusieurs sites de liaison dont les GP Ib-IX-V et GP IIb-IIIa. Les plaquettes adhèrent au sous-endothélium qui devient accessible suite à la brèche formée à travers la couche de cellules endothéliales.

Cette adhésion est rendue possible par le vWF qui, lorsqu'il passe du flux sanguin à la matrice sous-endothéliale, va se lier au collagène de type I et III qui s'y trouve. Cette liaison induit un changement de conformation du vWF qui peut alors se fixer à la surface des plaquettes par l'intermédiaire du récepteur GP Ib présent au sein du complexe glycoprotéique Ib-IX-V. Les plaquettes peuvent également se lier directement au collagène via d'autres récepteurs tels que la glycoprotéine GP VI ou l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ [1,2]. Ces liaisons stables vont déclencher la transduction de signaux intracellulaires qui vont activer les plaquettes.

- L'activation plaquettaire : les signaux intracellulaires comprennent notamment l'activation de tyrosine kinases et induisent la mobilisation du calcium permettant la phosphorylation des protéines contractiles. La contraction plaquettaire est indispensable au regroupement interne des granules α et denses (δ) et à la dégranulation grâce à la fusion de leur membrane avec celle du système canaliculaire ouvert. Les différents types protéiques alors déversés dans le plasma par les granules α sont nombreux [3] soit environ 280 types contenant des protéines participant à l'agrégation plaquettaire (comme le fibrinogène), à l'activation de la coagulation (comme le facteur V) ou encore des facteurs de croissance. Les granules denses libèrent quant à elles de l'ADP, qui est un puissant pro-agrégant en participant à l'amplification de l'activation plaquettaire, ainsi que de la sérotonine qui a également une action pro-agrégante plaquettaire et vasoconstrictrice.

L'activation des plaquettes entraîne l'expression de la P-sélectine et le phénomène *inside-out* permet le changement de conformation de la GP IIb-IIIa sous forme active. La GP IIb-IIIa pourra lier le fibrinogène soluble.

Les phospholipides membranaires libèrent de l'acide arachidonique qui va être métabolisé en thromboxane A2 par la voie des prostaglandines et ce, grâce à l'intervention du collagène, de l'ADP (libérée par les granules denses) et de la thrombine (générée à la fin de la cascade de coagulation qui se déroule au niveau des membranes plaquettaires). Cette voie est essentielle dans l'activation plaquettaire car elle permet un phénomène d'amplification. Le thromboxane A2, qui est un puissant pro-agrégant et vasoconstricteur [4], possède, tout comme l'ADP et la thrombine, des récepteurs spécifiques à la surface des plaquettes. La libération de l'ADP et du thromboxane A2 dans le plasma a donc pour effet de recruter de nouvelles plaquettes et d'amplifier le phénomène d'activation plaquettaire.

- L'agrégation plaquettaire : l'activation du récepteur GP IIb-IIIa lui permet de fixer ses ligands qui sont le vWF et le fibrinogène entraînant ainsi la liaison des plaquettes entre elles et leur agrégation.

Enfin, lors de l'activation plaquettaire, les phospholipides de surface des plaquettes subissent des remaniements et l'augmentation des niveaux de Ca^{2+} au sein du cytosol déclenche l'exposition des phosphatidylsérines procoagulantes chargées négativement à la surface des plaquettes. Cette surface d'amarrage procoagulante est essentielle afin que les facteurs de la coagulation puissent s'y fixer via leur domaine Gla afin de former les complexes enzymatiques procoagulants comme les complexes *tenase* et prothrombinase [5].

1.2.3- Les pathologies de l'hémostase primaire

Les pathologies plaquettaires et la maladie de Willebrand sont les troubles hémorragiques fréquents et renvoient à des dysfonctionnements de l'hémostase primaire. Les pathologies de l'hémostase primaire sont responsables de saignements de type cutanéomuqueux.

1.2.3.1- Les troubles plaquettaires

On distingue deux types de troubles plaquettaires, les thrombopénies caractérisées par une anomalie quantitative et qui sont les plus fréquentes, et les thrombopathies dues à une anomalie fonctionnelle des plaquettes. Les manifestations cliniques sont généralement des saignements cutanés et/ou des muqueuses qui surviennent rapidement. La gravité de ces saignements et leur cause restent très hétérogènes [6]. De nets progrès ont été réalisés quant au diagnostic des troubles plaquettaires sévères ou rares notamment grâce à l'identification de mutations responsables de maladies spécifiques. Cependant, les processus conduisant à des déficits modérés ou faibles en plaquettes sont encore mal connus [7].

Les thrombopénies peuvent être acquises (dus à la prise d'un médicament, par consommation ou à la survenue d'allo ou d'auto-anticorps antiplaquettaires) ou constitutionnelles. Sur le plan physiopathologique, elles peuvent résulter d'un défaut du pouvoir sécréteur des plaquettes, d'une anomalie de répartition ou le plus souvent de pertes périphériques. Ces pertes périphériques font suite à un fort taux de destruction des plaquettes par mécanisme immunologique ou à une forte consommation de plaquettes activées.

Les thrombopathies sont des pathologies beaucoup plus rares qui résultent d'un défaut fonctionnel des plaquettes. Certaines thrombopathies peuvent être associées à une thrombopénie, d'où la difficulté d'établir une classification claire des troubles plaquettaires. C'est le cas du syndrome de Bernard-Soulier qui est due à un dysfonctionnement de la glycoprotéine GP Ib-V-IX, récepteur plaquettaire du vWF, essentielle dans le processus d'adhésion des plaquettes au sous-endothélium [8]. Ce défaut de fonction est associé à une thrombopénie caractérisée par des plaquettes de taille plus importante. Le syndrome de Bernard-Soulier est une pathologie héréditaire très rare [9] comme

le déficit en GP IIb-IIIa responsable de la thrombasthénie de Glanzmann. Ces deux pathologies plaquettaires constitutionnelles représentent un haut risque hémorragique clinique.

I.2.3.2- La maladie de Willebrand

La maladie de Willebrand est la plus fréquente des troubles hémorragiques constitutionnels avec une prévalence de 1% de la population mondiale [10]. Elle est caractérisée par une anomalie qualitative ou quantitative du vWF, facteur indispensable à l'adhésion et à l'agrégation plaquettaire. La classification internationale de l'ISTH (*International Society on Thrombosis and Haemostasis*) actuellement utilisée définit trois types de maladie de Willebrand [11]. Cette classification catégorise les déficits quantitatifs partiels (type 1) ou complets (type 3), et les déficits qualitatifs du vWF (type 2) mais elle prend également en considération les différents phénotypes observés. Les déficits qualitatifs du vWF sont classés en quatre groupes distincts. Le sous-type 2A définit un défaut d'interaction vWF-plaquettes causé par la diminution des vWF de haut poids moléculaire. Le Willebrand de type 2B résulte à l'inverse d'une hyperaffinité du vWF aux plaquettes. Un défaut de liaison du vWF aux plaquettes ou au collagène qui n'implique pas les molécules de haut poids moléculaire est responsable du type 2M. Enfin, le type 2N résulte d'un défaut de liaison du vWF au facteur VIII de la coagulation (FVIII) [12], interaction nécessaire dans le rôle protecteur du vWF pour le FVIII dans la circulation.

Il existe également des déficits acquis en vWF, mais cette pathologie est beaucoup plus rare [9,13]. Ce déficit est souvent une complication rare d'hémopathies (myélome, maladie de Waldenström), de maladies auto-immunes ou néoplasiques [14].

I.3- La coagulation

Le thrombus plaquettaire constitué lors de l'hémostase primaire est fragile et doit être consolidé par le caillot de fibrine généré par la coagulation et retenant les éléments figurés du sang constitue le caillot sanguin. L'ensemble des étapes de la coagulation est simplifié dans la Figure 3. Tout comme l'hémostase primaire, le système de coagulation comprend des éléments cellulaires et plasmatiques. Les cellules du sous-endothélium qui permettent le déclenchement de la coagulation en exprimant le FT sont les fibroblastes. Cependant, les cellules endothéliales et les monocytes peuvent eux aussi exprimer le FT par stimulation physico-chimique ou sous l'effet de certaines cytokines. Les plaquettes activées exposent, quant à elle, une surface phospholipidique anionique indispensable aux réactions enzymatiques de la coagulation. Ces réactions consistent en des activations successives des différents facteurs de la coagulation. L'ensemble de ces facteurs ainsi que leurs caractéristiques sont listés dans le Tableau 1.

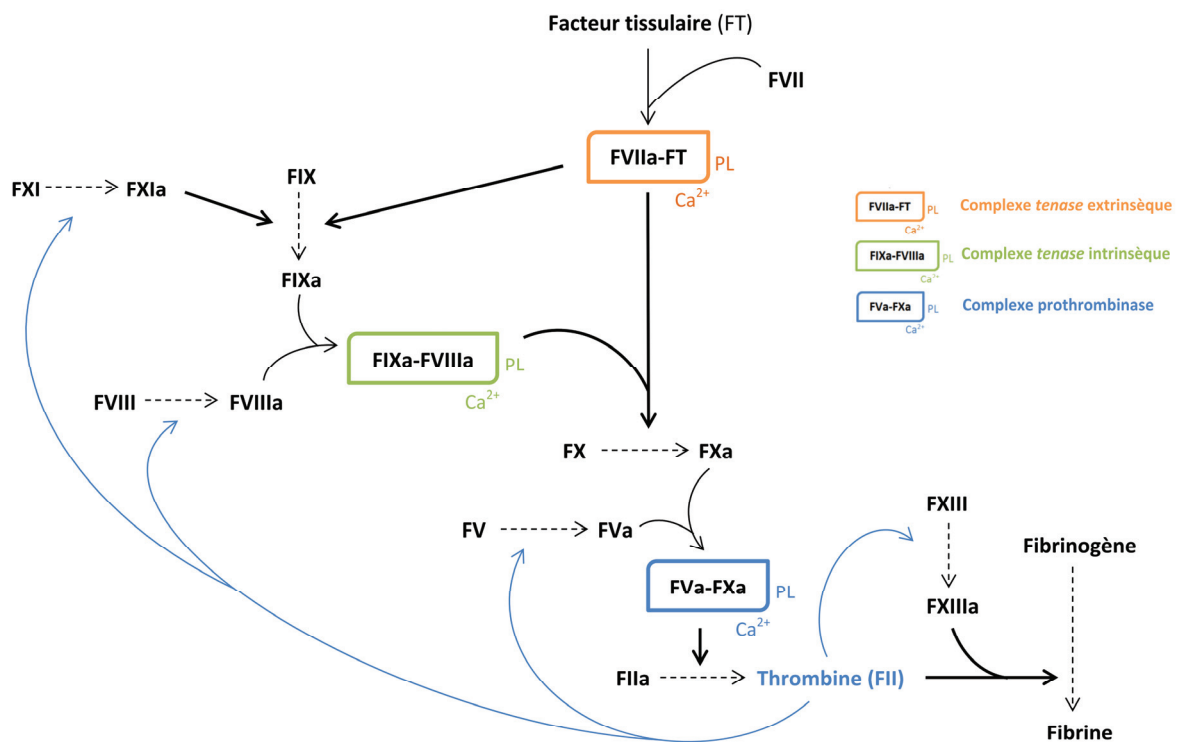


Figure 3. Schéma global de la coagulation.

Facteur	Fonction après activation	Synthèse	Demi-vie	Concentration plasmatique (µg/ml)	Poids moléculaire (kDa)
Fibrinogène	Formation du caillot Fibrinoformation		4-6 jours	3000	330
Prothrombine (II)	Activation V, VIII, XI, XIII, protéine C, plaquettes	Vitamine K (Vit K) dépendante	3-4 jours	90	72
Facteur V	Cofacteur Xa		12-36 h	10	330
Facteur VII	Activation IX, X	Vit K dépendante	4-6 h	0.5	50
Facteur VIII	Cofacteur IXa		10-16 h	0.1	330
Facteur IX	Activation X	Vit K dépendante	24 h	5	56
Facteur X	Activation II	Vit K dépendante	1-2 jours	8	59
Facteur XI	Activation IX		1-2 jours	5	160
Facteur XIII	Fibrinoformation		3-6 jours	10	320
Facteur XII (PK, KHPM)	Activation contacte		2-3 jours	30	80

Tableau 1. Principales caractéristiques et fonctions des facteurs de la coagulation. (PK : prékallicroïne. KHPM : kininogène de haut poids moléculaire.)

1.3.1- La synthèse des facteurs de la coagulation

Les facteurs de coagulation (le fibrinogène, les facteurs II, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII et les facteurs de la phase contact) sont essentiellement synthétisés par les hépatocytes (cellules du foie) sous forme de pro-enzymes. Les facteurs II, VII, IX et X possèdent des domaines Gla riches en résidus γ -carboxylés, ces résidus sont indispensables à la fixation de ces facteurs à la surface des plaquettes activées. En effet, la carboxylation des acides glutamiques en acides γ -carboxyglutamiques permet à ces résidus de se lier aux phosphatidylsérines des membranes plaquettaires. Les deux molécules étant chargées négativement, la liaison est possible par la capture d'ion Ca^{2+} . Le cofacteur de la gamma-carboxylase est la vitamine K réduite KH_2 (Figure 4) [15]. La synthèse des facteurs II, VII, IX et X est ainsi vitamine K-dépendante. Cette maturation des protéines a lieu dans le réticulum endoplasmique des hépatocytes.

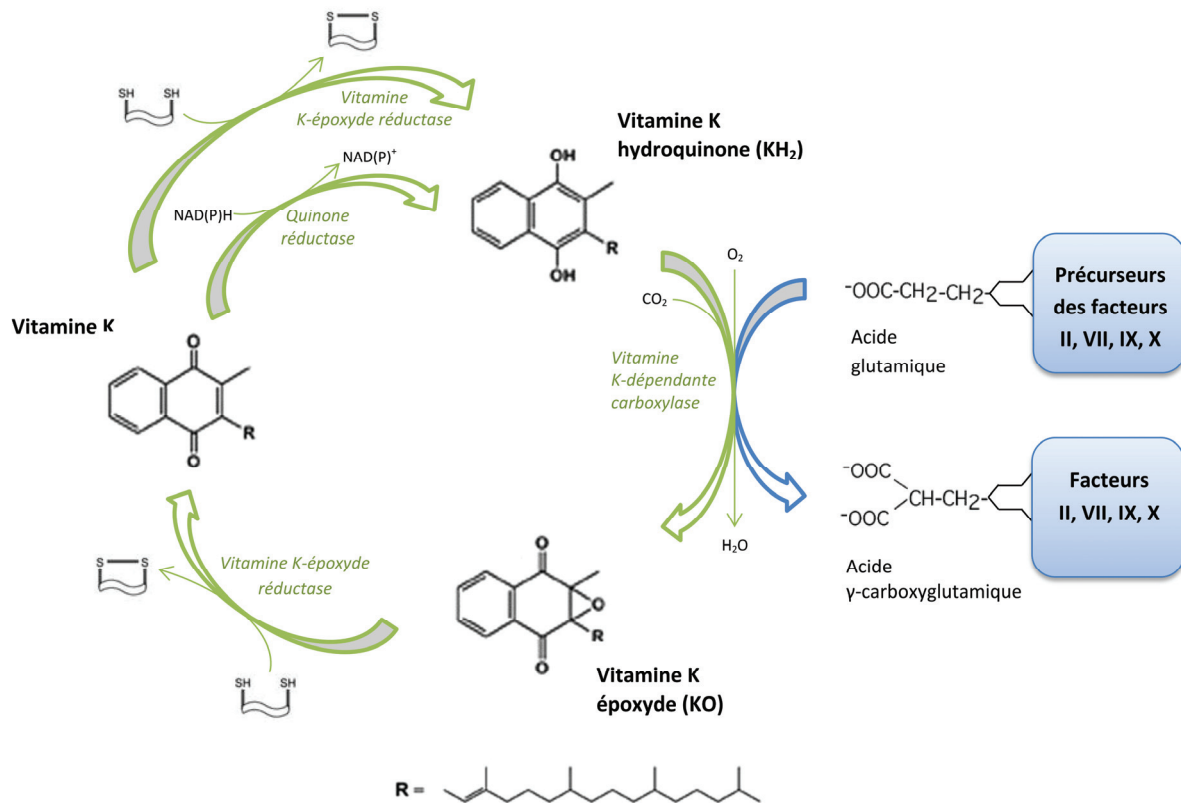


Figure 4. Gamma-carboxylation des acides glutamiques des facteurs de la coagulation vitamine-K dépendants.

1.3.2- La physiologie de la coagulation

Initialement, la coagulation était décrite selon deux voies d'activation : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque qui convergeaient en une voie commune [16]. La voie intrinsèque comprend l'ensemble des éléments nécessaires à la coagulation sans qu'il y ait d'apport extérieur à la circulation. La voie extrinsèque fait, quant à elle, intervenir le seul élément extérieur à la circulation : le FT présent à la surface des fibroblastes (Figure 3).

Cette conception classique a permis de rationaliser et de conceptualiser le processus de la coagulation et permet encore aujourd'hui de mieux appréhender et comprendre les réactions de la coagulation *in vitro*. Cependant, le déroulement physiologique de la coagulation *in vivo* ne suit pas réellement une cascade pure et simple d'activations et ne distingue pas strictement la voie intrinsèque de la voie extrinsèque. La conception actuellement proposée prend également en compte les surfaces cellulaires impliquées, elle reflète mieux la coagulation et permet ainsi d'expliquer plus justement certaines altérations du processus.

Dans ce modèle, la phase contact initialement décrite dans la voie intrinsèque de la coagulation paraît ne jouer qu'un rôle limité. La phase contact fait intervenir trois facteurs de la coagulation : le facteur XII (FXII), la prékallitréine et le kinogène de haut poids moléculaire. Ces deux derniers sont

présents sous la forme d'un complexe. Cette voie est ainsi nommée par le fait que les mécanismes impliqués se produisent après contact sur une surface chargée négativement. Le FXIIa active le FXI pouvant aboutir indirectement à la formation du complexe *tenase* intrinsèque. La phase contact reste une voie minoritaire face à la voie déclenchée par le FT et ne sera donc pas détaillée ici.

Le nouveau modèle est composé de trois phases permettant la génération de thrombine qui a un rôle central, à savoir les phases d'initiation, d'amplification et de propagation. Ce modèle est schématisé dans la Figure 5, à la page 33.

I.3.2.1- Initiation de la coagulation

L'élément déclenchant la coagulation est la glycoprotéine transmembranaire FT qui est exprimée à la surface des cellules musculaires lisses et des fibroblastes présents dans le sous-endothélium. Ainsi, lorsque le FT entre en contact avec le plasma suite à une bèche vasculaire, il forme un complexe avec le facteur VII activé plasmatique (FVIIa) pour lequel il a une très forte affinité. Cela a pour conséquence de libérer le site actif du FVIIa. De faibles taux de FVIIa plasmatique existent naturellement dans la circulation mais la protéine, en absence de FT, présente une très faible activité enzymatique. L'interaction avec le FT permet d'augmenter fortement l'activité du FVIIa lors de la protéolyse du facteur X (FX) [17].

Le complexe FVIIa-FT exerce préférentiellement son activité sur le FX, il porte donc le nom de complexe *tenase* « extrinsèque ». Cependant, il peut rapidement être régulé par l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI : *Tissue Factor Pathway Inhibitor*) ou l'antithrombine (AT) [18]. Dans ce cas, ou en présence de faibles quantités de FT, le complexe FVIIa-FT exerce alors son action, néanmoins plus lente, sur le facteur IX (FIX).

Contrairement au FIXa qui, une fois activé, a la capacité de migrer sur une plaquette, le FXa libre est inhibé par le TFPI ou l'AT ce qui crée une limitation spatiale du phénomène. Le FXa persiste donc à la surface des cellules exprimant le FT et va alors former les premiers complexes prothrombinases avec le facteur Va (FVa) en présence de calcium. Lors de cette phase d'initiation, le FVa provient alors soit de l'activation du FV circulant par le FXa, soit il est libéré des granules α des plaquettes activées. La formation du complexe prothrombinase initial va permettre d'activer la prothrombine et de générer les premières traces de thrombine (de l'ordre du picomolaire).

I.3.2.2- Amplification de la coagulation

La thrombine générée en surface des cellules exprimant le FT a de multiples fonctions. Elle permet l'activation des plaquettes, l'activation du FV [19], du facteur VIII (FVIII) [20] et du facteur XI (FXI)

[21,22] à la surface des plaquettes [18]. L'activation de ces facteurs permet la formation des complexes qui interviennent lors de la phase de propagation.

I.3.2.3- Propagation de la coagulation

La propagation de la coagulation a lieu à la surface des plaquettes activées. Le FIXa formé lors de la phase d'initiation lie son cofacteur : le FVIIIa généré pendant la phase d'amplification. Des molécules de FIXa supplémentaires sont alors fournies par l'activation de FXI à la surface des plaquettes. Le complexe *tenase* « intrinsèque » constitué du FIXa, du FVIIIa, du FX, de phospholipides anioniques et de calcium va alors générer du FXa directement à la surface des plaquettes. Le complexe *tenase* intrinsèque permet d'activer le FX cinquante fois plus efficacement que le complexe *tenase* extrinsèque [23].

Le FXa s'associe ensuite rapidement avec le FVa à la surface des plaquettes formant le complexe prothrombinase qui produit de grandes quantités de thrombine nécessaires à la génération de fibrine. La formation de thrombine à ce stade est jusqu'à un million fois plus élevée que lors de la phase d'initiation.

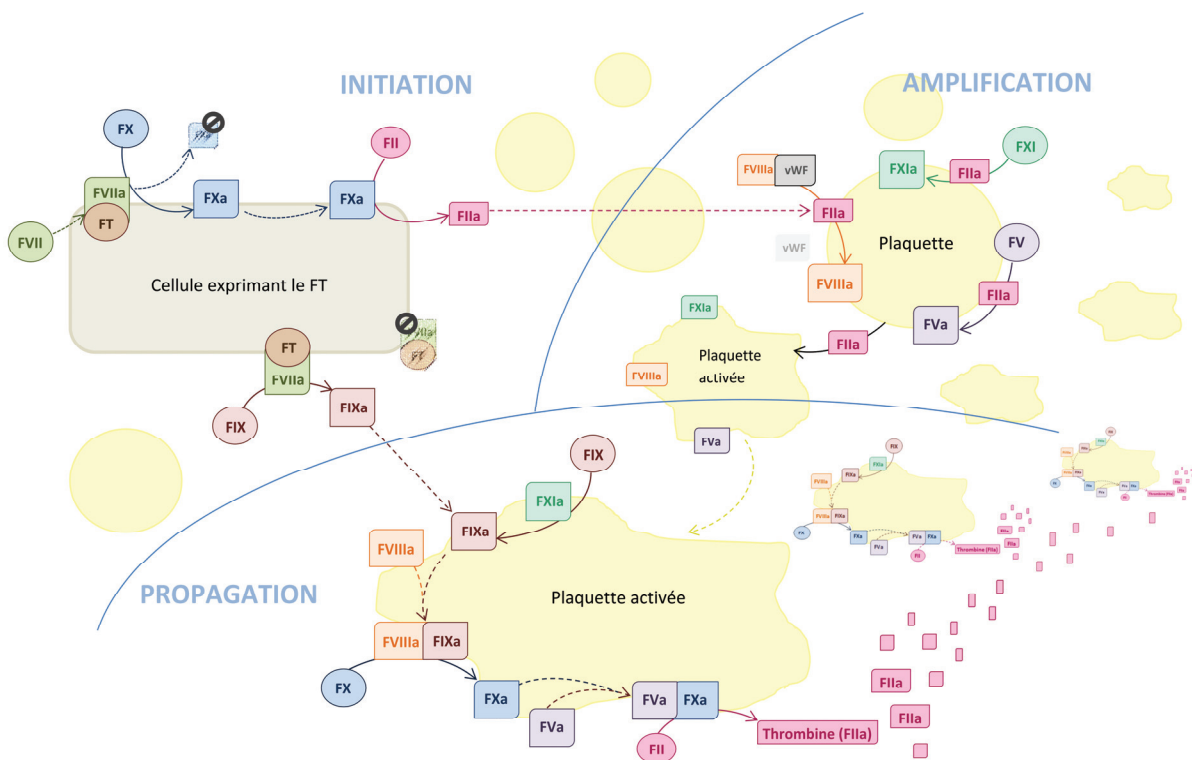


Figure 5. Schématisation des phases d'initiation, d'amplification et de propagation aboutissant à la formation de grandes quantités de thrombine lors de la coagulation.

I.3.2.4- La fibrinoformation

La constitution du caillot sanguin est permise par la formation d'un réseau de fibrine. La transformation du fibrinogène soluble en réseau de fibrine insoluble est catalysée par la thrombine en présence de facteur XIII activé (FXIIIa) (Figure 6). Dans un premiers temps, la thrombine clive le fibrinogène en libérant les deux fibrinopeptides A et B du domaine E lui-même relié à deux domaines D chargés négativement. Le domaine E ainsi formé acquiert quant à lui une charge positive. Ces trois domaines forment un monomère de fibrine. La répartition des charges permet l'association des monomères en protofibrilles puis en un réseau de fibrine instable qui s'étend dans les différents plans de l'espace [24]. Le FXIIIa, activé lui aussi par la thrombine, crée des liaisons covalentes entre les monomères de fibrines spatialement voisins afin de stabiliser l'ensemble [25]. De plus, la thrombine produite temporellement après la formation du caillot active alors le *Thrombin Activable Fibrinolysis Inhibitor* (TAFI) qui protège le caillot de la fibrinolyse lors de la réparation tissulaire.

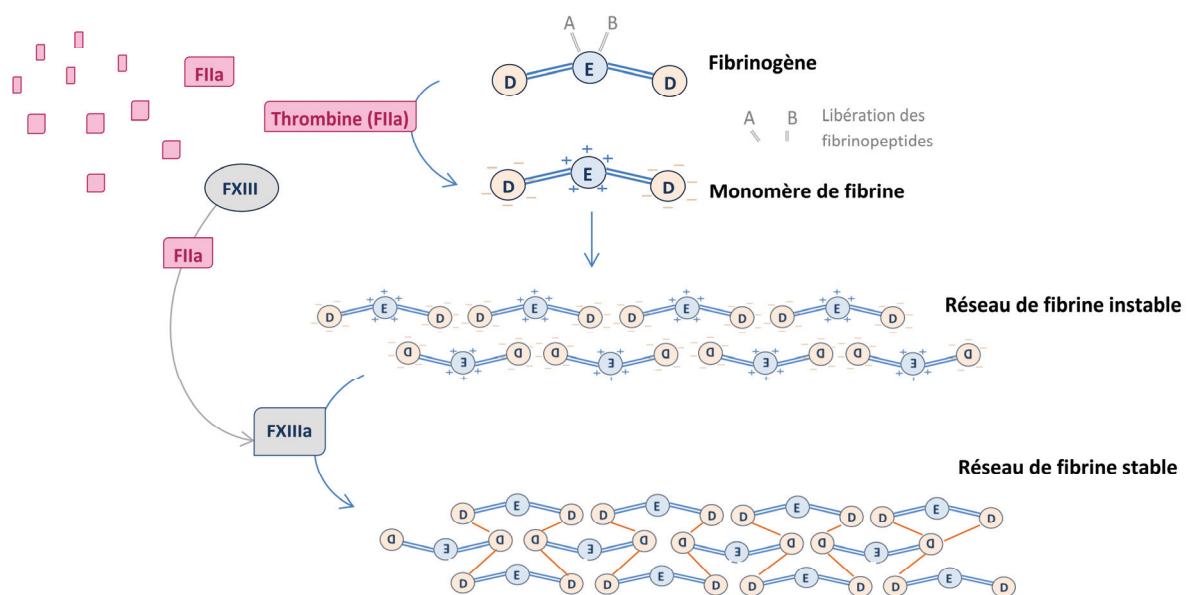


Figure 6. Schéma du processus de fibrinoformation. Le fibrinogène est composé de deux domaines D reliés entre eux par un domaine E, ces domaines deviennent respectivement chargés négativement et positivement après libération des fibrinopeptides A et B du domaine E par action de la thrombine (FIIa). Le FXIII activé permet ensuite la stabilisation du réseau de fibrine.

1.3.3- Régulation de la coagulation

Il existe des processus de régulation négative qui contrôlent les mécanismes de la coagulation plasmatique afin d'éviter une activation diffuse de la coagulation. Afin de maintenir l'équilibre, chaque zymogène de la coagulation peut être inhibé par l'un des systèmes inhibiteurs suivant : l'antithrombine, la protéine C, la protéine S, le ZPI (inhibiteur dépendant de la protéine Z) et le TFPI. L'ensemble de ces processus d'inhibition est représenté dans la Figure 7.

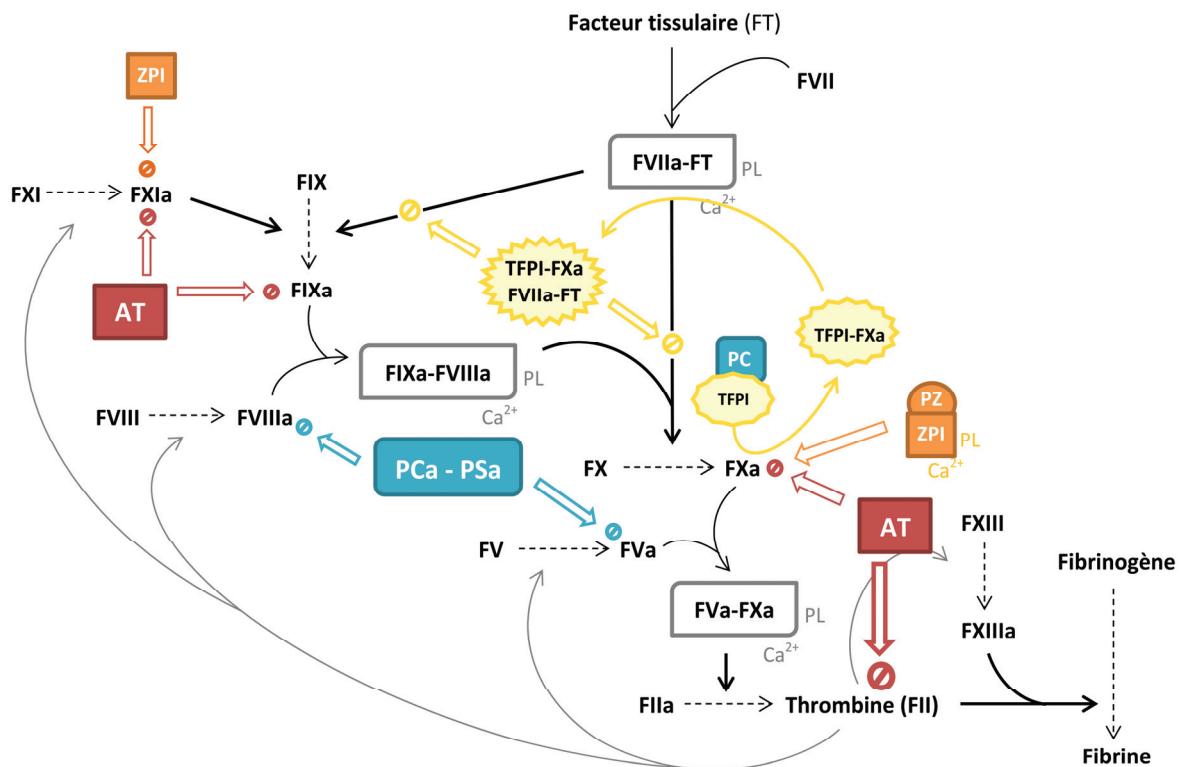


Figure 7. Schéma de la régulation de la coagulation. TFPI : Tissue Factor Pathway Inhibitor. AT : Antithrombine. PCa – PSa : protéine C activée – protéine S activée. ZPI : inhibiteur dépendant de la protéine Z. PZ : protéine Z.

1.3.3.1- L'antithrombine

L'antithrombine agit principalement sur la thrombine dont les rôles sont multiples dans le processus de la coagulation. Cependant, elle agit également sur le FXa, le FIXa et le FXIa qui s'échappent du caillot et se retrouvent dans la circulation. Enfin, l'antithrombine a la capacité d'inhiber le FVIIa au sein du complexe FVIIa-FT des surfaces cellulaires [26] et interagit avec les plaquettes via la GP Ib-IX-V [27].

L'antithrombine est une serpine synthétisée par le foie qui circule librement dans le plasma. Lorsque les sérine-protéases se retrouvent dans la circulation, l'antithrombine constitue un complexe

équimoléculaire irréversible et inactif qui sera ensuite éliminé. La formation du complexe est une réaction lente mais qui est catalysée par des glycosaminoglycanes comme les héparanes sulfates ou l'héparine. Les héparanes sulfates sont naturellement présents à la surface des cellules endothéliales [28] alors que l'héparine est sécrétée par les mastocytes et souvent utilisée en thérapeutique.

L'héparine augmente la réactivité de l'antithrombine avec le FIXa via deux mécanismes : l'un étant un changement conformationnel, l'autre étant dépendant des ions Ca^{2+} [29]. Ce dernier correspond à la formation de ponts non covalents via les ions Ca^{2+} entre l'antithrombine et le FIXa en présence d'héparine de longueur suffisante, ce qui permet de réduire la constante de dissociation entre les deux molécules [30]. De plus, lorsque l'héparine se lie à l'hélice D de l'antithrombine, cela induit un changement structural de la boucle RCL (*Reactive Center Loop*) permettant aux résidus 393 et 394 d'interagir avec deux boucles de la surface du FIXa. Il s'agit de la boucle dite d'autolyse au niveau du résidu Arg318 [31] et de la boucle formée par les résidus Val196 à Phe205 du FIXa [32,33], respectivement nommé *loop-148* et *loop-39* selon le système de numérotation de la chymotrypsine. En présence d'héparine, l'inhibition du FIXa par l'antithrombine est 40 fois moins efficace que celle du FXa [33].

I.3.3.2- La protéine C et la protéine S

Le système protéine C – protéine S est un inhibiteur très puissant des cofacteurs FVa et FVIIIa. La thrombine possède un cofacteur exprimé à la surface des cellules endothéliales : la thrombomoduline. Une fois liée à son cofacteur, la thrombine acquiert des fonctions anticoagulantes au détriment des propriétés coagulantes. La thrombine active la protéine C alors présente à la surface des cellules endothéliales grâce à une interaction avec son récepteur endothélial EPCR (*Endothelial Protein C Receptor*) et la thrombomoduline [34]. La protéine C activée (PCa) est capable d'inhiber le FV et le FVIII (activés ou non) par protéolyse. Ces réactions d'inhibition sont catalysées par la présence de protéine S activée qui se lie au domaine protéase de la protéine C activée et qui améliore son efficacité par changement de conformation [35]. La synthèse de la protéine S et de la protéine C est vitamine K-dépendante.

La protéine S, facteur vitamine K-dépendant, a également un autre rôle de régulateur, indépendamment de la PCa mais dépendant du TFPI. En effet, la protéine S permet d'améliorer l'inhibition du FXa par le TFPI en jouant un rôle de cofacteur [36,37].

I.3.3.3- Le TFPI (*Tissue Factor Pathway Inhibitor*)

Le TFPI est synthétisé par les cellules endothéliales et circule dans le plasma en faibles quantités [38]. Il inhibe quant à lui la réaction d'activation du FX par le complexe FVIIa-FT, il est l'inhibiteur physiologique de la voie du FT. Au lieu de se fixer directement sur le FVIIa et d'inhiber son activité, le

TFPI se fixe d'abord au FXa, puis le complexe FXa - TFPI se lie au complexe FVIIa-FT. Le TFPI sous la forme de complexe quaternaire inhibe donc non seulement la formation de FXa mais également celle du FIXa. Cependant, le TFPI n'inhibe pas directement le FIXa. Une étude récente a montré que la résistance du FIXa à être inhibé par le TFPI était due à ses résidus dans la boucle des résidus 196 à 205 du FIXa [39]. En effet, en remplaçant cette séquence du FIXa par les résidus correspondants du FXa, l'étude a montré une sensibilité du FIXa chimérique à l'inhibition par le TFPI.

I.3.3.4- L'inhibiteur dépendant de la protéine Z (ZPI)

Le ZPI (*Protein Z-dependant protease inhibitor*) est une protéine circulante qui inhibe le FXa et le FXIa. Le ZPI est une serpine dont le cofacteur est la protéine Z (PZ). En effet, l'inhibition du FXa par le ZPI en présence de phospholipides et de calcium est 1 000 fois plus efficace en présence de la protéine Z [40]. A l'inverse, l'inhibition du FXIa par ce système ne requiert pas de protéine Z, de phospholipides ou de calcium.

1.3.4- Les pathologies de la coagulation

De par la diversité des protéines et éléments cellulaires impliqués dans la coagulation et sa régulation, les pathologies associées à ces mécanismes sont nombreuses et variées. Les symptômes sont également très hétérogènes avec d'une part les troubles hémorragiques et d'autre part les troubles thrombotiques.

I.3.4.1- Les troubles hémorragiques

Les troubles constitutionnels entraînant des pathologies hémorragiques correspondent aux déficits qualitatifs ou quantitatifs en facteur de la coagulation. Les déficits les plus fréquents sont ceux en FVIII et en FIX qui causent respectivement l'hémophilie A et l'hémophilie B. Même si ce sont les déficits en facteur de la coagulation les plus fréquents, l'hémophilie reste une maladie rare. La description de cette pathologie sera abordée dans le *Chapitre II : L'hémophilie* à la page 41. Les déficits les plus rares responsables de syndrome hémorragique concernent les déficits constitutionnels en facteurs II, V, VII, X, XI et XIII.

Un déficit acquis en vitamine K ou la prise d'un traitement anti-vitamine K entraînent un défaut dans la synthèse des facteurs vitamine K-dépendants qui ne seront pas totalement fonctionnels. Les protéines alors produites sont appelées PIVKA (*Protein Induced by Vitamine K Absence or Antagonist*), elles ne sont pas carboxylées et donc inefficaces dans la liaison aux phospholipides [15].

Une grande proportion des éléments de la coagulation étant synthétisée par les hépatocytes, des troubles hémorragiques acquis sont également observés suite à une insuffisance hépatique.

Enfin, des syndromes hémorragiques rares peuvent apparaître suite au développement d'auto ou allo-anticorps inhibiteurs des facteurs de la coagulation. Même si ces inhibiteurs sont le plus souvent rencontrés lors des traitements anti-hémophiliques, ils peuvent également être générés spontanément et dirigés contre les facteurs de la coagulation endogènes, on parle alors d'hémophilie acquise.

I.3.4.2- Les troubles thrombotiques

De multiples troubles constitutionnels de la coagulation peuvent être à l'origine de thrombophilies.

D'une part, des polymorphismes sur les gènes du FV ou de la prothrombine ont été décrits comme étant les causes de thrombophilies les plus fréquentes. Le facteur V Leiden entraînant une augmentation de la résistance à la protéine C a été décrite pour la première fois en 1994 [41], les thrombophilies résultant de cette mutation sont les plus fréquentes. La deuxième cause de thrombophilie héréditaire est la mutation G20210A du gène de la prothrombine qui une augmentation de la protéine. D'autre part, les déficits en inhibiteurs de la coagulation, tels que les déficits en protéines C et S ou en antithrombine [42], ne permettent pas une régulation correcte de la coagulation et sont alors à l'origine d'une hypercoagulabilité. Le déficit en antithrombine représente la pathologie la plus thrombogène des thrombophilies constitutionnelles. Enfin, des troubles modérés/mineurs tels qu'une augmentation de l'activité des FVIII, FIX et FXI, une anomalie du plasminogène ou encore une augmentation de l'activité des régulateurs de la fibrinolyse peuvent également conduire à des accidents thrombotiques.

Le syndrome des antiphospholipides est une thrombophilie d'origine acquise suite au développement d'anticorps dirigés contre les protéines plasmatiques qui se lient aux phospholipides des membranes des cellules comme les plaquettes ou les cellules endothéliales.

Les pathologies responsables de consommation comme la CIVD (coagulation intravasculaire disséminée) peuvent également induire des signes hémorragiques ou thrombotiques.

I.4- La fibrinolyse

La fibrinolyse permet d'éliminer le caillot de fibrine constitué suite à l'hémostase primaire et à la coagulation au fur et à mesure que la paroi du vaisseau cicatrise et retrouve pleinement ses fonctions imperméabilisantes. La fibrinolyse permet ainsi d'empêcher l'installation du caillot mais également son extension qui pourrait entraîner des troubles thrombotiques secondaires.

1.4.1- La physiologie de la fibrinolyse

La fibrinolyse, qui est un processus lent, est contrôlée par un phénomène d'activation en phase solide au niveau du caillot, et un phénomène d'inhibition en phase liquide dans le plasma circulant. L'ensemble des réactions fibrinolytiques est représenté dans la Figure 8. L'enzyme principale du système fibrinolytique est la plasmine dont le précurseur est le plasminogène synthétisé par le foie. La plasmine exerce une action protéolytique puissante sur le caillot de fibrine. Les autres acteurs de la fibrinolyse sont essentiellement des protéines qui jouent un rôle d'activateurs ou d'inhibiteurs du plasminogène [43].

Lorsqu'un caillot de fibrine se forme, le plasminogène est activé par la voie de l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) mais aussi par la voie de la pro-urokinase (U-PA : *Urokinase Plasminogen Activator*). La pro-urokinase circulante et le t-PA, lié à son inhibiteur PAI-1, sont initialement très peu actifs. Cependant, dès l'apparition de fibrine, les cellules endothéliales surexpriment le t-PA qui a une forte affinité pour la fibrine. La libération des fibrinopeptides A et B du fibrinogène et la polymérisation des monomères lors de la fibrinoformation permettent de dévoiler des sites de liaison au t-PA et au plasminogène sur les polymères de fibrine. La fixation de ces deux protéines à la fibrine crée un complexe trimoléculaire qui catalyse l'activation du plasminogène par le t-PA. La voie de la pro-urokinase est également initiée par la présence de fibrine mais son activation est minoritaire face à l'efficacité du t-PA. La plasmine formée directement à la surface du caillot de fibrine dégrade celui-ci en libérant des produits de dégradation de fibrine (PDF). Parmi les PDF libérés certains sont spécifiques de l'action de la plasmine sur la fibrine, c'est le cas des D-dimères constitués de deux domaines D de monomères de fibrine initialement différents.

Au fur et à mesure de la destruction du caillot, la plasmine se retrouve en excès et passe alors dans la circulation où les inhibiteurs sont présents, on parle d'inhibition en phase liquide. L'alpha 2 antiplasmine ($\alpha 2AP$) inhibe l'action de la plasmine et l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 1 (PAI-1) bloque le t-PA permettant ainsi de maintenir une action locale du système fibrinolytique.

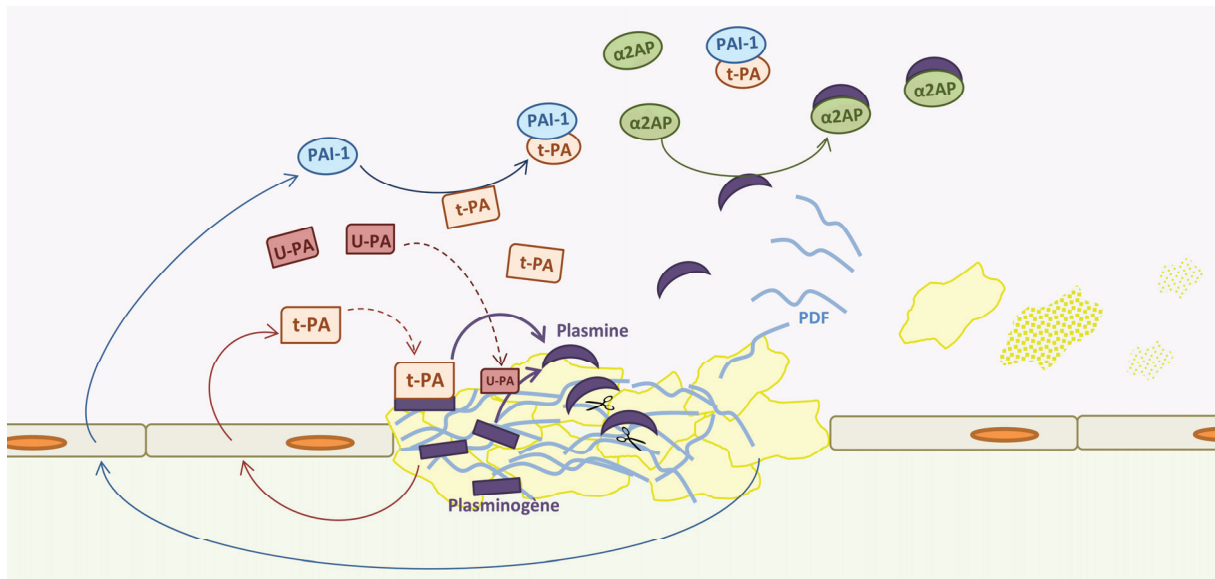


Figure 8. Schéma du processus de fibrinolyse. t-PA : activateur tissulaire du plasminogène, U-PA : pro-urokinase, PDF : produits de dégradation de fibrine, PAI-1 : inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 1, α 2AP : alpha 2 antiplasmine.

1.4.2- Les pathologies de la fibrinolyse

Une tendance thrombotique peut être observée par défaut de fibrinolyse, soit par anomalie du plasminogène soit par une hyperactivité des inhibiteurs.

Au contraire, un excès de fibrinolyse peut provoquer des hémorragies. Cet excès peut être dû à un excès d'activation ou à un défaut d'inhibition. C'est le cas des déficits en PAI-1 ou en α 2AP. Ces déficits sont causés par des défauts qualitatif ou quantitatif des inhibiteurs. Les patients sont alors traités par agents anti-fibrinolytiques [44].

Chapitre II : L'hémophilie

II.1- Définitions de l'hémophilie

II.1.1- Généralités

L'hémophilie est une maladie hémorragique constitutionnelle rare qui toucherait environ 500 000 personnes à travers le monde. Elle est caractérisée par un déficit total ou partiel en FVIII de la coagulation pour l'hémophilie A et en FIX pour l'hémophilie B. L'absence ou le dysfonctionnement de l'un de ces facteurs empêche la formation du complexe *tenase*, indispensable dans le processus de coagulation décrit à la page 29 du manuscrit. Avec 6200 patients hémophiles A et B en France [45], l'hémophilie A est six fois plus fréquente que l'hémophilie B. La prévalence de l'hémophilie B, qui fait l'objet de cette thèse, est estimée à une naissance d'individus masculins sur 30 000.

II.1.2- Génétique

La prévalence de l'hémophilie s'exprime chez les nouveau-nés de sexe masculin car il s'agit d'une maladie héréditaire de transmission récessive liée à l'X. Elle est due à des mutations sur le gène du FVIII (F8) ou du FIX (F9) qui sont situés sur le bras long du chromosome X. Alors que l'hémophilie A est due dans la moitié des cas à une inversion de l'intron 22 du gène F8 [46], les mutations à l'origine de l'hémophilie B sont très diverses. A l'heure actuelle, plus de 1000 variants du gène F9 ont été décrits [47]. Récemment, une étude a démontré une corrélation entre certains types de mutations et la sévérité de l'hémophilie B [48], montrant ainsi l'importance des acides aminés conservés du gène F9 qui, lorsqu'ils sont mutés, corrélerent avec une forme sévère de la maladie.

Les femmes portant un gène défectueux sur l'un de leurs deux chromosomes X sont dites conductrices car elles transmettent ce défaut à leur descendance mais ne développent généralement pas de manifestations de la maladie. En effet, le gène F8 ou F9 porté par leur deuxième chromosome X permet souvent de compenser le déficit de celui portant la mutation. Chez les femmes conductrices de la forme sévère de l'hémophilie, la compensation n'est pas optimale et elles peuvent exprimer des taux de FVIII ou FIX diminués correspondant à une forme mineure ou modérée. Les taux normaux ou abaissés du FVIII ou du FIX dépendent en réalité de la variabilité du mosaïcisme des cellules souches. Lors des premières phases du développement embryonnaire, chaque cellule se voit inactiver au hasard l'un de ses chromosomes X. Généralement, la répartition des deux chromosomes est équitable entre les cellules et permet donc de compenser une mutation possible [49]. Dans de très rares cas, l'inactivation du chromosome X n'est plus aléatoire (lyonisation) et aboutit à une majorité de cellules avec un chromosome X défectueux, ces femmes sont alors atteintes d'une forme sévère d'hémophilie [50,51]. Enfin, certaines femmes peuvent posséder des chromosomes X tous

deux porteurs d'une anomalie. Des mutations *de novo*, observées chez un individu mais absentes chez ses parents, sont alors apparues soit sur le chromosome X sain d'une femme déjà conductrice [52], soit sur les deux chromosomes X d'une femme non conductrice [53]. En France, plus de 2000 hommes présentent une forme sévère de la maladie alors que seules 8 femmes ont été répertoriées hémophiles sévères [45].

II.1.3- Sévérité de la maladie

La sévérité de la maladie est déterminée en fonction de l'activité biologique du facteur VIII ou IX circulant. Il existe trois formes d'hémophilie : sévère, modérée et mineure. Les hémophiles sévères possèdent un FVIII ou un FIX dont l'activité est inférieure à 1 UI/dl. Pour des taux de 1 à 5 UI/dl ou de 5 à 40 UI/dl, les hémophilies seront respectivement qualifiées de modérées ou mineures. En France, les formes modérées représentent 40% des cas d'hémophilies B tandis que les formes mineures et sévères de la maladie représentent chacune 30% [45].

II.2- Diagnostic

Dans plus de 65% des cas d'hémophilies sévères, le diagnostic clinique, lorsqu'il n'est pas prénatal, a lieu dans les premières années de la vie suite à l'apparition rapide de syndromes hémorragiques [54]. Les diagnostics biologiques résultent quant à eux d'analyses de première intention réalisées soit lors d'un bilan pré-opératoire, ou lorsqu'un patient présente des troubles hémorragiques fréquents et qu'il y a de fortes suspicions de trouble de la coagulation. Si le test de Temps de Céphaline avec Activateur (TCA) présente un allongement, ou bien en cas de dépistage pour antécédents familiaux, un dosage coagulométrique d'activité du FVIII ou du FIX est alors effectué en deuxième intention [54]. Ce dosage peut être réalisé soit par méthode chronométrique soit par méthode chromogénique, méthodes qui seront détaillées dans la Partie III : MATERIEL ET METHODES aux pages 104 et 105.

Le diagnostic génétique permet d'identifier la mutation responsable dans la majorité des cas et il est souvent suivi d'un conseil génétique. Ces mutations, rapportées au phénotype, sont ensuite répertoriées au sein de bases de données [47,55]. L'utilisation de ces bases de données représente un outil précieux pour la prise en charge des patients. En effet, si la mutation est déjà connue et associée à des particularités phénotypiques, cela peut par exemple permettre aux soignants d'anticiper le risque du développement d'inhibiteurs chez le patient et ainsi adapter le suivi et les modalités thérapeutiques [56].

Enfin, un diagnostic prénatal peut être proposé chez des femmes conductrices d'une forme sévère d'hémophilie. Les parents doivent obligatoirement être conseillés par une équipe de spécialistes pluridisciplinaire [54].

II.3- Manifestations cliniques

Dans la plupart des cas, la sévérité des signes cliniques est corrélée à la sévérité de l'hémophilie [38]. Les hémophiles sévères souffrent de saignements répétitifs et spontanés alors que les hémophiles mineures présentent des hémorragies induites par des traumatismes ou en cas d'intervention chirurgicale.

Les hémarthroses, saignements dans les articulations, sont les phénomènes hémorragiques les plus fréquents chez les hémophiles. Elles apparaissent dès l'âge de la marche dans les formes sévères de la maladie. Dans 90% des cas, elles touchent les articulations porteuses comme les genoux, les chevilles et les coudes [57]. Les hématomes musculaires sont dans la plupart des cas post-traumatiques. Enfin, des hémorragies viscérales et en particulier intracrâniennes sont plus rares mais graves puisqu'elles peuvent engager le pronostic vital du patient à court terme [38].

Une étude menée au Royaume-Uni a révélé que l'espérance de vie des patients hémophiles a été considérablement améliorée puisqu'en 2007 elle était de 63 à 75 ans selon la sévérité de la maladie [58] alors que dans les années 1960, l'espérance de vie d'un patient hémophile était d'environ 40 ans [59].

II.4- Complications de l'hémophilie

II.4.1- Complications ostéoarticulaires

Les hémarthroses répétées sur une même articulation peuvent conduire à une synovite chronique et à des lésions du cartilage. Ces lésions peuvent être responsables de la destruction progressive de l'articulation qui, étant souvent endommagée, saigne plus fréquemment et spontanément jusqu'à l'installation d'une arthropathie hémophilique. Cette complication peut devenir handicapante pour le patient et nécessiter la pose d'une prothèse. L'adoption du traitement prophylactique dès l'enfance pour les hémophiles sévères est le seul traitement qui a fait preuve d'efficacité pour prévenir la survenue d'arthropathies hémophiliques mais des progrès restent à faire dans la gestion et le traitement des hémorragies intra-articulaires [54,57].

II.4.2- Complication immunologique

Cette complication se caractérise par la survenue d'alloanticorps neutralisants (inhibiteurs) dirigés contre le FVIII ou le FIX exogène injecté. Ces anticorps ne doivent pas être confondus avec les autoanticorps développés lors d'une hémophilie acquise même si les méthodes de détection et certains modes d'action sont identiques. Le développement d'inhibiteurs chez des patients hémophiles est considéré comme une complication majeure car elle modifie la prise en charge thérapeutique des patients puisque les concentrés de FVIII ou de FIX ne sont plus efficaces [60,61].

C'est un processus complexe qui est propre au patient, au facteur (plasmatique ou recombinant) utilisé lors du traitement et à plusieurs éléments de la réponse immune. Le risque de développer des anticorps est plus élevé dans les formes sévères de la maladie, avec un taux de 25 à 30% chez les enfants hémophiles A sévères et de 1,5 à 10% pour les patients hémophiles B [62]. Même si les hémophiles B sont moins exposés au risque de développer des inhibiteurs, ce risque est cependant associé à des réactions allergiques sévères après avoir reçu des concentrés de FIX.

Concernant le mode d'action des alloanticorps anti-FVIII, il s'agit dans la plupart des cas d'inhibition de l'interaction du FVIII avec le vWF, le FIX, le FX ou les phospholipides par encombrement stérique ou encore les alloanticorps forment des complexes immuns avec le FVIII éliminé ainsi plus rapidement [56]. Certains allo- ou autoanticorps ont une activité catalytique directe sur le FVIII ou le FIX. La présence de ces IgG activateurs du FIX représente une perspective de recherche intéressante dans la restauration d'une génération de thrombine normale chez les patients avec inhibiteurs de FVIII endogène [63,64]. Enfin, certains alloanticorps non-neutralisants (ANN) ne présentent aucune action sur l'activité du FVIII ou du FIX et n'ont donc pas d'incidence clinique. Alors que les alloanticorps neutralisants ont une cinétique de type 1 avec une inhibition complète du FVIII ou du FIX de manière dose dépendante, les autoanticorps inhibiteurs des formes acquises de la maladie ont une cinétique de type 2. Ils n'interfèrent que partiellement dans l'interaction FVIII-vWF.

Le risque de développer des alloanticorps anti-FIX peut être associé au type de mutation détectée sur le gène F9 [62]. Cette diminution du risque d'inhibiteurs chez les hémophiles B serait due à la taille du FIX qui est ainsi moins immunogène que le FVIII mais aussi aux nombreuses séquences analogues du FIX avec les autres facteurs vitamine K-dépendants. Les alloanticorps anti-FIX agissent essentiellement sur les domaines Gla et protéasique du FIX. Ces inhibiteurs empêchent la formation du complexe *tenase* intrinsèque en interférant dans la liaison du FIX(a) avec les phospholipides ou la chaîne légère du FVIII [65].

Le développement d'inhibiteurs chez un patient hémophile pose encore des interrogations concernant les causes de cette complication, le pronostic et plus important encore : le traitement. Les thérapeutiques actuellement appliquées seront développées dans le paragraphe suivant: *II.5.2- Traitement des patients hémophiles B présentant des inhibiteurs* à la page 47 du manuscrit.

II.4.3- Complications infectieuses

Dans les années 1970-1980, des injections de cryoprécipités de facteurs de coagulation d'origine plasmatique et des transfusions sanguines issus de donneurs infectés ont causé des contaminations de nombreux patients hémophiles par les virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ainsi que des hépatites B et C. Cependant, depuis 1987, grâce aux différents procédés de sécurisation des produits

sanguins labiles et des médicaments dérivés du sang (chauffage, pasteurisation, nanofiltration, utilisation de solvant/détergent), aucun cas de contamination par l'un des trois virus n'a été reporté en France [66].

L'étude qui fait l'objet de ce manuscrit portant sur l'amélioration du FIX recombinant, la suite du manuscrit sera orientée sur le traitement de l'hémophilie B et sur la fonction du FIX.

II.5- Le traitement de l'hémophilie B

Le traitement substitutif représente l'approche thérapeutique principale de l'hémophilie B. Les protocoles thérapeutiques visent soit à traiter un épisode hémorragique, on parle alors de traitement à la demande ; soit à réduire le risque d'hémorragie de façon préventive, on parle ici de traitement prophylactique. Quelle que soit la stratégie appliquée, les traitements substitutifs de l'hémophilie B consistent en des injections intraveineuses de concentrés de FIX qui permettent d'améliorer le taux de FIX circulant. On distinguera le traitement des patients hémophiles B sans inhibiteurs avec celui des patients ayant développé des inhibiteurs anti-FIX.

II.5.1- Traitement des patients hémophiles B sans inhibiteurs

Lorsqu'un diagnostic d'hémophilie B est posé, plusieurs stratégies de traitement sont alors envisagées en fonction de la sévérité de la maladie, du profil hémorragique du patient et des contraintes environnementales et sociales qui peuvent influencer l'organisation thérapeutique.

II.5.1.1- Concentrés de FIX : plasmatiques / recombinants

Les concentrés de FIX utilisés dans le traitement de l'hémophilie B peuvent être :

- d'origine plasmatique, ils sont alors extraits de dons de plasma humain,
- recombinants c'est-à-dire produits par génie génétique dans un système cellulaire adapté puis purifiés avant d'être commercialisés.

Ces trente dernières années, des progrès significatifs ont été réalisés dans la production, la purification et la sécurisation des concentrés de FIX plasmatiques (pdFIX) et des FIX recombinants (rFIX).

Concernant les médicaments dérivés du sang, d'une part la sélection des donneurs a été perfectionnée afin de ne pas inclure des personnes dites à risque. Les plasmas sont systématiquement testés en réalisant une sérologie et une détection par PCR afin de détecter

d'éventuelles traces de virus même après inactivation. Les techniques d'inactivation virale ont elles aussi connu de nettes améliorations avec des méthodes chimiques (inactivation par solvant et détergent) qui sont venues compléter des méthodes physiques (chauffage à sec des concentrés et nanofiltration) [67,68].

En parallèle de cette sécurisation, les rFIX ont fait leur apparition sur le marché en 1997 [69,70], soit huit ans après la première utilisation de FVIII recombinant (rFVIII). La production de rFIX découle directement du séquençage du gène F9 en 1982 [71] dont l'ADN complémentaire (ADNc) a ensuite pu être insérer dans un plasmide transfecté à des cellules de mammifères. Ces cellules ont pu alors exprimer un rFIX actif [72]. Les améliorations étudiées portent maintenant sur le système cellulaire de production.

Les premières motivations de la mise au point d'un traitement à l'aide d'un rFIX étaient étroitement liées à la question de sécurisation du médicament mais très vite il s'est avéré présenter des avantages liés au conditionnement, avec un arsenal thérapeutique plus large et des concentrations en rFIX plus élevées que dans les concentrés de pdFIX. Cependant, les études de pharmacocinétiques, dont les principaux paramètres sont détaillés dans le Tableau 2, rapportent certains avantages du pdFIX [73]. Ces différences peuvent être expliquées par des modifications post-traductionnelles qui varient entre le pdFIX et le rFIX.

Les deux types de molécules présentent donc chacune des avantages qui leur sont propres [74]. Il n'existe pas de recommandations internationales en faveur de l'une ou de l'autre classe thérapeutique. En France, le choix est effectué par les médecins spécialistes en fonction des données de la littérature et de leurs propres expériences. Les enfants placés en prophylaxie dès leur plus jeune âge se voient le plus souvent administrer la forme recombinante. Dans les pays en développement, le coût du traitement est un critère limitant important et le choix s'oriente souvent sur du pdFIX par défaut d'avoir réellement le choix. Certaines études se placent même en faveur de l'utilisation d'un pdFIX qui serait moins purifié et donc moins coûteux que ceux actuellement commercialisés afin de couvrir les besoins des patients qui n'ont que très peu accès au traitement [68,75].

Paramètre étudié <i>in vivo</i>	pdFIX	rFIX
Clairance	3.8 à 5.4 ml/h/kg	7.5 à 9.1 ml/h/kg
Taux de récupération	1.0 à 1.7 UI/dl	0.7 à 1.0 UI/dl
Demi-vie	29 à 43 heures	19 à 24 heures

Tableau 2. Paramètres pharmacocinétiques du rFIX et du pdFIX. D'après Björkman et al., 2013 [73]

II.5.1.2- Traitement à la demande et prophylaxie

Les différents protocoles de prophylaxie mis au point tendent à prévenir les saignements, à réduire leur fréquence alors que le traitement à la demande fait suite à une hémorragie constatée. Le traitement à la demande est moins contraignant avec moins d'injections. Cependant, ce traitement ponctuel ne permet pas de prévenir le développement des hémarthroses et à plus long terme d'arthropathie. Il a été démontré que la prophylaxie à long terme permettait de réduire la survenue des hémorragies intracrâniennes, des hémarthroses et ainsi le risque d'arthropathie hémophilique en plus d'améliorer la qualité de vie et le bien-être des patients [76,77]. Dans le cas des enfants présentant une hémophilie B sévère, les études s'accordent pour la mise en place d'un traitement prophylactique [57] et ce dès les premiers accidents hémorragiques.

II.5.2- Traitement des patients hémophiles B présentant des inhibiteurs

Les stratégies thérapeutiques envisagées lors du développement d'inhibiteurs chez des patients hémophiles B doivent prendre en compte la sévérité du saignement, le titre en anticorps, le profil immunologique de la réponse immunitaire et le phénotype allergique observé [78]. La problématique principale de ce traitement réside dans le fait qu'il n'existe que très peu de données dans la littérature avec d'une part beaucoup moins de cas chez les hémophiles B, d'autre part des facteurs de risques qui ne sont pas bien connus et enfin, des réponses immunitaires généralement plus fortes dans le cas d'inhibiteurs du FIX. Les réponses immunitaires sont souvent caractérisées par de forts taux d'anticorps et une réponse secondaire due à une nouvelle exposition au FIX plus intense et plus rapide.

En fonction du titre des anticorps, on définit des patients faibles répondeurs (titre d'inhibiteurs inférieur à 5 UB/ml) et des patients forts répondeurs (titre supérieur à 5 UB/ml). Les patients faibles répondeurs peuvent alors être traités selon le contexte clinique avec des doses plus fortes de FIX afin de saturer les anticorps présents mais cette approche n'est pas envisageable à long terme. Une des stratégies de traitement des patients forts répondeurs consiste en l'utilisation d'agents dits « by-passants » qui court-circuitent la fonction du FIX dans le processus de coagulation. Deux agents by-passants sont actuellement utilisés : le FEIBA® qui est un concentré de complexe prothrombique activé et le Novoseven® qui est un concentré de FVIIa recombinant [79]. Lorsqu'une complication allergique au FIX survient, le concentré de complexe prothrombique activé n'est pas adapté car il contient de faibles taux de FIX, l'utilisation de FVIIa est alors recommandée en première intention [62].

Il existe également des stratégies immunologiques qui visent soit à éliminer transitoirement les anticorps (par immunoadsorption), soit à faire disparaître progressivement les anticorps par

induction de tolérance immune (ITI). Cependant, la tolérance est plus difficile à obtenir chez les patients hémophiles B [80].

Enfin, une prophylaxie par agents by-passants peut être envisagée en parallèle d'une ITI selon le profil hémorragique des patients. Cependant, l'adoption d'un tel traitement connaît encore des barrières dont une efficacité des agents by-passants moindre que celle des concentrés de FIX, un coût élevé de ces concentrés, et un manque de recommandations nationales et internationales [81].

L'amélioration des traitements des patients hémophiles B avec ou sans inhibiteurs fait l'objet de très nombreuses études qui seront décrites dans le *Chapitre IV : Améliorations récentes apportées au traitement de l'hémophilie B et perspectives thérapeutiques* à la page 67 du manuscrit.

Chapitre III : Le facteur IX de la coagulation

III.1- Le gène du facteur IX (F9)

III.1.1- Localisation sur le chromosome X et structure du gène F9

Le gène F9 responsable de la synthèse de FIX est localisé sur le bras long du chromosome X, dans la bande Xq27.1. Bien que l'ADNc codant pour le FIX ait été isolé et caractérisé en 1982 [71], la séquence nucléotidique complète du gène F9 fut décrite en 1985 [82]. Sur les 34 000 paires de bases constituant le gène F9, seul 8% de la séquence est constitué d'exons et code donc pour la protéine [83]. La structure du gène F9, sa position sur le chromosome X et la régulation de son promoteur sont représentés sur la Figure 9. Les positions et les tailles des introns et des exons sont quant à elles détaillées dans le Tableau 3.

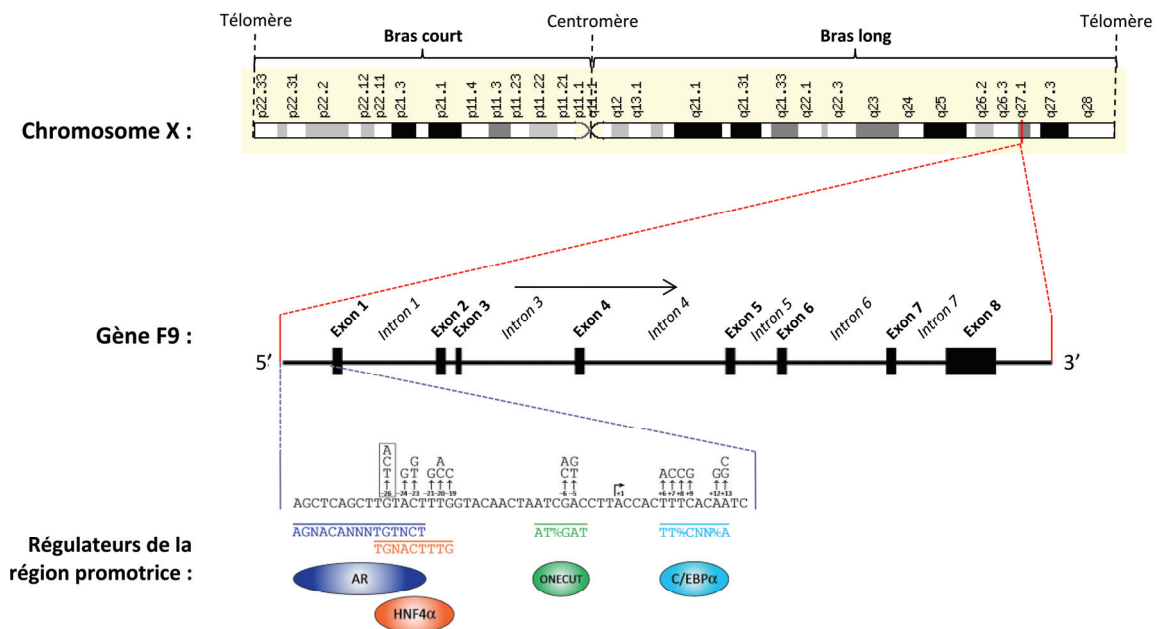


Figure 9. Le gène F9 : localisation dans le chromosome X, structure et régulation de la séquence promotrice. AR : Récepteur à androgène. HNF4 : Hepatocyte nuclear factor 4. C/EBPα : CCAAT/enhancer – binding protein.

Exon	Séquence Nucléotidique	Longueur	Acides aminés	Intron	Séquence Nucléotidique	Longueur
1	1-117	117	-46 à -17	1	118-6 325	6206
2	6 326-6 498	164	-17 à -37	2	6 490-6 677	188
3	6 678-6 702	25	38 à 47	3	6 703- 10 391	3689
4	10 392-10 505	114	47 à 85	4	10 506-17 668	7163
5	17 669-17 797	129	85 à 128	5	17 798-20 362	2565
6	20 363-20 565	203	128 à 195	6	20 566-30 038	9473
7	30 039-30 153	115	196 à 234	7	30 154-30 821	668
8	30 822-32 757	1935	234 à 415			

Tableau 3. Localisation et taille des exons et des introns au sein du gène du FIX humain. D'après Yoshitake et al, 1985 [82].

III.1.2- Régulation de la séquence promotrice du gène F9

La plupart des processus de régulation du gène F9 a été appréhendée et découverte dans le cadre de la compréhension de l'hémophilie Leyden. L'hémophilie Leyden a la particularité d'être liée à des mutations dans la région du promoteur proximal. C'est une forme de l'hémophilie qui ne touche que les enfants pour progressivement s'estomper, avec des taux de FIX revenant progressivement à la normale à l'âge adulte. A l'heure actuelle, les 21 mutations décrites comme touchant la zone du promoteur proximal du gène F9 et influençant l'expression du FIX correspondent toutes à des séquences du promoteur permettant la fixation d'éléments essentiels dans la régulation [84]. Il a ainsi pu être identifié quatre éléments responsables de la régulation de la transcription du gène F9, représentés dans la Figure 9 du manuscrit :

- Le C/EBP α (*CCAAT/enhancer – binding protein*) qui est un facteur de transcription qui, une fois lié à l'ADN, recrute des co-activateurs. La région d'interaction avec le promoteur du gène F9 est située du nucléotide +1 à +18 du promoteur [85].
- Le HNF4 (*Hepatocyte nuclear factor 4*) qui se lie à la région -34 à -10 du promoteur [86]. HNF4 est un facteur de transcription essentiellement exprimé dans les hépatocytes.
- Le facteur de transcription ONECUT qui reconnaît le motif du dinucléotide CpG en position -5 sur le promoteur [87].
- Enfin, une région en -26 a été identifiée comme correspondant à un récepteur à androgène (AR) qui permet l'activation de la transcription par la testostérone [88]. Ce récepteur chevauche la région d'interaction avec le HNF4 en position -20 et permet aux patients ayant une mutation au sein du promoteur F9 (autre qu'au sein de l'AR) de retrouver une expression de FIX à la puberté. Les AR sont essentiellement non-fonctionnels, en effet, ces séquences ne sont par exemple pas conservées chez la souris et les non-hémophiles ne voient pas leur taux de FIX augmenté après la puberté, lorsque les taux hormonaux augmentent. Cependant, les AR deviennent fonctionnels lorsque le promoteur F9 est compromis par des mutations [84].

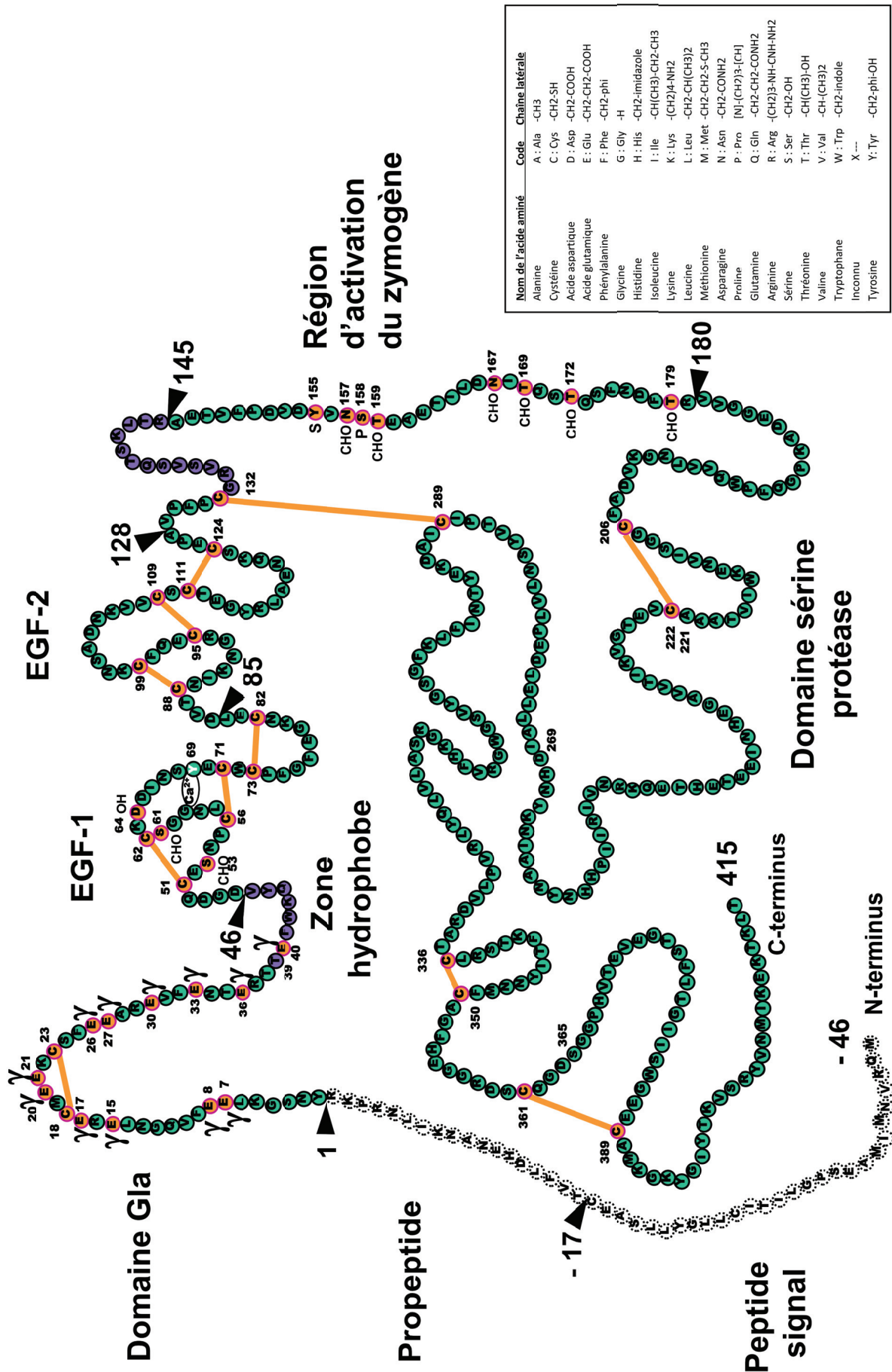


Figure 10. Structure primaire du FIX, d'après Bond et al., 1998 [89].

III.2- Le facteur IX (FIX)

Le FIX est une protéine synthétisée par le foie sous forme d'un précurseur immature de 461 acides aminés. Ce précurseur du FIX subit ensuite des modifications post-traductionnelles avant d'acquies sa structure définitive de 415 acides aminés correspondant à la forme zymogène plasmatique. La numérotation des acides aminés débute sur le premier résidu de la protéine mature, la séquence ne faisant pas partie de la protéine finale est numérotée négativement. La séquence protéique du précurseur du FIX comprend un peptide signal de 28 résidus (position -46 à -17), un propeptide de 18 résidus (-18 à -1) ainsi qu'une séquence correspondant à la protéine circulante (+1 à +415). La séquence protéique du précurseur du FIX est représentée dans la Figure 10 à la page 51 du manuscrit.

III.2.1- Sécrétion du FIX par les hépatocytes

Au fur et à mesure de sa synthèse, le précurseur de FIX subit une série de modifications post-traductionnelles nécessaires au bon repliement et à la sécrétion de la protéine, ainsi qu'à son activité enzymatique. Ces modifications ont lieu dans deux compartiments des hépatocytes : le réticulum endoplasmique rugueux (RER) et l'appareil de Golgi et sont schématisées dans la Figure 11.

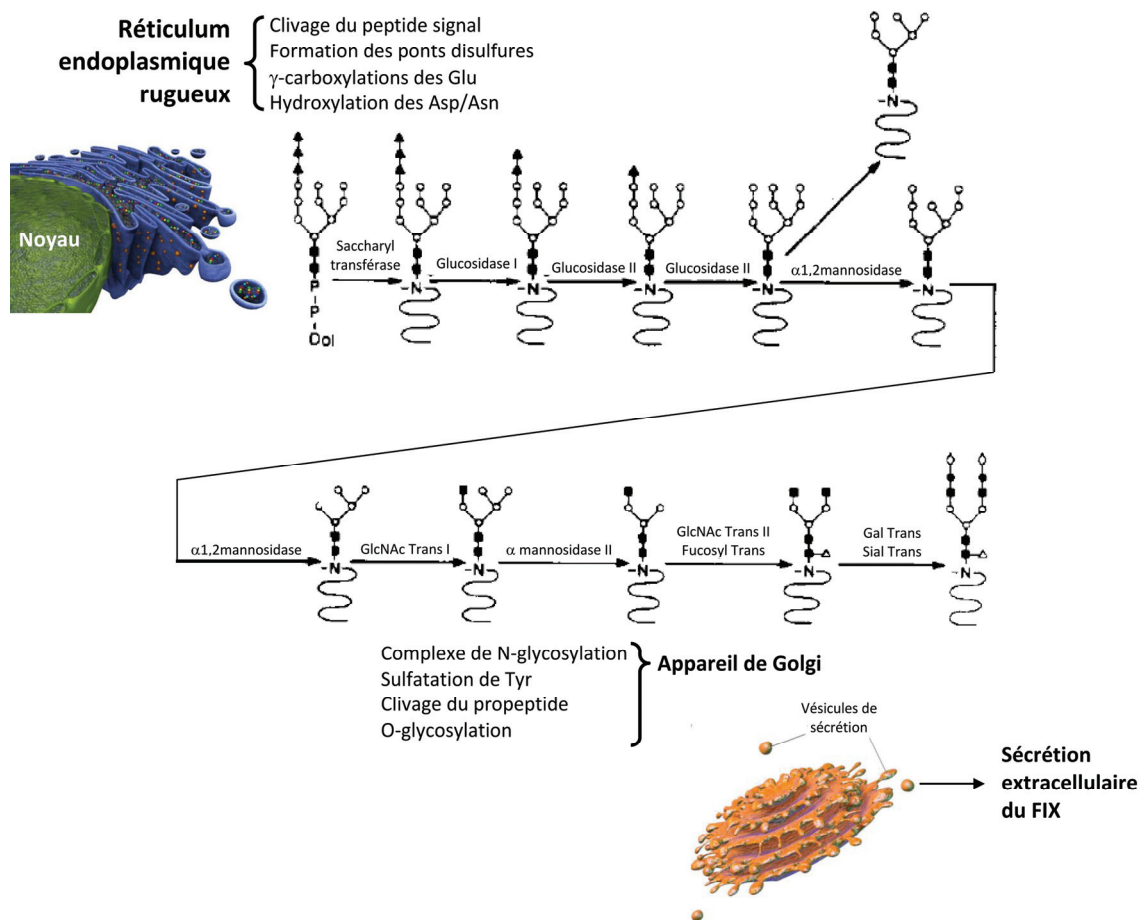


Figure 11. Modifications post-traductionnelles dans la voie de sécrétion du FIX. Détail de la formation des complexes de N-glycosylation lors du transfert du réticulum endoplasmique rugueux à l'appareil de Golgi. D'après Kaufman, 1998 [90].

III.2.1.1- Synthèse dans le réticulum endoplasmique rugueux et premières modifications

Après traduction de l'ARN messager (ARNm) du FIX par les ribosomes, la structure primaire du FIX présente un peptide signal à l'extrémité N-terminale (résidus -46 à -19) qui permet l'insertion de la protéine dans la membrane du RER par une structure boucle. Ce peptide signal est ensuite clivé entraînant la translocation du FIX dans la voie sécrétoire [90].

La protéine est stabilisée par la formation de onze ponts disulfures : un dans le domaine Gla, trois dans chaque domaine EGF-like (*Epidermal Growth Factor-like*), trois dans le domaine sérine protéase et un qui relie la partie N-terminale à la partie C-terminale du FIX [89]. Ces ponts disulfures, formés par oxydation des fonctions thiol de deux résidus cystéines, participent au bon repliement de la protéine et à sa stabilisation. De plus, l'un de ces ponts disulfures permet de relier la chaîne lourde à la chaîne légère lors du clivage du peptide d'activation.

Les douze premiers résidus d'acides glutamiques du domaine Gla sont sélectivement γ -carboxylés en acides γ -carboxyglutamiques. Ces γ -carboxylations font du FIX une protéine dont la synthèse est vitamine K-dépendante. Leur mécanisme a été précédemment décrit dans le paragraphe 1.3.1- *La synthèse des facteurs de la coagulation* et illustré dans la Figure 4 à la page 31.

L'acide aspartique Asp64 de l'EGF-1 est β -hydroxylé, cette modification ne présente pas de fonction connue. Des études montrent que cette modification n'est pas nécessaire à l'activité du FIX. Le rFIX exprimé en cellules CHO (*Chinese Hamster Ovary*) et le pdFIX présente des taux de β -hydroxylation de ce résidu similaire avec respectivement 46% et 37% de résidus Asp64 β -hydroxylés [91]. Ces différences seraient dues au squelette de la protéine et non pas au type cellulaire [90]. La β -hydroxylation est indépendante de la séquence du propeptide, de vitamine K ou de γ -carboxylations proches mais requiert du 2-cétoglutarate et des ions Fe^{2+} [92].

Les N-glycosylations sur certains résidus des glycoprotéines sont généralement nécessaires au repliement et à l'assemblage des protéines nouvellement synthétisées, elles permettent également une sécrétion efficace. Lors du transport dans l'appareil de Golgi, des complexes de N-glycosylation se forment sur les résidus asparagines Asn157 et Asn167 du FIX [71]. La première enzyme impliquée dans la formation de ce complexe est une oligosaccharyltransférase qui catalyse le transfert d'un oligosaccharide riche en mannose sur certains résidus asparagine. Les asparagines capables de recevoir de tels oligosaccharides ont été définis comme faisant partie de la séquence consensus suivante : Asn – X – Ser/Thr (X pouvant être n'importe quel résidu excepté la proline). Le transport du polypeptide jusqu'au Golgi nécessite la modification des sucres de ce complexe. Les étapes ainsi que les enzymes impliquées dans cette voie sont détaillées dans la Figure 11. Le complexe final possède

des acides sialiques terminaux dont les motifs et les liaisons ne sont pas les mêmes chez le pdFIX et le rFIX [93].

III.2.1.2- Transfert et maturation dans l'appareil de Golgi

Le résidu tyrosine Tyr155 est sulfaté à plus de 90 % pour le pdFIX alors qu'il ne l'est que de 10 à 15 % pour le rFIX [91]. Ces taux de sulfatation ont été suggérés comme pouvant expliquer les différences de pharmacocinétique entre le rFIX et le pdFIX [94]. De même, les incidences de la phosphorylation du résidu sérine Ser158 sont encore peu connues. Les molécules de rFIX non phosphorylées ont été décrites comme éliminées plus rapidement du plasma [95]. Une étude de ces modifications du peptide d'activation par spectrométrie de masse a montré que le rFIX ne possédait que 4% de sulfatations et de phosphorylations (contre 70 % pour le pdFIX) [93]. Ces deux modifications ont lieu dans le foie et pourraient jouer des rôles importants dans la sécrétion, l'activité catalytique, la pharmacocinétique ou encore l'immunogénicité du FIX [96].

Le clivage du propeptide du FIX (résidus -18 à -1) intervient dans le trans-Golgi, juste avant la sécrétion du FIX dans la circulation plasmatique. Le clivage est assuré par une endopeptidase eucaryote, la furin/PACE qui clive le propeptide après certains résidus basiques spécifiques. Le motif de clivage pour le propeptide du facteur IX a été défini comme étant : Arg – X – (Lys/Arg) – Arg [97].

La protéine subit enfin l'addition d'oligosaccharides sur certains résidus sérine et thréonine situés au sein du peptide d'activation, la réaction de O-glycosylation se fait par ajout d'un N-acétylgalactosamine sur les résidus concernés, contrairement aux liaisons N-glycosylées qui impliquent en premier lieu un résidu N-acétylglucosamine. Les résidus sérines et thréonines concernés sont généralement regroupés dans des régions riches en Proline. Les résidus Ser53 et Ser61 contenus dans le domaine EGF-1 sont uniformément glycosylés tandis que les résidus thréonine Thr159, Thr169, Thr172 et Thr179 ne sont que partiellement O-glycosylés, que ce soit sur les molécules de pdFIX ou de rFIX [90].

III.2.1.3- Sécrétion

Une fois toutes ces modifications post-traductionnelles effectuées, le FIX est alors sécrété dans la circulation. L'étude de certaines mutations de patients hémophiles B a permis d'identifier le rôle essentiel de la région carboxy-terminale de la protéine dans la sécrétion cellulaire [98]. Une étude récente souligne le rôle clé du groupement phénol du résidu tyrosine Tyr404 dans la sécrétion mais aussi dans la fonction du FIX [99]. D'une façon plus générale, on remarque que les trois résidus tyrosine de la région carboxy-terminale des FIX, FVII, FX et PC sont hautement conservés. Les résultats d'une précédente étude sur le rôle de l'extrémité carboxy-terminale du FVII rapportent qu'une mutation dans cette région influence non seulement la sécrétion mais aussi l'activité du

FVII [100]. Les auteurs de ces études émettent ainsi l'hypothèse que la partie carboxy-terminale de ces protéines homologues a non seulement une importance dans leur sécrétion mais aussi un rôle encore indéfini dans leur fonction. Cette incidence de l'extrémité C-terminale sur la fonction du FIX sera discutée dans la *Partie IV : RESULTATS ET DISCUSSION, Chapitre II : Amélioration in vitro et in vivo de l'activité coagulante du facteur IX humain recombinant. Caractérisation des mutants FIX-E410*, à la page 135 du manuscrit.

III.2.2- Structure du zymogène circulant

Suite à l'ensemble des modifications précédemment décrites et de par la composition de la séquence protéique, on définit plusieurs domaines distincts du FIX (Référence Uniprot du FIX : P00740). Les fonctions de chacun de ces domaines sont liées aux modifications post-traductionnelles qu'il porte. Chacun des domaines joue un ou plusieurs rôles dans la fonction du FIX et ses multiples interactions. La fonction des différents domaines dans la coagulation sera détaillée dans le paragraphe *III.3- Le rôle du FIX dans la coagulation et ses interactions* à la page 56.

En termes de structure et de fonctionnalité, on distingue six domaines dont la plupart sont conservés chez des protéines homologues vitamine K-dépendantes (FII, FVII, FIX, FX, PC et PS) :

- Le domaine Gla (résidus 1 à 38) est issu de la traduction des exons 2 et 3. Il est caractérisé par la présence de 12 acides γ -carboxyglutamiques. Hormis son implication dans les interactions avec le FVIIIa et le complexe FVIIa-FT qui seront décrites dans le paragraphe suivant, il a été montré que le domaine Gla interagissait avec la surface des plaquettes, les vésicules phospholipidiques et la membrane des cellules endothéliales via le collagène de type IV.
- La zone hydrophobe (résidus 39 à 46) est une petite séquence de 8 acides aminés codée par l'exon 3. Avec le domaine EGF-1, elle aurait une importance dans le maintien de l'intégrité fonctionnelle du domaine Gla dans la liaison aux cellules endothéliales [101,102] mais aucune étude récente sur la liaison du FIX aux cellules endothéliales ne mentionne la zone hydrophobe. Cette zone est d'ailleurs souvent confondue au sein du domaine Gla.
- Les domaines EGF-like sont communément nommés EGF-1 et EGF-2 car ce sont des domaines en tandem qui sont homologues à la structure des facteurs de croissance épidermique EGF. Cette structure est caractérisée par la présence de trois ponts disulfures permettant une structure secondaire en feuillets β . De par leur liaison aux ions Ca^{2+} , les domaines EGF-like permettent de nombreuses interactions protéine-protéine [103]. De plus, notre groupe a montré que l'intégrité des domaines EGF-1 et EGF-2 et notamment de leurs ponts disulfures étaient indispensables au transfert du FIX dans l'appareil de Golgi [104]. Ces

domaines s'étendent des résidus 47 à 145 et sont issus de la traduction des exons 4 et 5 du gène F9.

- Le peptide d'activation (résidus 146 à 180) est codé par l'exon 6. Le clivage de ce peptide intervient lors de l'activation du FIX en FIXa et sera développé dans le paragraphe *III.3.2- Activation du FIX* à la page 58 du manuscrit. Cependant, ce peptide n'est pas présent dans le FIX uniquement pour être éliminé lors de l'activation. En fonction de sa longueur et du nombre de glycosylations qu'il possède, il confère aux FVII, FIX et FX une demi-vie plus ou moins longue [105,106]. Ces glycosylations ont d'ailleurs permis de grandes avancées dans l'amélioration de la demi-vie de plusieurs facteurs de coagulation.
- Le domaine catalytique (résidu 181 à 415) résulte de la traduction des exons 7 et 8. Il assure l'activité enzymatique du FIXa grâce à la triade catalytique His221-Asp269-Ser365 et à ses nombreuses interactions lors de la formation du complexe *tenase* intrinsèque et lors de la liaison au substrat FX. Le domaine sérine protéase caractérisé par la présence de cette triade catalytique apparente le FIX à la famille des sérine-protéases.

III.3- Le rôle du FIX dans la coagulation et ses interactions

L'ensemble des domaines du FIX lui permet d'acquérir la bonne conformation et de présenter les repliements et les séquences nécessaires à son interaction avec ses différents partenaires. La connaissance des différentes interactions du FIXa avec ses partenaires de la coagulation a été améliorée par des études de modélisation. Une fois qu'une modélisation définit les résidus potentiellement impliqués dans une liaison, des études viennent compléter l'hypothèse posée. Ces études consistent en l'introduction d'une mutation sur les résidus en question ou en l'utilisation de peptide inhibiteur d'une séquence. L'étude approfondie d'une mutation en particulier et de ses conséquences passe bien souvent par sa reproduction *in vitro* sur l'ADNc du FIX. Cet ADNc muté est ensuite placé au sein d'un plasmide d'expression qui est transfecté transitoirement à des cellules. La culture de ces cellules transfectées permet ainsi de produire un rFIX qui présente la même mutation que celui du patient. Des expériences de caractérisation sur ce rFIX muté peuvent ainsi expliquer l'implication de l'acide aminé dans un mécanisme précis ou dans une interaction avec l'un des partenaires du FIX. Dans les paragraphes qui vont suivre, l'importance d'un ou de plusieurs résidus du FIX dans les mécanismes d'interaction tendra à être appuyée par la description d'une mutation soit décrite dans un cas d'hémophilie B soit étudiée plus précisément par des expériences de caractérisation.

III.3.1- Récepteurs au FIX

III.3.1.1- Liaison FIX et plaquettes

Lorsqu'elles sont activées lors des phases d'amplification et de propagation de la coagulation, les plaquettes fournissent une surface procoagulante très importante pour l'assemblage de deux complexes majeurs : le complexe prothrombinase et le complexe *tenase* intrinsèque. Les plaquettes exposent alors des sites distincts de fixation au FIX/FIXa, au FVIIIa et au FX. Alors qu'une plaquette possède environ 600 sites de fixation au FIXa, elle n'en présente que 250 à 300 pour le FIX [107]. De plus l'interaction FIXa/FVIIIa améliore l'affinité de liaison du FIXa à la membrane des plaquettes. Plusieurs études ont montré l'implication des résidus 1 à 12 du domaine Gla du FIX/FIXa dans la liaison aux plaquettes, soit par des expériences de modification chimique ou de suppression du domaine Gla [5], soit par la génération de FIX chimériques et mutés [108], ou encore par la synthèse de peptides inhibiteurs [109]. De plus, après avoir montré l'importance des résidus 88 à 109 dans l'assemblage du complexe *tenase* intrinsèque sur des vésicules phospholipidiques [110], une équipe a démontré l'implication de ces mêmes résidus du domaine EGF-2 dans la liaison aux plaquettes par la génération de FIXa chimériques [111].

III.3.1.2- Liaison FIX et cellules endothéliales

Il a été montré que le FIX possédait deux sites de fixation aux cellules endothéliales : les résidus 39 à 46 du domaine EGF-1 [101] et les résidus 1 à 12 du domaine Gla [112]. La même équipe a ensuite émis l'hypothèse que la liaison du FIX aux cellules endothéliales était due à une interaction du FIXa au collagène de type IV [113]. Le collagène de type IV est une protéine de la matrice extracellulaire et un composant majeur de la région membranaire des cellules endothéliales située au contact du sous-endothélium [114]. Le rôle de cette liaison FIX/collagène IV est encore mal connu mais une étude émet notamment l'hypothèse de son rôle dans le contrôle de la concentration plasmatique en FIX [115]. Cette liaison pourrait également avoir un impact sur l'efficacité des traitements et sur le développement d'arthropathie. En effet, le tissu synovial présente une forte expression de collagène IV qui pourrait capter les molécules de FIX exogènes lors des injections de concentrés. On pourrait évoquer l'hypothèse que le traitement prophylactique pourrait permettre d'occuper les sites de liaison au collagène IV et ainsi d'avoir un FIX circulant de plus en plus disponible pour la coagulation [116].

III.3.1.3- Liaison FIX et LRP (*Lipoprotein receptor-related protein*)

Lors de l'assemblage du complexe *tenase* intrinsèque, le FIXa s'associe avec des protéines présentes sur les surfaces cellulaires. Après la découverte des sites de liaison du FIX/FIXa aux plaquettes et aux cellules endothéliales, un site alternatif qui permet uniquement la reconnaissance du FIXa (et non du

FIX) a été décrit comme étant le LRP [117]. L'activité du FIXa peut-être contrôlée via la protéolyse limitée par la plasmine ou l'élastase, via la formation d'un complexe inhibiteur avec l'AT ou encore via la liaison au LRP. Celui-ci permet le transport de ces nombreux ligands de la surface cellulaire jusqu'à la voie de dégradation endosomale calcium-dépendante. Les LRP sont présents dans les organes tels que le cerveau, le foie, les poumons ou le placenta, à la surface de nombreux types cellulaires comme les cellules de Kupffer, les monocytes ou les fibroblastes. Ils sont composés d'une chaîne α extracellulaire liée de façon non covalente à une chaîne β transmembranaire. Cette chaîne β possède le motif du signal spécifique à l'endocytose alors que la chaîne α présente quatre régions semblables appelées LRP *clusters* I, II, III et IV. Les LRP clusters II et IV sont responsables de la liaison aux ligands qui sont très hétérogènes [118], parmi ceux-ci, on trouve des facteurs de la coagulation : le FIXa, le FVIII et le FVIIa [119]. La région du FIXa qui est impliquée dans la liaison aux LRP a été décrite comme étant la séquence composée des résidus 342 à 346 [120].

III.3.2- Activation du FIX

Lorsque le processus de la coagulation se met en place, les premiers partenaires du FIX circulant sont ses activateurs : le complexe FVIIa-FT et le FXIa. Quelle que soit l'enzyme impliquée, l'activation du FIX se déroule en deux temps. Le clivage entre les résidus Arg145 et Ala146 génère le FIX α intermédiaire constitué de deux chaînes : une chaîne légère de 18 kDa qui correspond à celle du FIXa et une chaîne lourde de 46 kDa qui comprend le domaine catalytique ainsi que le peptide d'activation. Le second clivage entre les résidus Arg180 et Val181 permet la libération du peptide d'activation de 11 kDa et ainsi la formation du FIXa β composé d'une chaîne légère et d'une chaîne lourde, respectivement de 18 et 28 kDa, reliée entre elles par un pont disulfure [121]. Le détail de cette activation est représenté dans la Figure 12. Le FIX α intermédiaire n'est pas actif et doit obligatoirement être clivé pour devenir le FIXa β fonctionnel. Une mutation au niveau des résidus Arg145 ou Arg180 provoque différentes formes d'hémophilie B. Actuellement 265 mutations de ces résidus ont été décrites chez des patients alors que seulement 7 mutations ont été répertoriées pour les résidus Ala146 et Val181 [47]. Ces données démontrent ainsi de l'importance du résidu arginine dans l'efficacité de la protéolyse.

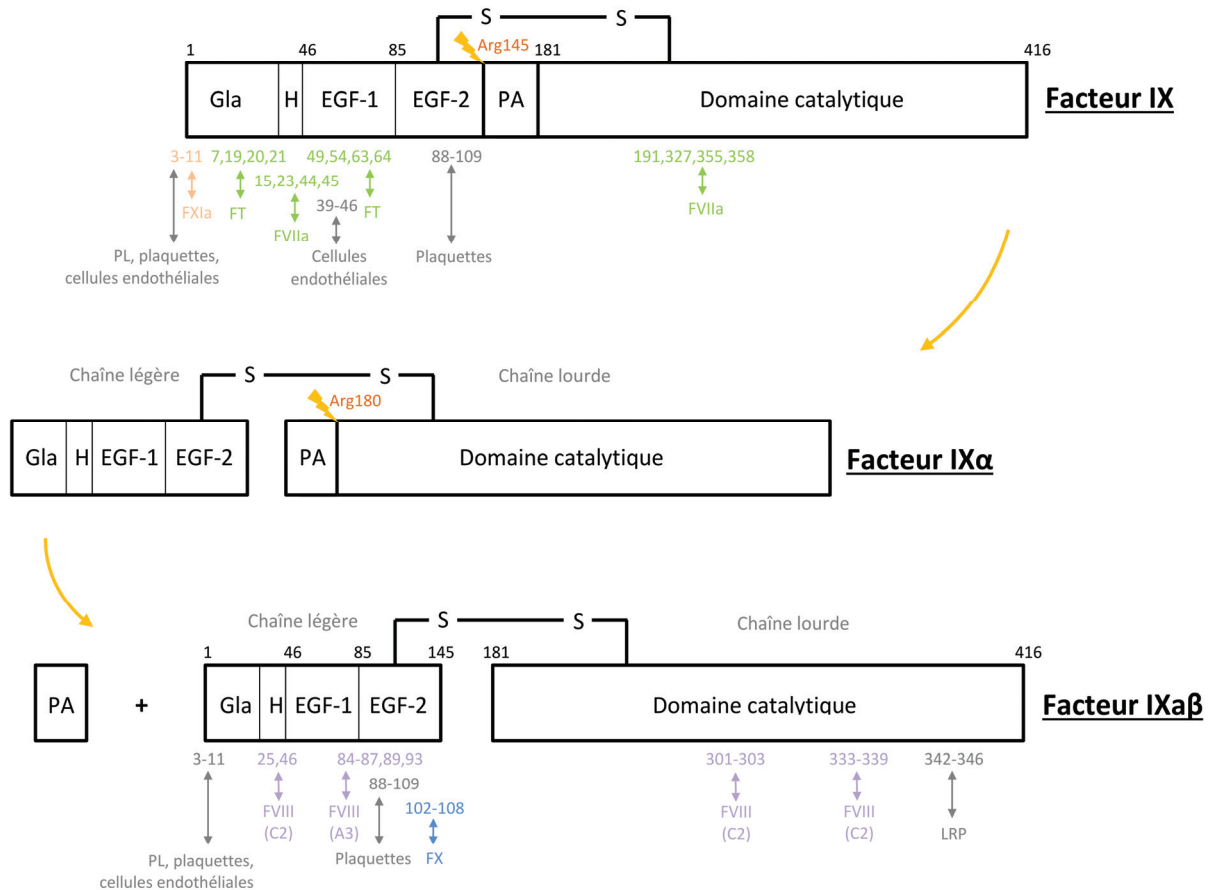


Figure 12. Activation du FIX en FIXα par clivages successifs et résidus interagissant lors de la coagulation. Gla : domaine Gla, H : zone hydrophobe, EGF : domaine EGF-like, PA : peptide d'activation, PL : phospholipides.

III.3.2.1- Activation du FIX par le complexe *tenase* extrinsèque

Le complexe *tenase* extrinsèque (ou complexe FVIIa-FT) est le complexe initiateur de la coagulation qui permet, en présence d'ions Ca^{2+} et d'une surface phospholipidique riche en phosphatidylsérines, l'activation du FX et du FIX. C'est pour cette raison que les études sur l'activation du FIX par ce complexe porte également sur celle du FX en parallèle [122–126].

Le domaine EGF-1 du FIX a d'abord été décrit comme nécessaire dans l'activation du FIX par le complexe FVIIa-FT [127] puis plus précisément comme possédant un motif obligatoire dans la reconnaissance pour le FT au sein du complexe FVIIa-FT [125]. Récemment les interfaces du FIX avec chaque protéine du complexe ont été modélisées [122]. Il apparaît que les résidus D49, N54, K63 et D64 du domaine EGF-1 du FIX interagissent avec la chaîne latérale du FT.

Le domaine Gla du FIX interagit quant à lui avec la partie C-terminale du FT mais aussi avec le domaine Gla du FVIIa [128,129]. Les résidus Gla15, C23, Q44, Y45 du domaine Gla du FIX forment des ponts hydrogènes avec le FT tandis que les résidus Gla7, M19, Gla20 et Gla21 du FIX interagissent avec le domaine Gla du FVIIa [122].

Les résidus Q191, R327, E355 et R358 du domaine catalytique du FIX viennent compléter l'interaction avec le FVIIa [122]. Cependant, les domaines EGF-1 et Gla sont les premiers déterminants dans la reconnaissance avec le complexe FVIIa-FT et dans la formation du complexe ternaire qui en découle. Les séquences qui doivent être clivées se rapprochent alors du site actif du FVIIa, ce qui induit une poche oxyanionique indispensable pour une protéolyse efficace. Le premier clivage entre les résidus Arg145 et Ala146 est plus efficace que le second clivage après le résidu Arg180, cette différence d'efficacité se traduit par une accumulation de la forme FIX α lors de l'activation par FVIIa. Enfin, on notera que tous ces mécanismes de reconnaissance entre le FIX (ou le FX) et le complexe FVIIa-TF permettent une sélectivité de l'activation du FIX (ou du FX) parmi toutes les protéines présentes sur le lieu de la coagulation.

III.3.2.2- Activation du FIX par le FXIa

De par sa structure, le FXIa se distingue de la majorité des facteurs de la coagulation. Le FXIa est une sérine protéase qui ne possède pas de domaine Gla, elle ne présente donc pas de sites de fixation aux phospholipides via les ions Ca²⁺. Il s'agit d'un homodimère dont chaque sous-unité présente un domaine catalytique de type *trypsin-like* et quatre domaines *apple* (A1 à A4). Au sein du FXIa, la séquence et la conformation des résidus N-terminaux et C-terminaux du domaine A3 forment un exosite de liaison pour la boucle Ω du FIX [130]. Cette boucle est formée par les résidus 4 à 11 au sein du domaine Gla du FIX.

Une fois le FIX fixé au domaine A3 du FXIa, le domaine catalytique du FXIa peut alors cliver dans un premier temps le FIX en FIX α qui va alors se détacher pour revenir se fixer au domaine A3 entraînant ainsi le second clivage générant le FIX $\alpha\beta$ final [131]. A l'inverse de l'activation par le FVIIa-FT, le second clivage par le FXIa est bien plus efficace que le premier, évitant ainsi l'accumulation du FIX α lors de la réaction d'activation. Cette meilleure efficacité n'est pas due à la structure en dimère du FXIa [132] mais potentiellement à la fixation simultanée de FIX et de FIX α sur le domaine A3 via des ions Ca²⁺ [131]. Cependant, l'organisation en dimère des deux sous-unités reliées par un pont disulfure permet la reconnaissance du FIX [133]. Elle serait également impliquée dans la liaison au FXIIa (qui active le FXI) ou permettrait de fixer une sous-unité à une surface et l'autre sous-unité au substrat [134].

Enfin, les mécanismes d'interaction du FIX avec le FXIa ne sont pas connus avec autant de précisions que l'interaction avec le complexe FVIIa-FT. Cependant, cette année une étude a émis une hypothèse pouvant préciser ce mécanisme. Lorsque le FXI est activé, le domaine N-terminal du domaine A3 forme une crête chargée à proximité d'une zone hydrophobe. Par ailleurs, l'interaction du FIX et du FXIa est rendue possible par la liaison de la boucle Ω en présence d'ions Ca²⁺. Cette boucle du

domaine Gla du FIX est connue pour être impliquée dans la liaison aux phospholipides membranaires, liaison qui requiert des zones chargées et une zone hydrophobe. Ce motif serait finalement le même que sur le domaine A3 du FXI qui serait donc en compétition avec les phospholipides pour la fixation du FIX. Cette hypothèse est actuellement en cours de vérification via des expériences d'interactions protéine-protéine par la technique de résonance des plasmons de surface [134].

Concernant l'interaction FIX/FXIa, c'est une mutation du FXI décrite chez un patient [135] qui a récemment permis d'affiner la connaissance du site de liaison du FIX sur le FXIa. En caractérisant des rFXI mutés sur le résidu Arg184, il a été possible de montrer l'implication de cet acide aminé du domaine A3 dans la fixation au FIX lors de son activation.

III.3.3- Formation du complexe tenase intrinsèque

Les activations du FIX en FIXa et du FVIII en FVIIIa permettent des modifications de conformation des protéines qui sont primordiales pour leur rôle dans la suite de la coagulation. Les modifications au sein du FIXa vont lui permettre dans un premier temps de se lier à son cofacteur, le FVIIIa, qui améliore la vitesse catalytique du FIXa lors de l'activation du FX dans un second temps. La majorité de ces modifications conformationnelles du FIXa et du FVIIIa permettent une orientation optimale des protéines avec l'exposition en surface des différents sites de liaison. La description progressive des nombreux sites du FIXa et du FVIIIa impliqués dans cette interaction a été réalisée grâce à un ensemble d'études complémentaires. Des études de modélisations proposant des modèles de structure tertiaire [136,137], l'analyse des mutations lors d'hémophilies A et B, l'introduction de mutations par mutagénèse [138–140] ou enfin des expériences d'inhibition par des peptides synthétiques [141] ont permis de décrire avec précision les sites d'interaction du FIXa et du FVIIIa au cours de ces trois dernières décennies. Ces études définissent les domaines A2, A3 et C2 du FVIIIa comme étant impliqués dans la fixation à divers sites du FIXa. Le FVIII, lorsqu'il est activé par la thrombine, perd son domaine B et présente une chaîne légère composée des domaines C1 et C2 et une chaîne lourde formée des domaines A1, A2 et A3. La structure primaire du FVIIIa est présentée dans la Figure 13. L'évolution de la description des interactions au sein du complexe au cours de ces dernières années est présentée dans la Figure 14.

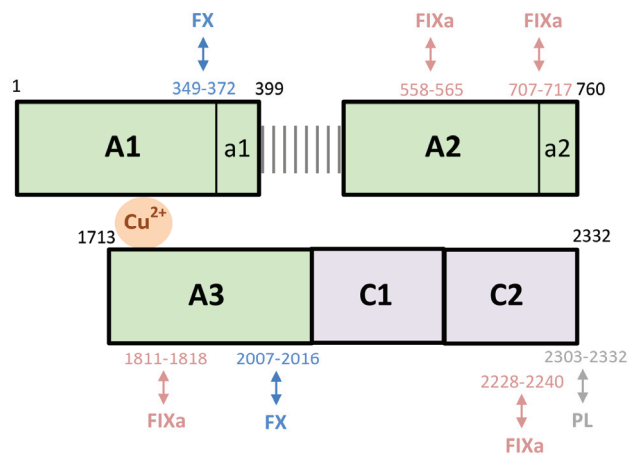


Figure 13. Structure du FVIIIa après clivage par la thrombine et résidus impliqués dans la formation du complexe *tenase* intrinsèque. Les domaines A1 et A2 sont reliés par des interactions électrostatiques tandis que les domaines A1 et A3 maintiennent les chaînes lourdes et légères ensemble grâce à une liaison faisant intervenir un ion Cu²⁺.

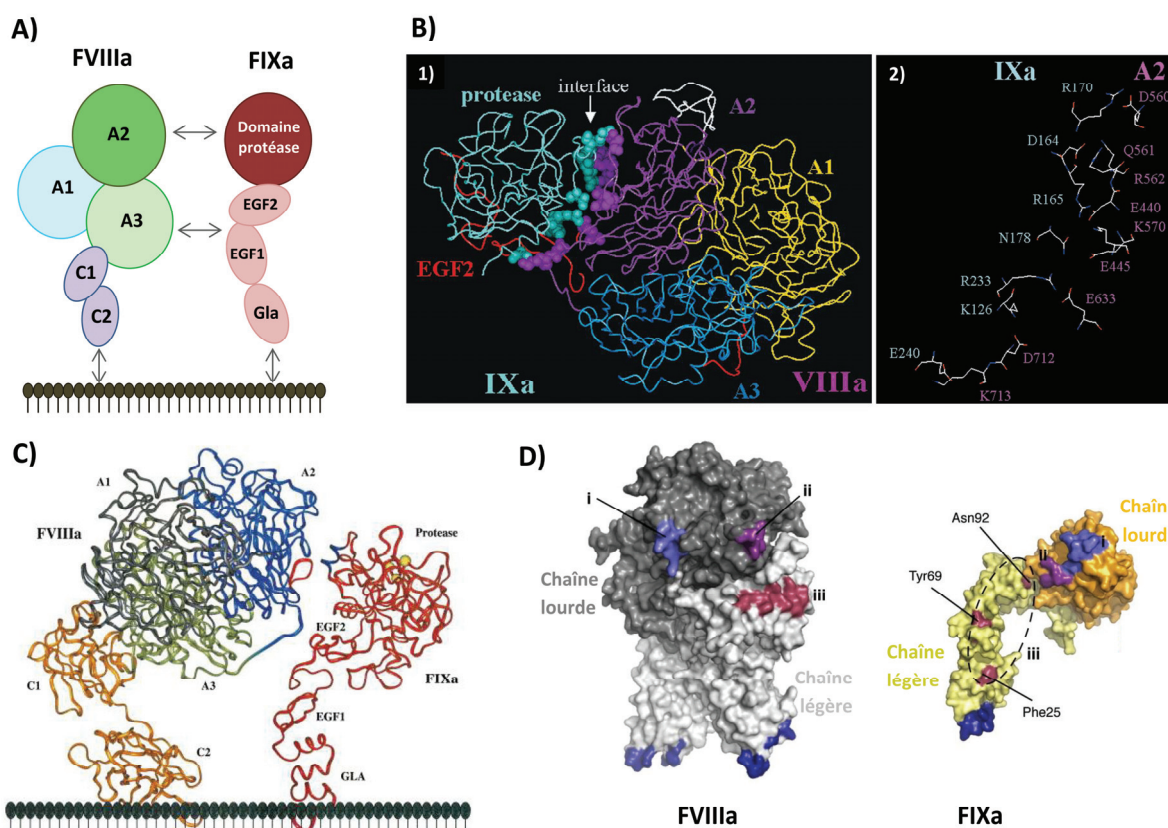


Figure 14. Evolution de la représentation des interactions FIXa/FVIIIa.

A : Représentation des interactions FIXa/FVIIIa d'après Mertens et al., 1999 [142].

B : Modèle de l'interface entre le domaine protéase du FIXa et le domaine A2 du FVIIIa, d'après Bajaj et al., 2001 [136].

B1 : Représentation schématique en rubans du modèle de l'interface ; **B2 :** interface détaillée avec les résidus impliqués ; le système de numérotation de la chymotrypsine a été utilisé pour le FIXa, les résidus correspondant sont les suivants : R338(c170), D332(c164), R333(c165), N346(c178), R403(c233), K293(c126) et E410(c240).

C : Représentation du FIXa et du FVIIIa, d'après Fay, 2004 [20]. Le FVIIIa et le FIXa sont représentés en format rubans comme associés aux phospholipides.

D : Modèle de l'interface d'après Ngo et al., 2008 [137].

La formation du complexe *tenase* intrinsèque inclut la fixation du FIXa au FVIIIa sur une surface membranaire riche en phosphatidylsérines chargées négativement et en présence d'ions Ca^{2+} . Les interactions des protéines avec les phospholipides permettent de regrouper les protéines de la coagulation augmentant ainsi leur chance d'interagir entre elles. Les résidus 3 à 11 du domaine Gla du FIXa lient les phospholipides membranaires de façon non covalente [143] tandis que le domaine C2 du FVIIIa réalise la même liaison mais avec une plus grande affinité [144,145].

Avant de considérer la liaison FIXa/FVIIIa proprement dite, il est important de noter que certaines interactions au sein de chaque protéine sont nécessaires à l'assemblage du complexe. Ainsi, il a été démontré, par la création de mutants, que la liaison du domaine EGF-2 et du domaine catalytique via des ponts hydrogène entre les résidus Asp92/Tyr295 et Phe98/Phe299 était non seulement indispensable à l'activité enzymatique mais aussi à l'assemblage du complexe [140]. De plus, le pont Na^+ entre les résidus Arg94 et Glu78 au sein du domaine EGF-1 participe au maintien de la structure du FIXa et a été décrit comme critique pour la liaison au FVIIIa [146]. Au sein de la structure tertiaire, ce pont Na^+ est lui-même soutenu par le *linker* E84-T87 situé entre les domaines EGF-1 et EGF-2 [138] dont les divers rôles (directs et indirects) seront énumérés au cours de ce paragraphe.

L'interaction FIXa/FVIIIa la plus proche de la surface phospholipidique fait intervenir le domaine Gla du FIXa et le domaine C2 du FVIIIa, les sites de liaison concernés étant respectivement les résidus Val46 et Phe25 d'une part [147] et la séquence 2228-2240 d'autre part [148]. Chacun des sites est connu pour être impliqué dans l'interaction entre les protéines mais aucune étude ne montre directement une liaison entre les résidus. Cependant, l'implication de ces deux domaines dans la fixation aux phospholipides leur conférant une proximité spatiale permet d'émettre une hypothèse solide quant à leur interaction. Le rôle principal impliqué ici n'est pas tant la fixation des protéines entre elles mais surtout une propagation générale de la coagulation accompagnée de l'expansion physiologique du caillot [149].

Légèrement plus éloignées de la membrane phospholipidique, les interactions entre les domaines EGF-1/EGF-2 et le domaine A3 jouent un rôle principal dans la fixation FIXa/FVIIIa. C'est la liaison qui présente la plus forte affinité dans la formation du complexe, et les interactions impliquées y sont complexes. Le *linker* E84-T87 des domaines EGF-1 et EGF-2 y joue un rôle direct de par la fixation au domaine A3 mais aussi un rôle indirect en maintenant la structure et l'orientation des domaines Gla et EGF-1 [138]. Une étude utilisant une méthode de criblage des mutations dans la première boucle du domaine EGF-2 (résidus 89 à 94) a permis d'identifier le rôle majeur du résidu Asn89 qui interagit directement avec le domaine A3 par la formation de ponts hydrogène [139]. L'étude des différentes mutations a souligné le rôle important de résidus proches dans le soutien sous-jacent du

résidu Asn89. Parmi ces résidus, on trouve Asn92 qui forme des ponts hydrogènes avec Glu97 (en plus de son interaction avec Tyr295 du domaine catalytique), le résidu Gly93 et le résidu Val107. Ce dernier résidu est compris dans la boucle 102-108 impliquée dans la liaison au FX, le résidu Val107 se distingue de par sa position proximale à la zone hydrophobe entre les domaines EGF-1 et EGF-2 et en renforçant le soutien de cette structure. Des mutations au niveau des résidus Asn92, Gly93 et Glu97 ont été décrites chez 47 patients hémophiles B avec une grande proportion d'hémophiles B sévères [47], montrant ainsi l'importance de ces trois résidus. De plus, les deux régions du *linker* E84-T87 et de la séquence 89-93 ne sont pas conservées chez d'autres facteurs de la coagulation tels que le FX ou le FVII. Le *linker* s'avère être beaucoup plus court chez le FIX permettant ainsi plus de contacts entre les domaines EGF [138]. Enfin, les résidus du domaine A3 connus pour être impliqués dans cette liaison font partie de la séquence 1811-1818 du FVIIIa et sont responsables de la forte affinité [141].

Enfin, la liaison entre le domaine protéasique du FIXa et le domaine A2 du FVIIIa est la plus distante des phospholipides. C'est également celle qui présente le moins d'affinité mais elle n'en demeure pas moins importante. En effet, cette liaison permet de moduler le site actif du domaine catalytique du FIXa, c'est elle qui définit vraiment l'activité de cofacteur du FVIIIa [150]. Par analogie aux sites de liaison au cofacteur sur le FVIIa et par la génération de FIX mutants au niveau de l'hélice α (résidus 333-339) et au niveau de la séquence 301-303, une première étude a permis d'identifier ces zones comme impliquées dans la liaison au domaine A2 du FVIIIa [151]. Une seconde étude a ensuite permis, par modélisation de l'interface, de définir la région 558-565 du FVIIIa comme interagissant avec l'hélice α du FIXa [136]. Les résidus 707-714 du domaine A2 qui se trouvent spatialement proches de la région 558-565, interagissent quant à eux avec la région 301-303 du domaine catalytique du FIXa [152]. Que ce soit sur le FIXa ou le FVIIIa peu de mutations dans ces domaines d'interactions sont rapportées à une hémophilie A ou B [47].

La complexité et la variabilité de toutes ces interactions font qu'il n'existe pas actuellement de modèle d'interface qui soit absolument complet même si de très nets progrès ont été faits, comme l'attestent les modèles présentés dans la Figure 14. De nouveaux sites de fixation sur le FIXa ou sur le FVIIIa pourraient encore être découverts et un des intérêts se porte maintenant sur les forces électrostatiques entre les résidus dans les régions adjacentes à l'interface FIXa/FVIIIa et qui pourraient y jouer un rôle important [136]. Un autre intérêt porte quant à lui sur les méthodes de modélisation qui deviennent de plus en plus puissantes [152].

III.3.4- Activation du FX

Même si le FIXa est capable d'activer le FX sans être complexé au FVIIIa, la formation du complexe *tenase* permet d'accélérer très significativement la vitesse catalytique de l'enzyme FIXa pour son substrat FX. Ainsi la présence du cofacteur FVIIIa augmente jusqu'à 10^6 le kcat/Km du FIXa [20,23,153]. Le kcat/Km est souvent utilisé pour juger de l'efficacité enzymatique car il prend en compte à la fois la vitesse catalytique de l'enzyme (kcat) et l'affinité de l'enzyme pour son substrat (Km). Le kcat est le *turnover* de l'enzyme c'est-à-dire la fréquence à laquelle l'enzyme réalise la catalyse de son substrat en conditions saturantes en substrat. Le Km est défini comme la concentration de substrat pour laquelle la vitesse de réaction enzymatique est la moitié de la vitesse maximale de réaction.

Le FVIIIa possède un site de réception qui lui permet de présenter le FX au FIXa sur la membrane des plaquettes activées [154]. Cette interaction fait intervenir le domaine catalytique du FX et le domaine A1 du FVIIIa au niveau des résidus 349-372 [155]. Une étude plus récente montre qu'il existe également un site de fixation au FX dans la région 2007-2016 du domaine A3 du FVIIIa [156]. Les résidus Thr2012 et Phe2014 y sont décrits comme participants à la liaison au FX.

L'activité du FIXa dans la génération de FXa est une activité FVIIIa-dépendante mais aussi sous le contrôle d'un mécanisme allostérique au sein même du FIXa impliquant le *linker* entre les domaines EGF-1 et 2 et le contact entre sa chaîne légère et son domaine catalytique [138]. Ce mécanisme permet d'améliorer l'activité enzymatique sans présenter d'interaction directe avec le domaine catalytique. De plus, la boucle hydrophobe du domaine EGF-1 du FIXa est insérée dans la zone concave hydrophobe de son domaine EGF-2 via les résidus 86, 94, 107, 109 et 122 [157]. Cela permet au FIXa d'adopter une conformation optimale pour la présentation de la troisième boucle de son domaine EGF-2 (résidus 102-108) au FX [139].

Une étude a décrit une activation physiologique en deux temps du FIXa lors de la formation du complexe *tenase* intrinsèque [158]. En effet, avant la liaison du FIXa au FVIIIa et au FX, la boucle dite *loop-99* du FIXa (comprenant les résidus Tyr259 à Tyr266) se trouve dans une conformation inadéquate pour une interaction avec le substrat FX. Cette boucle est stabilisée par un pont hydrogène entre le groupement carboxyle du résidu Lys265 et le groupement hydroxyle du résidu Tyr259. De plus, le résidu Tyr345 stabilise et bloque la *loop-99* dans sa conformation inactive par une interaction entre Asn264 et Asn267. Lorsque le FVIIIa se lie à la région 333-339 du FIXa qui est proche du Tyr345, il y aurait libération de la boucle maintenue inactive par ce résidu. Le FX serait alors ensuite capable de réarranger la boucle afin de se lier au site actif du FIXa.

Une fois le FX fixé au sein du complexe *tenase* intrinsèque, le FIXa peut alors cliver le FX entre les résidus Arg194 et Ile195 [159].

Enfin, la régulation négative du complexe *tenase* est surtout contrôlée par l'altération de l'activité du FVIIIa soit par inactivation protéolytique, soit par dissociation de ses domaines [20]. Cependant, il existe également plusieurs processus permettant la régulation de l'activité du FIXa, tels qu'une protéolyse du FIX/FIXa par la plasmine [160] ou l'élastase des neutrophiles [161] ; la formation d'un complexe inhibiteur avec l'antithrombine [162] ou la protéase nexine-2 [163] ou encore par liaison du FIXa au LRP [117,120].

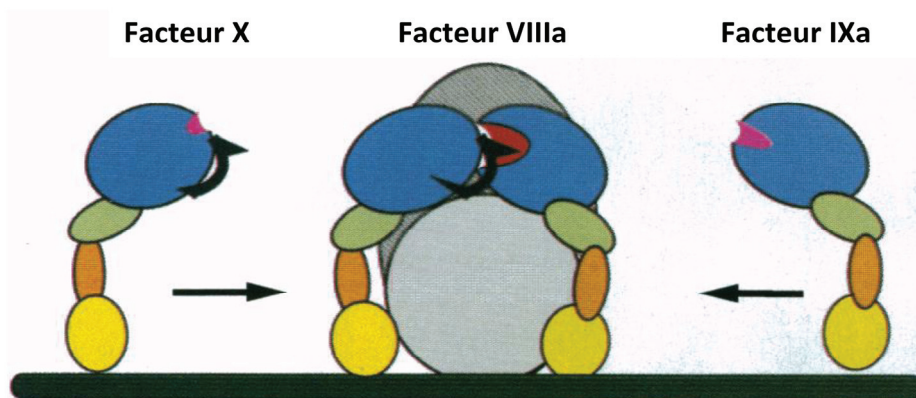


Figure 15. Représentation schématique de la formation du complexe *tenase* intrinsèque, d'après Brandstetter et al., 1995 [159].

Chapitre IV : Améliorations récentes apportées au traitement de l'hémophilie B et perspectives thérapeutiques

L'ensemble des connaissances sur la structure et la physiologie du FIX permet d'envisager de nombreux axes d'amélioration dans le traitement de l'hémophilie B. Il est encore nécessaire d'améliorer le confort des patients en réduisant la fréquence des injections intraveineuses et de réduire les coûts du traitement. Une meilleure adhésion des patients à leur traitement en diminuant la fréquence des injections met en jeu l'allongement de la demi-vie du FIX ainsi que le développement de nouveaux schémas thérapeutiques. La réduction du coût des injections passe quant à elle par une meilleure activité pro-coagulante du traitement. Cette amélioration peut être obtenue par différentes stratégies comme le développement d'un rFIX d'activité augmentée ou par l'utilisation d'agents ciblant les inhibiteurs de la coagulation. De plus, une production et une sécrétion optimisée du rFIX sont également à prendre en compte pour rendre les concentrés de rFIX commerciaux plus abordables. La thérapie génique est une perspective thérapeutique très intéressante car elle pourrait changer radicalement la vie des patients pendant plusieurs années. En effet, cette stratégie présente le potentiel de pouvoir soigner l'hémophilie sur le long terme. Enfin, les perspectives de traitement des patients ayant développés des inhibiteurs visent surtout à réduire l'immunogénicité des concentrés injectés.

Après des périodes de recherches *in vitro* et *in vivo* plus ou moins longues, le développement d'une nouvelle thérapeutique passe obligatoirement par des essais précliniques et cliniques dans le but d'obtenir une autorisation de mise sur le marché (AMM) accordée par les autorités compétentes. En France, les AMM sont octroyées par l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM). Pour une commercialisation des produits dans l'ensemble des pays européens, les AMM sont accordées par la Commission Européenne après un avis de l'Agence Européenne du Médicament (EMA). Les essais précliniques sont effectués chez les animaux afin de déterminer l'activité, le mécanisme d'action ou encore la toxicité de la protéine étudiée. Les essais cliniques pré-AMM sont réalisés chez l'Homme et se divisent en trois phases différentes : phases I, IIa-IIb et III. La phase I permet d'évaluer la tolérance, la dose maximale sans effets indésirables et de déterminer les premières données de pharmacocinétique. Elle est généralement réalisée chez des sujets sains mais dans le cas de l'hémophilie, les sujets « sains » sont souvent en réalité des patients hémophiles qui ne présentent pas d'épisodes hémorragiques et qui ne reçoivent pas de traitement en dehors du rFIX testé. La phase IIa a lieu chez cette même catégorie de patients et permet principalement de déterminer la dose optimale et les interactions par administration unique ou répétée. Cette phase

est d'abord effectuée sur un petit effectif de sujets « sains » puis sur une population de « patients » (phase IIb). Dans le cas de l'hémophilie, ces derniers sont des patients qui reçoivent la protéine testée dans le cadre du traitement des saignements en prophylaxie ou à la demande. La phase III démontre l'intérêt du médicament à plus grande échelle en le comparant au traitement de référence. Enfin les essais cliniques post-AMM correspondent à la phase IV qui consiste à effectuer le suivi d'un médicament à long terme. Elle permet de détecter les effets indésirables ou les complications tardives associées au traitement.

IV.1- Améliorations récentes concernant l'allongement de la demi-vie du facteur IX

La demi-vie du FIX chez l'Homme est d'environ 18-24h, ce qui nécessite des injections de concentrés deux à trois fois par semaine lors d'une prophylaxie. Il existe un réel besoin d'améliorer les constantes pharmacocinétiques en générant des rFIX à demi-vie allongée. De telles molécules permettraient d'espacer les injections lors des prophylaxies ou des traitements à la demande. Plusieurs stratégies d'allongement de la demi-vie du FIX ont été envisagées et de nombreuses études présentent des essais cliniques concluants.

IV.1.1- La PEGylation

IV.1.1.1- Principe de la PEGylation

La PEGylation consiste à lier des molécules de polyéthylène glycol (PEG) de façon covalente à une protéine et vise à améliorer ses propriétés pharmacocinétiques. Les molécules de PEG sont des polyéthers hydrosolubles de tailles et de poids moléculaires très variables qui permettent d'augmenter significativement la taille de la protéine sur laquelle elles sont fixées. La fixation de PEG présente deux effets intéressants : la réduction de la clairance totale et de l'immunogénicité de la protéine. La réduction de la clairance totale est due à une diminution de la clairance rénale et de la diffusion transmembranaire résultant d'une taille plus importante de la protéine. Elle est également liée au fait que les PEG créent un encombrement stérique qui protège la protéine des dégradations protéolytiques. Les protéines PEGylées n'entraînent généralement pas de réaction immunogène et les PEG permettent même de masquer certains épitopes de la protéine et ainsi de réduire son immunogénicité [164].

La première protéine PEGylée à avoir été commercialisée est la PEG-adénosine désaminase dans le cadre du traitement du déficit immunitaire combiné sévère (DICS). Sa commercialisation par la société Enzon fut autorisée en 1990.

Les premières techniques de PEGylation consistaient en la fixation aléatoire de molécules de PEG de petite taille (inférieure à 5kDa) qui entraînait la production de protéines PEGylées aléatoirement.

Néanmoins, cette stratégie pouvait causer la fixation de PEG sur les sites de reconnaissance des cofacteurs ou les sites actifs des protéines et ainsi diminuer leur activité. Une nouvelle approche consiste maintenant à fixer de plus longues molécules de PEG en ciblant un ou deux sites de fixations spécifiques afin de ne pas gêner l'activité des protéines [164].

IV.1.1.2- Le rFIX PEGylé

Le N9-GP est le nom provisoire du rFIX à demi-vie allongée qui est en cours de développement par le laboratoire Novo Nordisk™. Il s'agit d'un rFIX glycoPEGylé par la fixation d'un ou de deux PEG de plus de 40 kDa sur deux résidus N-glycanes du peptide d'activation du FIX. Les résidus Asn157 et Asn167 portant des complexes N-glycanes avec des acides sialiques terminaux ont été décrits comme étant les seuls à subir cette modification post-traductionnelle dans le paragraphe *III.2.1.1- Synthèse dans le réticulum endoplasmique rugueux et premières modifications* à la page 53 du manuscrit. Ces deux résidus sont donc les seuls à pouvoir lier un acide sialique couplé au PEG de 40 kDa par remplacement enzymatique de leurs acides sialiques terminaux. Hormis ces deux glycoPEGylations, le N9-GP présente la même séquence protéique que le Benefix® et il est produit par la même lignée cellulaire CHO, il a donc la même structure primaire. La plupart des N9-GP (80%) sont sécrétés sous forme mono-glycoPEGylée sans préférence pour l'un ou l'autre des résidus Asn [165,166]. Dans une étude préclinique publiée en 2011 [166], les propriétés pharmacocinétiques de la molécule de N9-GP ont été déterminées chez la souris HB, le mini-porc et chez les chiens HB où les demi-vie observées étaient respectivement de 41, 76 et 156 heures en comparaison à une demi-vie moyenne du rFIX de 19 heures. Elle est alors entrée en essais cliniques chez l'Homme. Lors des essais de phase I, la demi-vie du N9-GP était de 93 heures soit cinq fois plus que celle du Benefix® [165]. La récupération incrémentielle du N9-GP observée lors des profils pharmacocinétiques était 94% et 20% plus haute que celles du rFIX et du pdFIX, respectivement. Les profils des activités plasmatiques observés sur une période de 170 heures et obtenus lors de cette même étude sont présentés sur la Figure 16.

Enfin, les premières conclusions quant aux résultats des essais cliniques de phase III devraient être publiées d'ici la fin de cette année [167].

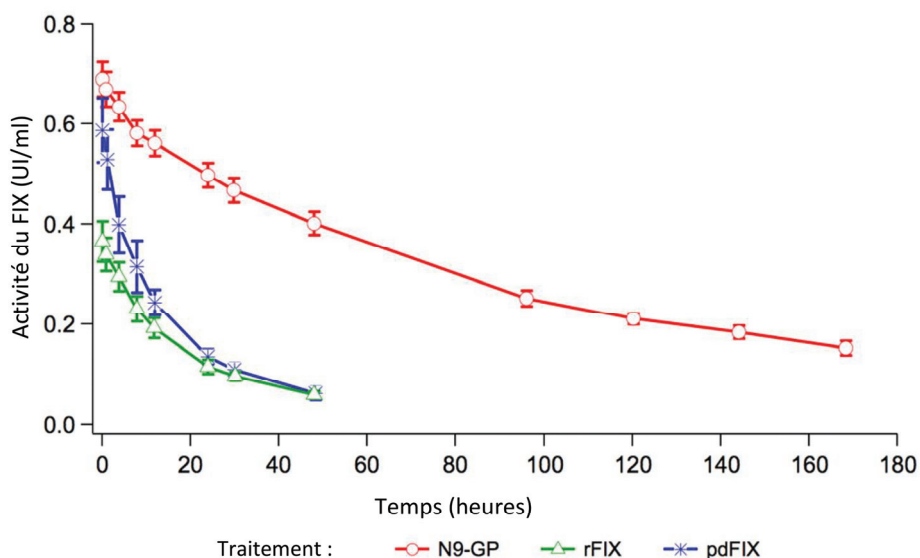


Figure 16. Profils des activités plasmatiques lors des essais cliniques de phase I du rFIX PEGylé (N9-GP), d'après Négrier et al., 2011 [165].

IV.1.1.3- Les liposomes PEGylés

La liaison non covalente des facteurs de coagulation à des liposomes PEGylés était une perspective d'allongement de la demi-vie intéressante. En effet, cette technique n'impliquait pas de modification dans la structure tertiaire et ainsi pas de perte d'efficacité dans les interactions protéine-protéine. Cette technique a été expérimentée sur le FVIII recombinant (rFVIII) et a présenté des essais précliniques concluants avec une demi-vie augmentée 1,5 fois [168]. Cependant, malgré des essais de phases I probants, ceux de phase II ont dû être stoppés du fait d'un manque d'efficacité du complexe rFVIII-Liposome PEGylé. En effet, les patients présentaient plus de 9 saignements par an. Ce chiffre était le premier point limite de l'expérimentation à ne pas dépasser. Ce manque d'efficacité serait dû à une différence entre les microparticules de liposome humaines et murines [167]. Malgré des intérêts attractifs, la conjugaison à des liposomes PEGylés ne sera vraisemblablement pas retenue à l'avenir concernant les recherches sur l'allongement de la demi-vie du FIX.

IV.1.2- Protéines de fusion

Une autre stratégie pour augmenter la demi-vie plasmatique du FIX est de le fusionner de façon covalente à des protéines qui présentent une demi-vie bien plus grande.

La longue demi-vie des molécules sériques telles que les IgG (Immunoglobulines G) et leur aptitude à traverser la barrière materno-fœtale a été attribuée à un récepteur spécifique de la portion Fc, appelé FcRn (*Neonatal Fc Receptor*). La résolution de sa structure a permis de l'identifier comme une

molécule apparentée au complexe majeur d'histocompatibilité de classe I, capable de prendre en charge les IgG et l'albumine grâce à des liaisons dépendantes du pH. Le FcRn assure à la fois des fonctions de recyclage permettant aux IgG et à l'albumine d'échapper au catabolisme endothélial, de transcytose favorisant la bio-distribution des IgG dans l'organisme et sans doute de coopération lors de la phagocytose. Le mécanisme permettant le recyclage des IgG et de l'albumine est représenté dans la Figure 17. Les cellules endothéliales captent les protéines du sang par un processus d'internalisation, la pinocytose qui permet le transport non spécifique des protéines dans les cellules. Les endosomes formés lors de la pinocytose s'acidifient puis transmettent les protéines à dégrader aux lysosomes. L'acidification de l'endosome permet la liaison de l'albumine ou du fragment Fc aux récepteurs FcRn, cette liaison étant impossible à pH neutre. Ces protéines ne passent donc pas dans le lysosome et sont protégées de la protéolyse. Elles sont ensuite externalisées dans la circulation à pH physiologique. Ce mécanisme explique ainsi la plus grande demi-vie des IgG par rapport à d'autres anticorps [169,170].

La connaissance de ce mécanisme a entraîné le développement de nouvelles protéines de fusion dans le but d'allonger leur demi-vie. Après le succès de nombreuses thérapies impliquant une fusion, plusieurs rFIX fusionnés sont maintenant en cours d'essais cliniques ou précliniques.

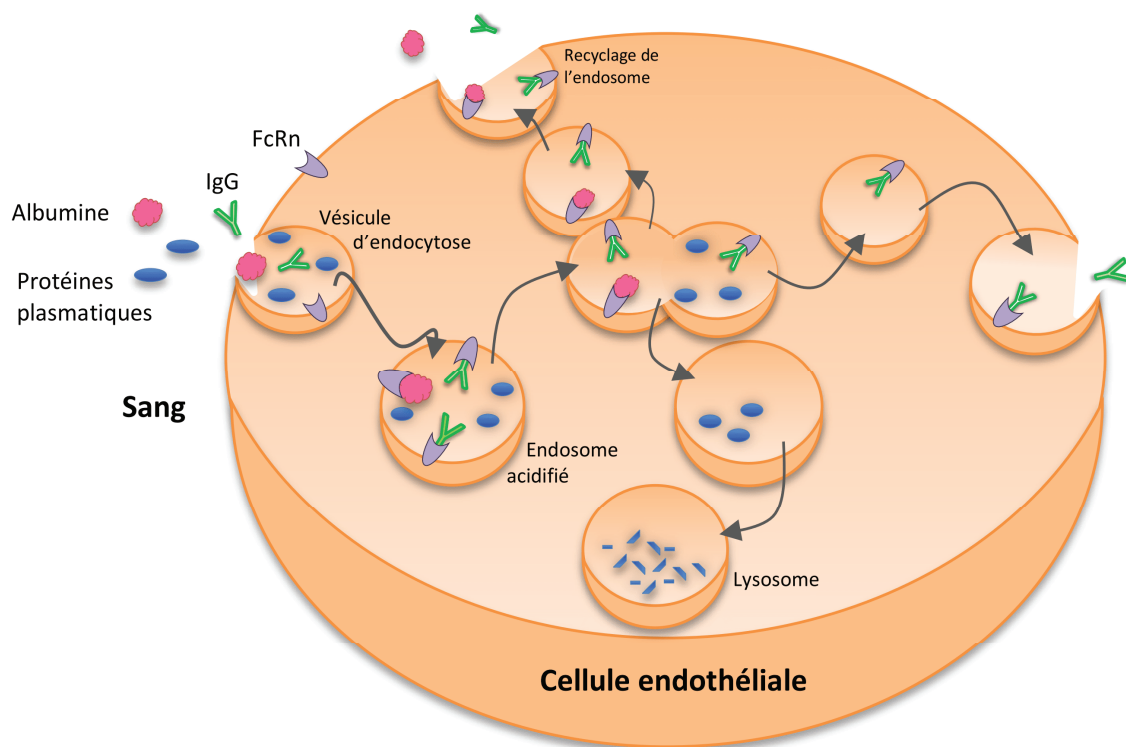


Figure 17. Représentation du mécanisme de recyclage pH-dépendant de l'albumine et de l'IgG plasmatisques par liaison au récepteur FcRn. Les protéines plasmatisques qui n'ont pas de sites de fixation au FcRn sont dégradées par le lysosome.

IV.1.2.1- La protéine de fusion rFIX-Fc

Les molécules Etanercept et Romiplostim font partie des premières protéines fusionnées au fragment Fc de l'IgG et qui sont actuellement commercialisées. Etanercept est une protéine de fusion avec la fraction P75 du récepteur soluble du TNF α qui permet une inhibition compétitive du récepteur [171]. Elle est utilisée dans le traitement de certaines maladies auto-immunes. Le Romiplostim intervient quant à lui dans le traitement de la thrombocytopénie. C'est une protéine de fusion entre le fragment Fc et une chaîne peptidique qui a la capacité de se lier sur le récepteur de la thrombopoïétine (TPO), qui stimule normalement la formation des plaquettes [172]. Cette molécule a obtenu une AMM pour le marché européen en 2010.

En parallèle de ces succès, des études sur une protéine de fusion du fragment Fc avec le rFIX ont été entreprises. Le rFIX-Fc généré par la société Biogen™ est représenté dans la Figure 18. Le rFIX-Fc est sécrété par les cellules d'embryon humain immortalisées HEK 293 (*Human Embryonic Kidney 293*). La partie C-terminale du rFIX est fusionnée à la partie N-terminale du fragment Fc. Ce monomère est lié à un deuxième monomère de Fc par un pont disulfure qui se forme lors de la synthèse et de la sécrétion de la protéine [173,174]. L'étude préclinique publiée en 2010 a été menée sur des souris, des rats et des singes sains puis sur des souris et des chiens hémophiles B et enfin sur des souris déficientes en récepteur FcRn [173]. Après injection en IV, les concentrations en rFIX et en rFIX-Fc ont été dosées chez toutes les espèces et les activités ont été déterminées dans les lignées hémophiles B. Cette étude présente une augmentation de la demi-vie du rFIX-Fc 3 à 4 fois selon les espèces. De plus, les expériences menées sur les souris déficientes en FcRn montrent une demi-vie similaire du rFIX et du rFIX-Fc. Ce dernier résultat prouve l'implication de l'interaction rFIX-Fc/FcRn dans l'allongement de la demi-vie observé, le fragment Fc ayant une demi-vie de trois semaines. L'étude émet également l'hypothèse que cette amélioration serait en partie due aux meilleures modifications post-traductionnelles réalisées par la lignée cellulaire HEK 293. Enfin, une clairance rénale plus lente du fait de l'augmentation de la taille du rFIX participerait également à l'allongement de la demi-vie [175].

Les essais cliniques de phases I et IIa réalisés ensuite chez des hémophiles B modérés ou sévères ont montrés des résultats encourageants [174]. L'étude n'a pas rapporté de développement d'inhibiteurs, la demi-vie observée était de 56,7 heures ce qui est trois fois plus long que la demi-vie du Benefix® et le taux de récupération était similaire à celui du pdFIX. Lors des essais de phase III (NCT01027364), le rFIX-Fc a présenté un allongement de la demi-vie de 82 heures par rapport au rFIX [176]. Une prophylaxie à hauteur d'une injection de rFIX-Fc hebdomadaire ou toutes les deux semaines a permis d'observer des taux faibles d'hémorragie chaque année chez les patients atteints d'hémophilie B. De plus, une autre étude montre une bonne efficacité du rFIX-Fc lors d'interventions

chirurgicales [177]. La molécule est maintenant commercialisée sous le nom d'ALPROLIX™ aux Etats-Unis, au Japon, en Australie et au Canada. Ce nouveau FIX à demi-vie allongée permet de réduire la fréquence des injections et ainsi d'améliorer non seulement l'adhésion des patients à leur traitement mais surtout leur qualité de vie.

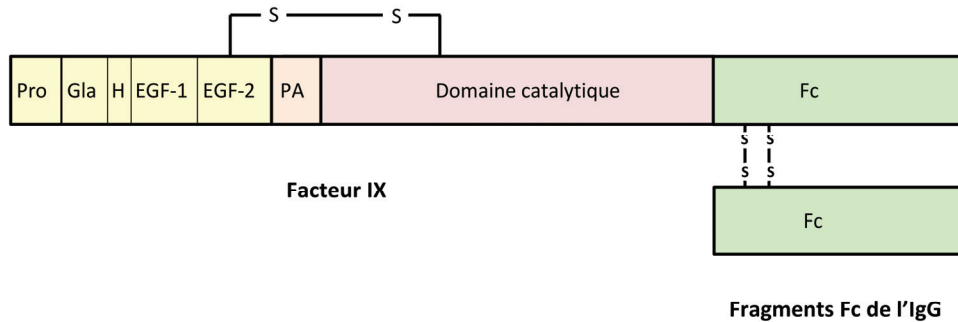


Figure 18. Représentation de la protéine de fusion rFIX-Fc. Pro : propeptide, Gla : domaine Gla, H : zone hydrophobe, PA : peptide d'activation.

IV.1.2.2- La protéine de fusion rFIX-FP

Connaissant la demi-vie de 20 jours de l'albumine et son mécanisme de recyclage supposé, la doxorubicine recombinante capable de se coupler à l'albumine est entrée en essais cliniques en 2007 [178]. L'aldoxorubicine est une molécule de doxorubicine couplée à un *linker* capable de lier l'albumine plasmatique lorsqu'elle est injectée en IV (intraveineuse). L'albumine permet ici de protéger et de transporter la protéine thérapeutique sur le lieu de la tumeur. L'environnement de la tumeur étant acide, l'albumine se détache et ainsi elle ne gêne pas l'activité de la protéine.

Après avoir caractérisé une protéine de fusion entre l'hirudine et l'albumine produite par la levure *Pichia pastoris* 2001 [179], une équipe canadienne a publié trois ans plus tard une étude préclinique sur le premier rFIX fusionné [180]. Dans cette étude, la protéine de fusion entre le rFIX et l'albumine possédait un *linker* non clivable entre les deux entités moléculaire. La protéine de fusion ainsi structurée et produite par la lignée HEK 293 présentait une augmentation de la demi-vie d'un facteur 3 chez la souris. Cependant, l'activité spécifique du FIX était diminuée de 50 à 70 % du fait de l'encombrement de l'albumine qui gênait les interactions du FIX avec ses partenaires.

En 2009, la société CSL Behring™ a publié une étude qui reprend le principe de cette chimère en produisant des protéines de fusion rFIX-FP avec des *linkers* possédant ou non un site de clivage par le FXIa ou par le complexe FVIIa-FT (Figure 19) [181]. L'étude compara également les protéines de fusion produites en cellules HEK 293 ou en cellules CHO. Les caractéristiques des constructions et les

résultats obtenus lors de l'étude sont présentés dans le Tableau 4. Le rFIX-FP permettait une amélioration significative de la demi-vie chez la souris hémophile B, le rat ou le lapin. De plus, le clivage de l'albumine lors de l'activation du FIX permettait d'augmenter considérablement l'activité observée par comparaison avec un rFIX-FP non clivable. Cependant, cette activité restait plus faible que celle observée avec les FIX commerciaux. Des résultats plus encourageants, en terme d'activité, obtenus chez le chien hémophile B et le singe [182] ont conduits au développement d'essais cliniques de phase I du rFIX-FP produit par la lignée cellulaire CHO [183]. La demi-vie du rFIX-FP était alors 5,3 fois plus élevée que celle du rFIX et une nette prolongation de l'activité était observée. Les taux d'activité du rFIX-FP comparés à ceux du rFIX et du pdFIX obtenus lors de cet essai sont reportés dans la Figure 20. Une étude plus récente publiant les résultats préliminaires d'essais cliniques de phase I et II du rFIX-FP confirme l'amélioration des paramètres pharmacocinétiques [184]. Enfin, des essais cliniques internationaux de phases II et III (NCT01496274) sont actuellement en train d'évaluer la sécurité et l'efficacité du rFIX-FP lors de prophylaxies à raison d'une injection par semaine ou de traitements à la demande chez des patients hémophiles B sévères [185].

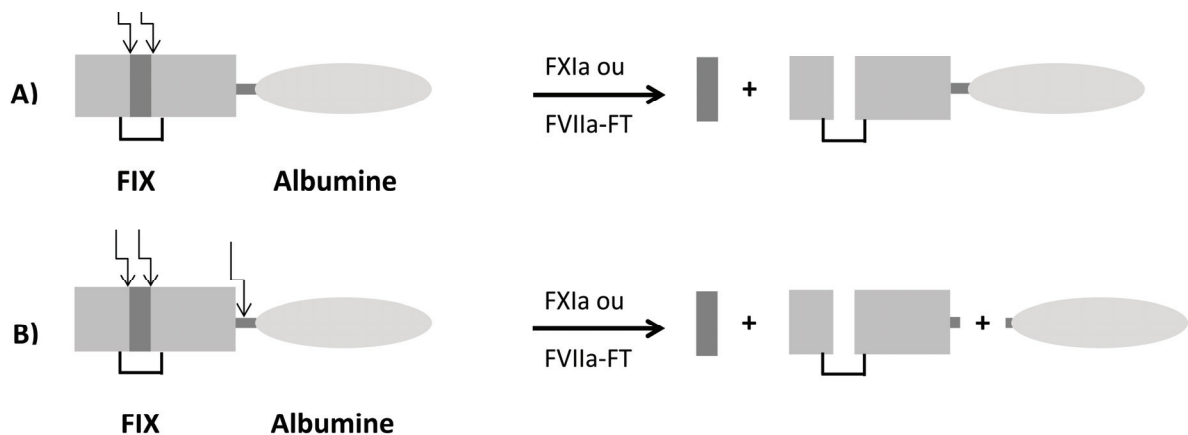


Figure 19. Concept de la protéine de fusion rFIX-FP possédant un *linker* non clivable (A) ou un *linker* clivable (B) lors de son activation par le FXIa ou le complexe FVIIa-FT lors du processus de coagulation. D'après Metzner et al., 2009 [181].

Facteur IX	Linker	Séquence du linker	Cellules	Activité (UI/nmol)	Demi-vie (heures)		
					Souris HB	Lapins	Rats
rFIX (Benefix®)	-	-	CHO	14.4	12.85	9.14	5.13
pdFIX (Mononine®)	-	-	-	11.2	-	-	4.43
rFIX-FP/ncl1	Non clivable	(G) ₆ V	HEK	0.2	-	-	14.8
rFIX-FP/ncl2	Non clivable	SS (GGS) ₇ GS	HEK	0.7	-	-	-
rFIX-FP/cl1 (HEK)	Clivable	SVSQTSKLTRA ETVFPDVGGS	HEK	5	15.01	29.6	17.4
rFIX-FP/cl1 (CHO)	Clivable	SVSQTSKLTRA ETVFPDVGGS	CHO	6.7	-	36.2	24.1

Tableau 4. Les différentes caractéristiques des rFIX-FP en fonction du linker et du type cellulaire choisi, d'après Metzner et al., 2009 [181].

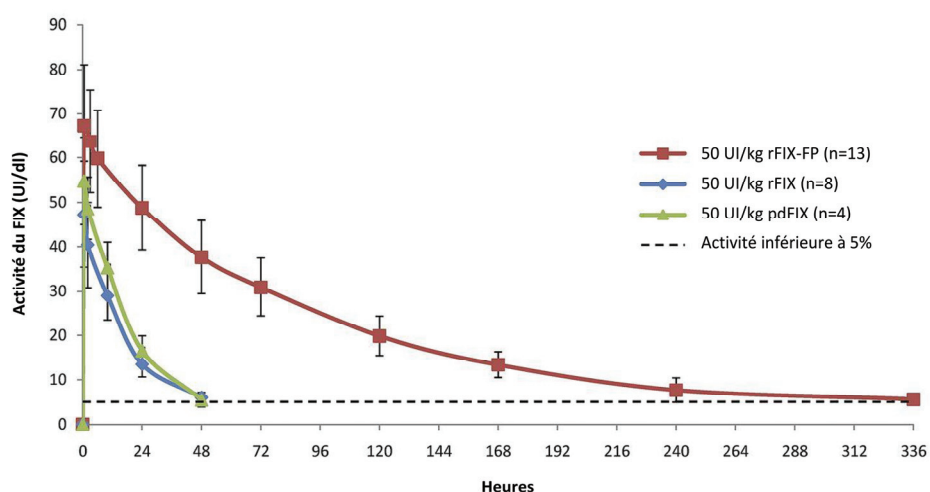


Figure 20. Taux d'activité observés après traitement des patients par la protéine de fusion rFIX-FP lors des essais cliniques de phase I. Le rFIX et le pdFIX sont utilisés comme référence. D'après Santagostino et al., 2012 [183].

IV.1.2.3- La protéine de fusion rFIX-CTP

La société Prolor Biotech™ étudie actuellement une protéine de fusion entre le rFIX et le peptide C-terminal de la sous-unité β de l'hormone chorionique gonadotrope humaine (β -hCG). Ce peptide a déjà prouvé son efficacité à allonger la demi-vie de plusieurs protéines dont l'hormone de croissance humaine (hGH) utilisée dans le traitement des patients souffrant d'un déficit en hormone de croissance [186]. Des études précliniques chez des souris hémophiles B ont déjà été menées sur la pharmacocinétique de la protéine de fusion rFIX-CTP [187]. Cette protéine, produite par la lignée cellulaire CHO, a montré une demi-vie allongée 4 fois par rapport à celle du rFIX avec une activité faiblement diminuée. Il conviendra à l'avenir de poursuivre les essais précliniques de cette molécule qui fait déjà l'objet d'un brevet [188].

Cette dernière protéine de fusion traduit une ouverture quant aux protéines ou peptides qui peuvent être utilisés pour allonger la demi-vie du FIX. Cependant, aucune étude ne s'intéresse encore à la construction d'une protéine de fusion entre le FIX et un autre facteur de la coagulation.

IV.2- Perspectives thérapeutiques

IV.2.1-Amélioration de la sécrétion du facteur IX

Malgré l'amélioration des propriétés pharmacocinétiques des nouvelles molécules de FIX, un des problèmes actuels dans le traitement de l'hémophilie B est le manque de disponibilité et d'accessibilité aux concentrés de FIX, notamment dans les pays en développement. L'amélioration de ces deux critères repose en grande partie sur les systèmes de production des concentrés de FIX existants qui visent continuellement à être améliorés et à être suppléés par des systèmes alternatifs.

Dans ce contexte, une technologie d'expression innovante a été explorée afin d'améliorer l'expression de protéines thérapeutiques au sein de la lignée cellulaire CHO [189,190]. L'expression du rFIX pourrait être améliorée en ajoutant au gène F9 les régions promotrices du gène d'une protéine hautement exprimée dans les cellules CHO : le CHEF-1 (*Chinese Hamster Elongation Factor 1*). Les expériences réalisées pour l'expression du récepteur à la chimiokine CCR4 ont montrées des taux d'expression plus de 10 fois supérieurs à ceux utilisant le promoteur fort du CMV (Cytomégalo virus) dans le contrôle de l'expression du gène. L'utilisation d'un vecteur CHEF-1 n'implique pas l'amplification du gène au sein des cellules ce qui a pour effet d'accélérer la croissance cellulaire.

L'amélioration de la production en système cellulaire passe également par l'optimisation des milieux de culture utilisés. Dans ce contexte, il a été montré que la diminution de la concentration de 1 à 0.5 mM en ions Ca^{2+} , néanmoins indispensable à la synthèse du rFIX, dans les milieux de culture permettait de réduire la proportion de FIXa [191]. La présence de FIXa dans les concentrés de rFIX injectés est connu pour augmenter le risque de formation spontanée de caillots en dehors du site de l'hémorragie.

Malgré les améliorations portées sur la production des protéines recombinantes en lignées cellulaires humaines, les faibles taux de sécrétion et les coûts de production élevés restent les deux inconvénients majeurs dans l'accessibilité au traitement dans le cadre de l'hémophilie. Une nouvelle alternative serait d'utiliser des animaux transgéniques en tant que bioréacteurs [192]. En effet, les tissus mammaires des animaux sont capables de produire de plus grandes quantités de protéines de par une densité cellulaire plus élevée que celle permise par la culture cellulaire [193]. Ainsi l'antithrombine humaine a été la première protéine recombinante produite et purifiée à partir du lait

de truies transgéniques à obtenir une AMM pour l'Europe en 2006. Une étude récente a caractérisé le rFIX produit dans le même système [194]. Les modifications post-traductionnelles du rFIX ainsi produit se rapprochent grandement de celles du pdFIX avec par exemple une moyenne de 11.9 acides γ -carboxyglutamiques au sein du domaine Gla contre 12 pour le pdFIX. Contrairement au rFIX produit en culture cellulaire, ce nouveau procédé permet de produire un rFIX qui présente une meilleure activité que le pdFIX. Enfin, en prenant en compte les taux de production et les pertes dues aux étapes de purification, les auteurs estiment qu'un troupeau de 192 truies transgéniques pourraient couvrir le marché mondial du facteur IX dont le besoin est estimé à 2 kg de FIX par an.

IV.2.2- Amélioration de l'activité coagulante du traitement.

Deux axes de recherche concourent à l'amélioration de l'activité coagulante du traitement de l'hémophilie B : le développement de rFIX à activité spécifique augmentée et celui des agents ciblant les inhibiteurs de la coagulation.

IV.2.2.1- Augmentation de l'activité spécifique du rFIX

Les recherches sur l'amélioration de l'activité se font principalement dans le but d'accroître l'index thérapeutique de la thérapie génique qui sera détaillée dans le paragraphe *IV.2.3- Thérapie génique* à la page 82 du manuscrit. Cependant, ces rFIX variants restent de bons candidats au développement de nouveaux concentrés de rFIX à activité augmentée.

Dès la mise sur le marché du rFIX (Benefix®) en 1997, des études se sont fixées comme objectif d'améliorer l'activité spécifique de cette nouvelle molécule. Une première expérience a consisté à remplacer le domaine EGF-1 du FIX par celui du FVII [195]. La chimère FIX_{VIIIEGF1} a d'abord présentée une activité augmentée d'un facteur 2 lors des essais de coagulation par méthode chronométrique. Lors de l'étude préclinique menée sur le chien hémophile B, son activité coagulante était augmentée 3 fois par rapport à celle du FIX *wild-type*. Cette augmentation d'activité a été expliquée par une meilleure affinité de la chimère pour le FVIIIa. En effet, une diminution de la constante de dissociation Kd était observée vis-à-vis du cofacteur.

Un an plus tard la même équipe a mis au point un FIX muté au niveau de l'arginine R338 par des expériences de mutagenèse dirigée [196]. Le FIX R338A présentait une activité catalytique 3 fois plus élevée *in vitro* que les rFIX et pdFIX *wild-type*. De plus, en présence de FVIIIa, le kcat/Km (traduisant l'efficacité catalytique de l'enzyme) était 6 fois plus élevé que le FIX *wild-type* et la constante Kd restait inchangée. Aux vues de ces résultats les auteurs ont alors émis l'hypothèse que cette augmentation d'activité était due au fait que le résidu R338 faisait partie de l'exosite qui lie le FX et non pas à un effet allostérique sur le site actif. Une étude du domaine catalytique du FIX vient compléter cette hypothèse en précisant que la région 333-339, normalement impliquée dans la

liaison au domaine A2 du FVIIIa, interfère indirectement avec le site de liaison au FX [151]. En effet, une mutation dans cette région interagissant avec la séquence 340-347 qui est impliquée directement dans la liaison au FX, entraîne alors un changement de l'activité catalytique de l'enzyme. L'implication du résidu R338 dans l'activité coagulante du FIX a été confirmée lors de la découverte de la mutation R338L par séquençage du gène F9 d'un patient atteint de thrombophilie juvénile [197]. Le FIX R338L (ou FIX Padua) était sécrété à un taux normal chez le patient mais il présentait une activité coagulante 8 fois plus élevée que le FIX *wild-type*.

Les travaux sur la chimère FIX_{VIIIEGF1} et sur le FIX R338A ont été repris afin de construire un ADNc contenant les deux modifications [198]. Cet ADNc a été inséré au sein d'une cassette d'expression lors d'une expérience de thérapie génique chez la souris hémophile B. Cette construction a permis d'observer une activité spécifique jusqu'à 12,6 fois plus élevée que celle du FIX *wild-type* ainsi qu'une expression stable et durable du transgène injecté.

Des études plus récentes ont mis au point un rFIX présentant trois mutations au niveau des résidus V86, E277 et R338 [199,200]. Le premier FIX-Triple (V86A/E277A/R338A) présentait une activité spécifique augmentée d'un facteur 13 *in vitro* [199]. Après détermination des paramètres cinétiques, présentés dans le Tableau 5 A, le FIX-Triple conférait une affinité pour le FVIIIa 11 fois plus forte que le FIX *wild-type*. Les auteurs émettaient alors l'hypothèse d'un effet synergique des trois mutations sur la liaison au FVIIIa. Le résidu R338 est bien connu comme participant à la liaison au domaine A2 du FVIIIa. Le résidu E277 y est décrit comme situé à l'opposé du domaine catalytique et une hypothèse serait que les résidus D276 et E277 constitueraient une région qui subit un changement conformationnel lors de l'activation du FIX. Concernant le résidu V86, les auteurs le décrivent comme situé sous la surface de contact au FVIIIa dans la structure tertiaire et comme pouvant peut-être influencer cette interaction. Dans le paragraphe III.3.3- *Formation du complexe tenase intrinsèque* à la page 61 du manuscrit, il a été évoqué que le *linker* E84-T87 jouait différents rôles dans l'interaction FIXa/FVIIIa [138]. Ceci confirme qu'une mutation sur le résidu V86 peut ainsi modifier l'affinité du FIXa pour son cofacteur. Deux ans plus tard, la même équipe a généré le FIX-TripleL (V86A/E277A/R338L) [200]. Cette étude a permis de comparer ce nouveau FIX avec le FIX *wild-type*, le FIX R338L, le FIX-Triple. Comme attendu, l'augmentation de l'activité spécifique comparée à celle du FIX *wild-type* était encore plus spectaculaire avec une augmentation d'un facteur 22. La détermination des paramètres pharmacocinétiques (Tableau 5 B) a montré que l'affinité pour le FVIIIa était 15 fois améliorée *in vitro*. Le FIX-TripleL injecté chez la souris hémophile B permettait une activité 2 à 3 fois supérieure au FIX R338L ou au FIX-Triple (Figure 21). De plus, les trois FIX mutants présentaient la même clairance que le FIX *wild-type* lors d'une expérience de pharmacocinétique,

montrant ainsi que les mutations n'influençaient pas la demi-vie du FIX. Enfin, les expériences de thérapie génique de ces deux études ont présenté des résultats très positifs. Après injections de particules AAV (*Adeno Associated Virus*) contenant les ADNc des nouvelles constructions, l'activité spécifique du FIX-TripleL était en moyenne 15 fois supérieure à celle du FIX *wild-type* (Figure 22).

(A)	Km (nM)	Vmax (nM FXa/min)	Enzyme (nM)	kcat (s ⁻¹)	kcat/Km	Kd,app
Sans FVIIIa						
FIX-wt	514.94 ± 78.44	0.16 ± 0.01	10	2.60 × 10 ⁻⁴	505	-
FIX-Triple	329.70 ± 94.55	0.16 ± 0.01	10	2.62 × 10 ⁻⁴	794	-
Avec 0.4nM FVIIIa						
FIX-wt	23.10 ± 4.87	24.33 ± 1.53	0.033	12.40	5.37 × 10 ⁸	2.44
FIX-Triple	80.97 ± 8.00	88.31 ± 3.89	0.144	10.25	1.27 × 10 ⁸	0.19
(B)	Km (nM)	Vmax (nM FXa/min)	Enzyme (nM)	kcat (s ⁻¹)	kcat/Km	Kd,app
Sans FVIIIa						
FIX-wt	399.69 ± 69.92	0.038 ± 0.006	10	6.29 × 10 ⁻⁵	157.58	-
FIX-R338L	282.83 ± 59.54	0.021 ± 0.004	10	3.58 × 10 ⁻⁵	126.58	-
FIX-Triple	125.33 ± 02.34	0.015 ± 0.001	10	2.56 × 10 ⁻⁵	204.09	-
FIX-TripleL	229.12 ± 13.08	0.026 ± 0.003	10	4.29 × 10 ⁻⁵	186.89	-
Avec 0.4nM FVIIIa						
FIX-wt	30.12 ± 9.98	034.10 ± 01.55	0.13	4.54	1.51 × 10 ⁸	1.92
FIX-R338L	52.96 ± 3.89	106.26 ± 05.41	0.27	6.67	1.26 × 10 ⁸	0.37
FIX-Triple	35.95 ± 6.05	070.09 ± 04.54	0.32	3.68	1.02 × 10 ⁸	0.18
FIX-TripleL	60.57 ± 6.77	126.32 ± 21.52	0.34	6.28	1.04 × 10 ⁸	0.13

Tableau 5. Paramètres cinétiques *in vitro* des différents FIX lors de l'étude du FIX-Triple (V86A/E277A/R338A) [199] (A) et l'étude du FIX-TripleL (V86A/E277A/R338L) [200] (B). En absence de FVIIIa, le terme « Enzyme » désigne la concentration en FIXa. En présence de FVIIIa, le terme « Enzyme » représente la concentration du complexe FIXa-FVIIIa dérivée des conditions d'expérimentation et du Kd observé.

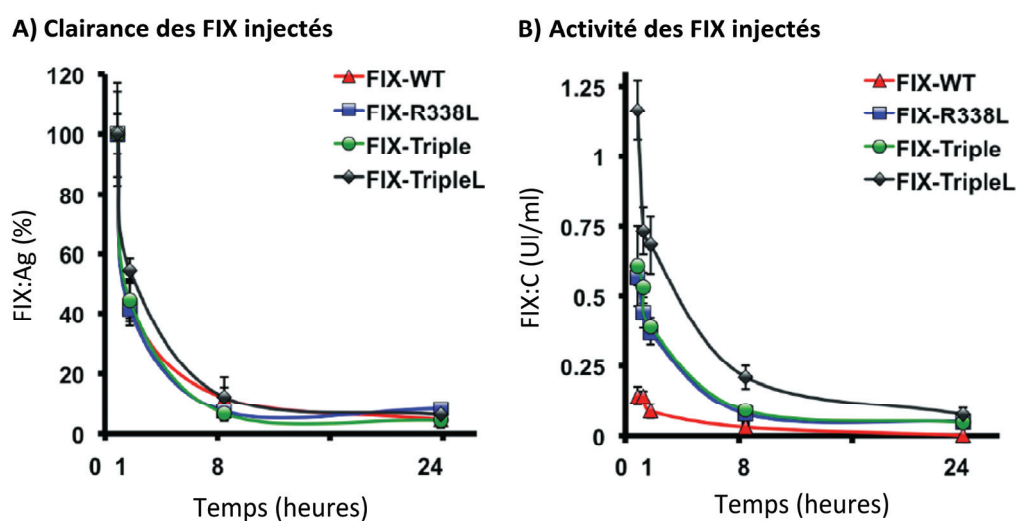


Figure 21. Efficacité comparée des FIX-R338L, FIX-Triple, FIX-TripleL et FIX *wild-type* après injection chez la souris hémophile B [200]. Les souris FIX KO (Knockout) ont été injectées par IV avec les différents FIX à hauteur de 10µg/20g. A chaque temps, des échantillons de sang ont été prélevés du sinus rétro-orbital et soumis à un test ELISA (A) et à un test d'activité chromométrique (B). Les valeurs représentent la moyenne ± l'écart-type (n=4-6 par groupe).

Activité spécifique des différents FIX

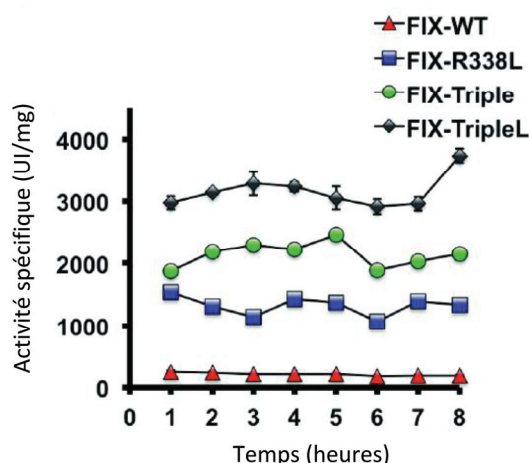


Figure 22. Suivi de l'activité spécifique des FIX R338L, FIX-Triple, FIX-TripleL et FIX *wild-type* lors d'une expérience de thérapie génique chez la souris hémophile B [200]. Les souris FIX KO ont été injectées en IV par les constructions ssAAV2/8-FIX en une dose unique de 4×10^9 v.p./souris. Des échantillons de sang ont été collectés une fois par semaine pendant deux mois et soumis à un test ELISA et un test d'activité afin de déterminer l'activité spécifique des différents FIX (n=3-4 par groupe).

Une stratégie complémentaire à celles décrites précédemment vise à augmenter l'activité catalytique du FIX indépendamment de la présence de FVIIIa. Comme cela a été décrit dans le paragraphe III.3.4-*Activation du FX* à la page 65 du manuscrit, la *loop-99* (comprenant les résidus 259 à 266) du FIX bloque l'accès du FX aux sites catalytiques en absence de FVIIIa. Une première étude a émis l'hypothèse que l'introduction de mutations au niveau des résidus Y259, K265 et Y345 permettait de mimer le changement conformationnel du FIXa induit par sa liaison au FVIIIa et au FX [158], le résidu Y345 étant normalement impliqué dans le maintien d'une conformation inactive de la *loop-99*. Le triple mutant engendrait une activité augmentée 7000 fois mais également une diminution de la spécificité pour le substrat. Une étude plus récente a repris ces données et a généré des FIX mutés sur les mêmes sites mais également sur les résidus I383 et E388 [201]. La mutation de ces deux résidus, situés à proximité du site actif du FIXa, a permis d'optimiser ce site responsable de la catalyse du FX en plus d'améliorer son activité en absence de FVIIIa. On pourrait spéculer que cette stratégie de mutants hyperactifs pourrait permettre de traiter des patients hémophiles A ayant développé des inhibiteurs car elle permet de s'affranchir de la fonction ou de la présence du FVIIIa lors de l'activation du FX. C'est également le cas d'un nouveau concept mis au point par une équipe japonaise qui a généré des anticorps humanisés bispécifiques, dirigés contre le FIXa et le FX. Les anticorps, nommés hBS23 [202] et ACE910 [203,204], placent le FIXa et le FX dans une configuration mimant la fonction du FVIIIa dans la cascade physiologique de façon à poursuivre la coagulation en absence de FVIIIa. Le second anticorps, l'ACE910, a été produit et optimisé de façon à présenter de meilleures affinités avec le FIXa et le FX. En effet, après étude des interactions par résonance des

plasmons de surface (SPR), l'ACE910 a présenté des baisses du kcat/Km d'un facteur 100 par rapport à l'hBS23 et une dissociation comparable au FVIIIa. Des injections hebdomadaires de cet anticorps maintenu à un taux plasmatique de 30 µg/ml chez un modèle de singe, chez qui une hémophilie A acquise a été provoquée, a permis de prévenir efficacement les saignements intra-articulaires.

IV.2.2.2- Agents ciblant les inhibiteurs de la coagulation

Le développement d'agents ciblant les inhibiteurs de la coagulation est une nouvelle approche qui vise essentiellement à empêcher l'action de l'inhibiteur principal de la coagulation : le TFPI via différentes stratégies. Cependant, des recherches portent également sur l'inhibition de l'antithrombine et de la protéine C activée. En inhibant le TFPI, l'antithrombine ou la protéine C activée, l'objectif est de stimuler la génération de thrombine chez les patients hémophiles A et B [205].

IV.2.2.2.1- Inhibition du TFPI

L'inhibition du TFPI est actuellement étudiée via trois types de molécules :

- Un anticorps monoclonal anti-TFPI a d'abord montré des résultats très encourageants en essais précliniques en permettant d'améliorer le profil hémorragique d'un modèle de lapin hémophile [206]. La société NovoNordisk™ a ensuite mené trois essais de phase I sur des patients hémophiles A et sur des sujets non hémophiles [207] avec l'utilisation d'un nouvel anticorps.
- Le fucoïdane qui fait partie de la famille des NASP (Polysaccharides Sulfatés Non-Anticoagulants) inhibe le TFPI et accélère le temps de coagulation des patients hémophiles A et B. Des essais précliniques chez la souris et le chien hémophiles A [208] ont montré des résultats très encourageants qui ont permis de débiter des essais cliniques de phase I avec le BAX513® par la société Baxter™ [207].
- Les aptamères sont des chaînes d'acides nucléiques synthétiques qui exercent leur inhibition par liaison spécifique de la structure tridimensionnelle des protéines. Actuellement, plusieurs aptamères qui inhibent spécifiquement le TFPI sont en cours d'essais cliniques, notamment le BAX499® (Baxter™) dont un premier essai de phases I et II a été achevé [207].

IV.2.2.2.2- Inhibition de la PCa et de l'AT par des ARN interférents

La société Alnylam Pharmaceuticals™ est spécialisée dans la recherche des ARN interférents (ARNi) permettant d'inhiber spécifiquement certaines protéines. Dans le cas de l'hémophilie, deux inhibitions par des ARNi sont actuellement étudiées : l'inhibition de la protéine C activée [209] et celle de l'antithrombine [210]. Une étude sur l'inhibition de l'antithrombine par l'ARNi ALN-AT3 a fait

l'objet d'une présentation lors du congrès mondial de la WFH en mai 2014. Cet ARNi a été utilisé à différentes doses pour tester la génération de thrombine chez les souris hémophiles A et B puis chez un modèle de singe hémophile A (après administration d'inhibiteurs afin de mimer une hémophilie A acquise). Une augmentation du taux de génération de thrombine mesurée sur les plasmas d'animaux traités a été corrélée avec des doses croissantes d'ALN-AT3 injectés par voie sous-cutanée. De plus, des temps de saignement ont été montrés comme significativement diminués, ce qui corroborait avec des taux amoindris en antithrombine. Enfin, une seule injection par voie sous-cutanée a pu rétablir la génération de thrombine et améliorer l'hémostase des animaux pendant 28 jours, sans complication thrombotique rapportée. Cette stratégie prometteuse sera bientôt testée chez l'Homme lors d'essais cliniques qui débuteront d'ici 2015.

IV.2.3- Thérapie génique

Les progrès réalisés dans le domaine de la thérapie génique permettent maintenant d'obtenir une expression ciblée de certaines protéines dans des organes, des cellules ou des compartiments cellulaires précis. La thérapie génique consiste en l'introduction d'un transgène dans les cellules ou les tissus d'un patient afin d'y faire synthétiser une protéine d'intérêt. La thérapie génique permet alors de remplacer un gène défectueux ou de surexprimer une protéine dont l'activité a un impact thérapeutique. Cette stratégie peut être pratiquée *ex vivo* en introduisant le gène fonctionnel dans les cellules cibles prélevées puis réintroduites chez le patient, ou *in vivo*, un vecteur contenant le transgène est alors introduit dans l'organisme du patient où il ciblera certaines cellules ou tissus dans lesquels le transgène s'intégrera au génome. L'efficacité de la thérapie génique dépend du type cellulaire ciblé, de la longueur de la séquence du transgène, du promoteur, des facteurs régulant le transgène et enfin de la nature du vecteur.

Concernant l'hémophilie B, les premières études de thérapie génique se sont déroulées *ex vivo* [211] dans les années 1980. Elles consistaient à transduire l'ADNc du FIX dans des fibroblastes via un vecteur rétroviral, puis à réinjecter ces fibroblastes par voie sous-cutanée. Des taux de FIX humain synthétisé par les fibroblastes étaient alors détectables chez les souris et rats injectés.

L'hémophilie B est une maladie qui, contrairement à d'autres, présente de nombreuses caractéristiques favorables à la réalisation d'une thérapie génique *in vivo*. En effet, la séquence nucléotidique du gène F9 est connue depuis 1982. Cette séquence est courte, en comparaison, par exemple, de celle du gène du FVIII qui est cinq à six fois plus longue, et elle est donc plus facile à insérer dans un vecteur. De plus, seule une faible concentration en FIX est nécessaire pour le bon fonctionnement de la physiologie de la coagulation et ainsi pour impacter le phénotype des patients hémophiles B. La réponse au traitement de thérapie génique est ainsi facilement mesurée

principalement par observation du phénotype mais aussi par contrôle de la concentration en FIX. Enfin, il existe actuellement de bons modèles animaux d'hémophilie B tels que les souris ou les chiens hémophiles B.

Les vecteurs de type AAV utilisés pour la thérapie génique dans le cadre du traitement de l'hémophilie B se sont rapidement imposés comme ceux ayant le plus d'avantages. En effet, l'Homme est un hôte naturel du sérotype AAV2 et la plupart des humains est infecté durant l'enfance mais aucun symptôme n'est alors observé, ce qui fait de l'AAV un virus non pathogène. Enfin, le ciblage d'une expression dans le foie est apparu comme possible par l'utilisation de certains sérotypes.

Après des essais précliniques sur différentes espèces animales dont le chien hémophile B [212], les résultats des premiers essais cliniques chez l'Homme ont été publiés en 2006 [213]. Ces essais consistaient à injecter le transgène F9 dans un vecteur de type AAV2 via l'artère hépatique. Les doses testées les plus basses n'ont pas montrées de problème de tolérance mais aucun FIX n'était détecté. La dose la plus forte a permis d'observer dans un premier temps la sécrétion de FIX par les hépatocytes à hauteur de 10 %. Cependant, une inflammation du foie accompagnée d'une perte d'activité du FIX était ensuite constatée. Les peptides de la capsid de l'AAV2, c'est-à-dire la structure entourant son génome, sont reconnus par les lymphocytes B et T activant une réponse cytotoxique qui détruit les hépatocytes transduits par un AAV2 et présentant des peptides de capsid à leur surface.

Suite à cette étude, le sérotype AAV8 s'est avéré plus prometteur car il présente une biodistribution naturelle dans le foie permettant ainsi une injection du vecteur via une veine périphérique moins contraignante qu'une injection via l'artère hépatique. De plus, l'hôte naturel du sérotype AAV8 est le primate non humain, ce qui diminue le risque que les peptides de capsides soient reconnus par réponse immune chez l'Homme [214]. Les premiers essais cliniques concluants de thérapie génique chez l'Homme ont été rapportés en 2011 [215]. Le vecteur scAAV8FIX a été obtenu par modification génétique du sérotype AAV8 et optimisation du transgène F9 puis injecté via une veine périphérique chez six patients hémophiles B sévères. Quatre des patients ont pu stopper leur traitement prophylactique durant les essais. Les deux plus faibles doses injectées n'ont pas montré de toxicité contrairement à la dose la plus élevée qui était de 2×10^{12} génomes/kg. L'inflammation du foie qui en a résulté a été traitée par corticoïdes, ce qui a permis aux patients de conserver des taux de FIX circulant compris entre 1.5 et 6 %. Il s'est avéré que la toxicité observée était en grande partie due à la forte proportion de capsides vides lors de la fabrication des vecteurs, de l'ordre de 80 à 90 %.

La récurrence des problèmes de toxicité lors des essais cliniques a soulevé deux axes d'amélioration : la mise au point de méthodes permettant de réduire la présence de capsides vides dans les

préparations et l'utilisation de séquences du gène F9 permettant une augmentation de l'activité spécifique du FIX [214]. Des essais précliniques utilisant une construction optimisée grâce à la mutation R338L ont montré des résultats très encourageants chez la souris et le chien hémophiles B [200,216,217]. Les traitements testés ont permis une protection contre l'apparition d'hémarthroses à des doses virales faibles, normalement inefficaces lorsque les vecteurs contiennent une séquence du gène F9 non muté. Des essais cliniques de phases I et II chez l'Homme utilisant cette mutation R338L au sein d'un vecteur de type scAAV8 et des méthodes réduisant la proportion de capsides vides sont actuellement en cours aux Etats-Unis (NCT01687608) [214].

L'ensemble de ces études montre l'importance d'une séquence de l'ADNc du FIX ou d'un minigène permettant une activité et une expression optimisées du FIX. Concernant l'expression du rFIX, des études se sont intéressées à la modification du gène F9 afin d'améliorer la sécrétion de la protéine dans le milieu extracellulaire. Ainsi, il a d'abord été montré que la présence de l'intron 1 dans l'ADNc de FIX entraînait une meilleure production de la protéine dans une lignée cellulaire hépatique et par des souris [218]. Lors d'une étude qui a suivie, il a été décrit que la présence de l'intron 1 (normalement tronqué) permettait une expression de FIX par les cellules HepG2 (lignée hépatique humaine). Cette amélioration de l'expression est due à l'épissage des séquences fonctionnelles présentes dans le précurseur ARNm et à une meilleure stabilité des ARN pouvant ensuite être traduits plus longtemps. De cette façon, les transcrits portant les séquences épissées seraient mieux protégés dans le noyau [219]. Notre groupe a ensuite confirmé l'effet de l'intron 1 dans l'ADNc du FIX pour une meilleure production de la protéine par les cellules CHO. Le premier exon du gène du FIX possède 3 sites d'initiation de la traduction. L'équipe s'est également interrogée sur l'intérêt de la présence des 3 ATG. Par des expériences de mutations/délétions du site d'initiation de la traduction, elle a démontré que les 3 ATG étaient nécessaires pour une meilleure production du FIX [220].

A l'heure où les séquences du gène F9 utilisées dans la thérapie génique commencent à être optimisées, il serait intéressant de combiner plusieurs axes d'amélioration de cette séquence afin de s'affranchir des inconvénients liés à la dose maximale de vecteurs injectés chez l'Homme.

Chapitre V : Le facteur XIII de la coagulation (FXIII)

Le FXIII est une protransglutaminase plasmatique qui participe aux dernières étapes du processus de coagulation : elle stabilise la fibrine permettant la constitution d'un caillot de fibrine insoluble et efficace, capable d'arrêter l'hémorragie.

V.1- Les gènes du facteur XIII (F13A1 et F13B)

Le FXIII est un hétérotétramère composé de deux sous-unités catalytiques A (FXIII-A) et de deux sous-unités B (FXIII-B). Les sous-unités A et B sont codées par deux gènes différents situés sur deux chromosomes distincts.

Le gène F13A1 responsable de la synthèse du FXIII-A humain est localisé sur le bras court du chromosome 6, dans la bande 6p24-25 [221]. Le gène F13A1 est constitué de 15 exons et 14 introns répartis sur 160 000 paires de bases. La localisation et la structure du gène F13A1 sont représentées dans la Figure 23.

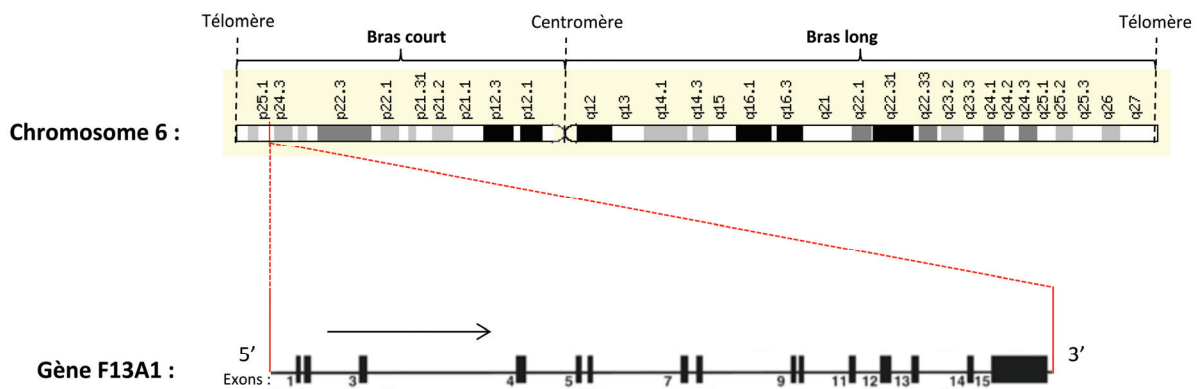


Figure 23. Localisation et structure du gène F13A1 codant pour la sous-unité A du FXIII.

Le gène F13B responsable de la synthèse du FXIII-B humain est quant à lui localisé sur le bras long du chromosome 1, dans la bande 1q31-32.1 [222]. Le gène F13B est constitué de 12 exons et 11 introns répartis sur 28 000 paires de bases et sa transcription est régulée par les facteurs HNF1 et HNF4. La localisation et la structure du gène F13B sont représentées dans la Figure 24.

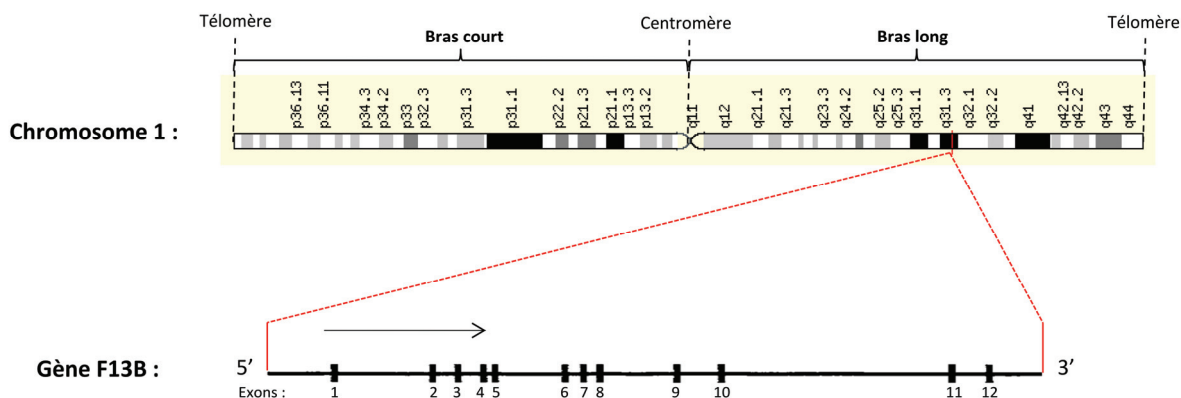


Figure 24. Localisation et structure du gène F13B codant pour la sous-unité B du FXIII.

Du fait du contrôle de sa transcription par les facteurs HNF1 et HNF4, le FXIII-B est exprimé dans le foie où il est sécrété par les hépatocytes [223] alors que le FXIII-A serait majoritairement synthétisé par des cellules d'origine hématopoïétique : macrophages / monocytes et mégacaryocytes / plaquettes. Le FXIII-A est présent à de fortes concentrations dans les plaquettes. En effet, une étude a montré que sa concentration intra-plaquettaire était 100 à 150 fois plus élevée que sa concentration plasmatique [224]. Cependant, le rôle du FXIII intracellulaire est encore mal connu.

V.2- Le facteur XIII : structure et fonction

V.2.1- Structures du FXIII-A et du FXIII-B

Le FXIII-A est une protransglutaminase de 731 résidus présentant un poids moléculaire de 83 kDa [225]. Il comporte quatre domaines structuraux : une région sandwich en feuillet β (résidus 38 à 184), un cœur catalytique (185 à 515), et deux barrettes en feuillet β (516 à 731) ; ainsi qu'un peptide d'activation en position N-terminale.

Le FXIII-B est une glycoprotéine de 641 résidus présentant un poids moléculaire de 80 kDa [226]. Il est composé de dix domaines sushis qui présentent de forts degrés d'homologie. Chacun de ces domaines est codé par un exon différent en une séquence d'environ 60 résidus. Ils sont maintenus ensemble par des paires de ponts disulfures internes à chaque domaine [227]. La structure primaire du FXIII-B est représentée dans la Figure 25. Il est à noter qu'aucune structure tridimensionnelle n'a encore été proposée pour le FXIII-B (Référence Uniprot du FXIII-B : P05160).

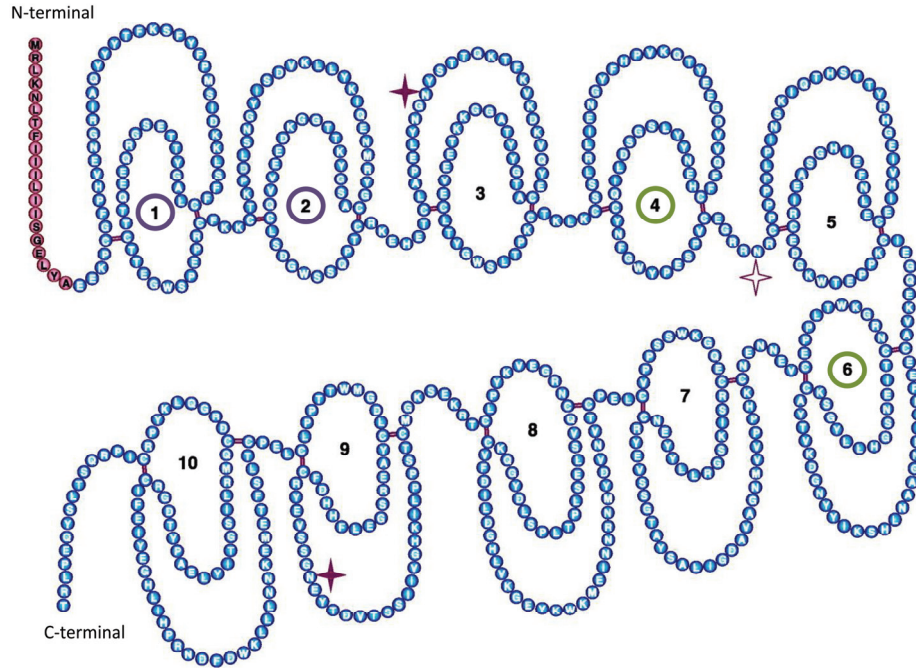


Figure 25. Schéma de la structure primaire du FXIII-B consistant en la répétition de 10 domaines sushi chacun maintenu ensemble par une paire de ponts disulfures, d'après Muszbek et al., 2011 [227]. La séquence d'adressage est représentée en rouge alors que la séquence de la protéine mature est représentée en bleu. Les domaines cerclés de violet sont impliqués dans la liaison au FXIII-A tandis que les domaines cerclés de vert seraient impliqués dans la dimérisation des formes libres.

V.2.2- Le FXIII plasmatique

Après leur synthèse et leur sécrétion dans le plasma les sous-unités FXIII-A et FXIII-B se lient entre elles afin de former un hétérotétramère FXIII-A₂/FXIII-B₂. L'interaction FXIII-A/FXIII-B reste peu explorée mais une étude récente a identifié les deux premiers domaines sushi du FXIII-B comme possédant les sites de liaison au FXIII-A [228]. Dans le plasma, la quasi-totalité du FXIII-A se trouve sous forme complexée alors que 50% des molécules de FXIII-B sont présentes sous forme libre, non complexée [229]. De plus, il semblerait que le FXIII-B libre circulerait dans le plasma sous forme de dimère FXIII-B₂ [230]. L'intervention du FXIII lors de la fibrinogenèse est facilitée par le fait que la grande majorité du FXIII est liée au fibrinogène dans le plasma. Cette liaison est calcium-dépendante et se fait via la sous-unité FXIII-B du FXIII [227].

V.2.3- Activation du FXIII plasmatique

Le FXIII est l'un des principaux contributeurs à la formation du caillot de fibrine dans les dernières étapes de la coagulation. Ainsi, la génération de thrombine va permettre le clivage du peptide d'activation du FXIII-A par hydrolyse du pont peptidique entre les résidus Arg37 et Gly38 par la thrombine. Ce clivage, qui affaiblit l'interaction entre les sous-unités FXIII-A et FXIII-B, est suivi par la liaison d'ions Ca²⁺ sur des sites hautement affins, ce qui suffit à dissocier le complexe et à libérer le

dimère FXIII-A₂. Ce dimère, sous l'effet d'un changement calcium-dépendant, acquiert ensuite une conformation active [227,231]. La présence de fibrine nouvellement polymérisée améliore considérablement l'activation du FXIII. En effet, la liaison à la fibrine du FXIII et de la thrombine fait que ces derniers se retrouvent dans des orientations favorables à la protéolyse.

V.2.4- Fonctions dans la coagulation

Dans le processus de la coagulation les deux substrats principaux du FXIIIa sont la fibrine et l'inhibiteur α 2AP. Son action sur la fibrine consiste à polymériser d'une part les chaînes γ en dimères et d'autres part les chaînes α . Même si la dimérisation des chaînes γ est la réaction la plus rapide, c'est la formation de polymères de chaînes α de haut poids moléculaire qui est majoritairement responsable de la stabilité finale du caillot de fibrine. Au fur et à mesure de la polymérisation, le FXIIIa incorpore des molécules de α 2AP au réseau de fibrine par la formation de liaisons covalentes ce qui permet la protection du caillot de la fibrinolyse par la plasmine [227]. Ce rôle est essentiel pour le maintien de l'hémostase.

En plus de son rôle majeur dans la coagulation, le FXIII présente également des fonctions essentielles comme le maintien de la grossesse, la réparation des tissus et la cicatrisation des plaies.

V.2.5- La sous-unité FXIII-B

La sous-unité B n'a pas d'activité enzymatique connue et agit en tant que protéine de transport en stabilisant et en inhibant le FXIII-A non activé. Les formes de FXIII-B non complexées à la sous-unité représentent une proportion de 50 %, elles circulent alors sous forme de dimères. Le modèle proposé pour l'homodimère FXIII-B₂ est rapporté dans la Figure 26.

De plus, il a été montré qu'une déficience primaire en sous-unité B aboutissait à une baisse rapide de la demi-vie du FXIII-A dans le plasma [232], ce qui prouve que le FXIII-B est responsable de la demi-vie du FXIII de 3 à 7 jours. De plus, le FXIII-B complexé dans le plasma est lié au fibrinogène qui quant à lui présente une demi-vie de 4 à 6 jours. Ces valeurs sont à mettre en regard avec la demi-vie du FIX qui est comprise entre 18 et 24 heures et qui fera l'objet du dernier chapitre de cette étude.

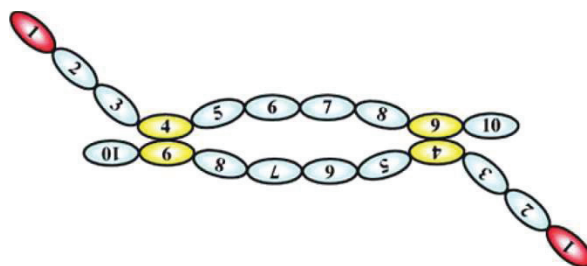


Figure 26. Modèle proposé pour l'homodimère FXIII-B₂. D'après Sourì et al., 2008 [230]. L'auteur propose une configuration symétrique due à l'interaction entre les domaines sushi 4 et 6 (représenté en jaune), ce qui expliquerait un aspect filamenteux du FXIII-B observé en microscopie électronique [233].

Partie II : OBJECTIFS DE L'ETUDE

Dans le contexte d'amélioration du traitement de l'hémophilie B, nous proposons la mise au point d'une nouvelle molécule de rFIX humain améliorée. L'activité coagulante ainsi que la demi-vie sont les deux axes d'amélioration envisagés lors de cette étude.

Une étude préliminaire a d'abord été nécessaire afin de valider le système cellulaire utilisé pour la production du rFIX. La lignée cellulaire d'hépatocarcinome humain Huh-7 a ainsi été sélectionnée dans le but d'améliorer les modifications post-traductionnelles du rFIX de façon à les rendre les plus proches possibles de celles du pdFIX.

Le premier axe de recherche de ce travail a consisté à produire et caractériser un rFIX à activité augmentée. Pour cela, nous avons choisi de générer des mutations sur un seul résidu, le glutamate E410, connu comme étant impliqué dans la formation du complexe *tenase* intrinsèque et plus particulièrement dans la liaison au FVIIIa [136]. Après production par la lignée cellulaire Huh-7 et purification des molécules recombinantes mutées au niveau du résidu E410 (FIX-E410), leur efficacité a d'abord été évaluée par plusieurs techniques *in vitro* complémentaires. Une étude chez la souris hémophile B a ensuite permis de confirmer *in vivo* cette amélioration d'efficacité. Enfin, une caractérisation complète du nouveau FIX a été effectuée afin de comprendre l'importance du résidu E410 sur l'activité coagulante de la molécule. L'objectif de cette première partie était de disposer d'un rFIX à activité améliorée pouvant à terme être utilisé en prophylaxie ou lors d'essais de thérapie génique.

Le deuxième axe de recherche de ce travail avait pour but de mettre au point un rFIX à demi-vie allongée. La conception d'une nouvelle protéine de fusion entre le FIX et le FXIII-B a été la stratégie utilisée. En effet, le FXIII-B possède une demi-vie de 4 à 6 jours, ce qui en fait le facteur de coagulation le plus stable chez l'Homme. Suite aux travaux sur les FIX fusionnés à l'albumine [183,184] ou au fragment Fc de l'IgG [174,176], il nous a paru intéressant de coupler le FIX à un autre facteur de la coagulation connu pour ses propriétés de transport. La demi-vie étant le critère à évaluer en priorité lors de cette étude, l'objectif était de produire suffisamment de FIX-FXIII-B afin de réaliser une expérimentation *in vivo*. Etant donné la taille importante de cette protéine de fusion, le but principal de cette seconde partie n'était pas de fournir un rFIX candidat pour des essais de thérapie génique mais bien d'obtenir un nouveau rFIX humain ayant une meilleure stabilité et pouvant être utilisé en prophylaxie.

Partie III : MATERIEL ET METHODES

Chapitre I : Biologie moléculaire

I.1- Obtention des pcDNA-FIX-E410

Les différents plasmides portant la mutation au niveau de l'acide aminé E410, pcDNA-FIX-E410, ont été obtenus à partir du plasmide pcDNA3.1-FIX-WT-I1 contenant l'ADNc du FIX, possédant l'intron I (I1) tronqué du gène F9 généré au laboratoire [220]. Ce plasmide, représenté dans la Figure 27 A, possédait les gènes de résistance à l'ampicilline et à la généticine ainsi qu'un promoteur fort CMV en amont de l'ADNc du FIX WT I1. Le pcDNA3.1-FIX-E410 est représenté dans la Figure 27 B. Pour une meilleure compréhension et une simplification du texte pour la suite, les plasmides seront nommés pcDNA-FIX-WT et pcDNA-FIX-E410 et les protéines résultant de leur expression, respectivement FIX-WT et FIX-E410.

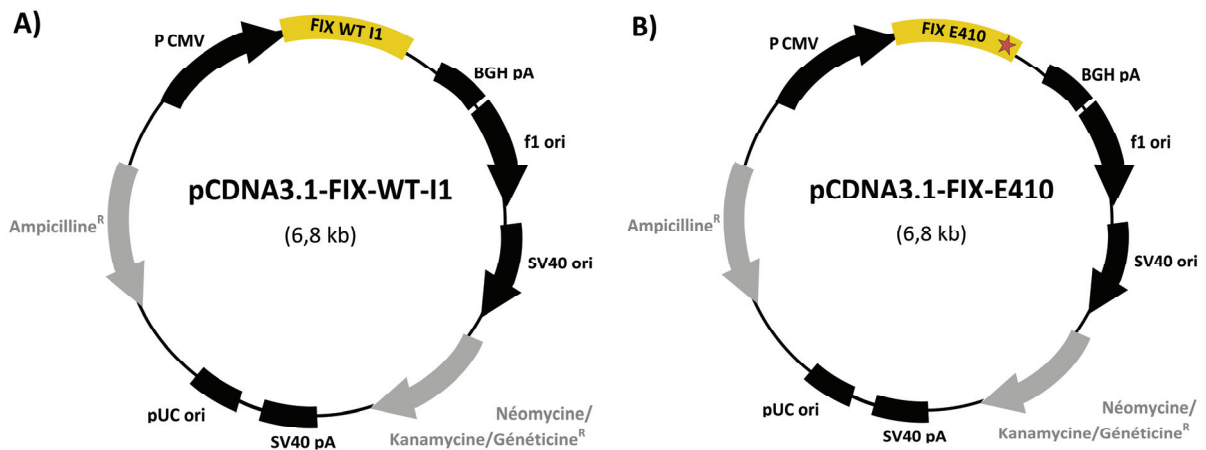


Figure 27. Constructions plasmidiques utilisées. Les plasmides contenant l'ADNc muté en E410 du FIX ont été obtenus à partir du pcDNA3.1-FIX-WT-I1. P CMV : promoteur fort du cytomégalovirus, BGH pA : Séquence signal de polyadénylation de l'hormone de croissance bovine, f1 ori : origine de répliation spécifique au phage M13 monobrin, SV40 ori et SV40 pA : origine de répliation et séquence signal de polyadénylation du virus simien 40, pUC ori : origine de répliation procaryote.

I.1.1- Expériences de mutagenèse dirigée

Les oligonucléotides ayant servis d'amorces pour la mutagenèse dirigée ont été synthétisés par la société Eurogentec (Angers, France) et sont représentés dans le Tableau 6.

Facteur IX	Amorce	Séquence nucléotidique
FIX-WT	Sens	5' GTC AAC TGG ATT AAG GAA AAA ACA AAG CTC ACT 3'
	Antisens	5' AGT GAG CTT TGT TTT TTC CTT AAT CCA GTT GAC 3'
FIX-E410H	E410H For	5' GTC AAC TGG ATT AAG CAT AAA ACA AAG CTC ACT 3'
	E410H Rev	5' AGT GAG CTT TGT TTT ATG CTT AAT CCA GTT GAC 3'
FIX-E410L	E410L For	5' GTC AAC TGG ATT AAG TTA AAA ACA AAG CTC ACT 3'
	E410L Rev	5' AGT GAG CTT TGT TTT TAA CTT AAT CCA GTT GAC 3'
FIX-E410A	E410A For	5' GTC AAC TGG ATT AAG GCT AAA ACA AAG CTC ACT 3'
	E410A Rev	5' AGT GAG CTT TGT TTT AGC CTT AAT CCA GTT GAC 3'
FIX-E410N	E410N For	5' GTC AAC TGG ATT AAG AAT AAA ACA AAG CTC ACT 3'
	E410N Rev	5' AGT GAG CTT TGT TTT ATT CTT AAT CCA GTT GAC 3'

Tableau 6. Amorces utilisées lors de l'expérience de mutagenèse. Les séquences mutées sont représentées en rouge. For : Forward ; amorce sens. Rev : Reverse, amorce anti-sens.

Les expériences de mutagenèse dirigée ont été menées à l'aide du kit *QuickChange Site-Directed Mutagenesis™* (Stratagene-Agilent, Massy, France). Selon les instructions du kit, le mélange de réaction suivant a été réalisé (volume final = 50 µl) :

- 5µl du tampon de réaction [10X] fourni dans le kit,
- 50 ng d'ADN plasmidique,
- 125 ng de chaque amorce,
- 1 µl du mix de dNTP (désoxyribonucléotides),
- 1 µl de *PfuTurbo DNA polymerase* (2.5 U/µl).

Ce mélange a ensuite été soumis à une étape de réaction en chaîne par polymérase (PCR : Polymerase Chain Reaction) selon les paramètres décrits dans le Tableau 7. Le produit de PCR a été digéré une heure à 37°C par l'enzyme *DpnI* afin d'éliminer l'ADN plasmidique matriciel, puis utilisé afin de transformer les bactéries *Escherichia coli* (*E.coli*) *XL1 Blue Competent Cells* selon les instructions du kit. Les bactéries ont étéensemencées dans des boîtes de Pétri sur une gélose composée de LB Agar et d'ampicilline à 50 µg/ml et incubées à 37°C sur la nuit.

Nombre de cycle	Température	Durée
1 cycle	95°C	30 secondes
	95°C	30 secondes
18 cycles	55°C	1 minute
	68°C	5 minutes

Tableau 7. Paramètres expérimentaux de l'étape de PCR lors de l'expérience de mutagenèse dirigée.

1.1.2- Contrôle des minipréparations des plasmides mutés

Après incubation des boîtes de Pétri, les clones bactériens contenant l'ADN plasmidique ont été mis en culture dans 2 ml de milieu LB sélectif contenant 50 µg/ml d'ampicilline, sous une agitation de 200 rpm, sur la nuit à 37°C. Les bactéries ont répliqué le plasmide d'intérêt au cours de leurs divisions successives. Les précultures bactériennes obtenues ont été utilisées afin de réaliser des minipréparations de cet ADN à l'aide du kit *High Purity Plasmid Miniprep* (Neo Biotech, CliniSciences, Montrouge, France). Cette technique permet d'extraire de petites quantités d'ADN plasmidique afin de le tester par digestion enzymatique puis par séquençage. Après que les digestions enzymatiques contrôles des pcDNA-FIX-E410 aient confirmé la taille des plasmides d'intérêt, les séquençages de la partie codante pour les FIX-E410 ont été réalisés par la société GATC Biotech AG (Constance, Allemagne) afin de s'assurer de la présence de la mutation E410 souhaitée et de l'absence de mutations indésirables dans le reste de la séquence.

1.1.3- Clonage de l'ADNc des FIX-E410

Après validation de l'ADNc des FIX-E410 par séquençage et dans le but de disposer de plasmides dont la totalité de la séquence est connue et vérifiée, les quatre séquences contenant l'ADNc des FIX-E410 ont été réintroduites dans le plasmide pcDNA-FIX-WT d'origine par des expériences de digestions enzymatiques et ligations. En effet, seuls 400 acides aminés autour de la mutation ont été séquencés et au cours des expériences de mutagenèse dirigée, il était possible que le plasmide d'accueil des séquences soit lui aussi muté. Les différentes étapes de ce clonage sont décrites dans la Figure 28.

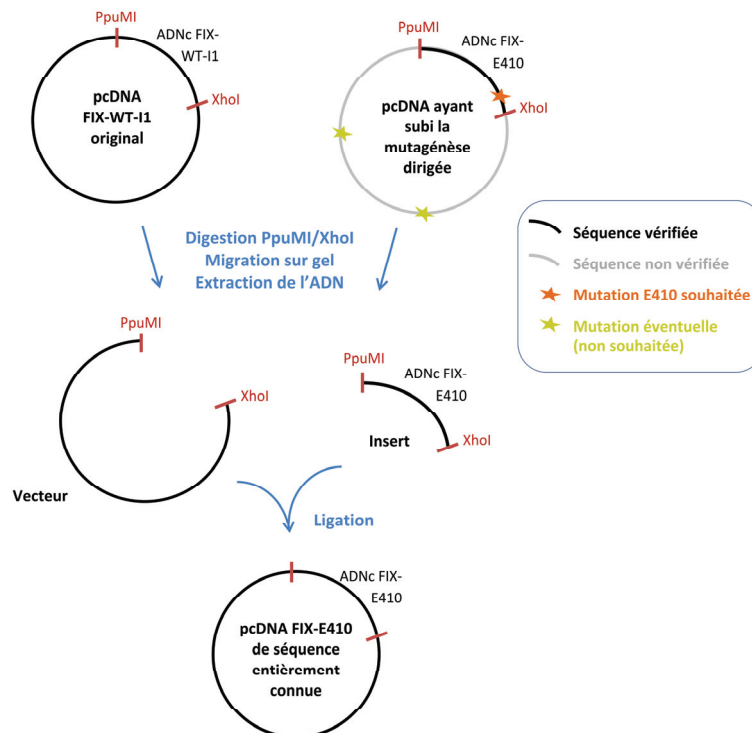


Figure 28. Etapes du clonage de l'ADNc des FIX-E410.

I.1.3.1- Digestion enzymatique

Les minipréparations de plasmides réalisées après les expériences de mutagenèse dirigée ont été digérées par les enzymes de restriction *PpuMI* et *XhoI* (New England BioLabs® Inc., Ipswich, MA, Etats-Unis) une heure à 37°C.

I.1.3.2- Migration sur gel d'agarose et extraction de l'ADNc des FIX-E410

Les produits de digestion enzymatique ont migré sur gel d'agarose 1% et la bande correspondant à l'ADNc des FIX-E410 a été découpée du gel afin d'y extraire l'ADN à l'aide du kit *QIAEX II Gel Extraction* (QIAGEN, Courtabœuf, France).

I.1.3.3- Ligation de l'insert dans le pcDNA d'origine

L'insert correspondant à l'ADNc des FIX-E410 a été ligué au sein du pcDNA-FIX-WT d'origine préalablement digéré par les enzymes de restriction *PpuMI* et *XhoI*, à l'aide du kit *Rapid DNA Ligation* (Roche, Neuilly-sur-Seine, France) qui utilise la *T4 DNA ligase*.

I.1.3.4- Transformation bactérienne

Le produit de ligation a directement été introduit au sein des bactéries compétentes *E.coli* (One Shot® TOP10 Chemically Competent E.coli, Life Technologies, Saint-Aubin, France) par transformation bactérienne. Le plasmide nouvellement formé a été ajouté aux bactéries compétentes puis incubé 30 minutes dans la glace. Un choc thermique a été réalisé par une incubation 45 secondes à 42°C puis 2 minutes dans la glace afin de faire pénétrer l'ADN plasmidique au sein des bactéries. Celles-ci ont été incubées une heure à 37°C après ajout de 250 µl de milieu LB nutritif puisensemencées dans des boîtes de Pétri sur une gélose composée de LB Agar et d'ampicilline à 50 µg/ml.

I.1.4- Amplification des pcDNA-FIX-E410 (maxipréparations)

Les bactéries *E.coli* transformées par les plasmides pcDNA-FIX-E410 ont ensuite été mises en culture dans du milieu LB sélectif contenant 50 µg/ml d'ampicilline et permettant ainsi la sélection des bactéries possédant le plasmide. Les bactéries ont été mises en culture dans un volume de 250 ml de milieu sous une agitation de 200 rpm, sur la nuit à 37°C. L'ADN plasmidique amplifié a été extrait par lyse alcaline du culot bactérien à l'aide du kit *HiSpeed Maxiprep* (QIAGEN). Il a ensuite été purifié par chromatographie d'adsorption sur la membrane de silice du kit et élué par un tampon salin. Enfin, l'ADN a été dessalé et concentré avec une précipitation par l'isopropanol. Cette technique a permis d'obtenir sélectivement des quantités de pcDNA-FIX-E410 suffisantes pour les transfections en cellules eucaryotes, tout en éliminant l'ADN du chromosome bactérien.

I.2- Obtention des pcDNA-FIX-FXIII B

Initialement, seule la génération de deux plasmides pcDNA3.1 différents contenant les ADNc du FIX et du FXIII-B était prévue. Le premier plasmide devait contenir les deux ADNc reliés entre eux par une séquence codant pour un site clivable par la thrombine (FIIa) suivi du *linker* AGC(AGCGGAGGA)₆AGC, le second devait présenter une séquence codant pour un site clivable par le FXa suivi du même *linker*. Très tôt dans l'expérimentation, il s'est avéré que le premier plasmide ne permettait pas la sécrétion des protéines dans le milieu extracellulaire. La présence de deux peptides signaux au sein de la protéine de fusion empêchant la sécrétion correcte de la protéine en était certainement la cause. Il a alors été nécessaire de construire deux autres plasmides ne possédant pas la séquence codante pour le peptide signal du FXIII-B. Trois plasmides ont ainsi été construits :

- pcDNA3.1 FIX + Site clivable par FIIa/*Linker* + FXIII-B (pcDNA FIX-FIIa-FXIII B)
- pcDNA3.1 FIX + Site clivable par FIIa/*Linker* + FXIII-B sans peptide signal (pcDNA FIX-FIIa-FXIII BØPS)
- pcDNA3.1 FIX + Site clivable par FXa/*Linker* + FXIII-B sans peptide signal (pcDNA FIX-FXa-FXIII BØPS)

1.2.1- Synthèse commerciale de l'ADNc de FIX-FIIa-FXIII B

Le plasmide pcDNA FIX-FIIa-FXIII B a été synthétisé via le service *GeneArt*[®] (Life Technologies). La carte de ce plasmide tel qu'il a été demandé est présentée dans la Figure 29.

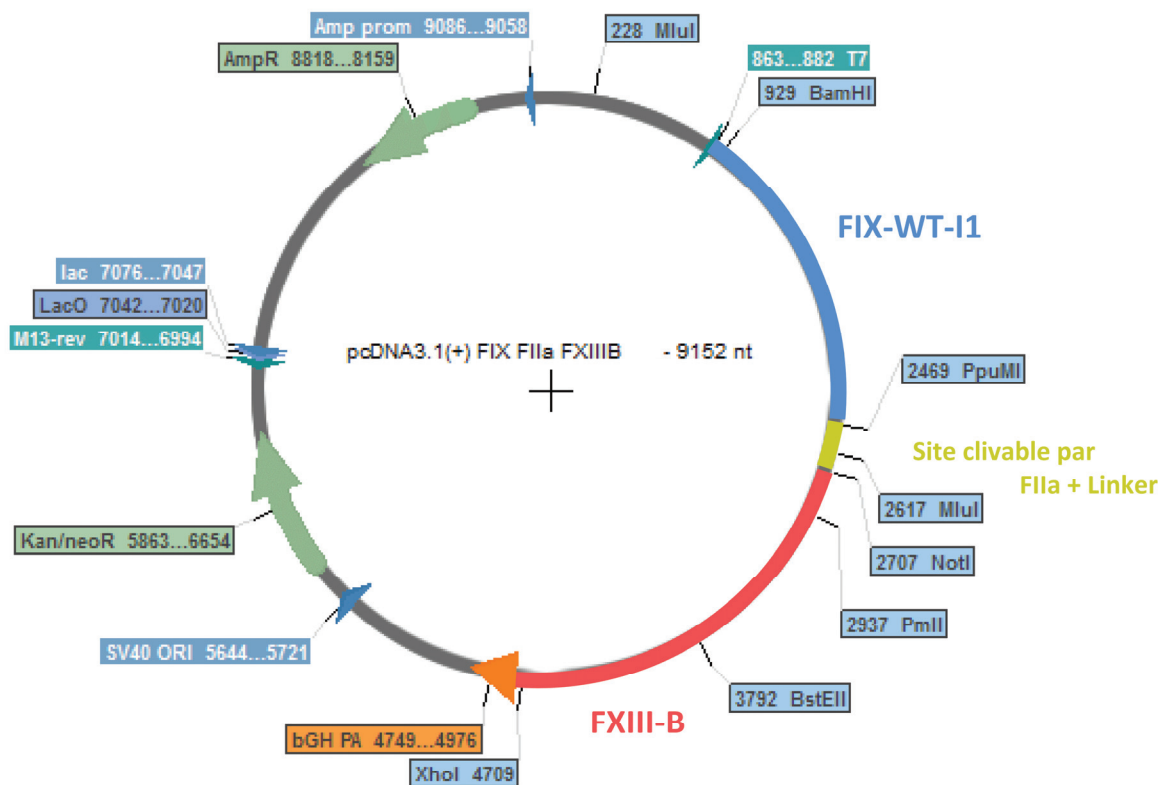


Figure 29. Carte plasmidique du pcDNA FIX-FIIa-FXIII B synthétisé par la société Life Technologies. Les sites de restriction d'intérêt ainsi que les caractéristiques du plasmide ont été placés sur la carte à l'aide du logiciel *Serial Cloner* (Serial Basics).

Après réception du plasmide, celui-ci a été utilisé afin de transformer des bactéries et de réaliser des minipréparations puis des maxipréparations comme décrit précédemment. Ces étapes ont permis de réaliser des digestions enzymatiques du plasmide afin de vérifier la conformité du plasmide et d'obtenir des quantités suffisantes pour le transférer à des cellules eucaryotes.

1.2.2- Obtention du pcDNA FIX-FIIa-FXIIIBØPS

Des expériences préalables avaient permis d'obtenir un plasmide contenant l'ADNc du FXIII-B grâce à des expériences de PCR à partir des ARN totaux d'une biopsie de foie humain prélevée chez un patient sain. Une dernière expérience de PCR a ensuite permis d'obtenir un fragment possédant la première partie (d'environ 1000 bp) de la séquence du FXIII-B débarrassée de la séquence codant pour le peptide signal (FXIIIBØPS). Les amorces utilisées ont été synthétisées par la société Eurogentec et leur séquence est détaillée dans la Figure 30. Les expériences ultérieures de PCR avaient permis d'introduire le site unique de restriction BstEII dans la séquence nucléotidique du FXIII-B sans pour autant changer la séquence d'acides aminés après traduction.

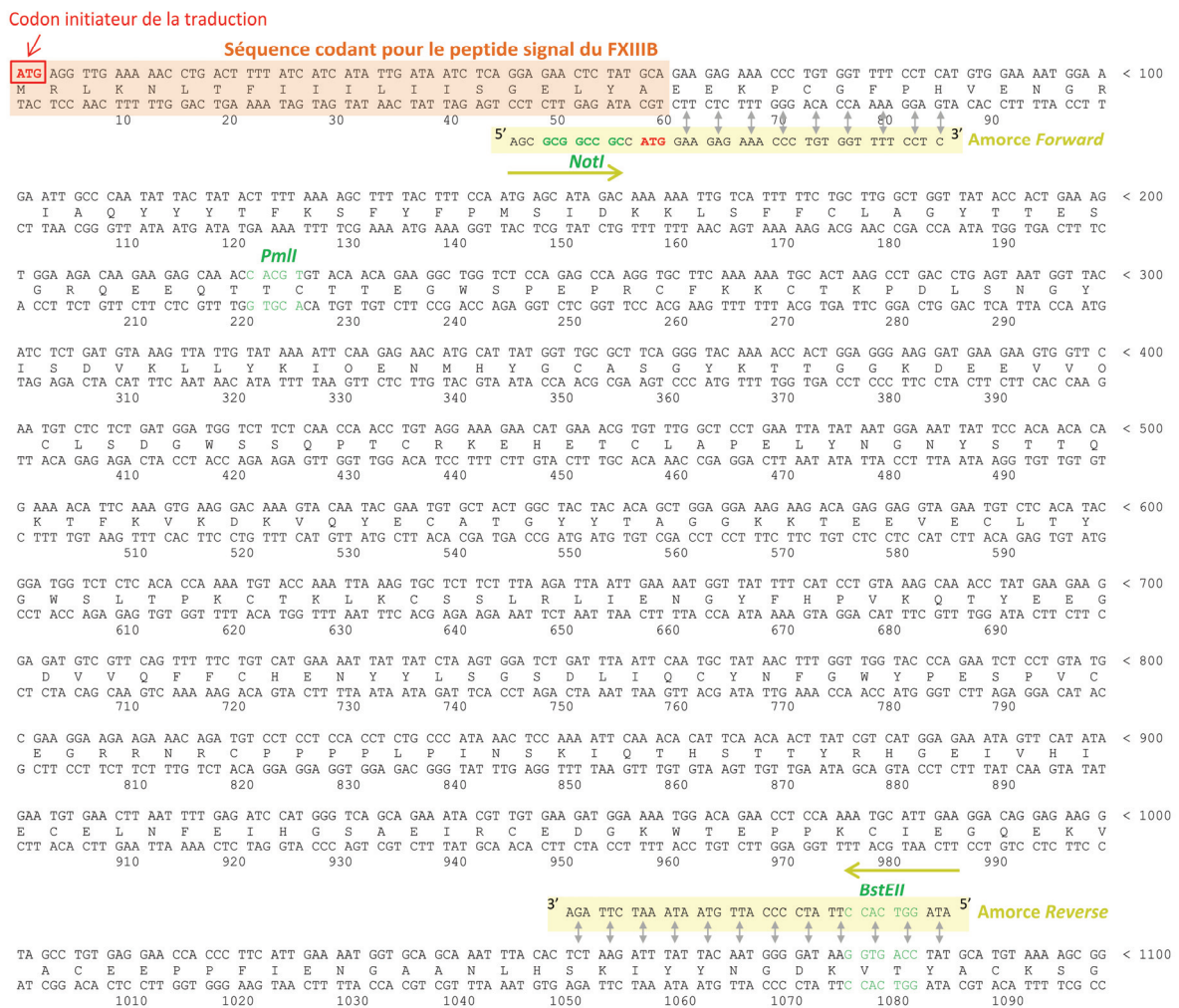


Figure 30. Séquence des 1100 premières paires de bases du FXIII-B. La séquence codant pour le peptide signal est surlignée en orange. Les amorces utilisées pour obtenir un fragment avec un peptide signal tronqué sont surlignées en jaune. Les sites de restriction d'intérêt sont représentés en vert.

Le fragment amplifié par PCR a migré sur gel d'agarose puis a été extrait du gel avant d'être ligué au sein d'un plasmide comme décrit précédemment. La séquence du fragment a été vérifiée par séquençage. Ce plasmide ainsi que le pcDNA3.1 FIX-FIIa-FXIII B ont été digérés par le couple d'enzymes NotI/PmlI et l'insert ne possédant pas le peptide signal a été ligué dans le vecteur. Cette étape de clonage a permis d'obtenir le plasmide pcDNA FIX-FIIa-FXIII BØPS.

1.2.3- Obtention du plasmide pcDNA FIX-FXa-FXIII BØPS

1.2.3.1- Synthèse du linker clivable par le FXa

La séquence contenant le site clivable par le FXa et le linker contenant la séquence répétée AGCGGAGGA, a été produite par une réaction d'hybridation. Les oligonucléotides nécessaires à l'hybridation ont été synthétisés par la société Eurogentec et leur séquence est détaillée dans le Tableau 8. Cette séquence a été liguée au sein d'un plasmide pCR2.1 TOPO après plusieurs étapes de sous-clonages.

Oligonucléotide sens	5' CTCACTACGCGTATCGAGGGACGCATCGTCAGCAGCGGAGGAAGCGGAGGAAGCGGAGG AAGCGGAGGAAGCGGAGGAAGCGGAGGAAGCGGAAGCGCGGCCGCATGAGGTTG 3'
Oligonucléotide anti-sens	5' CAACCTCATGCGGCCGCGCTTCCGCTTCCCTCCGCTTCCCTCCGCTTCCCTCCGCTTCCCTC CGCTTCCCTCCGCTTCCCTCCGCTGCTGACGATGCGTCCCTCGATACGCGTAGTGAG 3'

Tableau 8. Séquence des oligonucléotides utilisés lors de la synthèse du linker clivable par le FXa. Les séquences en rouge et bleu représentent respectivement les sites de restriction MluI et NotI. Les nucléotides surlignés ont été ajoutés afin de respecter le cadre de lecture pour la synthèse du FXIII-B suivant le linker.

1.2.3.2- Etapes de sous-clonages

Le plasmide pcDNA FIX-FIIa-FXIII BØPS possédant deux sites de restriction MluI, il n'a pas été possible de remplacer directement la séquence du linker par celle du linker clivable par le FXa grâce aux sites MluI et NotI. Plusieurs étapes de sous clonage ont alors été nécessaires afin d'obtenir le pcDNA FIX-FXa-FXIII BØPS, ces étapes sont détaillées dans la Figure 31.

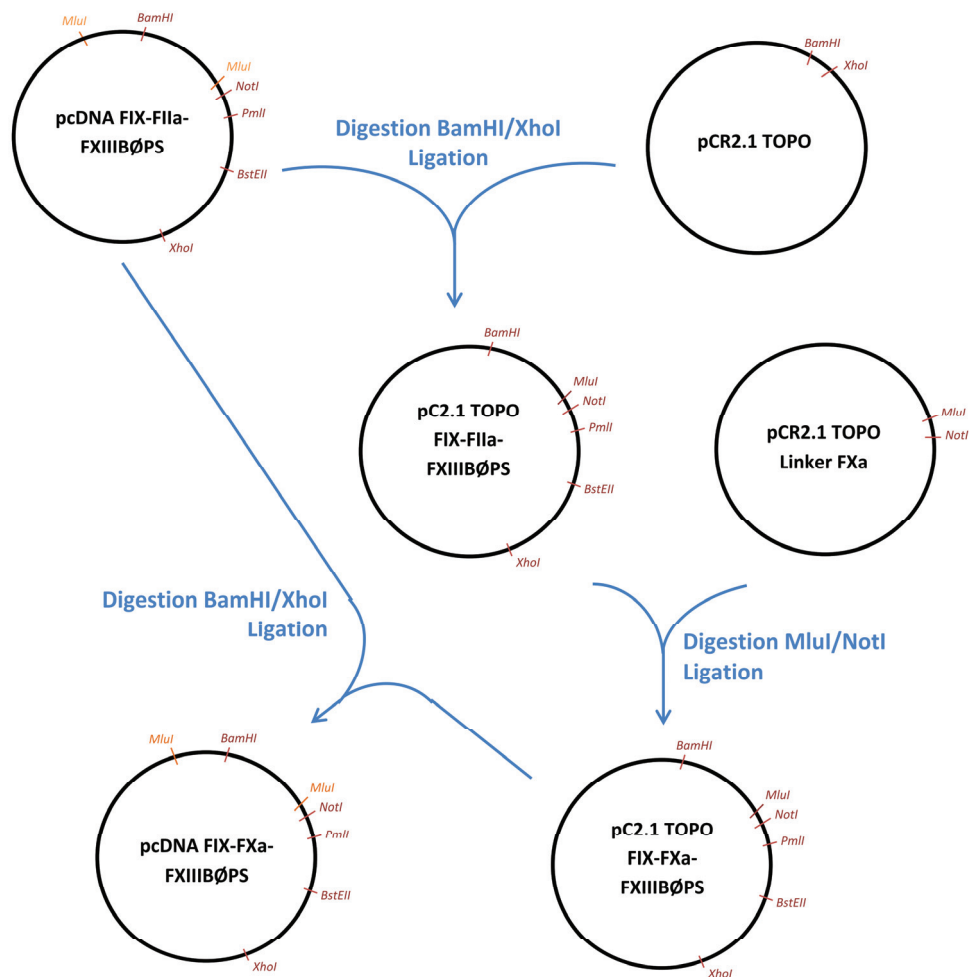


Figure 31. Plan de clonage pour l'obtention du pcDNA FIX-FXa-FXIIBØPS. Les sites de restriction uniques d'intérêt sont représentés en rouge.

Chapitre II : Culture cellulaire

II.1- Lignée cellulaire Huh-7 et entretien de la lignée

La lignée de cellules d'hépatocarcinome humain Huh-7 (JCRB0403) a été utilisée lors des transfections des différents plasmides d'expression. La lignée nous a été fournie par le Docteur Petit de l'équipe INSERM U871.

La lignée cellulaire a été maintenue à 37°C, sous 5 % de CO₂ en atmosphère saturée en eau, dans du milieu de culture HyClone® DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Thermo Scientific™, Courtabœuf, France). Le milieu a été supplémenté par :

- 10 % de Sérum de Veau Fœtal (SVF) (Perbioscience, Brebières, France),
- 1 % de Pénicilline/Streptomycine (*Pen Strep*, Gibco®, Life Technologies)

- 2 mM de L-Glutamine (Gibco®, Life Technologies)
- et 5 µg/ml de vitamine K1 (Roche) nécessaire à la synthèse du FIX.

Les cellules ont été entretenues ou amplifiées deux fois par semaine à raison d'un rapport 1/3. Lors des passages, les cellules ont été décollées par ajout de trypsine (Gibco®, Life Technologies). L'entretien des cellules a été effectué en conditions stériles sous une hotte à flux laminaire.

II.2- Transfections transitoires

Vingt-quatre heures avant la transfection, les cellules Huh-7 ont étéensemencées dans des plaques 6 puits, à raison de 5×10^5 cellules par puits, dans 2 ml de milieu complet avec SVF.

Lorsque les cellules étaient à 70-80 % de confluence, la transfection des plasmides a été réalisée en utilisant le réactif FUGENE-6® (Roche). Les 2 ml de milieu ajoutés la veille ont été remplacés par 1 ml de milieu frais. Parallèlement, 4 µl de FUGENE-6® ont été mélangés délicatement à 50 µl de milieu HyClone® DMEM dépourvu de SVF et d'antibiotique. Le mélange a été incubé 5 minutes à température ambiante puis ajouté goutte à goutte dans un tube contenant 1 µg d'ADN plasmidique. Le mélange a été incubé 25 minutes à température ambiante puis réparti sur l'ensemble du tapis cellulaireensemencé la veille.

Après 48 heures d'incubation, le milieu de culture a été récolté et centrifugé à 13 000 rpm pendant 15 minutes à +4°C. Le surnageant a été congelé à -20°C pour le dosage du FIX par test ELISA et la mesure de l'activité ultérieurs. La tapis cellulaire a été lavé et remis en incubation sur la nuit sous 350 µl de milieu HyClone® DMEM complet dépourvu de SVF. Le surnageant cellulaire sans SVF a ensuite été récolté et centrifugé à 13 000 rpm pendant 15 minutes à +4°C puis congelé à -20°C pour la visualisation ultérieure du FIX.

Pour chaque transfection transitoire, l'ADN plasmidique contenant la séquence du FIX-WT a été transfecté en tant que témoin positif. Par ailleurs, des puits de cellules non transfectées constituaient, lors de chaque expérience, un témoin négatif de la transfection transitoire.

II.3- Sélection de clones cellulaires stables

Une transfection en boîte de Pétri a été effectuée à raison de 1×10^6 cellules par boîte, dans 8 ml de milieu complet avec SVF. Pour une boîte de Pétri, des volumes de 8 µl de FUGENE-6® et de 100 µl de milieu HyClone® DMEM sans SVF ont été ajoutés, goutte à goutte, à 2 µg d'ADN plasmidique. Ce mélange a ensuite été réparti à raison d'un volume de 100 µl par boîte.

Après 24 heures d'incubation à 37°C sous 5% de CO₂, le milieu de culture a été remplacé par 8 ml de milieu frais HyClone® DMEM complet avec SVF supplémenté par 0.3 mg/ml de généticine (G418,

Invitrogen™, Life Technologies, Saint-Aubin, France). Ce milieu a ensuite été changé deux fois par semaine en augmentant progressivement la concentration en généticine jusqu'à 0.4 mg/ml. Les clones résistants à la généticine et possédant ainsi le plasmide d'expression sont apparus entre deux semaines et un mois après la transfection. Chacun des clones a alors été repiqué dans un puits d'une plaque 96 puits.

Après dosage par test ELISA, détermination de l'activité et visualisation du FIX, les trois meilleurs clones ont été amplifiés en plaques 24, 12 et 6 puits puis en flasques T25, T75 et T150 pour obtenir des ampoules contenant 1×10^6 cellules dans un mélange 90 % de milieu complet et 10 % de DMSO (*Diméthylsulfoxyde*, Sigma-Aldrich®, Saint-Quentin Fallavier, France). Ces ampoules ont été conservées à -80°C puis placées dans l'azote liquide.

II.4- Production en roller-bottles

Les cellules du meilleur clone ont été amplifiées etensemencées à raison de 30×10^6 cellules par *roller-bottle* (*Cellmaster rollerbottles*, Greiner BioOne, Brumath, France) sous 35 ml de milieu complet avec SVF. Les *roller-bottles*, d'une surface de $1\,700\text{ cm}^2$, ont été utilisés avec un système de rotation *IBS CellRoll* (Integra Biosciences, Cergy-Pontoise, France) et maintenus à 37°C, sous 5 % de CO₂. Soixante-douze heures après ensemencement, les cellules ont été lavées à l'aide de PBS et mises en présence de 25 ml de milieu sans sérum, puis incubées sur la nuit. Le milieu a été ensuite prélevé et débarrassé des cellules en suspension et autres débris cellulaires par centrifugation à 3 000 rpm pendant 20 minutes à +4°C. Les cellules ont été mises en présence de 25 ml de milieu complet avec SVF sur la journée. Ce protocole de production a été renouvelé trois fois. Les cellules ayant servi à la production n'ont pas été conservées. Les surnageants de culture sans SVF contenant les FIX ont été conservés par congélation à -30°C.

Un aliquot de chaque surnageant de culture sans sérum a été soumis à un dosage de FIX par test ELISA, à une mesure de l'activité par méthode chromométrique et le FIX a été visualisé par western blot à chaque étape de la production.

Des cellules Huh-7 non transfectées ont été amplifiées etensemencées de la même façon afin d'obtenir du milieu dit MOCK dépourvus de FIX. Ce milieu a ensuite été supplémenté de Benefix® à une concentration équivalente à celles observées lors de la production des différents FIX. En suivant les mêmes étapes de purification que les FIX étudiés, le Benefix® a ainsi été utilisé comme référence lors des tests *in vivo*, tout comme le FIX-WT.

Chapitre III : Etapes de purifications

Les surnageants de culture sans SVF ont été poolés et le FIX a été purifié par deux chromatographies successives à l'aide de colonnes branchées sur un système de chromatographie liquide à basse pression (*BioLogic™ LP*, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) couplé à un collecteur de fraction (*Model 2110 Fraction Collector*, Bio-Rad).

III.1- Chromatographie sur colonne échangeuse d'ions

Une colonne échangeuse d'ions (5 ml HiTrap™Q-FF unit, GE Healthcare, Orsay, France) a été utilisée lors de la première étape de purification. La colonne a été préalablement équilibrée à l'aide de tampon Tris 50 mM – NaCl 0.15M – pH7.4, puis chargée par un volume de 500 à 1 000 ml de surnageant de production préalablement filtré sur une unité de filtration de 0,2 µm. La colonne a été ensuite lavée par du tampon Tris 50 mM – NaCl 0.15M – pH7.4. L'élution du FIX a été réalisée par un gradient de sel à l'aide de tampon Tris 50 mM – NaCl 1M – pH7.4. L'éluat a été récolté sous forme de fractions de 1 ml dosées par test ELISA anti-FIX et conservées ensuite à -20°C. La colonne a été lavée par du tampon Tris 50 mM – NaCl 1M – pH7.4 puis conservée à +4°C dans du tampon Acétate de Sodium 200 mM – 20 % éthanol.

Les fractions les plus concentrées en FIX ont ensuite été poolées, dialysées contre du tampon PBS à l'aide d'une membrane de dialyse ayant un *cut-off* de 10 kDa (*SnakeSkin® Dialysis Tubing*, Thermo Scientific™) puis concentrées sur une unité de concentration de 15 ml de *cut-off* 10 kDa (*Amicon®Ultra-15*, Millipore S.A.S, Guyancourt, France).

III.2- Chromatographie sur colonne héparine

Une colonne héparine (1 ml HiTrap™ Heparin HP, GE Healthcare) a été utilisée dans un second temps. Le pool des fractions dialysé et concentré à 10 ml a été chargé sur la colonne préalablement équilibrée par du tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{K}_2\text{HPO}_4$) 50 mM – pH7.2. Le FIX a été élué par un gradient de NaCl à l'aide du tampon phosphate 50 mM – NaCl 1M – pH7.2. Les fractions de 300 µl ont été dessalées par dialyse contre du tampon phosphate 50 mM – pH7.2 puis plus ou moins concentrées en fonction des besoins des expériences ultérieures sur des unités de concentration de 15 ml, 4 ml (*Amicon®Ultra-4*, Millipore S.A.S) ou 500 µl (*Amicon®Ultra-0.5mL*, Millipore S.A.S) ayant un *cut-off* de 10 kDa. La colonne héparine a été conservée à +4°C dans de l'éthanol 20 %.

Chapitre IV : Dosage et visualisation du FIX

IV.1- Dosage du FIX par test ELISA

La concentration en FIX dans les surnageants de production ou dans les fractions purifiées a été déterminée par dosage immuno-enzymatique via la technique ELISA (*Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*) à l'aide du kit Asserachrom®IX:Ag (Diagnostica Stago, Asnières, France) selon les recommandations du fabricant. Un tapis de fragments F(ab')₂ d'anticorps de lapin anti-FIX humain a capté le FIX contenu dans les échantillons. Le FIX fixé a été révélé à l'aide d'immunoglobulines de lapin anti-FIX humain couplées à la peroxydase. La lecture de l'intensité de la coloration a été réalisée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 450 nm. La densité optique affichée a ensuite été reportée sur une droite d'étalonnage d'un standard de pdFIX fourni dans le kit afin de déterminer la valeur de la concentration en FIX.

Une seconde technique de dosage ELISA en sandwich a été utilisée lors de l'étude du FIX-FXa-FXIII $\text{B}\text{\O}$ PS. L'anticorps de capture était un anticorps polyclonal anti-FIX du kit FIX-EIA (Kordia Life Sciences, Pays-Bas) et a été utilisé selon les recommandations du fabricant.

IV.2- Visualisation du FIX

IV.2.1- Composition des gels et des tampons

Les gels de polyacrylamide utilisés pour la migration des protéines ont été obtenus par polymérisation d'un gel de migration inférieur et d'un gel de concentration supérieur contenant les puits de dépôt des échantillons. La composition des gels est détaillée dans le Tableau 9.

	Gel de migration 10%	Gel de concentration 4%
Eau distillée	2.9 ml	1.4 ml
Tris-HCl 1.5 M – pH8.8	2.6 ml	-
Tris-HCl 0.5 M – pH6.8	-	0.6 ml
Acrylamide/Bisacrylamide (29 :1)	2 ml	0.3 ml
Persulfate d'ammonium 10%	60 μ l	19 μ l
UltraPure™ Temed (Invitrogen™)	9 μ l	3.8 μ l

Tableau 9. Composition des gels utilisés lors de l'électrophorèse SDS PAGE.

Le tampon de Laemmli utilisé était sous forme [6X], sa composition était la suivante : Tris-HCl 1.5 M, pH6.8 – Dodécylsulfate de Sodium (SDS) 9 % – Glycérol 50 % – β -Mercaptoéthanol 9 % – Bleu de Bromophénol 0.3 %.

Le tampon de migration utilisé lors de l'électrophorèse était du tampon Tris 25 mM – Glycine 190 mM – SDS 4 mM – pH8.3.

Le tampon de transfert liquide était composé de Tris 25 mM – Glycine 190 mM – Ethanol 20 %.

Le tampon TBS (*Tris Buffer Saline*)/Tween utilisé lors du western blot était composé de Tris 40 mM pH7.5 – NaCl 150 mM – Tween 20 à 0.05 %.

IV.2.2- Migration du FIX par électrophorèse SDS PAGE

Les échantillons contenant le FIX ont été dilués dans du tampon de Laemmli [6X] avant d'être dénaturés 5 minutes à 96°C. Des volumes de 6 à 20 µl des échantillons dilués ont été déposés dans les puits. La migration a été réalisée à l'aide d'une cuve de migration remplie de tampon de migration à un voltage de 200 puis 240 volts jusqu'à ce que le front de migration ait atteint le bas du gel.

Un marqueur de taille moléculaire a également été déposé pour chaque gel de migration. Deux marqueurs différents ont été utilisés au cours de cette étude : *Precision Plus Protein™ Standards* (BioRad, Hercules, CA, Etats-Unis) et *Prestained Protein Ladder, Broad Range (10-230 kDa)* (New England BioLabs® Inc.). Les profils de migration des deux marqueurs sont détaillés dans la Figure 32.

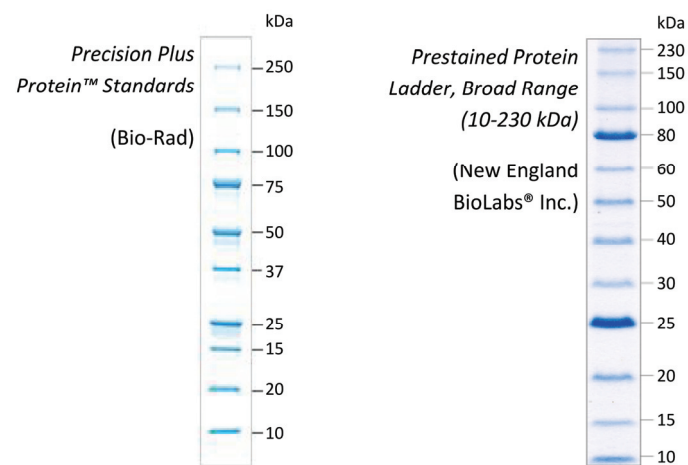


Figure 32. Profils de migration des deux marqueurs de taille utilisés lors des migrations par électrophorèse SDS PAGE.

IV.2.3- Transfert liquide sur membrane de nitrocellulose

Les protéines séparées dans le gel de polyacrylamide ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose (*Amersham™ Hybond ECL*, GE Healthcare) par un transfert liquide à un ampérage fixe de 350 mA pendant 1h30.

IV.2.4- Visualisation du FIX par western blot

A la suite du transfert liquide, la membrane a été saturée par incubation en TBS/Tween 5 % lait pendant une heure à température ambiante. Après l'étape de saturation, la membrane a été incubée

avec une solution d'anticorps primaires pendant une heure, puis lavée trois fois 5 minutes en tampon TBS/Tween avant d'être incubée avec une solution d'anticorps secondaires pendant 30 minutes. Les anticorps ont été utilisés en fonction de la protéine à visualiser, les anticorps ainsi que leur origine et la dilution réalisée sont détaillés dans le Tableau 10. La membrane a ensuite été lavée trois fois en tampon TBS/Tween et les bandes correspondant aux protéines ont été détectées à l'aide du kit de révélation *Clarity™ Western ECL Substrate* (Bio-Rad). Les signaux émis ont été visualisés par application d'un film photographique (*Kodack ECL*, GE Healthcare).

	Anticorps primaires	Anticorps secondaires
FIX		
<i>Anticorps</i>	Polyclonal anti-FIX de lapin	IgG (H+L) de chèvre anti-lapin / HRP
<i>Origine</i>	Extrait de sérum de lapin [‡]	Covalab (Villeurbanne, France)
<i>Dilution</i>	Sérum dilué au 1/3000	Solution commerciale diluée au 1/3000
FIX-FXIII B		
<i>Anticorps</i>	Polyclonal α FXIII B de lapin	IgG (H+L) de chèvre anti-lapin / HRP
<i>Origine</i>	Atlas Antibodies AB (Stockholm, Suède)	Covalab (Villeurbanne, France)
<i>Dilution</i>	Solution commerciale diluée au 1/500	Solution commerciale diluée au 1/3000
<i>Anticorps</i>	Monoclonal α FIX de souris	IgG (H+L) de chèvre anti-souris / HRP
<i>Origine</i>	Culture cellulaire d'hybridome*	Bio-Rad
<i>Dilution</i>	Surnageant d'hybridome* au 1/2	Solution commerciale diluée au 1/3000

Tableau 10. Anticorps primaires et secondaires utilisés lors de la visualisation des différents FIX et FIX-FXIII B. [‡] : Les anticorps ont été extraits de sérum total de lapin immunisé par du Benefix®. * : L'hybridome a été obtenu à l'aide de souris immunisée par du Benefix®. Les anticorps ont été dilués dans du tampon TBS/Tween. HRP : *Horseshoe Peroxydase*.

Chapitre V : Tests fonctionnels

V.1- Evaluation de l'activité

V.1.1- Mesure de l'activité par méthode chronométrique

L'activité du FIX dans les surnageants de production ou dans les fractions purifiées a été évaluée par méthode chronométrique sur le coagulomètre DestinyMax® (Tcoag, Bray, Irlande).

Les surnageants ou les fractions purifiées ont été dilués puis supplémentés de plasma déficient en FIX (Immuno, Illkirch, France). Le réactif du kit MDA® Platelin® LS (Tcoag) contenant des phospholipides et de la silice micro ionisée (activateur) a été ajouté au mélange. Après 3 minutes d'incubation à 37°C, la réaction de coagulation a été déclenchée par ajout de la solution MDA® Platelin® LS - CaCl₂ 25 mM et le temps de coagulation a été mesuré sur le coagulomètre. L'activité du FIX a été déterminée à partir d'une gamme standard réalisée avec un plasma humain contrôle (Precision Biologic, Darmouth, Canada).

V.1.2- Mesure de l'activité par méthode chromogénique

La détermination *in vitro* de l'activité du FIX purifié a également été déterminée à l'aide du kit *Biophen FIX* (Hyphen BioMed, Neuville-sur-Oise, France) qui utilise une méthode colorimétrique. L'ensemble des facteurs impliqués dans l'activation et l'activité du FIX se trouvaient en excès dans la réaction, seul le FIX se trouvait être le facteur limitant. Ainsi, la quantité de FXa formée était fonction du taux de FIX. Les FIX étant placés à des concentrations identiques et connues, la quantité de FXa formée dépendait de l'activité de chaque FIX. Ce FXa ainsi formé clivait un substrat chromogène spécifique du FXa. La quantité de substrat chromogène libérée a été mesurée par lecture de la densité optique à 405 nm reportée à une gamme d'étalonnage réalisée à l'aide d'un standard de pdFIX.

V.2- Détermination de la capacité de génération de thrombine

La capacité de génération de thrombine *in vitro* a été mesurée sur le fluoromètre *Fluoroscan Ascent™ Microplate* (Thermo Scientific™). Du plasma déficient en FIX (FIX < 1 %) (Cryo-check FIX deficient plasma, Precision Biologic Inc, Dartmouth, NS, USA) et pauvre en plaquettes a été supplémenté par le FIX à tester. Le tampon utilisé était composé d'Hepes 20 mM pH7.35 – NaCl 140 mM supplémenté de 5 mg/ml d'albumine sérique bovine (BSA: *bovine serum albumin*) (Euromedex, Souffelweyersheim, France). L'expérience a consisté à placer, dans les puits d'une plaque 96 puits, 80 µl de plasma pauvre en plaquettes (PPP) supplémenté du FIX à tester puis 20 µl d'un mélange de FT recombinant (Dade® Innovin®, Siemens, Marburg, Allemagne) et de phospholipides (phosphatidylsérine 20 % - phosphatidyléthanolamine 20 % - phosphatidylcholine 60 %), pour atteindre des concentrations finales respectives de 1 pM et 4 µM. Les phospholipides ont été préparés au laboratoire par méthode d'extrusion [234]. Un volume de 20 µl d'un mélange de CaCl₂ et du substrat fluorogénique (Z-Gly-Gly-Arg-AMC, Bachem, Bubendorf, Suisse) a ensuite été ajouté dans les puits. Ce mélange avait été préalablement préparé dans un tampon Hepes 20 mM pH7.35 – BSA 60 mg/ml, avec CaCl₂ 0,1 M et substrat fluorogénique 2,5 M. Le logiciel *Thrombinoscope* (Synapse Bv, Maastricht, Pays-Bas) a ensuite permis de calculer l'activité de la thrombine en fonction du temps.

La capacité de génération de thrombine *in vivo* induite par les FIX chez la souris hémophile B a été mesurée selon un protocole similaire mais les plasmas de souris ont été dilués au 1/6^e afin de s'affranchir de l'excès d'inhibiteurs, comme l'AT, présents chez la souris. La concentration en FT était de 0,5 pM [235].

V.3- Activation du FIX

D'une part, des cinétiques d'activation du FIX par le FXIa et par le complexe FVIIa-FT ont été réalisées. Le FXIa recombinant a été commandé chez Cryopep (Montpellier, France), le FVIIa

provenait du NovoSeven® (Novo Nordisk®, Upsala, Suède) et le FT recombinant du Dade® Innovin®. Les phospholipides PC:PS (75:25) (75 % de phosphatidylcholine et 25 % de phosphatidylsérine) ont été préparés au laboratoire par méthode d'extrusion. Le tampon de réaction était composé d'Hepes 20 mM pH7.4 – NaCl 150 mM – CaCl₂ 5 mM. Le FIX purifié (167 nM) a été incubé à 37°C avec le FXIa (4,17 nM) ou avec le FVIIa (1,67 nM) et le FT (1,48 nM), en présence de 20 µM de PC:PS (75:25). Pour chaque réaction d'activation, des échantillons ont été prélevés à différents temps et la réaction a été arrêtée par ajout de tampon de Laemmli [6X].

D'autre part, le FIX (116 nM) a été pleinement activé par le FXIa (3,35 nM) après une incubation de 5 heures à 37°C, en présence de phospholipides et dans le même tampon de réaction.

Enfin, le FIX-FXa-FXIII B ϕ PS (930 pM) a été activé par une incubation de 5h à 37°C en présence de FVIIa (93 pM), de FT (9 pM) et de PC:PS (75:25) (20 µM). Le tampon de réaction était composé d'Hepes 25 mM pH7.4 – NaCl 137 mM – KCl 3.5 mM – Tween 20 0.005 % – CaCl₂ 5 mM.

Le FIXa de chaque échantillon a ensuite été visualisé par électrophorèse suivi d'un western blot.

V.4- Titration du FIXa par l'antithrombine

La concentration du FIX pleinement activé par le FXIa a été déterminée par titration du site actif du FIXa en utilisant l'AT (ATIII, Diagnostica Stago), en absence de FVIIIa et de thrombine. Le tampon Hepes utilisé a été supplémenté avec 1 mg/ml de BSA (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, Etats-Unis) et avec 0,5 µg/ml d'héparine (Roche).

Des solutions de FIXa estimée à environ 15 nM ont été incubées 15 minutes à 37°C en présence d'une gamme de 0 à 15 nM d'AT. Une génération de FXa a ensuite été initiée par ajout de 600 nM de FX (Cryopep), de 3 mM de CaCl₂ et de 50 µM de PC:PS. L'hydrolyse du substrat chromogène du FXa (PNAPEP 1025, Cryopep, Montpellier, France) a été suivie par mesure de l'absorbance à 405 nm et tracée en fonction de la concentration en AT. En supposant qu'une mole de FIXa était inhibée par une mole d'AT, la concentration en FIXa dans l'échantillon a été déterminée comme étant la valeur d'intersection de l'axe des abscisses.

V.5- Générations de FXa par FIXa – Détermination des paramètres cinétiques *in vitro*

V.5.1- Génération de FXa en absence de FVIIIa

La génération de FXa a été observée grâce à l'hydrolyse du PNAPEP 1025. Les concentrations en FXa générées ont été déterminées par l'utilisation d'une gamme standard préparée avec des concentrations connues en FXa commercial (Cryopep). Le tampon de réaction utilisé était du tampon Hepes 20 mM pH7.4 – NaCl 150 mM – BSA 1 mg/ml. Dans une plaque 96 puits, des concentrations

croissantes de 0 à 1600 nM de FX (50 µl) ont été ajoutées à une solution de FIXa 40 nM et de PC:PS 80 µM (25µl). La réaction a été déclenchée par ajout d'une solution de PNAPEP 1025 (1 mM) et de CaCl₂ (6 mM) (25µl). Après une incubation de 7 minutes à 37°C, l'évolution de l'absorbance à 405 nm a été enregistrée toutes les 9 secondes pendant 3 minutes à l'aide d'un lecteur de plaque et du logiciel *SoftMax[®] Pro* (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA, Etats-Unis).

V.5.2- Génération de FXa en présence de FVIIIa

V.5.2.1- Concentrations variables en FX

Du fait de son instabilité, le FVIII activé a été préparé extemporanément. Le FVIII activé a été préparé par incubation de 12 nM de FVIII (*Kogenate[®] Bayer*, Bayer Healthcare, Berkeley, CA, Etats-Unis) et de 15 nM de thrombine issue de plasma humain (*Sigma-Aldrich[®]*) pendant 1 minute à 37°C. La formation du complexe *tenase* s'est déroulée pendant 1 minute à 37 °C après ajout d'une solution de 9 nM de FIXa et de 90 µM de phospholipides. L'action de la thrombine a été bloquée par 4 ATU de r-hirudine (*Pentapharm*, Basel, Suisse) pendant 1 minute à 37°C. Après ajout de l'hirudine, le complexe a été mis au contact d'une gamme de FX de 0 à 200 nM final, gamme préparée extemporanément en plaque 96 puits. La génération de FXa et la réaction chromogène ont été déclenchées par ajout d'une solution de CaCl₂ et d'un substrat chromogène du FXa. Après 2 minutes d'incubation à 37°C, la génération de FXa a été déterminée par mesure de la DO/min à 405 nm pendant 3 minutes à 37°C. Les concentrations finales étaient : 2 nM FIXa - 0,30 nM FVIIIa - 0,37 nM FIIa - 20 µM PC:PS – 0 à 200 nM FX - 3 mM CaCl₂ - 0,5 mM PNAPEP 1025.

V.5.2.2- Concentrations variables en FIXa

L'efficacité de la liaison du FIXa au FVIIIa a été déterminée à une concentration limitante en FVIIIa. Une gamme de 0 à 40 nM de FIXa a été supplémentée de FVIIIa préparé extemporanément (0,6 nM), de FX (400 nM) et de PNAPEP 1025 (1M). Après 3 minutes d'incubation à 37°C, la DO/min à 405 nm a été mesurée pendant 3 minutes.

V.6- Clivage de la protéine de fusion FIX-FXIIIBØPS

Le FIX-FXa-FXIIIBØPS (0.016 nM final) a été incubé avec des concentrations croissantes en FXa (0,22 à 5,45 nM final) en présence de PC:PS 20 µM, dans du tampon Hepes 20 mM pH7.4 – NaCl 150 mM – CaCl₂ 3 mM. Après incubation 1 heure à 37°C, les réactions ont été arrêtées par ajout de bleu de Laemmli [6X].

Les formes clivées de chaque échantillon ont ensuite été visualisées par électrophorèse suivi d'un western blot anti-FIX.

Chapitre VI : Tests *in vivo*

Les expérimentations menées sur les animaux ont été approuvées par le Comité d'expérimentation animale de l'Université Claude Bernard Lyon 1, en accord avec les directives européennes (Protocole n° BH2013-03).

VI.1- Lignées murines

Des souris *wild-type* non hémophiles (C57BL/6J) et des souris hémophiles B (B6.129P2-F9tm1Dws/J) ont été commandées auprès de *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, Maine, Etats-Unis) et élevées sur notre site au sein d'une animalerie conventionnelle. Les animaux utilisés pesaient approximativement 20 grammes, étaient des deux sexes et âgés de 8 à 10 semaines. L'ensemble des expérimentations a été pratiquée sous anesthésie par l'isoflurane 5%. Afin d'atteindre un taux de FIX circulant de 5 µg/ml, une quantité de 10 µg de FIX était injectée pour une souris de 20 grammes.

VI.2- Préparation des échantillons avant injection

Après purification du FIX, les fractions ont été concentrées et diluées dans une solution stabilisante permettant l'injection des échantillons. Cette solution [10X] était composée de saccharose 10 g/l – glycine 60 g/l – NaCl 10 g/l. Une fois les échantillons à tester dilués dans cette solution (concentration finale [1X]), le FIX a été dosé par test ELISA afin de connaître la quantité exacte à injecter à chacune des souris, le volume à injecter devant toujours se trouver à environ 100 µl.

VI.3- Protocole d'expérimentation *in vivo*

Une première expérimentation a permis de caractériser *in vivo* le FIX circulant dans le plasma murin deux minutes après injection. Le sang total murin a alors été prélevé via la veine cave inférieure deux minutes après injection du FIX. Une aiguille de 23 gauge ainsi qu'une seringue de 1 ml ont été utilisées. Afin d'éviter un déclenchement de la coagulation dans le tube de prélèvement, du citrate de sodium a été ajouté au sang avec un ratio 1:9. Une seconde expérimentation a permis quant à elle d'étudier le comportement pharmacocinétique du FIX *in vivo*. Des échantillons de sang murins ont alors été prélevés 2, 30, 90 et 300 minutes après injection des FIX-WT et FIX-E410 ; et à 2 minutes, 2 heures, 5 heures, 24 heures et 30 heures après injection du FIX-FXa-FXIIIBØPS, via le sinus rétro-orbital et à l'aide de pipettes Pasteur silylées.

VI.4- Traitement des échantillons

Dans l'heure suivant le prélèvement, les échantillons ont été traités de façon à obtenir des plasmas pauvres ou riches en plaquettes, selon le besoin des expériences ultérieures.

Les PPP ont été obtenus par centrifugation à 2 500 g pendant 15 minutes à température ambiante tandis qu'une centrifugation à 300 g pendant 3 minutes a permis de préparer les plasmas riches en plaquettes (PRP).

Le FIX des différents échantillons plasmatiques a ainsi pu être caractérisé par test ELISA, par détermination de la capacité à générer la thrombine ou encore par détermination de l'activité via la méthode chromogénique.

Chapitre VII : Etude des interactions du FIX

VII.1- Interaction FIX/A2(FVIII) par SPR

L'interaction entre le FIXa et le domaine A2 du FVIII a été étudiée par SPR à l'aide d'un système *Biacore T100 biosensor* (GE Healthcare) disponible au plateau technique « Production et Analyse de Protéine » de Lyon. Le domaine A2 du FVIII a été synthétisé par la société Protéus (Nîmes, France) et nous a gentiment été fourni par l'équipe du Docteur Lavigne du laboratoire d'hématologie de Montpellier. Le domaine A2 a été immobilisé sur une puce *CM5 Sensor chip* (GE Healthcare) à raison de 39,2 fmol/mm² à l'aide d'une méthode de couplage amine selon les recommandations du fabricant. Le FIXa a été injecté dans le système à différentes concentrations (de 0 à 60 nM) à un débit de 20 µl/min dans un tampon composé de Hepes 20 mM – NaCl 150 mM – Tween 20 0,005% - pH7.4. Les phases d'association et de dissociation avaient une durée de 3 minutes chacune. La régénération de la puce a été réalisée par incubation du tampon Hepes 20 mM – NaCl 1 M – EDTA 10 mM – Tween 20 0,005% - pH7.4. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel *BIAevaluation 3.1*.

VII.2- Interaction FIX/plaquettes *ex vivo*

Le sang total de 5 souris hémophiles B et un échantillon de sang humain ont été recueillis et mélangés directement à du tampon anticoagulant ACD (*Acid-citrate-dextrose*) à raison d'un volume de tampon pour 6 volumes de sang. Le tampon ACD était composé de 1,25 g de citrate de sodium dihydrate, de 0,64 g d'acide citrique anhydre et de 1 g de D(+)glucose pour un volume final de 50 ml et un pH ajusté à 4.5. Une suspension de plaquettes lavées a été obtenue par des centrifugations et lavages successifs. Les plaquettes, ainsi débarrassées des facteurs de la coagulation ou d'autres composants plasmatiques, ont été resuspendues en tampon physiologique contenant 2 mM de CaCl₂. Après comptage des plaquettes, 500 à 2000 x 10⁶ plaquettes murines / ml et 150 x 10⁶ plaquettes humaines / ml ont été incubées à 37°C avec 2 à 5 µg/ml de FIX purifié. Des échantillons ont été prélevés à 2, 15, 30 et 60 minutes puis centrifugés 30 secondes à 10 000 rpm afin de culoter les

plaquettes en suspension et de doser le FIX restant après différents temps de liaison aux plaquettes à l'aide d'un test ELISA.

VII.3- Interaction FIX/cellules endothéliales

Deux jours avant l'expérience, des cellules endothéliales de la lignée EAhy926 (ATCC[®] CRL-2922™) ont étéensemencées en plaque 24 puits à raison de $2,5 \times 10^5$ cellules / puits dans un volume de 1 ml de milieu complet DMEM supplémenté de SVF. Des concentrations de 2,5 et 5 µg/ml de FIX ont été incubées à 37°C sur le tapis cellulaire pendant 2, 30 et 60 minutes en présence de 3 mM de CaCl₂. Les quantités de FIX restant dans les surnageants ont ensuite été déterminées par test ELISA.

Chapitre VIII : Analyses des données

Concernant l'analyse des paramètres cinétiques *in vitro*, le logiciel *SoftMax[®] Pro* a permis d'obtenir des données analysées par l'algorithme basé sur la méthode Levenberg–Marquardt. L'équation de Michaelis-Menten a été utilisée dans le logiciel *GraphPad Prism 5[®]* (GraphPad Software, San Diego, CA, Etats-Unis) afin d'obtenir les valeurs de Vmax et de Km des activations du FX par le FIXa, avec ou sans FVIIIa. Les valeurs de Kd apparent du FIXa pour le FVIIIa ont été dérivées de calculs dans *GraphPad Prism 5[®]*.

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart-type excepté pour les expériences de SPR. Comme cela est le cas dans la littérature [138], nous avons considéré que des différences observées pour chaque concentration en FIXa injecté démontraient des différences d'interaction répétables.

Les groupes ont été comparés à l'aide du test de Mann-Whitney dans le logiciel *GraphPad Prism 5[®]*, une valeur de *p-value* ≤ 0,05 était considérée comme statistiquement significative.

Partie IV : RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre I : Expression et caractérisation du FIX recombinant synthétisé par la lignée cellulaire d'hépatocarcinome humain Huh-7

Les résultats sont détaillés dans l'article n°1 publié dans le journal *Thrombosis Research* (inclus dans ce manuscrit aux pages 113-120) et dans l'article n°2 soumis au journal *Haemophilia* (inclus aux pages 123-134).

Le Benefix® (BIX) présente un taux de récupération après injection chez le malade [70] inférieur à celui obtenu avec les FIX plasmatiques commerciaux (Mononine® : MIX, CSL Behring ; Betafact®, LFB). Cette différence peut être attribuée à des différences de modifications post-traductionnelles, principalement la sulfatation de la tyrosine 155 et la phosphorylation de la sérine 158.

Le but de ce projet visait à améliorer les modifications post-traductionnelles du rFIX de façon à les rendre les plus proches possibles de celles du pdFIX. Nous avons choisi la lignée hépatique humaine Huh-7, lignée connue comme pouvant générer des clones stables producteurs de molécules recombinantes. Après transfections transitoires de cette lignée, nous nous sommes assuré que ce type cellulaire pouvait générer l'ARNm correspondant à la construction plasmidique. Après électrophorèse, le FIX a été montré comme correctement sécrété dans le milieu avec le poids moléculaire attendu. La protéine intracellulaire a présenté plusieurs signaux correspondant à différentes formes en cours de modifications post-traductionnelles. Nous avons montré à l'aide d'inhibiteurs spécifiques que ce FIX était correctement transloqué dans le réticulum endoplasmique pour se retrouver ensuite dans l'appareil de Golgi. Une faible concentration intracellulaire était dirigée vers la voie lysosomale. Ce FIX empruntait ainsi les voies intracellulaires classiques avant d'être sécrété.

Par la suite, nous avons généré un clone cellulaire capable de sécréter de manière stable le FIX à un taux de 0,5 µg/ml pour 10⁶ cellules : le clone cellulaire CD4. Ce nouveau FIX (HIX) a présenté une activité spécifique de 250 UI/mg, activité légèrement supérieure aux deux formes commerciales.

Pour étudier ce nouveau FIX, nous avons mis au point un système de production de la protéine sécrétée par ce clone cellulaire dans du milieu sans sérum et un protocole de purification du HIX par

chromatographie échangeuse d'ions et immunoaffinité de façon à caractériser ses modifications post-traductionnelles. Tout d'abord, le HIX a été démontré comme correctement glycosylé par rapport au BIX et MIX. Par la suite, le HIX a été caractérisé par spectrométrie de masse de manière à identifier certaines modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation de la sérine 158 impliquée dans la baisse du taux de récupération en la comparant avec celle de la forme plasmatique (MIX) et celle du BIX recombinant. Ces analyses qualitatives préliminaires ont montré la pleine phosphorylation du pdFIX ainsi que la présence dans la préparation de FIX issu du clone cellulaire Huh-7 de formes phosphorylées et sulfatées.

Ces travaux ont montré qu'un clone cellulaire d'origine hépatique pouvait sécréter un FIX pleinement actif présentant des modifications post-traductionnelles plus proches de celles de la forme plasmatique que de la forme recombinante.

Le procédé d'élaboration du clone cellulaire Huh-7-CD4 (clone CD4) a fait l'objet d'un brevet en octobre 2009 pour la France et la demande d'exploitation a été étendue à l'Europe en septembre 2014.



Regular Article

Human hepatoma cell line HuH-7 is an effective cellular system to produce recombinant factor IX with improved post-translational modifications

Nathalie Enjolras ^{a,*}, Yesim Dargaud ^a, Eloïse Pérot ^a, Florine Guillaume ^a, Michel Becchi ^b, Claude Négrier ^a^a Unite Hemostase, Inflammation & Sepsis EA 4174, Universite Lyon1-Hospices Civils de Lyon, Faculte de Medecine Laennec, 69372 Lyon cedex 08, France^b Institut de Biologie et de Chimie des Proteines UMS 3444, CNRS/Universite Lyon1, 69367 Lyon cedex 07, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 March 2012

Received in revised form 14 August 2012

Accepted 28 August 2012

Available online 25 September 2012

Keywords:

Recombinant Factor IX (rFIX)

Hemophilia B

HuH-7 cell line

Post-translational modifications (PTM)

ESI-MS

ABSTRACT

Recombinant factor IX (rFIX) is increasingly used to treat patients with hemophilia B. CHO (Chinese Hamster Ovary) cells are commonly used for the production of rFIX but they have a limited capacity for introducing post-translational modifications (PTM) leading to incomplete γ -carboxylation, low phosphorylation and sulfation profiles as compared with plasma-derived preparations. Imperfect PTM might have an impact on the activity of Factor IX molecule. Several studies in animal models as well as clinical trials have previously reported a lower recovery of rFIX compared to plasma-derived FIX concentrates.

In the present study, we aimed to produce a rFIX having a profile of PTM similar to plasma-derived FIX, using human hepatoma cell line HuH-7. We showed that rFIX produced by HuH-7 cells followed the classical intracellular pathway before secretion. In addition, improved PTM were associated with fully active molecule compared to plasma-derived and recombinant control FIX molecules. Secreted rFIX presented as a single band at the correct molecular weight. HuH-7 cellular clones were obtained and they secreted a biologically active human FIX. FIX was then purified for a detailed evaluation of PTM. Glycosylation and sialylation profiles were similar to plasma-derived and rFIX and mass spectrometry analysis demonstrated the presence of phosphorylated and sulfated forms of rFIX.

These data strongly support that HuH-7 cells may represent an effective cellular system for production of rFIX exhibiting PTM similar to plasma-derived FIX.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Hemophilia B is an inherited coagulation defect characterized by a deficiency in human factor IX (FIX). Patients with hemophilia B are commonly treated with plasma-derived FIX concentrates (pdFIX) prepared from pooled human plasma. More recently, recombinant FIX (rFIX) was produced in transfected Chinese hamster ovary (CHO) cells co-expressing the endopeptidase PACE/Furin for proper protein maturation [1]. Nevertheless, CHO cells have a limited capacity for introducing post-translational modifications, which lead to incomplete γ -carboxylation, decreased phosphorylation and sulfation of the recombinant coagulation proteins [2].

Though the circulating half-life of rFIX is not distinguishable from that of pdFIX, clinical data in patients with hemophilia B have shown that rFIX has a lower in-vivo recovery than plasma-derived preparations [3–5]. Phosphorylation has been considered as a critical feature explaining this low in-vivo recovery since similar in-vivo recoveries were reported with de-phosphorylated pdFIX and rFIX in hemophilia B mice [6]. Furthermore, these authors have engineered Human Embryonic Kidney (HEK) cell line clones secreting FIX with different

degrees of sulfation and phosphorylation. They have produced and purified different FIX molecules phosphorylated between 25% to 56%, but no pharmacokinetic data has been reported in hemophilia B mouse model [6].

FIX is naturally synthesized in the liver and secreted into blood. Hepatic cell lines contain the biosynthetic machinery required for correct synthesis and processing leading to complete post-translational modifications of FIX. Human hepatic cells like HepG2 cells [7–9] have been previously used for FIX expression. HuH-7 cell line was established from a human hepatocellular carcinoma characterized by Nakabayashi et al. in 1982 [10]. The authors have shown their colony-forming ability and their liver function maintenance, as revealed by production of plasma proteins such as alpha 1-fetoprotein [11]. In addition, among the common cell lines like HEK, CHO-K1, HepG2, the HuH-7 cellular system has the best capacity to phosphorylate serine residue of recombinant Proprotein convertase subtilisin / kexin 9 [12].

The present study reports a human rFIX secreted by HuH-7 cell line stably transfected with the corresponding expression vector. The recombinant molecule has been purified phosphorylation/sulfation profiles have been analyzed by mass spectrometry and have been compared to two reference FIX molecules, one plasma-derived FIX (Mononine®, CSL-Behring) and one rFIX molecule (Benefix®, Pfizer) both routinely used for hemophilia B treatment.

* Corresponding author. Tel.: +33 4 78 77 87 97; fax: +33 4 78 77 87 78.
E-mail address: nathalie.enjolras@univ-lyon1.fr (N. Enjolras).

Materials and Methods

Construction of Expression Vectors

Human FIXcDNA containing the truncated Intron-1 from FIX gene (299 bp) has been cloned in pcDNA3.1 (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) expressing the gene for geneticin (G418) resistance to obtain pcDNAFIXwt1 [13] with the polymorphism T148A.

Cell Culture and Transfection Assays

The HuH-7 human hepatocellular carcinoma cell line (JCRB0403) was kindly provided by Dr Marie-Anne Petit (INSERM-U871, France) and was maintained in HYQ medium (Thermo-Scientific, Courtaboeuf, France), supplemented with fetal-calf-serum (FCS, 10%) (Perbioscience, Brebières, France), 1% penicillin, streptomycine, 1% L-Glutamine, and 5 µg/mL vitamin K1 (Roche, Neuilly-sur-Seine, France) at 37 °C in humidified air with 5%CO₂. Twenty hours before transfection, HuH-7 cells were plated on six-well plates at a density of 5 × 10⁵ cells/dish. HuH-7 cells were then transfected with 1 µg per well of pcDNAFIXwt1 recombinant vector using FUGENE-6® (Roche, Neuilly-sur-Seine, France) according to the manufacturer's instructions.

Culture Media, Cell Lysates and Western Blotting

HuH-7 cells (5 × 10⁵/dish) were transfected or not with pcDNA FIXwt1 into 6-dish plates. Thirty-six hours after transfection, supernatants were collected and cell extracts were prepared in 300 µL (per 2 × 10⁶ cells) of ice-cold 0.5% Triton-X100 lysis buffer (0.1 mol/L KCl, 2 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L Hepes pH7.5, 0.5% Triton-X100) containing an antiprotease mix Complete® (Roche, Meylan, France). The resulting solution (10 µL) was subjected to electrophoresis on denatured 12% polyacrylamide gel (SDS-10% PAGE) as already described [13].

ELISA Assays and Coagulation Activity

Concentrations of FIX in culture media and cell extracts were measured after 36 h of transient transfection using an ELISA kit (AsserachromIX:Ag, Diagnostica Stago, Asnières, France). FIX activity was determined in a one-stage clotting assay on a Destiny Max coagulometer (Trinity-Biotech, Dublin, Eire). Control plasma (Precision Biologic, Darmouth, Canada) was used for standard. Diluted supernatant (50 µL) was added to 50 µL of FIX-deficient plasma (Immuno, Illkirch, France) and 50 µL of MDA Platelin LS® (Kordia, Leiden, Netherlands). After a 3-min incubation at 37 °C, clotting was initiated by addition of 50 µL of 50 mM CaCl₂ buffer. Coagulation times were measured in a Destiny Max® coagulometer and FIX activity was determined from a log-log standard curve. Chromogenic technique was also chosen using Biophen FIX kit (Hyphen BioMed, Neuville sur Oise, France). By definition, 5 µg/mL of FIX in normal human plasma equals 1 U/mL. Specific activity of plasma-derived FIX was considered at 200 U/mg of FIX.

Effects of Protease and Translocation Inhibitors on FIX Intracellular Trafficking

We next analyzed the effects of various protease inhibitors and inhibitor of cellular protein transport on the classical secretory pathway of rFIXwt. Transiently transfected HuH-7 cells grown in 35-mm dishes were incubated in FCS-free media supplemented N-acetyl-Leu-Leu-Norleucinal (ALLN 40 µg/mL) (Sigma Aldrich, L'Isle-D'Abeau, France), NH₄Cl (50 mmol/L), or Brefeldin-A (10 mmol/L) (Sigma Aldrich) dissolved according to the manufacturer recommendations (1%DMSO); the medium was renewed every 2 h. Six hours later, cell lysates were harvested and assayed for FIX:Ag. After each treatment, the cell extracts were prepared in 120 µL of ice-cold 0.5% Triton lysis buffer, and FIX antigen was quantified in the lysates by using an ELISA assay. Results were

expressed as a percentage of values obtained with control culture medium containing 1%DMSO. Comparisons were based on Fischer's test with Stat View® software (<http://www.statview.com>).

Selection of HuH-7 Clones Producing FIX

HuH-7 cells were plated in Petri dishes (1 × 10⁶ cells/dish) and transfected with pcDNAFIXwt1 as previously described [13]. Twenty-four hours after transfection, the medium was removed and replaced by fresh medium containing 0.3 mg/mL geneticin (G418, Invitrogen). G418 resistant clones were obtained 3 weeks after transfection with regular G418 concentration elevations to reach 0.4 mg/mL. Clones were individually scrapped without trypsin and re-inoculated in a 96-well-plate. FIX was evaluated in each supernatant and high producer HuH-7 clones were amplified at dilution 5 to reach 75 cm² flasks. The highest producer clone was amplified and then frozen in liquid nitrogen for conservation in medium containing 10%DMSO.

Production of FIX in Roller-Bottles

FIX was produced by high producing HuH-7-CD4 clone, in roller-bottles (Cellmaster rollerbottles, Greiner BioOne, Brumath, France) using a system of rotation IBS CellRoll (Integra Biosciences, Cergy-Pontoise, France). Thirty million HuH-7-CD4 cells were maintained in roller-bottle at 37 °C under 5%CO₂ in HyQ medium supplemented with 10%FCS during 72 h. At day one, cells were washed twice with PBS buffer and serum-free medium (25 mL per roller-bottle) was added for 15-18 h. Supernatants were collected and represented the first sample of FIX production (day1). The cells were then maintained for 10 h in complete medium. The production of FIX in serum-free medium was repeated for 3 other days alternating with complete medium incubation steps. FIX production in the 4 collected samples (day1 to day4) was evaluated by ELISA test and coagulation activity was measured on the Destiny Max coagulometer.

FIX Purification

Serum-free supernatants from roller-bottles were pooled constituting an aliquot of 300 mL containing FIX at a concentration of 0.3-0.5 µg/mL. The aliquot was filtered at 0.45 µm before loading on an ion-exchange chromatography unit (5 mL HiTrap™Q-FF unit, GE-Healthcare, Orsay, France) previously equilibrated with Tris 50 mmol/L, pH7.4 at a flow rate of 2 mL/min. The resin was then washed with 50 mL of the same buffer. Recombinant FIX was eluted with Tris 50 mmol/L, pH 7.4, NaCl 1 mol/L buffer before dialysis against PBS buffer.

Dynabeads®-MyOne Tosylactivated (DynaL, Invitrogen) were coated with purified FIX-MAB (kindly provided by CSL Behring) according to the instructions supplied. The washed-coupled Dynabeads-MAB (250 µL) were mixed with the dialyzed proteins from ion-exchange chromatography (3 µg/mL of FIX) overnight at 4 °C. Dynabeads-MAB were washed 3 times with PBS buffer to remove the unbound components. The FIX bound to the beads was eluted in 100 µL of glycine 2 mol/L, pH2.1 and pH was adjusted by adding Tris 1 mol/L, pH9. Aliquots were immediately desalted on PD MiniTrap G-25 columns (GE-Healthcare). Purification quality was verified by 10% SDS-PAGE following silver staining.

Glycosylation Analysis

Purified and commercial FIX were incubated with 100 mU/mL neuraminidase (Roche) for 1 h at 37 °C, and then with 9.4 U/mL peptide-N4 (N-acetyl-glucosaminyl) asparagine amidase (recombinant N-glycosidase-F) (Roche) for 18 h at 37 °C in Tris-maleate 20 mmol/L pH6.0, NaCl 150 mmol/L, CaCl₂ 5 mmol/L, and 1.75% (v/v) NP-40. The reactions were terminated by adding 2xLaemmli buffer followed by SDS/10% PAGE in reducing conditions. FIX was visualized by Western immunoblotting as described below.

Sulfation and Phosphorylation Analysis by Mass Spectrometry

Sample Preparation

Ten micrograms of HIX, and from Benefix® and Mononine® were deglycosylated using the Enzymatic DeglycoMix™ Kit (QAbio-Euromedex, Souffelweyersheim, France) for 16 h at 37 °C. Digested products were then submitted to gel electrophoresis on 4–12% Bis-Tris polyacrylamide (NuPage, Invitrogen). Coomassie-Blue stained bands were excised from the gel and in-gel digestion was performed as described by [14] with minor modifications. Samples were reduced with 40 µL of 10 mmol/L dithiothreitol in 50 mmol/L NH₄HCO₃ for 15 min at 50 °C. Alkylation was performed with 40 µL of 100 mmol/L iodoacetamide in 50 mmol/L NH₄HCO₃ for 15 min at room temperature in the dark. The gel pieces were dried using 0.4 mL of CH₃CN. For proteolytic digestion, the protein containing gel pieces were treated with 30 µL of trypsin solution, 0.02 µg/µL in 50 mmol/L NH₄HCO₃ (sequence-grade, Promega, Charbonnières-Les-Bains, France) for 45 min at 50 °C. A second extraction step was performed using 30 µL of H₂O/CH₃CN/HCOOH (68:30:2; v/v/v) mixture for 30 min at 30 °C, and finally all extracts were pooled and dried in a vacuum concentrator and redissolved in 0.3% trifluoroacetic acid (20 µL). This peptide extract solution was used for LC-ESI/MS/MS (8 µL) and for MALDI-TOF (12 µL) analyses [14].

LC-ESI-MS/MS

Mass spectrometry was performed with a LTQ Velos (Thermo-Scientific) instrument in the positive ion mode. The nanospray source was operating at 1.5 kVolts. Typically, two scan events were used: (1) m/z 400–2000 survey scan MS with enhanced resolution; two data dependent scans MS/MS on the twenty most intense ions from event 1. The spectra were recorded using dynamic exclusion of previously analyzed ions for 0.6 min. The MS/MS normalized collision energy was set to 35 Volts. Reversed-phase LC was performed with an Ultimate 3000 nano-LC system (Dionex, Villeneuve-d'Ascq, France). Chromatographic separation of peptides was obtained on a C18 PepMap micro-precolumn (5 µm; 0.3 mm × 5 mm) for desalting and a C18 PepMap nano-column (3 µm; 75 µm × 150 mm). One µL of the peptide extract solution was injected. Peptides were separated at 0.3 µL/min flow rate with linear gradient of 5–80% of CH₃CN in 0.1% formic acid for 60 min.

MALDI-TOF

The peptide extract solution (12 µL) was treated on Zirconium oxide Tip (10 µL Supel-Zr Tips, Supelco, Garches, France) according to the manufacturer protocol, to enrich phosphorylated and sulfated peptides. The extract was analyzed on a Voyager DE-PRO (AB-Sciex, Les Ulis, France), in a negative linear mode using the mixture: 2',4',6'-trihydroxyacetophenone (5 mg) and ammonium citrate dibasic matrix (4 mg) in 0.5 mL of H₂O/CH₃CN (70/30; v/v) as matrix. The calibration was external and average masses were considered. Experimental mass values were compared with average theoretical mass values available at the Swiss-Prot data bank (<http://us.expasy.org/tools>) with the accession N°P00740, using the Peptide Mass program.

Results

Expression and Biosynthesis of Recombinant FIX in Transiently Transfected HuH-7 Cells

To test the capacity of producing FIX, HuH-7 cells were transiently transfected with pcDNAFIXwt1. Thirty-six hours after transfection, FIX (HIX) concentrations from culture supernatants and total cell lysates were evaluated by ELISA kit and specific activity in supernatants was measured by one-stage clotting assay (Fig. 1A).

Studies in transiently transfected HuH-7 cells revealed the ability to secrete 0.5 µg/mL/36 h +/– 0.15 of FIX. Intracellular FIX concentrations reached 0.05 µg/mL of cell lysate. No FIX was detected in lysates

and supernatants from non-transfected HuH-7 cells. The specific activity, measured by a one-stage clotting assay of transfected cell supernatant, was 300 U/mg +/– 140.

Transcription efficiency of pcDNAFIXwt1 was evaluated using transfected and non-transfected HuH-7 cells as previously described [9]. A single FIX mRNA species was detected in transfected cells whereas non-transfected HuH-7 cells did not contain detectable endogenous FIX mRNA (data not shown).

Lysates and supernatants were submitted to electrophoresis in reducing conditions, followed by western blotting (Fig. 1B). Secreted non-activated FIX was visualized as a single band (S-HIX) and presented the same mobility than Mononine® and Benefix®. No FIX signal was detected in the medium from non-transfected HuH-7 cells (S-NT). FIXwt from cell lysates was retrieved as three major bands. The upper band (E) had the same molecular weight as the secreted form. Two other bands (referred to as band I) migrated slightly faster than band E. These results showed that HuH-7 cells expressing FIX contained two forms of intracellular FIX, one corresponding to a form that is ready to be secreted and a doublet with likely different degrees of post-translational modifications.

Effects of Protein Degradation Inhibitors on FIX Biosynthesis

The effect of various inhibitors of protein degradation and cellular trafficking on transiently transfected HuH-7 cells with pcDNAFIXwt1 are summarized in Table 1. Thirty-six hours after transient transfection, these inhibitors were added to the medium for 6 h and intracellular FIX concentrations were measured after treatment using an ELISA assay.

A specific lysosomal inhibitor such as NH₄Cl, which inactivates lysosomal enzymes by pH modification, had no significant effect on intracellular FIX levels. ALLN, which inactivates proteasomal enzymes, changed only marginally the intracellular FIX levels (75.4% with ALLN, versus 100% without ALLN). Brefeldin-A blocks protein transport from the endoplasmic reticulum (ER) to the Golgi complex and causes translocation of Golgi components back to the ER. After incubation with brefeldin-A, intracellular FIX levels increased by 254% as compared to that found without brefeldin-A (p = 0.005).

These results indicated that no significant amount of FIX molecule was degraded into HuH-7 cells. This data also demonstrated that FIX follows a normal intracellular pathway that led to a normal and rapid secretion and could cross the ER barrier efficiently to be rapidly secreted.

Selection for a HuH-7 Clone Which Stably Secreted FIX and Production in Serum Free-Medium

A FIX producing HuH-7 clone was obtained after a two-month period of cellular cloning as indicated in Materials and Methods. The final choice of the clone was done on the basis of FIX production rate, specific activity and quality of protein signal on western blot. This HuH-7 clone, named HuH-7-CD4, produced 0.5 µg/mL of FIX per 24 h for 1 × 10⁶ cells in the presence of FCS. When inoculated in roller-bottle system in the absence of serum, FIX concentrations varied from 0.2 µg/mL at day1 to 0.3 µg/mL at the end of the production period. Specific activity was fully retained during the four days.

Serum-free supernatants from roller-bottles were pooled and submitted to a first step of ion-exchange chromatography followed by immuno-affinity purification. Eluted FIX represented approximately 60% of the protein before purification. Our process led to fully FIX active molecule retrieved in the aliquot of the purified protein with a value at 120% +/– 15. This specific activity was calculated with chromogenic and chronometric methods. As illustrated in Fig. 2, a major band was eluted and the subsequent silver staining of the gel showed that the molecular weight of the peak corresponded to the signals of Benefix®, and Mononine®.

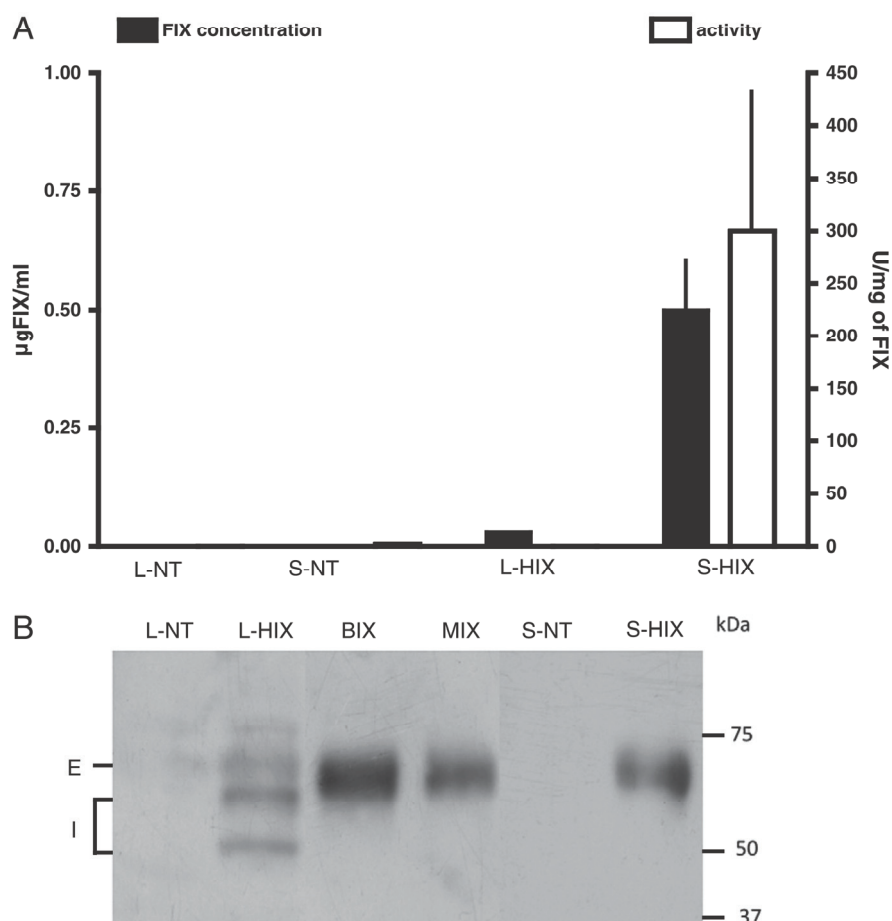


Fig. 1. Biosynthesis of FIX molecule by HuH-7 cells. HuH-7 cells were transfected or not by pcDNAFIXwt1. FIX antigen in lysates (L-NT : non-transfected, L-HIX : transfected) and supernatants (S-NT : non-transfected, S-HIX : transfected) was quantified 36 h following transient transfection using an ELISA kit Asserachrom FIX:Ag (■). Coagulation time of each sample was measured in a coagulometer and FIX activity in the medium was determined in U/mg of FIX in comparison with standard plasma-derived-FIX values (□). Values are representative of three transfections. B. Gel mobility of FIX molecules in HuH-7 cells. Supernatants (S) and total lysates (L) (10 µL, prepared 36 h after transfection) of non transfected HuH-7 cells (NT) and HuH-7 cells transfected with the plasmid pcDNAFIXwt1 (HIX) were collected and subjected to electrophoresis on SDS-10%PAGE. FIX was detected with a polyclonal rabbit anti-human FIX antibody and visualized by autoradiography. Benefix® (BIX), Mononine® (MIX) and molecular weight standards (PM) from Biorad were used as reference.

Analysis of Post-Translational Modifications

To investigate N-linked glycosylation and sialylation of FIX secreted from HuH-7-CD4 clone, purified FIX (HIX), Benefix® (BIX) and Mononine® (MIX), were incubated with neuraminidase and N-glycosidase, which cleave sialic acids and N-linked carbohydrates, respectively. Digestion products were submitted to reducing electrophoresis and western blotting (Fig. 3). The secreted form of FIX (HIX) was retrieved as band E with expected molecular weight. A slight decrease in the molecular weight of FIX occurred following neuraminidase digestion (lane b), and a further reduction occurred after

N-deglycosylation. Similar migration profiles were observed for Benefix® and Mononine®, in the same digestion conditions.

These results demonstrate that FIX secreted by transfected HuH-7 cells was correctly N-glycosylated and sialylated corresponding to mature secretable FIX.

In order to verify whether the propeptide of HIX was cleaved before its secretion in the HuH-7 cell medium, the N terminal end of the purified molecule has been sequenced before MALDI-TOF/MS experiences and we observed that the sequence was similar to the Gla-domain of human FIX (data not shown).

Mass Spectrometry Examination

To identify the sulfated and/or phosphorylated residues in the HIX as well as in BIX and MIX, preparations were converted to peptides by tryptic digestion and glycosidic residues were removed enzymatically. Samples were first analyzed by nano-LC-ESI-MS/MS to confirm the peptide sequences of FIX (P00740) and to get information on PTM. MS/MS techniques had become a powerful tool to characterize peptide phosphorylation [15], but in the positive ion mode mass spectrometry, tyrosine sulfated peptides exhibited a loss of SO₃ generating an unmodified peptide [16]. Then, activation peptides were characterized in their unmodified form for the three preparations, and as a mono-phosphorylated species for HIX using this technique (data not shown).

Table 1

Effect of inhibitors of protein degradation and brefeldin A on intracellular levels of FIX molecule in HuH-7 cell line. Transiently transfected HuH-7 cells at 80% confluence expressing rFIX were incubated for 6 h in fresh serum-free medium containing in the presence or absence of the different agents. The results correspond to six independent transfections. Total intracellular FIX:Ag was measured in cell lysates using the ELISA kit and the results are expressed as a percentage of FIX (mean ± SE) values observed in control conditions. (*:p = 0.005).

Treatments	Intracellular FIX levels
Control without agents	100%
NH ₄ Cl 50 mmol/L	84.7% ± 28.1
ALLN 40 µg/mL	75.4% ± 27.8
Brefeldin-A 10 µg/mL	254.4%* ± 21.4

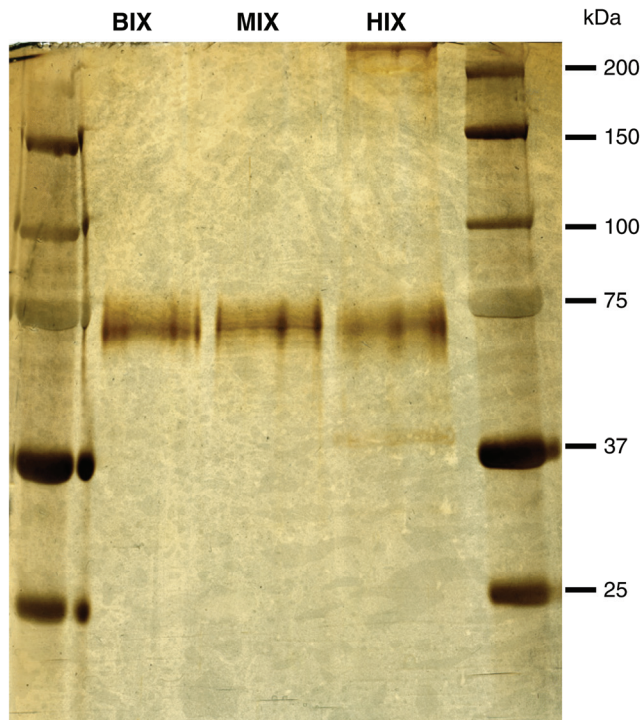


Fig. 2. Factor IX purified from media of HuH-7-CD4-clone. Serum-free supernatants of HuH-7-CD4-clone attached in roller-bottles were pooled constituting an aliquot of 300 mL containing FIX at the concentration of 0.3–0.5 µg/mL. The sample was submitted to through ion-exchange chromatography unit following by immuno-affinity assays. The final eluted concentrated rFIX (HIX) was visualized on SDS-PAGE after silver staining in presence of Benefix® (BIX) and Mononine® (MIX).

MALDI-TOF in negative ion mode represents the best laboratory tool to study sulfated peptides [17]. The stability of sulfate and phosphate groups was very different under MS ionization. For the peptides containing a phosphate group, a good stability was observed either in positive ion mode or in negative ion mode with the observation of $(M+H)^+$ and $(M-H)^-$ ions, respectively. Peptides with a sulfate group had a particular behavior as $(M-H)^-$ ions were observed in negative ion mode and only $(M+H-SO_3)^+$, i.e. sulfate loss $(M+H-80)^+$ in positive ion mode. Therefore, the switching from positive to negative ion mode allowed differentiation between phosphate and sulfate group with 2 Da and 78 Da mass differences, respectively. To have a minimum of interfering peptides in the positive/negative ion survey in MALDI-TOF analyses, an enrichment of phosphorylated and sulfated peptides was

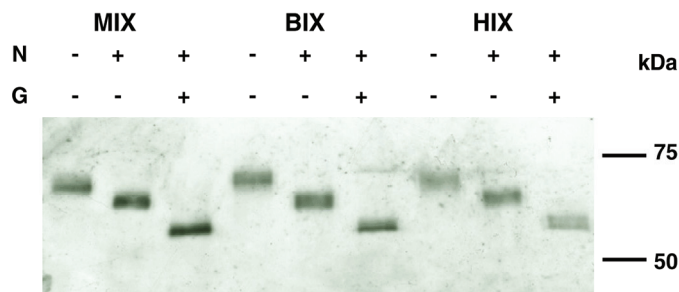


Fig. 3. Neuraminidase and N-glycosidase treatment of FIX. Purified FIX from HuH-7-CD4-clone (HIX), Benefix® (BIX) and Mononine® (MIX) were treated with (+) or without (–) neuraminidase (N) for 1 h at 37 °C and with (+) or without (–) N-glycosidase (G) for 16 h at 37 °C. Digestions were stopped by Laemmli buffer and products were electrophoresed on denaturing SDS-10%PAGE before immunoblotting. FIX was detected by using a polyclonal rabbit anti-human FIX antibody and the chemiluminescent signals were detected by autoradiography.

performed using the metal oxide affinity chromatography selectivity of titanium oxide and zirconium oxide [18].

Results from the MALDI-TOF analyses of the enriched tryptic peptides were presented in Fig. 4 and mass interpretation was summarized in Table 2. The MALDI spectrum pattern of BIX (Fig. 4A) showed no phosphorylation and a very low amount of a sulfate form at m/z 4019.6 in negative ion that disappeared in positive mode as expected. Two main peptides were characterized: the (146–180) T/A¹⁴⁸ variant and one other peptide with signal at m/z 3868.8 and 3870.9 (negative and positive ion, respectively) that could be attributed to an activation peptide (146–180) T/A¹⁴⁸ with one Alanine loss at the N-terminal position, i.e. peptide (146–180) T/A¹⁴⁸.

The MIX MALDI pattern (Fig. 4B) was characteristic of sulfated peptides as all the signal observed in negative ion were shifted in positive ion with a 78 Da mass difference: 4130.0/4052.4 for the form containing T¹⁴⁸, 4100.0/4022.4 for the form containing A¹⁴⁸ and 4028.9/3951.2 for the form containing T¹⁴⁶ with a N-terminal loss of A¹⁴⁶. Moreover, the observed peptides were all phosphorylated (Table 2). MALDI spectrum of HIX (Fig. 4C) showed an activation peptide mix of MIX and BIX (146–180) T/A¹⁴⁸ and (146–180) T/A¹⁴⁸-A¹⁴⁶ with an important change as the (146–180) T/A¹⁴⁶ peptide which was phosphorylated and sulfated. The sulfated form at m/z 4099.6 in negative mode did not completely disappeared in positive mode as a signal was observed at m/z 4101.5, but this signal was very broad and could correspond to another compound.

Presence of an abnormal sequence for the activation peptide (146–180) with a 71 Da loss, corresponding to an N-terminal Alanine loss, was confirmed by the LC-ESI/MS/MS spectra (data not shown). This N-terminal amino acid loss leading to the (147–180) and (147–180) T/A¹⁴⁸ peptides was observed in the three samples (BIX, MIX and HIX) and probably occurred during sample preparation.

Discussion

The production of recombinant FIX with PTM similar to plasma-derived FIX is still highly challenging because of the significant difference observed in the *in vivo* recovery of the recombinant molecule. The present study is the first report on the expression of fully functional recombinant FIX by a clone from the HuH-7 human hepatoma cell line presenting improved PTM.

Human-cell based expression systems can provide some unique characteristics to biopharmaceutical products including lower immunogenicity, greater biological activity and increased half-life [19]. With the trend to introduce the human-cell-based expression system to synthesize the biopharmaceutical products, HuH-7 has been already proposed for expression study of erythropoietin (EPO) gene in comparison to CHO cell line [20]. They have concluded that recombinant EPO produced from this human liver cell line is properly folded and glycosylated as EPO mainly produced by liver cells.

In the present study, one of the advantages to use a human hepatoma cell system was the fact that no co-transfection with vitamin K 2,3-epoxide reductase C (VKORC) or furin/PACE cDNAs was necessary to generate active rFIX. No band was detected (Fig. 2) corresponding to a form containing the propeptide (form with a molecular weight 2000–5000 greater than mature FIX). This particular form was previously reported as FIX Cambridge [21]. For instance, co-transfection with vitamin K 2,3-epoxide reductase C (VKORC) or furin/PACE cDNAs was required when CHO cells are chosen to produce rFIX, like commonly used recombinant FIX concentrate Benefix® [22,23].

Data concerning specific activity and intracellular trafficking inhibitors showed that HuH-7 cells transfected with FIX cDNA presented all the intrinsic capacities to secrete a fully active FIX whose specific procoagulant activity could reach 300U/mg. This enhanced value may be due to the presence of factor X traces in the medium. Indeed, hepatoma cell lines are known to preserve the ability to express plasma proteins [11]. The capacity of other hepatoma cell lines like HepG2 to

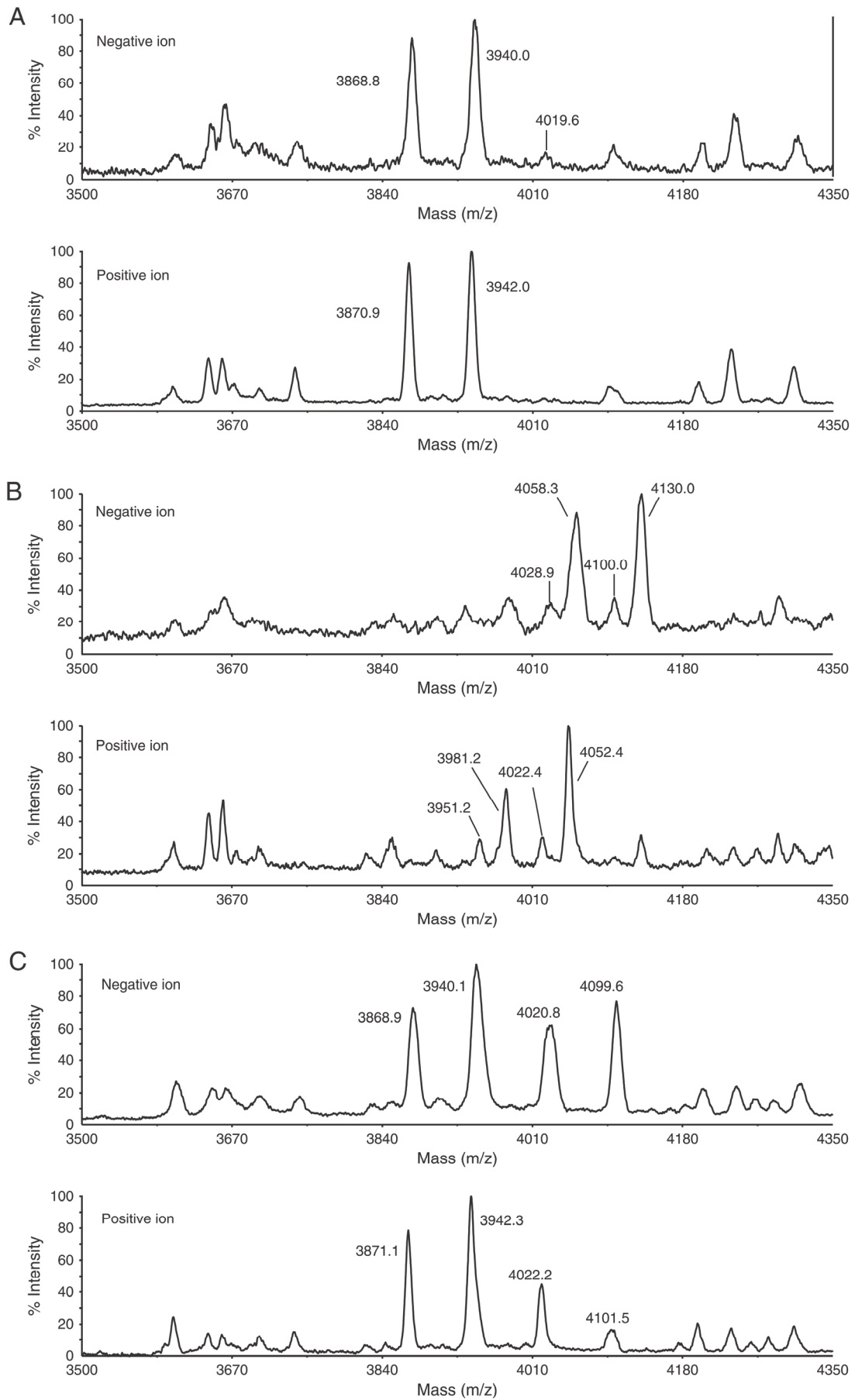


Fig. 4. MS spectra collected during MALDI-TOF/MS analysis of tryptic digests corresponding to activation peptide of purified FIX molecules. A: Benefix® (BIX), B: Mononine® (MIX), C: HuH-7-CD4 FIX (HIX). The different peaks are identified in Table 2.

Table 2

MALDI-TOF detection of enriched tryptic activation peptide in positive and negative ion mode using tetra-hydroxy acetophenone with ammonium citrate as matrix, + phos = phosphate group, + sulf = sulphate group. Average masses were recorded in linear TOF mode, ^a calculated average mass, ^b sulphate group loss (–80 Da) was observed in positive ion mode. Our results showed the presence of Ala-deleted FIX molecules, including commercial plasma-derived and recombinant FIX concentrates (Table 2). The most probable reason for the presence of Ala deleted forms might be due to the loss of the N-terminal amino acid Ala in peptides (146–180).

Activation Peptides (theoric mass)	BIX		MIX		HIX	
	(M-H) ⁻	(M+H) ⁺	(M-H) ⁻	(M+H) ⁺	(M-H) ⁻	(M+H) ⁺
(146–180) + phos + sulf (4131.2) ^a			4130.0	4052.4 ^b		
(146–180)T/A ¹⁴⁸ + phos + sulf (4101.1) ^a			4100.0	4022.4 ^b	4099.6	4022.2 ^b
(146–180)-A ¹⁴⁶ + phos + sulf (4030.1) ^a			4028.9	3951.2 ^b		
(146–180)-A ¹⁴⁶ + phos + sulf (4060.1) ^a			4058.3	3981.2 ^b		
(146–180)T/A ¹⁴⁸ + sulf (4021.1) ^a	4019.6				4020.8	3942.3 ^b
(146–180)T/A ¹⁴⁸ (3941.1) ^a	3940.0	3942.0			3940.1	3942.3
(146–180)T/A ¹⁴⁸ -A ¹⁴⁶ (3870.1) ^a	3868.8	3870.9			3868.9	3871.1

secrete an active FIX has been already demonstrated [7,9] but several studies mentioned that this cell line presented several difficulties to generate high amounts of FIX even when cDNA constructs driven by retrovirus were used [7,8,24,25].

In our study, an effective transfection of a FIX cDNA and selection in the presence of geneticin led to the generation of a HuH-7 clone expressing high amounts of FIX. This clone represented a durable system for FIX production without any addition of activator of PKCs known to stimulate the in vitro growth of monolayer cell cultures like PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate) as previously shown with HepG2 cells [25]. This is an additional advantage of our system because PMA might interfere with the quality of FIX after purification.

The full activity of rFIX secreted from the HuH7-CD4-clone suggested that the γ -carboxylation degree was at least similar to the level found for recombinant or plasma-derived forms which suggests that the levels of VKORC enzyme in HuH-7 cells are indeed adequate to produce fully γ -carboxylated rFIX since no significant decrease in the specific activity was found [26].

Other cell lines have been previously reported to have high expression levels of FIX. For example, the Drosophila Schneider (S2) cell line transfected with a human FIX expressing plasmid showed significantly higher (12-fold) expression level than CHO cells but it has a weak ability for γ -carboxylation and co-transfection with γ -carboxylase is needed to obtain active rFIX molecules [27].

In addition, glycosylation analyses were evaluated in comparison with the CHO-derived and plasma-derived forms. First, human FIX activation peptide contains two N-linked sugar chains at Asn-157 and Asn-167 [28]. In addition, attachment of O-linked sugar chains with sialic acids occurs at two sites in EGF domain, e.g. Ser-53 and Ser-61 [29] and at two sites in AP domain, e.g. Thr-159 and Thr-169 [30]. In our study, carbohydrate composition of both natural and recombinant molecules has been determined by successive neuraminidase and N-glycosidase digestions. Glycans are known to mediate protein–protein and protein–cell interactions and the degree of sialylation of a glycoprotein is thought to be an important determinant of its pharmacokinetic properties [31]. In this study, Neuraminidase and N-glycosidase F treatments demonstrated that recombinant and plasma-derived molecules and HIX have similar N-glycan profiles (Fig. 3). HuH-7 cells contain required machinery to direct glycosylation pattern over all similar to those observed in human liver cells for secreting plasma-derived FIX even if the detailed glycosylation structure of FIX produced by HuH-7 cells is not described by MS strategy. We can however conclude that such a human hepatoma cell line may have a glycosylation capacity at least as efficient as CHO cells routinely used to produce recombinant coagulation proteins.

Our work has focused mainly on the phosphorylation and sulfation analysis. Mass spectrometry led us to compare the three molecules showing a peak at (m/z = 3940.0) that identified the non-phosphorylated form in BIX as already quantified at 1% [32]. In our study, MIX profiles differ from those of BIX, clearly indicating that only phosphorylated and sulfated forms (m/z = 4058.3 and m/z = 4130.0, respectively) were present with a mix of polymorphic

A/T148 peptides. The extent of serine phosphorylation in rFIX synthesized by CHO cells and myotubes was analyzed using an anti-phosphoserine antibody [32,33] and only 7% of rFIX was found to be phosphorylated in the case of myotubes and less than 1% for CHO cells. The mass of deglycosylated activation peptide of the FIX determined by MALDI-TOF mass spectrometry was 3940.1 for the dephosphorylated form, 4020.8 with the phosphorylation and 4099.6 for the phosphorylation and sulfation with the T/A polymorphism which corresponded to the sequence of our FIX cDNA. These qualitative studies did not allow us to precisely quantify each form and the ratio of phosphorylated form but strongly suggests that HuH-7 cells are more efficient than CHO cells for rFIX phosphorylation. Our study on commercial FIX (Benefix® and Mononine®) phosphorylation is the first one that really compared each form with regard to their profile in mass spectrometry.

In conclusion, we report here a method using human hepatoma cell line HuH-7 for the expression of a functional human rFIX molecule having some of the PTM more similar to pdFIX than to rFIX molecules produced by CHO cells. Our study also describes a methodology for obtaining a highly efficient cellular clone for FIX secretion. Further studies on a large-scale expression of rFIX using a bioreactor, phosphorylation/sulfation quantitation and on the pharmacokinetic characteristics of the new rFIX molecule are currently being carried out.

Conflict of Interest Statement

The authors of this manuscript have no conflict of interest.

Acknowledgements

We would like to thank Muriel Rea-Marano for her efficient technical assistance. Nathalie ENJOLRAS is supported by the Hospices Civils de Lyon (France).

References

- [1] Kaufman RJ, Murtha P, Ingolia DE, Yeung CY, Kellems RE. Selection and amplification of heterologous genes encoding adenosine deaminase in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:3136–40.
- [2] Bond MD, Jankowski MA, Huberty MC, Patel H, Scoble HA. Structural analysis of recombinant human factor IX. *Blood* 1994;84:194a.
- [3] White G, Shapiro A, Ragni M, Garzone P, Goodfellow J, Tubridy K, et al. Clinical evaluation of recombinant factor IX. *Semin Hematol* 1998;35:33–8.
- [4] Aznar JA, Lucia JF, Abad-Franch L, Rubio R, Jimenez-Yuste V, Perez R, et al. Focusing on haemophilia B: prophylaxis in Spanish patients. *Haemophilia* 2011;17:542–3.
- [5] Bjorkman S. A commentary on the differences in pharmacokinetics between recombinant and plasma-derived factor IX and their implications for dosing. *Haemophilia* 2011;17:179–84.
- [6] Scheiflinger FB, Boehm E, Himmelspach M, Merkel O. Highly phosphorylated and sulphated recombinant factor IX. *WO/2007/101681*; 2007.
- [7] Kirachi S, Hitomi Y, Furukawa M, Kirachi K. Role of intron I in expression of the human factor IX gene. *J Biol Chem* 1995;270:5276–81.
- [8] Chen L, Perlick H, Morgan RA. Comparison of retroviral and adeno-associated viral vectors designed to express human clotting factor IX. *Hum Gene Ther* 1997;8:125–35.

- [9] Enjolras N, Plantier JL, Rodriguez MH, Rea M, Attali O, Vinciguerra C, et al. Two novel mutations in EGF-like domains of human factor IX dramatically impair intracellular processing and secretion. *J Thromb Haemost* 2004;2:1143–54.
- [10] Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* 1982;42:3858–63.
- [11] Nakabayashi H, Taketa K, Yamane T, Miyazaki M, Miyano K, Sato J. Phenotypical stability of a human hepatoma cell line, HuH-7, in long-term culture with chemically defined medium. *Gann* 1984;75:151–8.
- [12] Dewpura T, Raymond A, Hamelin J, Seidah NG, Mbikay M, Chretien M, et al. PCSK9 is phosphorylated by a Golgi casein kinase-like kinase *ex vivo* and circulates as a phosphoprotein in humans. *FEBS J* 2008;275:3480–93.
- [13] Enjolras N, Rodriguez MH, Plantier JL, Maurice M, Attali O, Negrier C. The three in-frame ATG, clustered in the translation initiation sequence of human factor IX gene, are required for an optimal protein production. *Thromb Haemost* 1999.
- [14] Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 1996;68:850–8.
- [15] Palmisano G, Thingholm TE. Strategies for quantitation of phosphoproteomic data. *Expert Rev Proteomics* 2010;7:439–56.
- [16] Salek M, Costagliola S, Lehmann WD. Protein tyrosine-O-sulfation analysis by exhaustive product ion scanning with minimum collision offset in a NanoESI Q-TOF tandem mass spectrometer. *Anal Chem* 2004;76:5136–42.
- [17] Drake SK, Hortin GL. Improved detection of intact tyrosine sulfate-containing peptides by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in linear negative ion mode. *Int J Biochem Cell Biol* 2010;42:174–9.
- [18] Aiyal UK, Ross AR. Enrichment and analysis of phosphopeptides under different experimental conditions using titanium dioxide affinity chromatography and mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2010;24:219–31.
- [19] Jacobs PP, Callewaert N. N-glycosylation engineering of biopharmaceutical expression systems. *Curr Mol Med* 2009;9:774–800.
- [20] Kausar H, Gull S, Ijaz B, Ahmad W, Sarwar MT, Iqbal Z, et al. Huh-7 cell line as an alternative cultural model for the production of human like erythropoietin (EPO). *J Transl Med* 2011;9:186.
- [21] Bristol JA, Furie BC, Furie B. Propeptide processing during factor IX biosynthesis. Effect of point mutations adjacent to the propeptide cleavage site. *J Biol Chem* 1993;268:7577–84.
- [22] Kaufman RJ, Wasley LC, Furie BC, Furie B, Shoemaker CB. Expression, purification, and characterization of recombinant gamma-carboxylated factor IX synthesized in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1986;261:9622–8.
- [23] Wasley LC, Rehemtulla A, Bristol JA, Kaufman RJ. PACE/furin can process the vitamin K-dependent pro-factor IX precursor within the secretory pathway. *J Biol Chem* 1993;268:8458–65.
- [24] Gordon EM, Tang H, Salazar RL, Kohn DB. Expression of coagulation factor IX (Christmas factor) in human hepatoma (HepG2) cell cultures after retroviral vector-mediated transfer. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1993;15:196–203.
- [25] de Castilho Fernandes A, Fontes A, Gonsales N, Swiech K, Picanco-Castro V, Faca S, et al. Stable and high-level production of recombinant Factor IX in human hepatic cell line. *Biotechnol Appl Biochem* 2011;58:243–9.
- [26] Hallgren KW, Hommema EL, McNally BA, Berkner KL. Carboxylase overexpression effects full carboxylation but poor release and secretion of factor IX: implications for the release of vitamin K-dependent proteins. *Biochemistry* 2002;41:15045–55.
- [27] Vatandoost J, Zomorodipour A, Sadeghizadeh M, Aliyari R, Bos MH, Ataei F. Expression of biologically active human clotting factor IX in *Drosophila* S2 cells: gamma-carboxylation of a human vitamin K-dependent protein by the insect enzyme. *Biotechnol Prog* 2011.
- [28] Makino Y, Omichi K, Kuraya N, Ogawa H, Nishimura H, Iwanaga S, et al. Structural analysis of N-linked sugar chains of human blood clotting factor IX. *J Biochem* 2000;128:175–80.
- [29] Nishimura H, Takao T, Hase S, Shimonishi Y, Iwanaga S. Human factor IX has a tetrasaccharide O-glycosidically linked to serine 61 through the fucose residue. *J Biol Chem* 1992;267:17520–5.
- [30] Agarwala KL, Kawabata S, Takao T, Murata H, Shimonishi Y, Nishimura H, et al. Activation peptide of human factor IX has oligosaccharides O-glycosidically linked to threonine residues at 159 and 169. *Biochemistry* 1994;33:5167–71.
- [31] Sinclair AM, Elliott S. Glycoengineering: the effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins. *J Pharm Sci* 2005;94:1626–35.
- [32] White GCn, Beebe A, Nielsen B. Recombinant factor IX. *Thromb Haemost* 1997;78:261–5.
- [33] Arruda VR, Hagstrom JN, Deitch J, Heiman-Patterson T, Camire RM, Chu K, et al. Posttranslational modifications of recombinant myotube-synthesized human factor IX. *Blood* 2001;97:130–8.

Par la suite, des expériences ont consisté à adapter le clone cellulaire Huh-7-CD4 à un milieu synthétique dépourvu de sérum, étape clef qui a permis aux cellules de produire de façon continue le FIX dans un fermenteur. Nous avons l'objectif de caractériser *in vitro* la capacité coagulante de la molécule purifiée, de quantifier la phosphorylation et de mesurer son efficacité chez la souris hémophile B.

Tout d'abord, nous avons mis au point un test ELISA utilisant un anticorps monoclonal (Millipore, clone 4A2) spécifiquement dirigé contre la sérine phosphorylée de façon à mesurer le taux de phosphorylation du HIX. La gamme utilisée se composait de mélanges connus de BIX et de MIX à différentes proportions partant du fait que le MIX était phosphorylé à 100% et que le BIX ne l'était pas, comme cela est décrit dans la littérature [93]. Un test de quantification de FIX à l'aide d'un autre anticorps différent de celui du kit commercial Asserachrom®IX:Ag a également servi à valider la méthode. Nous avons évalué le taux de phosphorylation du HIX à 14%.

Nous avons mesuré la capacité du HIX à être activé par le FXIa ou par le complexe FVIIa-FT. Les profils d'activation, visualisés par l'apparition des chaînes lourde et légère après électrophorèse puis western blot, ont montré que le HIX s'activait aussi bien que le BIX ou le MIX. Des mesures d'activité des trois molécules ont été menées par des expériences de capacité de génération de thrombine *in vitro*. Elles ont révélé que le HIX présentait des valeurs de pics de thrombine et de vitesse analogues voire supérieures à celles mesurées pour le BIX et le MIX.

Injectée aux souris hémophiles B, notre molécule n'a pas présenté d'augmentation du taux de récupération par rapport à la forme recombinante. Cependant, elle a montré une meilleure activité procoagulante révélée par une augmentation significative de la génération de thrombine *in vivo* comparée aux deux molécules de FIX commerciales. En effet, le pic de thrombine tout comme la vitesse ont été identifiés comme analogues à ceux du MIX alors que les taux circulants en terme d'antigène du HIX étaient inférieurs.

La question posée dans ce travail était de savoir si la phosphorylation de la sérine 158 (S158) du FIX pouvait être améliorée par les cellules Huh-7 susceptibles d'assurer toutes les modifications post-traductionnelles comme c'est le cas dans le foie. Concernant la phosphorylation des protéines sécrétées dans le plasma, des résultats de la littérature avaient montré que la nature des acides aminés avoisinant une sérine potentiellement phosphorylable est importante pour assurer au mieux cette modification. La séquence d'acides aminés au niveau de la S158 du peptide d'activation du FIX est la suivante : V-N-S-T-E-A-E-T. Deux kinases pouvaient théoriquement phosphoryler la S158 du FIX : la protéine kinase G couplée à un récepteur membranaire et une caséine kinase golgienne (G-CK) décrite pour son rôle dans la phosphorylation de molécules hépatiques sécrétées. Les caséines

kinases 1 et 2 localisées dans le cytoplasme ont été écartées sachant qu'il est bien décrit que le FIX est phosphorylé dans l'appareil de Golgi [90]. Tout en démontrant la présence de la séquence d'acides aminés S-X-E-X dans de nombreuses phosphoprotéines sécrétées dans le plasma humain [236–238], Salvi et ses collaborateurs avaient isolé la G-CK mais ne sont jamais parvenus à proposer la moindre séquence protéique. Il y a deux ans, la G-CK a été identifiée par une autre équipe comme étant la FAM20C-kinase (ou DMP4) [239,240]. Les auteurs ont évoqué cette FAM20C comme la kinase phosphorylant la majorité du phospho-protéome plasmatique, enzyme également impliquée dans la biominéralisation des dents et des os. Par ailleurs, cette kinase, synthétisée dans divers tissus et organes dont le foie, est présente dans le plasma [241,242]. Il peut être envisagé que la FAM20C puisse être la kinase phosphorylant le FIX dans le foie. Nous avons identifié cette protéine dans les lysats de cellules Huh-7 et HepG2 par western blot utilisant un anticorps spécifique (Anti-DMP4, Sigma), mais il ne nous a pas été possible de nous assurer de la pleine activité de cette kinase et de son rôle dans les modifications post-traductionnelles du FIX.

Malgré le taux de récupération du HIX identique à celui du BIX chez les souris HB, notre molécule a présenté une efficacité surprenante lorsque l'activité coagulante a été mesurée lors de la détermination de la capacité de génération de thrombine. Les analyses des modifications post-traductionnelles sur le HIX ne nous permettent pas encore d'expliquer cette augmentation de l'activité spécifique, augmentation déjà visible dans les toutes premières transfections transitoires [243]. Une analyse plus précise sur d'autres modifications post-traductionnelles comme les glycosylations pourrait apporter de nouveaux éléments.

***In vivo* efficacy of human recombinant Factor IX produced by the human Hepatoma cell line HuH-7**

Nathalie Enjolras, Eloïse Perot, Sandra Le Quellec, Alice Indalecio*, Jonathan Girard*, Claude Negrier and Yesim Dargaud.

* Both authors contributed equally to this work.

Unite Hemostase, Inflammation & Sepsis EA 4174, Universite Lyon1-Hospices Civils de Lyon, Faculte de Medecine Laennec - 69372 Lyon cedex 08 - France.

Corresponding author at : Nathalie ENJOLRAS, Ph.D, Unite Hemostase, Inflammation & Sepsis EA 4174, Universite Lyon1-Hospices Civils de Lyon, Faculte de Medecine Laennec - 69372 Lyon cedex 08 - France. nathalie.enjolras@univ-lyon1.fr

Keywords

Coagulation factor IX, HuH-7 cells, hemophilia B, *in vivo* recovery, thrombin generation test, animal models.

Summary:

Post-translational modifications (PTM) of the CHO-cell-derived-recombinant human factor IX (FIX) currently used for the treatment of hemophilia B (HB) are different from plasma derived FIX. Our previous studies described a rFIX (HIX) having better PTM profile than rFIX produced by CHO cells. The aim of the study consisted to verify the improved PTM effect of HIX on *in vivo* recovery.

HIX has been produced in a bioreactor and then purified from supernatants. *In vitro* activation and activity were evaluated measured by thrombin generation tests (TGT) and compared to commercial molecules, Benefix®, Mononine®. The three molecules were then administrated (i.v.) to FIX-knockout mice and two minutes after injection, blood samples were collected and subjected to human FIX-specific-ELISA and TGT.

The clotting function of HIX, activation courses of HIX by FXIa and FVIIa-TF complex appear normal as did activation of Benefix®, Mononine® and TG constants of each FIX were equivalent. After injection to HB mice, circulating HIX did not present any significant difference in term of antigen value with Benefix®. Intriguingly, TGT were clearly exhibiting a better velocity for HIX than Benefix® and Mononine®. These data suggested that HIX may improve *in vivo* coagulant efficacy in comparison with the two commercial FIX injected at the same dose.

In conclusion, the study shows that HuH-7-derived-rFIX has better *in vivo* haemostatic activity in hemophilia B mice compared to the reference rFIX molecule despite similar *in vivo* recovery rates, suggesting that HuH-7 cells could represent an effective cellular system for production of rFIX.

Introduction

Hemophilia B (HB), a deficiency of clotting factor IX (FIX), is a rare, X-linked congenital disorder that results in impaired haemostasis and manifests with frequent spontaneous bleeding episodes in joints, muscles and soft tissues and more rarely, life-threatening hemorrhages [1]. Recurrent haemarthroses result in progressive joint damage and the development of painful and debilitating hemophilic arthropathy [2]. Replacement therapy with plasma-derived (pdFIX) or recombinant FIX (rFIX) concentrates, is currently used to control and prevent bleeding episodes of patients with hemophilia B (HB). One of the major improvements in the HB therapy was the introduction of rFIX ensuring an advanced level of safety. Based on pharmacokinetic (PK) parameters, the comparison between pdFIX and rFIX has demonstrated similar half-lives and clearance, but significantly different *in vivo* recovery, resulting in the need for higher doses of rFIX to obtain similar peak concentrations of circulating FIX. This difference is most likely attributable to the post-translational modifications (PTM) between rFIX and pdFIX [3,4].

Phosphorylation has been considered as a critical feature explaining this low *in vivo* recovery of rFIX, since similar *in vivo* recoveries were reported with de-phosphorylated pdFIX and rFIX in HB mice [5]. Furthermore a Human Embryonic Kidney (HEK) cell line clone secreting FIX with improved sulfation and phosphorylation was engineered. However, better PK parameters i.e. area under the curve and *in vivo* recovery, were reported with CHO-derived FIX compared to the HEK293-rFIX molecule [6]. PK differences between pdFIX and CHO cell-derived rFIX in humans were also well known [7].

Our previous studies described a methodology for obtaining a highly efficient cellular clone from a human hepatoma-cell line HuH-7 secreting a rFIX with improved PTM profile compared to CHO cells derived-rFIX [8]. In addition, we have demonstrated that HuH-7 cells derived-FIX (HIX) preparation contained a phosphorylated form of the protein.

To verify the effect of improved PTM on *in vivo* recovery, HIX has been produced in a bioreactor and then purified from supernatant via anion-exchange and heparin-affinity chromatographies. Phosphorylation rate of HuH-7-cell derived FIX was evaluated. To study the HIX clotting function, thrombin generation tests were performed. This HuH-7-

derived rFIX was compared with Benefix®, Mononine® in biochemical properties and in pharmacokinetic studies in FIX knock-out mice.

Materials and methods

Proteins

Plasma derived FIX (MIX) was from CSL Behring GmbH (Mononine®: CSL-Behring, King of Prussia, CA, USA), recombinant, CHO derived FIX (BIX) was from Pfizer (Benefix®: Andover, MA, USA). Recombinant HuH-7 derived FIX (HIX) was already described by [8].

Cell culture

HuH-7 cell clone producing HIX was adapted to serum-free suspension culture in Ultra Culture medium (Lonza, Thermosciences, Brebières, France) 1% penicillin, streptomycin, 1% L-Glutamine, and 5µg/mL vitamin K1 (Roche, Neuilly-sur-Seine, France) at 37°C in humidified air with 5%CO₂ and cultivated in repeated batch mode fermentation runs. Non-transfected HuH-7 cells were used to produce MOCK medium devoided of FIX for analogous preparations of BIX and MIX.

Purification

Supernatants were pooled constituting an aliquot of 600 mL and HIX concentration was determined (0.1-0.3µg/mL), values obtained using a FIX ELISA kit (ELISA-FIX Asserachrom, Diagnostica Stago, Asnieres Sur Seine, France). MOCK media were used to to prepare BIX and MIX solutions at similar FIX concentrations than HIX. Supernatants were loaded to an ion-exchange-chromatography as previously described [8]. Eluted-fractions of FIX destined to phosphorylation studies were purified using an immuno-affinity method [8], while FIX samples for biochemical characterization and *in vivo* mice PK study were loaded on a 1mL-chromatography-heparin unit (HiTrap™-Heparin, GE-Healthcare, Brumath, France) [9].

Activation and procoagulant activity of FIX molecules

Activation of FIX molecules by FVIIa/TF were performed as previously described [10]. *In vitro* thrombin generating capacity of FIX samples was evaluated in FIX deficient plasma (Precision Biologic Inc, Dartmouth, Canada) [11].

Serine phosphorylation

The extent of serine phosphorylation of immune-purified HIX was analyzed using an anti-phosphoserine ELISA assay as previously described [12]. Calibration was done with 20 µg/ml FIX mixes (BIX/MIX: 0/100, 10/90, 20/80, 40/60, 50/50, 60/40, 80/20, 90/10, 100/0 %).

In vivo pharmacokinetic study

All *in vivo* experiments followed an Animal Utilization Protocol approved by the Animal Research Ethics Board, University of Lyon (Directive 2010/63/EU : number BH2010-43). FIX molecules were intravenously administered to anaesthetized FIX-knockout mice (B6.129P2-F9^{tm1Dws}, The Jackson Laboratory, Sacramento, CA, USA) at a nominal dose of 10µg/20g. Citrated plasmas were collected from the inferior vena-cava two minutes after infusion. Circulating FIX levels were determined by ELISA (Diagnostica Stago) and *in vivo* procoagulant activity of FIX in HB mice plasma was evaluated using Thrombin Generation Test (TGT) and a low concentration of tissue factor at 0.5pM, as previously described [13].

Results and Discussion

To demonstrate the biologic activity of HuH-7-synthesized-FIX, we conducted *in vitro* and *in vivo* characterizations using the TGT method.

Activation of equimolar amounts of MIX, BIX and HIX by FVIIa/TF complex (Fig. 1A) or FXIa (data not shown) showed similar activation profiles with the presence of FIXa heavy and light-chains at the appropriate molecular weights. No statistically significant difference was observed ($p>0.05$) between *in vitro* thrombin generating capacity of the three FIX molecules at any dose tested (10 to 100 UI/dL) (Fig. 1B).

Our *in vivo* results from 50 HB mice obtained two minutes after the injection of the three FIX molecules showed a better *in vivo* recovery of plasma derived MIX whilst no statistically significant difference was observed between the two recombinant molecules, as measured by a hFIX ELISA assay (Fig. 2A). As expected from the literature, the same differences for *in vivo* recoveries between MIX and BIX in HB mice were retrieved in term of circulating antigen as described by Böhm and collaborators [6]. In this publication, authors reported that a HEK-derived-FIX, phosphorylated at 56% did not allow to an enhancement of the *in vivo* recovery in comparison to FIX produced by CHO cells. However, despite similar circulating antigen levels, HuH-7 derived-rFIX (HIX) induced statistically higher *in vivo* thrombin generation in HB mice compared to the CHO-cell derived-rFIX (BIX) (Fig. 2B). Endogenous Thrombin Potential (ETP), maximum thrombin peak and TG velocity induced by HIX were all statistically higher than BIX and were comparable to MIX circulating at higher concentrations in plasma. These data show really a higher *in vivo* procoagulant activity of the rFIX molecule produced by HuH-7 cell line.

In spite of our mass-spectrometry experiments which were showing a mix of phosphorylated/non phosphorylated molecule [8], serine phosphorylation at position serine 158 (S158) of HIX was evaluated only at 14%, which reflects a limited capacity of this clone to perform this modification. Our technique for measuring phosphorylation rate of FIX molecules was built on previous research from Arruda et al., 2001 [12], who were evaluated the phosphorylation rate of their myotube-derived FIX at 16%. According to published data [14], CHO-derived recombinant FIX contains no phosphorylation at this position. Thus, HIX is poorly phosphorylated at this residue, and, as it has been observed with HEK-derived recombinant FIX [6] the specific activity was not affected. This raises the question of the phosphorylation efficiency on the serine 158 (S158) in FIX secreted by our cellular clone. Previous results have demonstrated that phosphorylation on serine containing S-X-E motifs in secreted plasmatic phosphoproteins can be introduced along the secretory pathway by the Golgi apparatus casein kinase [15, 16]. This Golgi apparatus casein-kinase has been identified as the FAM20C-kinase (or DMP-4) and led to solve a 130-year-old mystery [17, 18]. FAM20C-kinase is present in plasma and it is synthesized by liver [19] implicated in biomineralization, including the small integrin-binding ligand and liver secreted N-

linked glycoproteins like FIX or factor V [17]. Recently, a new rFIX produced by porcine mammalian cells and secreted in porcine milk has been described with improved PTMs such as activation-peptide phosphorylation at 40% [20]; in accordance with this data, we may speculate that the casein-kinase present in the milk might contribute to the phosphorylation of the molecule. Using an anti-FAM20C-kinase antibody (Anti DMP-4, Sigma), western blot analysis showed that FAM20C-kinase was also expressed by HepG2 and HuH-7 cells (data not shown). However, the low phosphorylation rate of S158 in HIX suggests that FAM20C-kinase identified in the HuH-7 cell lysates might not be fully functional. Oligosaccharide composition on FIX activation peptide could also be focused as demonstrated when N-glycan analysis on MIX and BIX was done by Chevreux et al 2013 [14]. Such a glycosylation mapping of HIX could provide additional information concerning the better efficiency of our HuH-7-cell-derived FIX than the two commercial molecules in term of velocity and thrombin peak.

In conclusion, as reported before, HuH-7 cells have the advantage to produce a rFIX with glycosylation and sialylation profiles similar to plasma-derived FIX and containing sulfated forms of rFIX as shown with mass spectrometry analysis [8]. Taken together, these characteristics may contribute to the improved *in vivo* haemostatic efficacy of HuH-7 derived-rFIX in HB mice. However, despite the expression of Fam20C-kinase, HuH-7 cells do not significantly improve the phosphorylation of rFIX. A human hepatic cell line producing a rFIX with similar safety advantages to the reference rFIX currently used in clinics, with improved PTM and better procoagulant activity might be of interest to produce bioengineered rFIX molecules with improved specific activity or half-life.

Acknowledge

This study was supported by a grant from SATT (Societe d'Acceleration du Transfert de Technologies, University of Lyon1, France) and Hospices Civils de Lyon, France.

Conflicts of interest

No conflict of interest to declare.

Figure legends

Figure 1: **Functional characterization of FIX molecules.** **(A)** FVIIa/TF (1.67nM and 1.48nM) was added to 167nM MIX, BIX or HIX for 20 min. Aliquots were removed at timed intervals and the reaction was quenched with SDS-PAGE reducing loading buffer containing 5mM EDTA. Gels were blotted to nitrocellulose and stained with a polyclonal anti-human FIX antibody synthesized in the laboratory. **(B)** Thrombin peak and velocity constants represented at different FIX concentrations mixed 1:1 with hemophilia B patient plasma to determine the level of FIX activity necessary for restoration of thrombin generation. The resulting data was transformed using manufacturer's software to yield thrombin generation curves, peak thrombin concentration and index velocity. HIX (gray circles), BIX (black circles) and MIX (empty circles).

Figure 2: **Comparison of *In vivo* recoveries of BIX, MIX and HIX.** The FIX preparations were administered to FIX-knock-out mice intravenously at a nominal dose of 75 U/kg. Citrate plasmas were obtained by veina-cava puncture after 2min. **(A)** FIX levels in plasmas were determined by FIX-ELISA (Asserachrom FIX, DiagnosticaStago). **(B)** Coagulant capacities were explored in plasmas using TGT experiments: ETP, Thrombin peak and velocity constants. Mann Whitney tests between TGT values observed two minutes after injection of HIX, MIX and BIX into hemophilia B mice were performed.

References

1. Tagliaferri A, Di Perna C, Riccardi F, Pattacini C, Rivolta GF, Franchini M. The natural history of mild haemophilia: a 30-year single centre experience. *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia* 2012; **18**: 166-74.
2. Pergantou H, Matsinos G, Papadopoulos A, Platokouki H, Aronis S. Comparative study of validity of clinical, X-ray and magnetic resonance imaging scores in evaluation and management of haemophilic arthropathy in children. *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia* 2006; **12**: 241-7.
3. Bjorkman S. Pharmacokinetics of plasma-derived and recombinant factor IX - implications for prophylaxis and on-demand therapy. *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia* 2013; **19**: 808-13.
4. Lissitchkov T, Matysiak M, Zavilska K, et al. Head-to-head comparison of the pharmacokinetic profiles of a high-purity factor IX concentrate (AlphaNine(R)) and a recombinant factor IX (BeneFIX(R)) in patients with severe haemophilia B. *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia* 2013; **19**: 674-8.
5. Scheiflinger F BE, Himmelspach M and Merkel O. Highly phosphorylated and sulphated recombinant factor IX. *WO/2007/101681* 2007.
6. Bohm E, Dockal M, Graninger M, et al. Expression of recombinant human coagulation factors VII (rFVII) and IX (rFIX) in various cell types, glycosylation analysis, and pharmacokinetic comparison. *BMC proceedings* 2011; **5 Suppl 8**: P23.
7. White G, Shapiro A, Ragni M, et al. Clinical evaluation of recombinant factor IX. *Semin Hematol* 1998; **35**: 33-8.
8. Enjolras N, Dargaud Y, Perot E, Guillaume F, Becchi M, Negrier C. Human hepatoma cell line HuH-7 is an effective cellular system to produce recombinant factor IX with improved post-translational modifications. *Thrombosis research* 2012; **130**: e266-73.
9. Ribeiro DA, Passos DF, Ferraz HC, Castilho LR. Anion-exchange purification of recombinant factor IX from cell culture supernatant using different chromatography supports. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 2013; **938**: 111-8.
10. Rodriguez MH, Enjolras N, Plantier JL, et al. Expression of coagulation factor IX in a haematopoietic cell line. *Thrombosis and haemostasis* 2002; **87**: 366-73.
11. Dargaud Y, Prevost C, Lienhart A, Claude Bordet J, Negrier C. Evaluation of the overall haemostatic effect of recombinant factor VIIa by measuring thrombin generation and stability of fibrin clots. *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia* 2011; **17**: 957-61.
12. Arruda VR, Hagstrom JN, Deitch J, et al. Posttranslational modifications of recombinant myotube-synthesized human factor IX. *Blood* 2001; **97**: 130-8.

13. Dargaud Y, Spronk HM, Leenders P, Hemker HC, Ten Cate H. Monitoring platelet dependent thrombin generation in mice. *Thrombosis research* 2010; **126**: 436-41.
14. Chevreux G, Faid V, Andre MH, Tellier Z, Bihoreau N. Differential investigations from plasma-derived and recombinant Factor IX revealed major differences in post-translational modifications of activation peptides. *Vox sanguinis* 2013; **104**: 171-4.
15. Lasa M, Chang PL, Prince CW, Pinna LA. Phosphorylation of osteopontin by Golgi apparatus casein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **240**: 602-5.
16. Lasa M, Marin O, Pinna LA. Rat liver Golgi apparatus contains a protein kinase similar to the casein kinase of lactating mammary gland. *Eur J Biochem* 1997; **243**: 719-25.
17. Tagliabracci VS, Engel JL, Wen J, et al. Secreted kinase phosphorylates extracellular proteins that regulate biomineralization. *Science* 2012; **336**: 1150-3.
18. Tagliabracci VS, Pinna LA, Dixon JE. Secreted protein kinases. *Trends Biochem Sci* 2013; **38**: 121-30.
19. Carrascal M, Gay M, Ovelleiro D, Casas V, Gelpi E, Abian J. Characterization of the human plasma phosphoproteome using linear ion trap mass spectrometry and multiple search engines. *Journal of proteome research* 2010; **9**: 876-84.
20. Lee MH, Lin YS, Tu CF, Yen CH. Recombinant human factor IX produced from transgenic porcine milk. *BioMed research international* 2014; **2014**: 315375.

Figures:

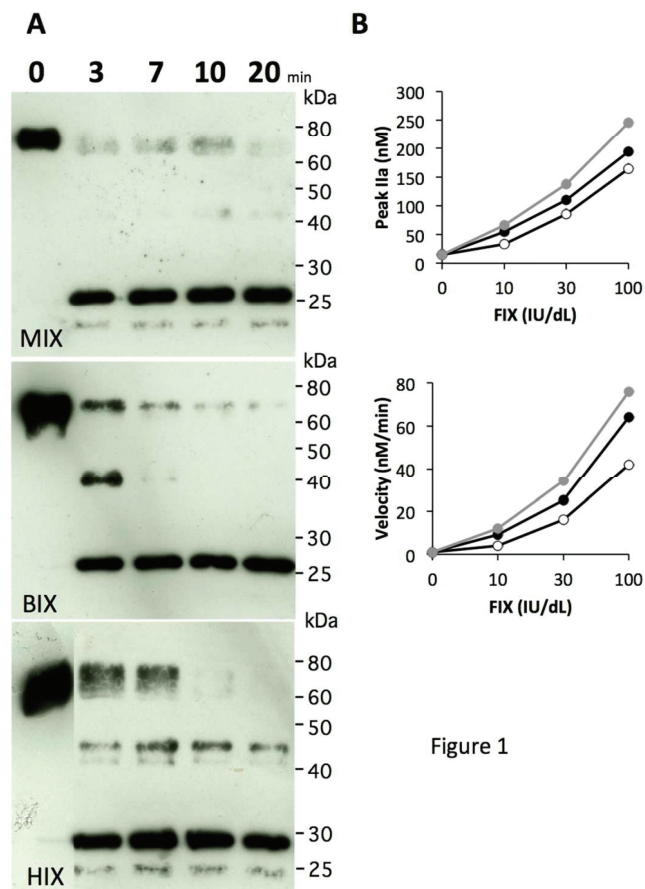


Figure 1

In vivo efficacy of human recombinant Factor IX produced by the human Hepatoma cell line HuH-7. Nathalie Enjolras, Eloïse Pérot, Sandra Le Quellec, Alice Indalecio, Jonathan Girard, Claude Negrier and Yesim Dargaud.

Figure 1 : Functional characterization of FIX molecules. (A) FVIIa/TF (1.67nM and 1.48nM) was added to 167nM MIX, BIX or HIX for 20 min. Aliquots were removed at timed intervals and the reaction was quenched with SDS-PAGE reducing loading buffer containing 5mM EDTA. Gels were blotted to nitrocellulose and stained with a polyclonal anti-human FIX antibody synthesized in the laboratory. (B) Thrombin peak and velocity constants represented at different FIX concentrations mixed 1:1 with hemophilia B patient plasma to determine the level of FIX activity necessary for restoration of thrombin generation. The resulting data was transformed using manufacturer's software to yield thrombin generation curves, peak thrombin concentration and index velocity. HIX (gray circles), BIX (black circles) and MIX (empty circles). 209x297mm (150 x 150 DPI)

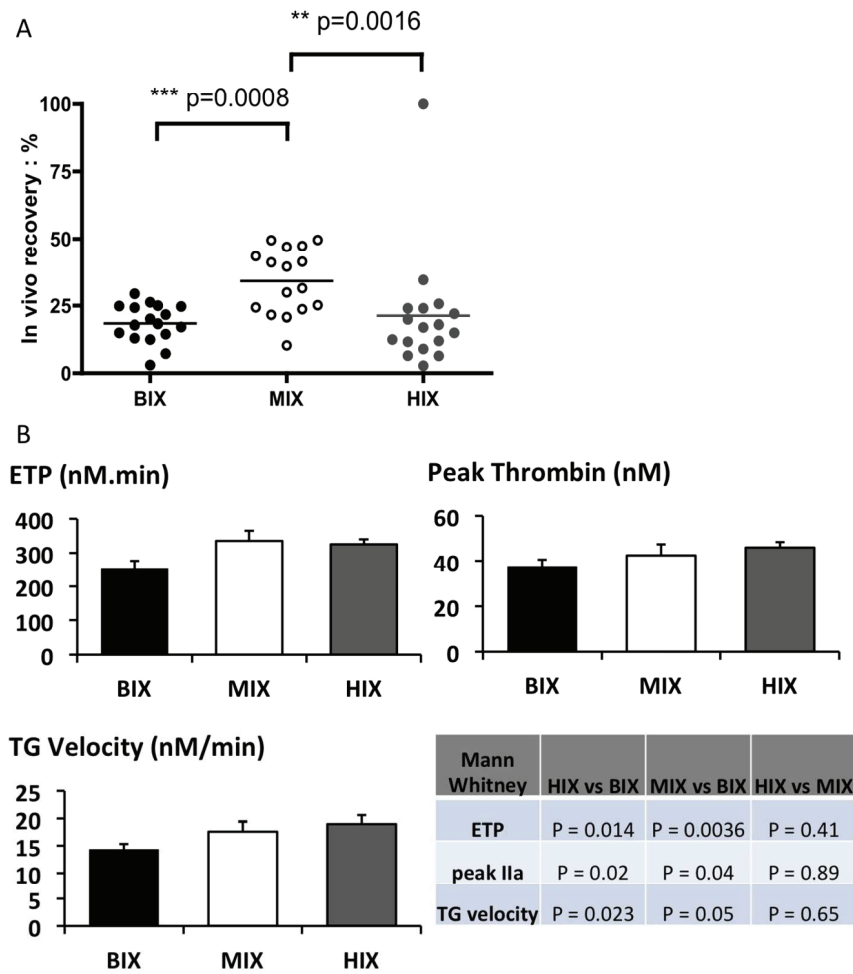


Figure 2

In vivo efficacy of human recombinant Factor IX produced by the human Hepatoma cell line HuH-7. Nathalie Enjolras, Eloise Pérot, Sandra Le Quellec, Alice Indalecio, Jonathan Girard, Claude Negrier and Yesim Dargaud.

Figure 2 : Comparison of In vivo recoveries of BIX, MIX and HIX. The FIX preparations were administered to FIX-knock-out mice intravenously at a nominal dose of 75 U/kg. Citrate plasmas were obtained by veinacava puncture after 2min. (A) FIX levels in plasmas were determined by FIX-ELISA (Asserachrom FIX, DiagnosticaStago). (B) Coagulant capacities were explored in plasmas using TGT experiments: ETP, Thrombin peak and velocity constants. Mann Whitney tests between TGT values observed two minutes after injection of HIX, MIX and BIX into hemophilia B mice were performed.

529x705mm (72 x 72 DPI)

Chapitre II : Amélioration *in vitro* et *in vivo* de l'activité coagulante du facteur IX humain recombinant. Caractérisation des mutants FIX-E410.

L'étude a fait l'objet d'une communication affichée et commentée lors du 24^e congrès de l'ISTH, ainsi que d'un article soumis au journal *Thrombosis Research*, celui-ci est inclus dans le manuscrit aux pages 147-172. Les résultats détaillés et les figures associées sont présentés dans l'article. De plus, des résultats ainsi que des figures supplémentaires sont discutés dans ce manuscrit.

Notre objectif était ici de produire et de caractériser *in vitro* et *in vivo* de nouvelles molécules de rFIX présentant une activité coagulante améliorée.

II.1- Production des molécules de FIX par la lignée cellulaire Huh-7

Après les deux études réalisées sur la lignée cellulaire Huh-7 et présentées dans le manuscrit aux pages 113-120 et 123-134, ce système de production ainsi validé a servi comme outil cellulaire pour la suite de nos travaux sur le FIX.

Une étude préalable a d'abord été réalisée afin de vérifier la capacité de la lignée Huh-7 à exprimer les plasmides *pcDNA* contenant les ADNc mutés correspondant aux FIX modifiés. L'étude de la sécrétion et de la capacité coagulante des FIX-E410 dans les surnageants cellulaires après transfection transitoire a été résumée dans la Figure 33. Les taux de sécrétion des FIX-E410 étaient plus faibles (0.98 ± 0.08 µg/ml) que ceux observés pour le FIX-WT (1.81 ± 0.17 µg/ml). Les activités spécifiques (en UI/mg) des FIX mutants déterminées par la méthode chronométrique étaient 2,4 à 7,5 fois plus élevées que celui de la molécule *wild-type* (Figure 33 A), avec p -value=0.0004 pour le FIX-E410N et p -value<0.0001 pour les autres FIX-E410. Enfin, l'analyse par western blot a permis de visualiser le FIX-WT et les signaux des FIX-E410 sous la forme d'une seule bande correspondant au poids moléculaire attendu (Figure 33 B).

Cette première approche nous a permis de confirmer la pertinence du système cellulaire choisi et de vérifier notre hypothèse concernant un changement de l'activité des FIX-E410.

De façon à obtenir les différentes molécules mutées en grande quantité, l'étude a été poursuivie par la génération de clones cellulaires stables capables de produire les différentes molécules recombinantes FIX-E410 dans le milieu de culture. Ces clones ont été sélectionnés en fonction de leur capacité de sécrétion du FIX. L'activité spécifique coagulante de chaque molécule présente dans les surnageants des clones choisis a également été corrélée aux résultats obtenus dans les expériences

de transfections transitoires. Le FIX-WT a été utilisé comme référence tout au long de l'étude, il a donc subi les mêmes procédés de production et de purification que les FIX modifiés.

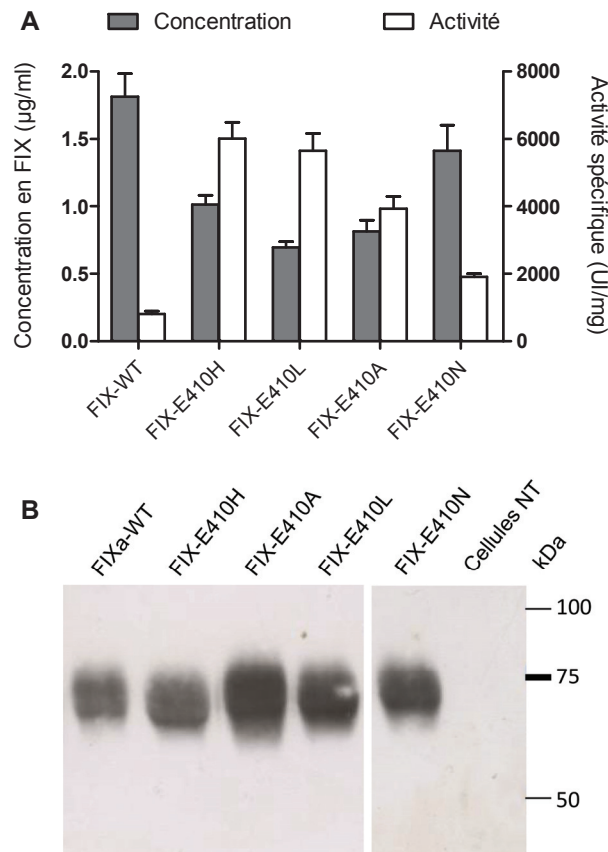


Figure 33. Sécrétion des molécules de FIX par les cellules Huh-7. Les cellules ont été transfectées transitoirement par les plasmides pcDNA-FIX-WT et pcDNA-FIX-E410. Les surnageants cellulaires ont ensuite été analysés par test ELISA, par méthode chromométrique sur coagulomètre DestinyMax® (A) et par électrophorèse suivi d'un western blot (B).

Les parties C-terminales des sérines protéases FIX [98], FVII [244] et PC [245] sont connues pour être impliquées dans la sécrétion. Lors de notre étude, les taux de FIX-E410 sécrétés dans les milieux extracellulaires, lors des transfections transitoires (Figure 33) ou lors de la production par les clones (Figure 1 de l'article), étaient toujours significativement plus faibles que ceux du FIX-WT. Ces résultats ont montré que le résidu E410 jouait effectivement un rôle dans la sécrétion du FIX. Cependant, le glutamate E410 ne fait pas parti des résidus conservés de la partie C-terminale de ces sérines protéases contrairement à la tyrosine Y404 (Figure 34), récemment décrite comme ayant un rôle crucial dans la sécrétion [99]. Notre hypothèse était que le résidu E410 participait indirectement à la sécrétion en permettant le maintien de la structure de la région 403-415 [98] et plus particulièrement en aidant à la bonne orientation du groupement phényle du résidu Y404.

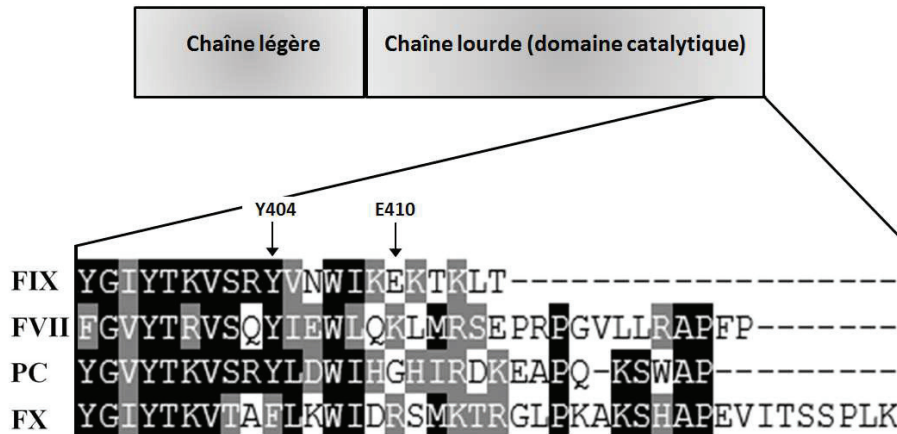


Figure 34. Alignement des séquences des régions carboxy-terminales des protéines FIX, FVII, PC et FX, d'après Branchini et al., 2013 [99].

II.2- Amélioration *in vitro* de l'efficacité du FIX

Une analyse plus précise de l'amélioration de l'efficacité des FIX mutants purifiés a été menée dans un premier temps *in vitro*.

La méthode chromogénique a montré que les FIX-E410 étaient 1.7 à 5 fois plus actifs que le FIX-WT. Ce dernier présentait une pleine activité (100 UI/dl) à une concentration de 5 µg/ml, alors que seulement 1 µg/ml de FIX-E410H était nécessaire pour atteindre cette même activité, faisant de ce mutant le plus actif par rapport aux trois autres FIX-E410 étudiés. Des expériences de capacité de génération de thrombine sur des plasmas de patients hémophiles B supplémentés par 5 et 30 UI/dl de FIX ont également confirmé cette tendance. Les résultats des essais cliniques de thérapie génique chez des patients hémophiles B sévères publiés en 2011 [215] ont décrit le maintien d'un taux circulant de FIX compris entre 1.5 et 6 UI/dl. Dans notre étude, le pic de thrombine générée avec 5 UI/dl de FIX-E410H (461.36 nM) était largement supérieur à celui généré par 30 UI/dl de FIX-WT (288.78 nM) (Table 1 de l'article). Etant donné qu'un taux circulant de 30 UI/dl de FIX est proche de la limite supérieure fixée dans la définition d'une forme mineure de l'hémophilie, nous avons ainsi émis l'hypothèse que l'utilisation du FIX-E410H en thérapie génique pourrait permettre d'obtenir une génération de thrombine similaire à celle observée chez des patients non hémophiles, permettant ainsi de palier aux faibles taux de FIX obtenus en thérapie génique.

II.3- Amélioration *in vivo* de l'efficacité du FIX

L'efficacité de chaque molécule a ensuite été testée *in vivo* par injection à des souris hémophiles B. Notre projet a été soumis au comité d'éthique et accepté sous le protocole N° BH2013-03. Dans un souci de préservation des vies animales, le plan d'expérimentation a été défini de façon à n'utiliser

qu'un nombre minimal d'animaux (initialement n=30) tout en permettant de réaliser une analyse statistique fiable par méthode non paramétrique. Seuls le FIX-E410H, le Benefix® et le FIX-WT ont fait l'objet d'une étude *in vivo* complète. Ces deux derniers ont été utilisés comme molécules de référence.

Les valeurs d'activité et de capacité de génération de thrombine étaient à nouveau significativement plus élevées pour le plasma de souris injectées par le FIX-E410H en comparaison de celui des souris ayant reçues le FIX-WT. Cette augmentation d'activité était d'autant plus significative que le FIX-E410H se trouvait être en réalité à une concentration dans le plasma murin 3,5 fois moindre que le Benefix® et le FIX-WT (Figure 4 de l'article). En considérant les concentrations plasmatiques observées (Figure 35), le FIX-E410H (2073 ± 94.72 UI/mg) présentait une activité spécifique 5,8 fois plus élevée (p -value=0.0286) que celui du FIX-WT (356.1 ± 13.65 UI/mg). Cependant, lors des études de pharmacocinétique, le taux de FIX-E410H détecté dans le plasma aux temps 2, 30, 90 et 300 minutes restaient inférieurs à ceux des molécules de références (Figure 5 de l'article). En effet, le FIX-E410H et le FIX-WT avaient respectivement des demi-vies de 11,15 et 16,50 minutes.

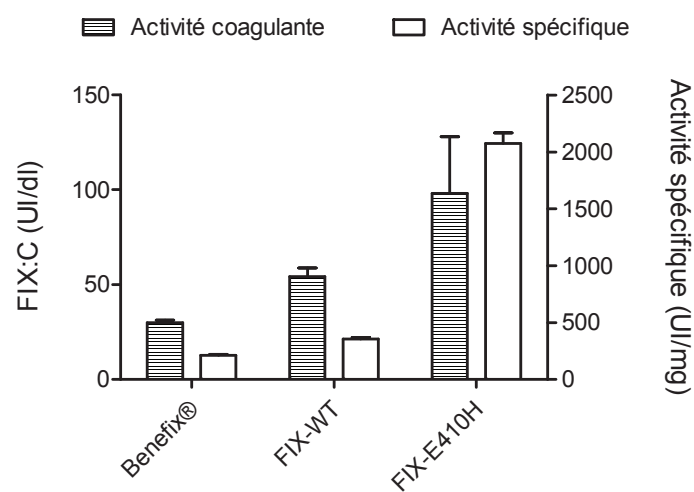


Figure 35. Comparaison des activités coagulante (UI/dl) et spécifique (UI/mg) observées dans les plasmas des souris hémophiles B deux minutes après injection des différents FIX (n=4-6 par groupe). Les activités spécifiques ont été calculées en fonction de la concentration en FIX observée dans le plasma pauvre en plaquettes. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne \pm écart type.

II.4- Etude de la concentration du FIX-E410H dans le plasma murin

Afin de savoir si cette diminution du taux de récupération était liée à la mutation E410H, nous avons également injecté les molécules purifiées FIX-E410L et FIX-E410A à des souris hémophiles B. La Figure 36 présente les concentrations en FIX présentes dans le plasma après deux minutes. Les taux circulants des deux autres FIX mutés ont été identifiés à $0.51 \pm 0.03 \mu\text{g/ml}$ pour le FIX-E410L et $0.58 \pm 0.04 \mu\text{g/ml}$ pour le FIX-E410A. Des tests statistiques de Mann Whitney n'ont montré aucune différence significative entre les trois FIX mutés, éloignant ainsi cette première hypothèse ou confirmant le fait qu'une mutation au niveau du résidu E410 avait une incidence sur le taux de récupération indépendamment de la nature de l'acide aminé se trouvant en cette position.

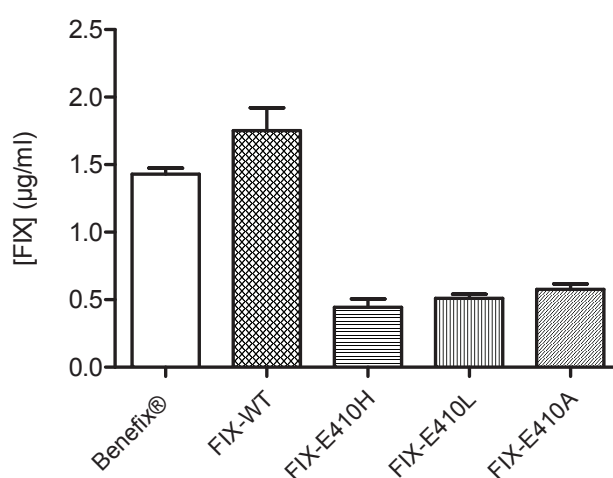


Figure 36. Molécules de FIX présentes dans le plasma 2 min après injection. FIX-WT et FIX-E410H, L et A ont été injectés à des souris hémophiles B (n=4-6 par groupe) via le sinus retro-orbital. Le Benefix® a été injecté comme référence dans les mêmes conditions. Deux minutes après injection, des échantillons de sang ont été collectés via la veine cave inférieure. Les échantillons ont été centrifugés de façon à sédimenter les plaquettes et autres types cellulaires. Les concentrations en FIX dans le plasma pauvre en plaquettes ont été déterminées par un test ELISA. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne \pm écart type.

Une autre question s'est alors posée à savoir s'il existait des taux résiduels de FIXa dans nos préparations, la forme n'étant que peu reconnue par l'ELISA mais seulement visualisée après électrophorèse et active lors des mesures de générations de thrombine. En effet, une présentation lors du 53^e congrès de l'ASH (*American Society of Hematology*) décrivait des générations de thrombine significatives induites par des traces de FIXa présentes dans un concentré de FIX commercial, tel que le Benefix® [246]. Cette présentation allait même jusqu'à proposer les tests de génération de thrombine comme outil pour le dosage des fractions de FIXa présentes dans les produits commercialisés. La présence de FIXa, à des taux différents, dans les échantillons de plasma aurait pu expliquer cette absence de corrélation entre concentration et activité. En effet, la concentration en FIX était déterminée par un test ELISA qui ne détecte pas de la même manière le

FIX et le FIXa. L'absence de FIXa dans les solutions de FIX-E410H, de Benefix® et de FIX-WT avant et après injection a alors été vérifiée par western blot et aucune traces de FIXa n'a été observée.

Par la suite, nous avons émis l'hypothèse d'une rétention possible du FIX et notamment des molécules mutées au niveau de la paroi endothéliale des vaisseaux des souris injectées. Des expériences de liaison du FIX à deux types cellulaires différents ont alors été menées. Le premier type cellulaire choisi a été la lignée de cellules endothéliales humaines EAhy926. En effet, de telles expériences ont déjà été réalisées pour caractériser les liaisons entre FIX et cellules endothéliales [101,112,115]. Ces études ont montré que le domaine Gla, la zone hydrophobe et le domaine EGF-1 du FIX étaient responsables de la liaison avec les membranes cellulaires. De plus, une étude récente sur les souris hémophiles B a montré la présence de stocks extravasculaires de FIX [247]. Cette étude montre que le FIX continue à avoir une activité coagulante en empêchant les saignements même après que le taux de FIX dans le sang ait été inférieur à 1 UI/dl durant plusieurs jours. Les processus menant à l'existence de ces stocks sont liés à la reconnaissance du collagène IV des cellules endothéliales par le FIX. Nos expériences ont consisté à incuber à différents temps le FIX-WT et le FIX-E410H sur un tapis cellulaire EAhy926 en présence d'ions Ca^{2+} et avec ou sans FVIIIa. Aucune différence significative de liaison à ces cellules n'a été observée entre le FIX-E410H et le FIX-WT.

De par leur rôle clef dans la liaison avec les facteurs de la coagulation FIX [5,107,111,248], les plaquettes ont été suspectées comme entité cellulaire ayant une liaison possiblement améliorée avec le FIX muté. Des expériences de cinétique de liaison des FIX purifiés (de 2 à 5 $\mu\text{g/ml}$) à une suspension de plaquettes purifiées de souris hémophiles B (500 à $2000 \cdot 10^6$ plaquettes) ont révélé que 20 % du FIX-E410H initial était retenu par les plaquettes de souris après 2 minutes de contact, alors que les taux de FIX-WT n'avaient baissé que de 10 % (Figure 37 A). Une deuxième étude de liaison aux plaquettes a été réalisée cette fois à l'aide de plaquettes sanguines d'origine humaine (Figure 37 B). Après une heure d'incubation, le pourcentage de FIX-E410H lié aux plaquettes humaines atteint une valeur de 40 %, ce qui est 1,6 fois plus élevé que pour les plaquettes murines. La même augmentation a été observée pour la molécule *wild-type* avec un pourcentage de FIX-WT lié aux plaquettes humaines de 33 % après 60 minutes. Dans les deux cas le FIX-WT est retenu par les plaquettes sanguines qu'elles soient humaines ou murines mais la substitution d'un acide aminé au niveau de la position E410 augmente cette rétention *ex vivo*. De plus, quelle que soit la molécule de FIX, il apparaît que le FIX se lie de façon saturante dès deux minutes aux plaquettes murines tandis que la liaison aux plaquettes humaines est plus progressive.

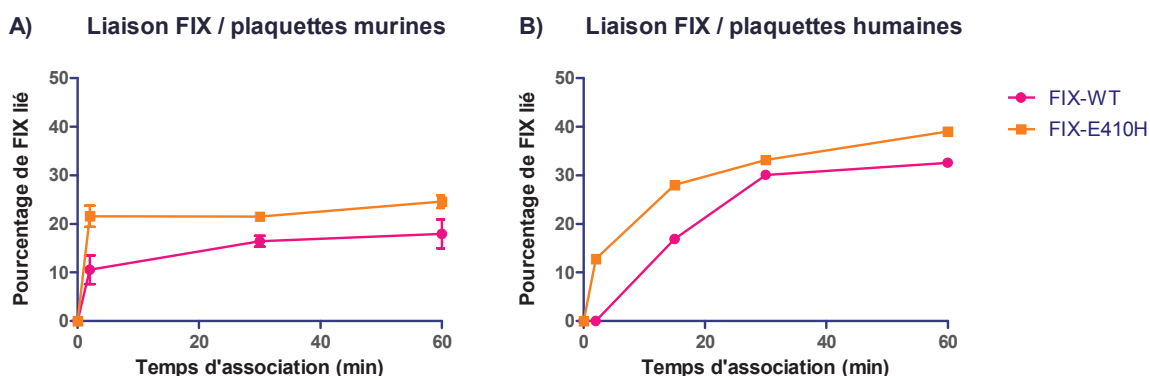


Figure 37. Liaison du FIX aux plaquettes murines (A) et humaines (B). FIX-WT et FIX-E410H ont été incubés à 37°C avec des plaquettes murines ($500-2000 \cdot 10^6$ plaquettes/ml) ou humaines ($150 \cdot 10^6$ plaquettes/ml). Aux temps 2, (15,) 30 et 60 min, les échantillons prélevés ont été centrifugés afin d'éliminer les plaquettes et le FIX lié aux plaquettes. Le pourcentage de FIX lié a été déduit du pourcentage de FIX restant dans le surnageant et dosé par méthode ELISA. Les résultats de la **Figure 37A** sont présentés sous forme de moyenne \pm écart-type. Un test de Mann-Whitney a été réalisé pour chaque temps : à 2 min, p -value=0.0087 ; à 30 min, p -value=0.0450 ; à 60 min, les moyennes n'étaient pas significativement différentes.

Les valeurs obtenues lors de la liaison aux plaquettes murines ont apporté des éléments nouveaux pouvant interpréter la différence de concentration en FIX muté versus FIX-WT observée après injection chez les souris hémophiles B. La plus forte liaison aux plaquettes observée pouvait résulter d'un changement dans la conformation du FIX-E410H dû à la présence du résidu histidine. Il existe environ 300 sites de fixation du FIX sur les plaquettes [107] et jusqu'à présent, les résidus du FIX décrits comme impliqués dans la liaison aux plaquettes étaient les résidus 3-11 du domaine Gla [108] et les résidus 88-109 du domaine EGF-2 [111]. Nos résultats portaient à croire que le glutamate E410 serait également directement ou indirectement impliqué dans cette liaison.

II.5- Caractérisation biochimique des FIX mutants. Explication de l'augmentation d'activité observée.

Afin de comprendre les mécanismes permettant l'augmentation *in vitro* et *in vivo* de l'activité coagulante des FIX-E410, une caractérisation biochimique complète a été menée.

II.5.1- Etude de l'activation des FIX-E410

Des cinétiques d'activation de quantités équivalentes en FIX-E410H et FIX-WT ont d'abord été réalisées, à l'aide du FXIa (Figure 4 de l'article) ou du complexe FVIIa-FT (Figure 38 du manuscrit). Les FIX étudiés ici ont présenté le même comportement lors des cinétiques d'activation, à savoir l'apparition des deux signaux correspondant aux chaînes lourde et légère du FIXa, après électrophorèse et western blot. Les FIX n'étant pas totalement activés après deux heures d'incubation par le FXIa, le temps de réaction (5 heures) et le ratio FXIa/FIX (35 au lieu de 40) ont été

modifiés jusqu'à observer des FIX-WT et FIX-E410 pleinement clivés (Figure 39). Aucune différence de capacité à être activé par le FXIa ou le complexe FVIIa-FT n'ayant été observée entre les FIX mutants et le FIX-WT lors de ces expériences, nous pouvons déduire que l'amélioration de l'activité ne pouvait être expliquée par une activation plus rapide ou plus efficace.

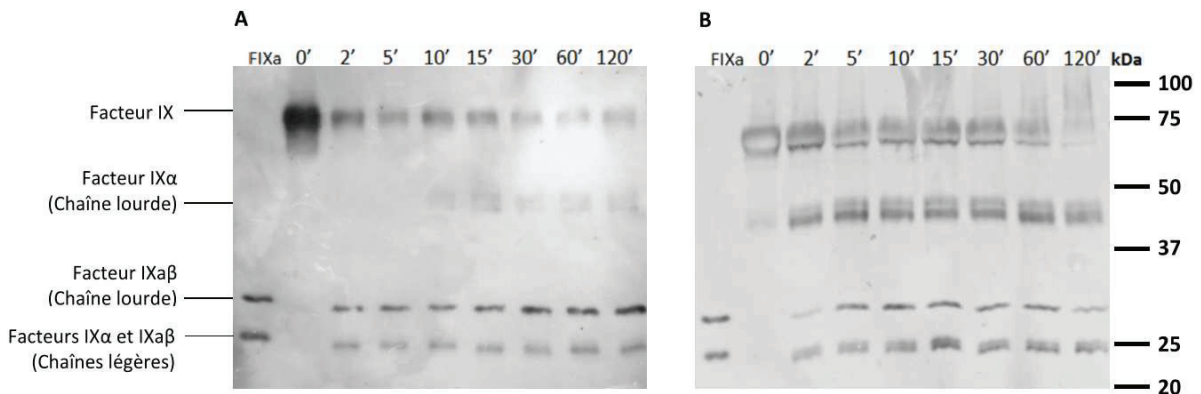


Figure 38. Cinétique d'activation du FIX-WT (A) et du FIX-E410H (B) par le complexe FVIIa-FT. A différents temps, des aliquots ont été prélevés et la réaction a été arrêtée par ajout de tampon Laemmli [6X] contenant de l'EDTA. Les FIXa ont ensuite été visualisés par western blot. Le FIXa commercial a été utilisé comme référence. kDa : kilo Dalton.

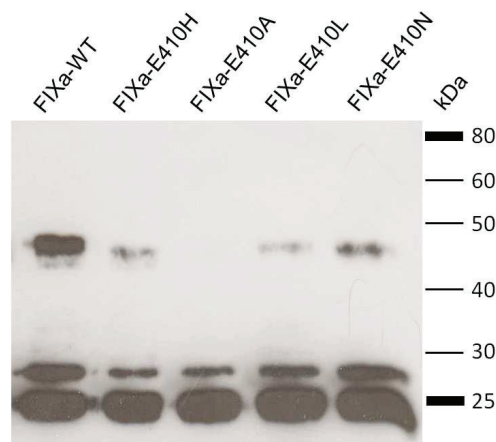


Figure 39. Pleine activation du FIX-WT et des mutants FIX-E410. Les FIX ont été activés 5h à 37°C par le FXIa avant d'être analysés par une électrophorèse SDS-PAGE suivie d'un western blot anti-FIX. kDa : kilo Dalton.

L'explication de l'augmentation d'activité spécifique a donc été orientée vers la capacité de chaque FIX à générer du FXa avec ou sans FVIIIa. Pour ces expériences, les FIXa ont été activés par le FXIa et les taux de molécules ainsi générées ont été titrés en présence d'ATIII par une méthode décrite dans la littérature [111,249] (Figure 40).

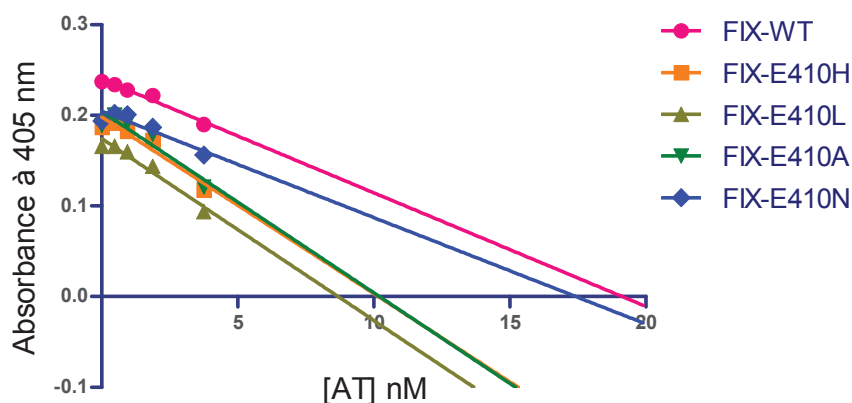


Figure 40. Titration des sites actifs des FIXa en présence d'AT. Les molécules de FIXa ont été inactivées par des concentrations croissantes d'AT comme décrit dans la Partie III du manuscrit.

II.5.2- Détermination des paramètres cinétiques

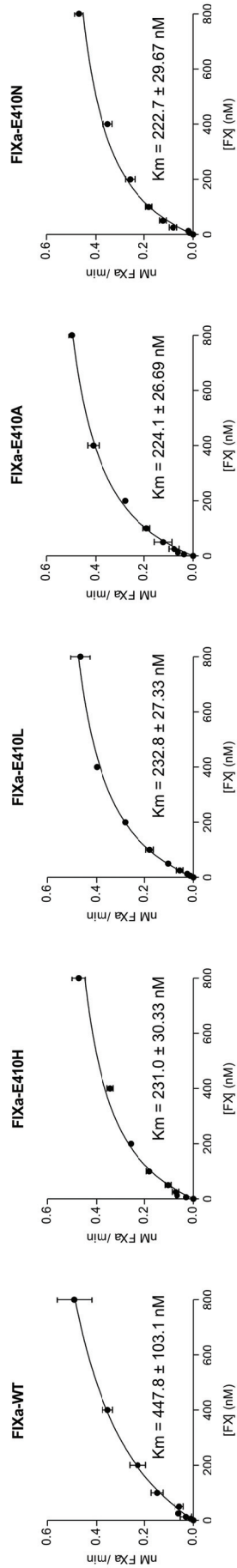
Afin de mieux évaluer la façon dont les FIX mutants interagissaient avec leur substrat, le FX et leur cofacteur, le FVIIIa, les constantes biochimiques de liaisons des FIXa ont été déterminées par des réactions de génération de FXa en absence ou en présence de FVIIIa (Figure 41).

Le K_m représente l'affinité de l'enzyme (FIXa) pour son substrat (FX). Plus le K_m est faible, plus l'activité enzymatique maximale est atteinte pour une faible concentration de substrat. En absence de FVIIIa, les K_m des FIXa-E410 étaient diminués d'un facteur 2 par rapport au FIXa-WT.

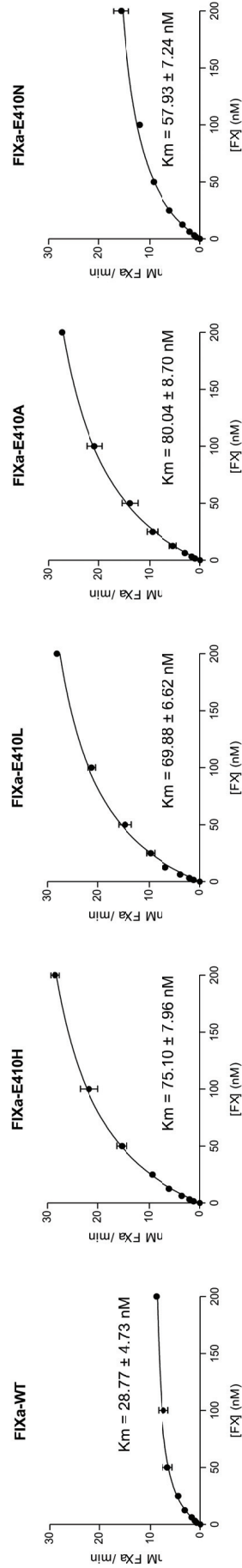
Le k_{cat} est la vitesse à laquelle l'enzyme réalise la catalyse de son substrat en conditions saturantes en substrat. Ici, les valeurs des k_{cat} n'étaient pas significativement différentes. Ainsi les rapports k_{cat}/K_m des FIX mutants se trouvaient être inversement proportionnels aux K_m . Cette observation traduisait une meilleure efficacité catalytique du FIXa muté pour le clivage du FX en FXa, et ce, grâce à une interaction plus forte avec le FX.

La présence de FVIIIa dans les réactions de génération de FXa a entraîné l'augmentation d'un facteur 10^4 de l'ensemble des k_{cat}/K_m , montrant ainsi une très nette amélioration de la spécificité des FIXa *wild-type* et mutants pour le FX grâce à son cofacteur qui lui permet d'acquérir une conformation optimale au sein du complexe *tenase*. Les valeurs de k_{cat} des FIX mutants étaient jusqu'à 2,5 fois plus élevées que celle du FIX-WT. Les FIXa-E410 clivaient donc 2,5 fois plus de molécules de FX en FXa, au sein du complexe *tenase*, pour une durée donnée. Le FVIIIa assurait donc aux FIXa mutants une meilleure efficacité de réaction en terme de vitesse de génération de FXa, traduisant très vraisemblablement une meilleure affinité FIXa/FVIIIa. Ce résultat était confirmé par une augmentation de la V_{max} jusqu'à 3,9 fois par rapport au FIX-WT. Les valeurs de K_d apparent ($K_{d,app}$) obtenues confirmaient également l'hypothèse d'amélioration d'affinité des FIXa-E410 pour le FVIIIa.

A) Courbes de génération de FXa, en absence de FVIIa



B) Courbes de génération de FXa, en présence de FVIIa



C) Courbes de génération de FXa, en présence de FVIIa et de [FIXa] variables

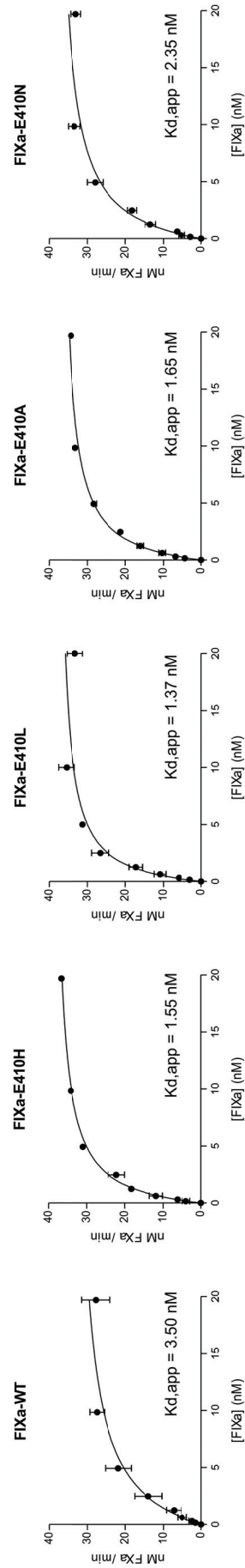


Figure 41. Activations du FX par FIXa-WT et FIXa-E410. Détermination des constantes cinétiques. A. Générations de FXa en absence de FVIIa par FIXa 10 nM. B. Générations de FXa en présence de FVIIa 0.3 nM par FIXa 2 nM. C. Générations de FXa en présence de FVIIa 0.3 nM et en concentration croissante en FIXa (0-20 nM). Les résultats sont présentés en nM de FXa formés par minute. Les expériences ont été réalisées en triplicats et chaque point a été présenté sous la forme moyenne \pm écart type. $K_{d,app}$: K_d apparent.

II.5.3- Etude de l'affinité FIXa/FVIIIa par résonance des plasmons de surface (SPR)

De façon à corroborer les valeurs des constantes cinétiques et de confirmer une meilleure affinité de liaison des FIX-E410 pour le FVIIIa par rapport à celle du FIX-WT, des expériences de SPR ont été menées. Plusieurs concentrations (0-60 nM) des différents FIXa-E410 et du FIXa-WT ont été incubées avec le domaine A2 du FVIIIa couplé à une puce CM5 dans un système Biacore T100 comme décrit dans la Partie II du manuscrit à la page 109. Trois des FIX mutés ont effectivement présenté de meilleurs taux d'association pour le domaine A2 du FVIIIa, en comparaison de ceux du FIXa-WT utilisé comme référence (Figure 42). Le FIX-E410N, qui possédait pourtant un $K_{d,app}$ plus faible que le FIX-WT (Figure 41), n'a pas démontré d'amélioration d'association avec le domaine A2 du FVIIIa et ce, malgré une augmentation de son activité coagulante. Ce dernier résultat confirmait que l'amélioration d'activité des FIX mutés n'était très certainement pas seulement due à une meilleure affinité pour le cofacteur, le FVIIIa, mais aussi pour son substrat, le FX.

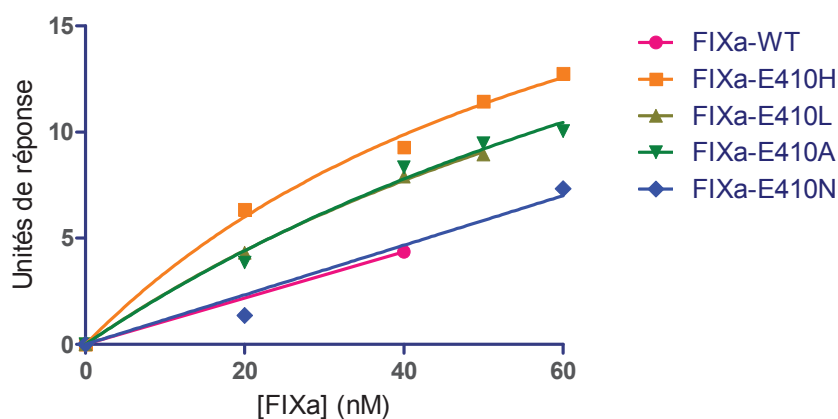


Figure 42. Association des FIXa avec le domaine A2 isolé du FVIIIa. L'association a été enregistrée et la quantité de FIXa lié au domaine A2 a été exprimé en taux de FIXa (Unités de réponse) associé après 180 secondes.

II.6- Conclusion et perspectives

Lors de cette étude, nous avons pu produire et caractériser quatre nouveaux FIX recombinants ayant une activité coagulante augmentée. La caractérisation et l'étude des interactions des FIX-E410 a permis de confirmer l'importance de la partie C-terminale dans la sécrétion du FIX ainsi que du résidu E410 dans la liaison au FVIIIa lors de la formation du complexe *tenase* intrinsèque. Nos résultats apportent également un nouveau questionnement quant à l'implication de la partie C-terminale du FIX dans la liaison aux plaquettes.

Enfin, notre étude a permis de générer un nouveau FIX recombinant à activité spécifique augmentée 5 fois *in vitro* et *in vivo*. Cette nouvelle molécule pourrait être utilisée en prophylaxie ou lors d'expériences de thérapie génique et nous envisageons d'utiliser prochainement ce nouveau FIX-E410H afin de mener des essais précliniques de thérapie génique sur des souris hémophiles B. Nous envisageons également de générer cette mutation sur la protéine de fusion FIX-FXIII B qui fait l'objet du deuxième axe de recherche de ce travail sur le FIX.

Expression and characterization of a novel human recombinant factor IX molecule with enhanced *in vitro* and *in vivo* clotting activity

Eloïse Perot¹, Nathalie Enjolras¹, Sandra Le Quellec^{1,2}, Alice Indalecio¹, Jonathan Girard¹, Claude Negrier^{1,2} and Yesim Dargaud^{1,2}

1. EA 4174, Hemostase, Inflammation & Sepsis Universite Lyon1 Faculte de Medecine Laennec - 69372 Lyon cedex 08 – France
2. Unité d'Hémostase Clinique, Centre Regional du Traitement des Hemophiles, Hopital Cardiologique Louis Pradel, 28 Bd du Doyen Jean Lepine – 69500 Bron - France

Corresponding author:

Yesim Dargaud, MD, PhD

Unite d'Hemostase Clinique,

Hopital Cardiologique Louis Pradel

28 Bd du Doyen Jean Lepine,

F-69500 Bron, France

Tel: +33 4 72118825; Fax: +33 4 72118817

E mail: ydargaud@univ-lyon1.fr

Abstract

Introduction: Hemophilia B is an inherited X-linked recessive bleeding disorder, due to a defect in human factor IX (FIX). The main treatment for hemophilia B is replacement therapy using FIX concentrates. Prophylactic treatment in severe hemophilia B is very effective but is limited by cost issues. Production of a recombinant FIX (rFIX) with enhanced clotting activity, offering the possibility of fewer infusions and fewer costs with similar efficacy, is one of the current challenges for hemophilia B treatment. The present study focused on an important amino acid sequence known to be involved in the interaction of activated FIX (FIXa) with its cofactor, activated factor VIII (FVIIIa).

Materials and Methods: Using site-directed mutagenesis of glutamate E410 (c240, chymotrypsin numbering), four recombinant FIX-E410 (E410H, A, L and N) mutants were developed and produced by the human hepatoma cell line Huh-7.

Results: The *in-vitro* clotting activity of mutant FIX molecules was 3 to 5-fold higher than wild-type recombinant FIX (FIX-WT). FIX-E410H compound showed the highest *in-vitro* procoagulant activity. Enhanced specific activity was confirmed using thrombin generation assay. FIX-E410H induced 5.2-fold higher thrombin generation than FIX-WT. In hemophilia B mice, we observed significantly higher *in-vivo* clotting activity and thrombin generating capacity with FIX-E410H compared to FIX-WT. We demonstrated that increased procoagulant activity of FIX-E410H was mainly explained by 2.5- fold enhanced affinity of the mutant for human FVIIIa.

Conclusion: We have engineered and characterized four improved FIX proteins with enhanced *in-vitro* and *in-vivo* activity. Future studies are required to evaluate the immunogenicity of FIX-E410.

Keywords

Recombinant factor IX (rFIX) , Huh-7 cell line, glutamate 410, enhanced specific activity, hemophilia B mice

Introduction

Hemophilia B (HB) is an X-linked inherited recessive bleeding disorder characterized by a deficiency in human factor IX (FIX). Patients with hemophilia B are commonly treated with protein replacement therapy, using recombinant or plasma derived-FIX concentrates (1). Prophylactic therapy beginning at an early age should be considered the evidence-based treatment of choice for children with severe hemophilia, enabling normal physical, psychologic, and social development (2,3). Prophylaxis protocols are, however, demanding on peripheral veins and very expensive (4). Prophylaxis using bioengineered recombinant FIX molecules with enhanced clotting activity, offering similar clinical efficacy and lower costs, may be of great interest. The development of new FIX molecules with increased specific activity is therefore one of the current challenges of hemophilia B treatment (5–9).

FIX is a vitamin K dependent serine protease synthesized in the liver (10). During the coagulation process, plasma FIX is activated to FIXa by either tissue factor/factor VIIa complex (extrinsic pathway) or factor XIa (FXIa). In the presence of Ca²⁺, platelet membrane phospholipids and FVIIIa cofactor, FIXa hydrolyses one arginine-isoleucine bond in factor X to form factor Xa (FXa) (11). The intrinsic tenase complex, formed by FVIIIa/FIXa/phospholipids, activates FX at a 50-100 fold-higher rate than the extrinsic tenase complex and it is 10⁵ to 10⁶ fold more active than FIXa alone as a FX activator (12). Patients with hemophilia have impaired platelet surface FXa generation and a failure of the thrombin generation. Affinity improvement of the FIXa for FX or FVIIIa could be therefore a valuable strategy to increase the catalytic activity of FIX and the therapeutic index of replacement therapy, by permitting administration of lower doses to achieve the same therapeutic outcome.

Some specific regions of the FIXa molecule are known to play a critical role in the binding to FX but not to FVIIIa. It has been shown that modifications in the FIX surface loop 99 (residues 256-268) can considerably increase FIX activity for FX in the absence of FVIIIa (13,14). Single amino acid substitutions at arginine R338 were described (5,6). This region of the protein is important for FVIIIa binding, and inducing a single amino acid mutation at this position increases the efficiency of the binding of FIXa to FVIIIa. Promising results were reported for gene therapy in hemophilia B mice using FIX-R338L (7); and recently, FIX variants with several substitutions including R338A or R338L mutations showed significantly enhanced clotting activity in hemophilia B mice, due to tighter binding to FVIIIa (8,9).

The aim of the present study was to develop and characterize a novel recombinant human FIX (rhFIX) molecule, with increased clotting activity. We hypothesized that single amino acid substitution at residue E410 (c240, chymotrypsin numbering), involved in interaction between the protease domain

of FIXa and the A2 subunit of FVIIIa (15), might improve the affinity of FIXa to FVIIIa. We designed four modified rhFIX mutants with a substitution at glutamate E410 (E410H, E410A, E410L and E410N). FIX-E410 mutants were produced using human hepatoma cell line Huh-7, an effective cellular system for production of rhFIX with improved posttranslational modifications compared to CHO cells-derived rhFIX (16). FIX-E410 mutants described here have higher affinity towards FVIIIa and therefore five fold- enhanced in-vitro and in-vivo hemostatic efficacy.

Materials and methods

In-vitro mutagenesis

Mutated FIX plasmids were derived by site-directed mutagenesis on the pcDNA-FIX-WT plasmid, coding for FIX wild-type (FIX-WT) and containing a truncated intron 1 (17), with a PCR-based method using the QuickChange® site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA). The forward primers used to introduce nucleotide substitutions at glutamateE410 (numbering is relative to the amino-terminal tyrosine [position 1] of the circulating zymogen) were:

5'-GTCAACTGGATTAAGCATAAAACAAAGCTCACT-3' (E410H);

5'-GTCAACTGGATTAAGGCTAAAACAAAGCTCACT-3' (E410A);

5'-GTCAACTGGATTAAGTTAAAAACAAAGCTCACT-3' (E410L) and

5'-GTCAACTGGATTAAGAATAAAACAAAGCTCACT-3' (E410N).

Reverse primers were complementary to these oligonucleotides. The four cDNAs coding for FIX-E410 (FIX-E410H, A, L or N) mutants were sequenced.

Expression of FIX molecules in human cells

Transfection assays

The Huh-7 human hepatocellular carcinoma cell line (JCRB0403) was maintained as previously described (16). To ensure that Huh-7 cells could secrete FIX-E410 properly, they were transiently transfected with pcDNA-FIX-E410H, pcDNA-FIX-E410A pcDNA-FIX-E410L, pcDNA-FIX-E410N and pcDNA-FIX-WT (used as a control) into 6-well plates using FUGENE-6® (Roche, Neuilly-sur-Seine, France). Forty-eight hours after transfection, supernatants containing fetal-calf-serum (FCS, 10%) were collected for ELISA and FIX activity assays. HYQ medium without FCS was handed on the cell layer overnight, collected and then subjected to SDS-PAGE followed by immunoblotting.

Selection of Huh-7 clones and production of FIX

In order to produce FIX-WT and FIX-E410 at large scale, Huh-7 cells plated in Petri dishes (1×10⁶cells/dish) were transfected with corresponded pcDNA expression vectors. After transfection, geneticin (G418, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) was regularly added to a final concentration of 0.4 mg/ml in cell media. G418 resistant clones, appeared after one month, were scrapped and individually inoculated in a 96-well plate. For each FIX molecule, the highest producer clone was amplified from T25 flask to roller-bottles (Cellmaster rollerbottles, Greiner BioOne, Brumath, France). FIX-WT and FIX-E410 were produced in roller-bottles using a system of rotation IBS CellRoll (Integra Biosciences, Cergy- Pontoise, France) and following the protocol previously described (16).

FIX Purification

Supernatants from roller-bottles were pooled, filtered at 0.22 µm before purification on an ion-exchange chromatography unit (5 ml HiTrap™Q-FF unit, GE Healthcare, Orsay, France). FIX dialyzed elutes were then loaded on a heparin affinity chromatography unit (1 ml HiTrap™Heparin HP, GE Healthcare) firstly equilibrated with Phosphate 50mM, pH 7.2. FIX-WT and FIX-E410 were eluted using a linear NaCl gradient and desalted by dialysis. Purified FIX compounds were evaluated by ELISA, one-stage clotting assays and western blot analysis.

FIX Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

FIX concentration was measured using a FIX ELISA kit (Asserachrom®IX:Ag, Diagnostica Stago, Asnières, France). The kit uses rabbit anti-human FIX F(ab')₂ fragments and rabbit anti-human FIX antibodies coupled with peroxidase.

Western blot

After a SDS-PAGE step, western blotting was used to visualize FIX molecules, following an already described protocol (17). Briefly, primary antibodies were obtained from rabbit injected with rhFIX (Benefix®) and secondary polyclonal antibodies were coupled with HorseRadish Peroxidase. The kit Immun-Star™ (WesternC™ Chemiluminescent, BioRad, Hercules, CA, USA) was used to reveal FIX molecules.

Activation time course of FIX by FXIa and FVIIa-TF complex

Recombinant activated FXI (FXIa) 4.17 nM (Haematologic Technologies Inc., Essex Junction, USA) and 167 nM purified FIX were incubated at 37°C in buffer containing 20 mM Hepes, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂ as previously described (18). Recombinant activated FVII (FVIIa) (NovoSeven®, Novo Nordisk, Upsala, Sweden) and recombinant tissue factor (TF) (Innovin®, Dade Behring, Franckfurt, Germany) were added, at concentration of 1.67 nM and 1.48 nM respectively, to 167 nM FIX in the same buffer supplemented with 20 µM PC:PS (75:25 of phosphatidylcholine: phosphatidylserine, prepared in the laboratory by extrusion method (19)). For each activation time course, subsamples were removed at different times and the reaction was quenched using Laemmli buffer [6X].

FIX Clotting activity

FIX clotting activity was determined with two methods i.e. one-stage clotting assay on a Destiny Max® analyzer (Trinity-Biotech, Dublin, Ireland) (16) and chromogenic FIX assay using Biophen FIX kit (Hyphen BioMed, Neuville sur Oise, France).

Thrombin generation assay

In-vitro thrombin generation capacity was measured in a Fluoroscan Ascent fluorometer (Thermolab systems OY, Helsinki, Finland) according to the calibrated automated thrombography method, as previously described (20,21). Briefly, FIX deficient plasma (Cryo-check FIX deficient plasma, Precision Biologic Inc, Dartmouth, NS, USA) was spiked with increasing concentrations of FIX-WT or FIX-E410 and thrombin generation was measured using a low concentration of tissue factor at 1pM.

In-vivo thrombin generating capacity induced by FIX-E410 or FIX-WT in hemophilia B mice, was measured in mice plasma using 0.5pM of tissue factor, as previously described (22).

Determination of *in-vitro* kinetic parameters of FIX

Preparation of FIXa mutants

Firstly, 116 nM FIX were fully activated by 3.35 nM FXIa after 5h of incubation at 37°C, in the presence of CaCl₂. Activation of the FIX molecules was evaluated by SDS-PAGE/immunoblotting. Concentrations of all FIXa variants were determined by active site titration using antithrombin (AT) (23) without FVIIIa and thrombin. The following method was adopted: FIXa solutions (~ 15 nM final) were added to 0-15 nM AT (Diagnostica Stago) dilutions in Hepes buffer supplemented with 1 mg/ml bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) and 0.5 µg/ml heparin. After 15 min of incubation at 37°C, activated factor X (FXa) generation was initiated by addition of 600 nM factor X (FX) (Haematologic Technologies Inc.), 50 µM PC:PS and 3 mM CaCl₂. The hydrolysis of spectrozyme-FXa PNAPEP 1025 (Cryopep, Montpellier, France) allowed monitoring absorbance at 405 nm that was plotted as a function of the [AT]. Assuming 1 mol of FIXa was neutralized by 1 mol of AT, the FIXa concentration in the reaction mix was determined as corresponding to the x-intercept value.

Interaction of FIXa with FX

Interaction of FIXa with FX was studied by FXa generation assay in the absence or in the presence of activated factor VIII (FVIIIa), using a chromogenic FXa substrate PNAPEP 1025 (8,9,24). Factor Xa concentrations were determined using a calibration curve obtained with several dilutions of FXa (Haematologic Technologies Inc.) All experiments were performed in 20 mM Hepes, pH 7.4, 150 mM NaCl containing 1 mg/ml BSA. In the assay without FVIIIa, 50 µl of 0-1600 nM FX was added to a solution of 25 µl with 40 nM FIXa and 80 µM PC:PS in a 96-well plate. The reaction was initiated adding a mix containing 1 mM spectrozyme-FXa and 6 mM CaCl₂. After 7 min incubation at 37°C, the absorbance at 405 nm was monitored at 9-seconds intervals for 3 min using a THERMOmax[®] microplate reader paired with SoftMax[®] Pro Software (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA, USA).

Because of its instability, FVIIIa was prepared extemporaneously. Fifty microliters of activated FVIII were first prepared incubating 12 nM FVIII (Kogenate® Bayer, Bayer Healthcare, Berkeley, CA, USA) and 15 nM thrombin (FIIa) (Haematologic Technologies Inc.) for 1 min at 37°C. Tenase complex formation was performed 1 min after addition of 9nM FIXa and 90 µM PC:PS. The action of thrombin was then blocked by 4 ATU of r-hirudin (Pentapharm, Basel, Switzerland) incubation. The complex was mixed with a range of FX (0-200 nM final concentration), prepared extemporaneously in a 96-well plate. Generation of FXa and chromogenic reaction were initiated by addition of CaCl₂ solution and PNAPEP 1025. After 2 min at 37°C, FXa generation was thus determined by measuring the absorbance at 9-seconds intervals for 3 min.

Interaction of FIXa with FVIIIa

Binding of FIXa to FVIIIa was determined at limiting concentration of FVIIIa (5). Briefly, 50 µl of FIXa 0 to 40 nM supplemented with 0.6 nM FVIIIa (freshly prepared) were added to 50 µl mix of 400 nM FX and 1 M PNAPEP. After 3 minutes of incubation at 37°C, absorbance was measured at 9-seconds intervals during 3 minutes.

Animal experiments: *in-vivo* activity of recombinant FIX molecules in HB mice

Experimental procedures were approved by the Animal Care Committee of University Lyon1, in accordance with the European guidelines. HB mice B6.129P2-F9tm1Dws/J (25) were purchased from Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA). Mice (n=29) were injected with 10µg rhFIX Benefix® (Pfizer, New York, NY, USA), recombinant FIX-WT or FIX-E410H per 20g body weight, to yield a targeted circulating level of 5µg/ml (8). Benefix® used here was added to serum-free supernatants of untransfected cells, and then purified in the same conditions than FIX-WT and FIX-E410H. Two minutes later infusion, whole blood was collected from the inferior vena cava of 15 HB mice, as previously described (22). Platelet poor plasma (PPP) was immediately prepared for ELISA and thrombin generation assays. In 14 mice, blood samples were collected from the retro-orbital sinus at 2, 30, 90 and 300 minutes using silylated Pasteur pipettes. PPP was immediately prepared for ELISA and chromogenic FIX activity assays.

FIX/mice platelets binding

Washed platelet suspension was prepared from pooled whole blood of five HB mice, using a well-defined protocol (26). Platelets were thus resuspended in a physiological buffer with 2 mM of CaCl₂ and without coagulation factors or other plasma components. After platelet count, 500 to 2000.10⁶ platelets/ml were incubated with 2 to 5µg/ml FIX-WT or FIX-E410H, at 37°C. At 2, 30 and 60 min,

samples were collected and centrifuged at 10,000rpm during 30 seconds to remove platelets. FIX-specific ELISA test was performed to determine FIX concentration in the supernatant plasma.

Data analysis

Concerning determination of kinetic parameters, the software SoftMax[®] Pro provided data analyzed with an algorithm based on the Levenberg–Marquardt method. Initial velocity (Vmax) and Km values of FX activation by FIXa, with or without FVIIIa were determined using Michaelis-Menten equation and GraphPad Prism 5[®] software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The apparent Kd values of FIXa and FVIIIa were derived from calculations in GraphPad Prism 5[®].

All data were expressed as mean \pm SEM. Groups were compared using Mann Whitney test in GraphPad Prism 5[®]. An a priori α of $p \leq 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Production of FIX molecules in Huh-7 cells

To investigate the impact of E410 mutations on FIX secretion, Huh-7 cells were transiently transfected by pcDNA vectors containing the wild-type or mutant FIX cDNAs directed by a CMV promoter. Thirty-six hours after transfection, culture supernatants were collected for ELISA, activity assays and were submitted to electrophoresis in reducing conditions, followed by western blotting. FIX-WT and FIX-E410 concentrations were $1.47 \pm 0.12 \mu\text{g/ml}$ and $0.87 \pm 0.09 \mu\text{g/ml}$ respectively. One-stage clotting assay showed 2 to 6.5 -fold higher clotting activity with FIX-E410 compared to wild-type FIX molecule. All secreted FIX-WT and FIX-E410 mutants were visualized as a single band with an apparent molecular weight of 65 kDa (data not shown).

Stable Huh-7 clones producing FIX variants were obtained. The concentration of secreted FIX-WT was $0.48 \pm 0.04 \mu\text{g/ml}$ and the average concentration of FIX-E410 variants was $0.31 \pm 0.02 \mu\text{g/ml}$ (Fig.1A). western blot analysis showed that both wild-type, variant FIX molecules and the control rhFIX Benefix® presented the same expected molecular weight of 75 kDa (Fig.1B).

In-vitro procoagulant activity of FIX mutants

Factor IX clotting activity was measured using a chromogenic assay, in cell culture supernatants containing FIX-WT or FIX-E410 variants. Our results showed that $5 \mu\text{g/ml}$ of FIX-WT were necessary to induce FIX activity at 100 IU/dl (Fig.2), whilst 1 to 3 $\mu\text{g/ml}$ of FIX-E410 variants were sufficient to achieve the same clotting activity. The highest increase of activity was obtained with the mutant FIX-E410H showing a five-fold higher in-vitro activity compared to FIX-WT.

In-vitro thrombin generating capacity was measured for each molecule. FIX deficient plasma (FIX < 1 IU/dl) was supplemented with 0 – 5 ($0.25 \mu\text{g/ml}$) and 30 IU/dl ($1.5 \mu\text{g/ml}$) of FIX. In the absence of exogenous FIX, FIX deficient plasma showed very low peak thrombin and endogenous thrombin potential (ETP) values at 14.58 nM and 384.33 nM/min respectively. Thrombin generation was dose dependently improved with all tested FIX compounds. FIX-E410 variants induced higher thrombin peak and ETP compared to FIX-WT (Table 1). In accordance with FIX clotting activity results, the highest thrombin generation capacity was obtained with the mutant FIX-E410H at any tested concentration (Table 1).

Activation of FIX variants by FXIa and FVIIa-TF complex

Activation time courses of equimolar amounts of purified FIX-E410 mutants and FIX-WT were induced by FXIa or FVIIa-TF complex. Representative activation time course profiles of FIX-WT and FIX-E410H induced by FXIa were presented in Fig.3. After two minutes of incubation with FXIa, two bands corresponding to the heavy and light chains of FIXa were observed for both FIX-WT and FIX-E410H. However, FIX could not be fully activated despite a long incubation of two hours with FXIa. When the reaction time was extended to five hours and the molar ratio FXIa/FIX was reduced from 40 to 35, FIX-E410 variants were completely activated (data not shown).

Improvement of the binding affinity to FVIIIa

To evaluate the interaction of FIX-E410 mutants with FX and FVIIIa, kinetic parameters of the molecules were calculated and compared to FIX-WT (Table 2). In the absence of FVIIIa, FIX molecules exhibited a k_{cat}/K_m between 2825 and 4693 $M^{-1}.s^{-1}$. In the presence of FVIIIa, we observed a 10^4 -fold increase of the k_{cat}/K_m ratio, demonstrating a greater specificity of FIX for FX and a correct conformation of the intrinsic tenase complex.

In presence of FVIIIa, the apparent K_d of FIX-E410 varying from 1.55 to 2.35 nM were lower than the K_d of FIX-WT 3.50 nM. The three variants FIX-E410H, FIX-E410L and FIX-E410A exhibited 2.1 to 2.6-fold higher affinity for FVIIIa while FIX-E410N had 1.5-fold higher affinity compared to FIX-WT. Finally, the V_{max} of the FIX-E410H (38.78 ± 0.81 nM FXa min^{-1}) was increased by 3.9 fold in comparison to the FIX-WT (9.91 ± 0.52 nM FXa min^{-1}).

Animal studies

Pharmacokinetic parameters of the FIX-E410H were compared to those of Benefix® and FIX-WT in hemophilia B mice. Purified proteins were injected at the dosage of 10 μ g FIX/ 20 mg body weight. Two min after infusion, the concentration of Benefix® (1.43 ± 0.04 μ g/ml; $p < 0.0001$) and FIX-WT (1.75 ± 0.17 μ g/ml; $p = 0.0011$) in mice plasma were 3.3 to 4-fold higher than FIX-E410H (0.44 ± 0.06 μ g/ml) (Fig. 4A). Despite lowest plasma concentrations, FIX-E410H induced the highest clotting activity in hemophilia B mice, 98 ± 18 IU/dl compared to FIX-WT 54 ± 8 IU/dl ($p = 0.0376$) and Benefix® 30 ± 4 IU/dl ($p = 0.0001$).

Higher procoagulant activity of FIX-E410H was confirmed with significantly higher in-vivo thrombin generating capacity (ETP $p = 0.0037$; and peak thrombin $p = 0.0069$) of mice treated with this compound compared to those treated with FIX-WT (Fig. 4B). These results demonstrated that FIX-

E410H displayed a significant enhancement of clotting activity and thrombin generation compared to FIX-WT and Benefix®.

Plasma half-life of FIX-E410H, FIX-WT and Benefix® were determined by serial blood sampling from hemophilia B mice over a period of 5 hours. Our results reported shorter half-life of FIX-E410H e.g. 11 min, compared to FIX-WT 16 min and Benefix® 20 min (Fig. 5A). Thirty minutes after a single infusion of FIX, 44±5% of FIX-WT and 52±2% of Benefix® were detectable in plasma compared to 23±3% of FIX-E410H. Sixty minutes after the infusion, the difference between residual FIX levels was reduced but was still significantly lower for FIX-E410H. FIX clotting activity was measured in each sample using a chromogenic FIX assay. No statistically significant difference was observed ($p>0.05$) between FIX-E410H variant and the reference molecules despite shorter half-life and lower plasma concentration of the molecule (Fig. 5B).

Comparison of FIX-WT and FIX-E410H for the binding with HB mice platelets

Differently from humans, platelet count often exceeds $1000 \times 10^9/l$ in laboratory mice. Regarding the high clotting activity of FIX-E410H variant and its low plasma antigen levels in mice plasma, we hypothesized that the mutant FIX might be bound to platelets. Purified FIX-WT and FIX-E410H were incubated at 37°C with washed platelets from hemophilia B mice during 2- 30 or 60 minutes. Our results showed a rapid and increased binding of FIX-E410H to mice platelets compared to FIX-WT ($p=0.0087$ at 2 min, $p=0.0450$ at 30 min and $p>0.05$ at 60 min) (Fig. 6).

Discussion

Modified recombinant FIX molecules have been generated to reduce i) the amount of protein needed for FIX replacement therapy or ii) the amount of vector for gene therapy of hemophilia B. FIX exhibits low activity toward FX, but during the propagation phase of coagulation, complex formation with FVIIIa increases the k_{cat} for the conversion of FX to FXa by several orders of magnitude and results in a significant increase (more than 10^4 fold) in FX activation by FIXa (12). The aim of the present study was to generate a new recombinant FIX molecule with greater affinity for FVIIIa and therefore increased specific activity.

Factor IXa is composed of i) a light chain containing the amino-terminal gamma-carboxyglutamic acid (Gla) rich domain and two epidermal growth factor (EGF)-like domains; ii) a heavy chain containing the serine protease domain. FIXa binds to FVIIIa in an interaction involving more than one domain of the FIXa polypeptide. The protease domain of FIXa interacts with the A2 subunit of FVIIIa. Studies suggest that the alpha-helix region 330-339 (c162 by chymotrypsin numbering), region 301-303 (c132) and N346 (c178) of FIXa are involved in the interaction with the A2 subunit of FVIII (15,27). Other areas of interaction have been recently identified as K293 (c126) of FIXa and D712 of FVIIIa, and the interaction between E410 (c240) of factor IXa and K713 of factor VIIIa (15). The EGF1/EGF2 domains of FIXa interact with the A3 subunit of FVIIIa (24). Further, it is postulated that the Gla domain of FIXa interacts with the C2 domain of FVIIIa (28). We hypothesized that modification of the residue E410 in C-terminus, involved in FVIIIa binding might increase the affinity of FIXa to FVIIIa cofactor, and might therefore generate a FIX molecule with significantly higher clotting activity. From our data, we concluded that we have generated four novel FIX variants with higher clotting activity compared to FIX-WT; among them E410H exhibited 5-fold greater in-vitro and in-vivo specific activity than FIX-WT and a reference rhFIX used in clinics (Benefix®). The higher haemostatic activity of FIX-E410H over the other FIX-E410 variants and FIX-WT was demonstrated with calibrated automated thrombin generation test. Thrombin generation results showed highest thrombin peak and ETP when performed at 5 and 30 IU/dl of FIX.

Activation time course experiments triggered by FXIa or FVIIa-TF complex demonstrated that the increased activity of FIX-E410 variants was not explained by a more efficient activation of FIX to FIXa. In addition, in-vitro kinetic parameters showed increased affinity of FIXa-E410 for FVIIIa, with a decreased K_d , 2.6-fold lower than FIX-WT. Taking together, these results suggest that enhanced clotting activity of FIX-E410 variants is explained by enhanced affinity of the variants for FVIIIa. Our preliminary experiments of surface plasmon resonance (SPR) also confirmed increased affinity interaction of the isolated FVIIIa A2 domain for FIX-E410H (data not shown).

Our present data confirm the role of glutamate E410 in the interaction of FIXa with lysine K713 of the A2 domain of FVIIIa (15). It has been recently shown that alanine substitutions made for individual residues within the sequence 707-714 of the FVIII A2 domain, including K713A mutation, significantly decreased affinity for FIXa (29). In contrast, here, we report that E410H, E410A, E410L and E410N substitutions in the C-terminal region of FIX increased the affinity of FIXa for K713 of FVIIIa.

FIX-triple (FIX- V86A / E277A / R338A) is a FIX variant containing several residues mutated to alanine in the EGF2 domain and the protease domain of FIX which are critical for the interaction between FIXa and FVIIIa (8). FIX-Triple exhibits increased in-vitro clotting activity 13 times greater than FIX-WT. It has been recently shown that incorporation of an arginine to leucine mutation at residue 338 of FIX (FIX Padua), which is a gain-of-function mutation, further improves clotting activity of FIX-Triple in-vitro and in-vivo (9). The new molecule named FIX Triple-L (FIX- V86A / E277A / R338L) exhibits 22-fold higher clotting activity and increased binding to FVIIIa. It is difficult to compare the kinetic characteristics of FIX-E410H and FIX-Triple/TripleL molecules. Differences were observed between k_{cat} and apparent K_d values of FIX-E410H ($k_{cat}_{FIX-E410H} = 3.97 \text{ s}^{-1}$ – $K_d_{FIX-E410H} = 1.55 \text{ nM}$) and those published for FIX-Triple ($k_{cat}_{FIX-Triple} = 10.25 \text{ s}^{-1}$ – $K_d_{FIX-Triple} = 0.19 \text{ nM}$) (8) or FIX-TripleL ($k_{cat}_{FIX-TripleL} = 6.28 \text{ s}^{-1}$ – $K_d_{FIX-TripleL} = 0.13 \text{ nM}$) (9). However, k_{cat} and K_d were also considerably different for FIX-WT in the three studies i.e. k_{cat}_{FIX-WT} 12.40 ; 4.54 ; 1.57 and K_d_{FIX-WT} 2.44; 1.92; 3.50 respectively. These differences in kinetic parameters may be explained by the use of different experimental conditions such as the concentration of FVIIIa, which was lower in our experiments compared to others, or the duration of FVIIIa-FIXa incubation during the FXa generation reaction.

Increased in-vitro clotting activity and thrombin generating capacity of E410H variant were confirmed with in-vivo experiments in FIX knockout mice. Surprisingly, despite significantly increased in-vivo clotting activity and thrombin generation, we observed lower plasma concentrations of FIX-E410H compared to FIX-WT and Benefix[®], 2 minutes after injection. Considering the difference between the plasma FIX antigen levels of FIX-E410H, FIX-WT and Benefix[®], estimated increase of the specific activity of FIX-E410H was 5.8 and 9.7 times higher than FIX-WT and Benefix[®], respectively. In parallel, to better explore the discrepancy between enhanced in-vivo procoagulant activity of FIX-E410H and its lower concentration in mice plasma, we hypothesized that FIX-E410H might have enhanced binding to platelets. In-vitro binding tests between washed platelets and FIX-E410H or FIX-WT confirmed our hypothesis showing a rapid and increased binding of FIX-E410H to mice and human platelets compared to FIX-WT. Both FIX and FIXa bind to thrombin activated platelets in the presence of physiological concentrations of calcium ions. Approximately 300 low affinity binding sites per platelet were identified for FIX/FIXa with maximal binding occurring in 10-20 min at 37°C (30).

Our results obtained after 2 min of incubation with platelets, showed that FIX-E410H was bound to platelets more rapidly than FIX-WT. In addition, in-vitro binding tests between washed mice/human platelets and FIX-E410H showed higher platelet binding of FIX-E410H compared to FIX-WT. These data may explain at least partly, the discrepancy observed between plasma low FIX-E410H antigen levels and the enhanced in-vivo procoagulant activity of the molecule. Finally, we may speculate that the high platelet count of laboratory mice i.e. 500-2000x10⁹/L might amplify the effect of platelet binding and therefore the low plasma concentration of FIX-E410H observed. Factor IX residues involved in binding to platelets are residues 3-11 of Gla domain (31) and residues 88-109 of EGF2 domain (32). Our data suggest that the glutamate E410 might have an impact on FIX/FIXa binding to platelets, further studies are required to determine the role of glutamate E410 in the interaction of FIX with platelets.

Patients with hemophilia B presenting mutations in the carboxyl-terminal region amino acids 403-415 display severely reduced plasma FIX antigen and activity levels (33). It has been shown that C-terminal regions of serine proteases FIX (33), FVII (34) and protein C (PC) are involved in intracellular factor trafficking and secretion (35). Recently, the crucial role of tyrosine Y404 of C-terminus (c234), was described in the secretion of the FIX (36). Our results, showing lower secretion rates of FIX-E410 in the extracellular media, are in line with previously reported data on the role of C-terminal region in secretion of FIX. Differently from Y404, the glutamate E410 is not a conserved C-terminal residue of serine proteases, but we may speculate that the residue E410 might be indirectly involved in the secretion by helping to preserve the structure of the 403-415 region (33), by helping to maintain the correct orientation of the phenyl ring which contains the Y404 residue.

Gene therapy that would eliminate the need for frequent intravenous infusions of FIX is of great clinical interest. However, a low level of protein expression is one of the major obstacles for gene therapy. The introduction of bioengineered FIX variants with increased clotting activity in the vectors used for gene therapy may considerably improve the expression of FIX, as shown by Finn et al (37). Our study enabled the generation of a new recombinant FIX with enhanced in-vitro and in-vivo clotting activity, confirming the importance of glutamate E410 in the formation of the intrinsic tenase complex. This new molecule could be of interest for protein replacement therapy or for gene therapy.

References

1. Aledort L m. Making a therapeutic choice: human versus recombinant fractions – can we do it? *Haemophilia*. 1 janv 2001;7:1-3.
2. Noone D, O'Mahony B, van Dijk JP, Prihodova L. A survey of the outcome of prophylaxis, on-demand treatment or combined treatment in 18–35-year old men with severe haemophilia in six countries. *Haemophilia*. 1 janv 2013;19(1):44-50.
3. Ljung R. Prophylactic therapy in haemophilia. *Blood Rev*. nov 2009;23(6):267-74.
4. Gater A, Thomson TA, Strandberg-Larsen M. Haemophilia B: impact on patients and economic burden of disease. *Thromb Haemost*. 11 août 2011;106(3):398-404.
5. Chang J, Jin J, Lollar P, Bode W, Brandstetter H, Hamaguchi N, et al. Changing Residue 338 in Human Factor IX from Arginine to Alanine Causes an Increase in Catalytic Activity. *J Biol Chem*. 15 mai 1998;273(20):12089-94.
6. Simioni P, Tormene D, Tognin G, Gavasso S, Bulato C, Iacobelli NP, et al. X-Linked Thrombophilia with a Mutant Factor IX (Factor IX Padua). *N Engl J Med*. 22 oct 2009;361(17):1671-5.
7. Cantore A, Nair N, Valle PD, Matteo MD, Màtrai J, Sanvito F, et al. Hyperfunctional coagulation factor IX improves the efficacy of gene therapy in hemophilic mice. *Blood*. 29 nov 2012;120(23):4517-20.
8. Lin CN, Kao CY, Miao CH, Hamaguchi N, Wu HL, Shi GY, et al. Generation of a novel factor IX with augmented clotting activities in vitro and in vivo. *J Thromb Haemost*. 1 août 2010;8(8):1773-83.
9. Kao C-Y, Yang S-J, Tao M-H, Jeng Y-M, Yu I-S, Lin S-W. Incorporation of the factor IX Padua mutation into FIX-Triple improves clotting activity in vitro and in vivo: *Thromb Haemost*. 16 mai 2013;110(2):244-56.
10. Furie B, Furie BC. Molecular basis of vitamin K-dependent gamma-carboxylation. *Blood*. 1 mai 1990;75(9):1753-62.
11. Schmidt AE, Bajaj SP. Structure–Function Relationships in Factor IX and Factor IXa. *Trends Cardiovasc Med*. janv 2003;13(1):39-45.
12. Dieijen G van, Tans G, Rosing J, Hemker HC. The role of phospholipid and factor VIIIa in the activation of bovine factor X. *J Biol Chem*. 4 oct 1981;256(7):3433-42.

13. Hartmann R, Dockal M, Kammlander W, Panholzer E, Nicolaes GA, Fiedler C, et al. Factor IX mutants with enhanced catalytic activity. *J Thromb Haemost.* 1 oct 2009;7(10):1656-62.
14. Kolkman JA, Mertens K. Insertion Loop 256–268 in Coagulation Factor IX Restricts Enzymatic Activity in the Absence but Not in the Presence of Factor VIII[†]. *Biochemistry (Mosc).* 1 juin 2000;39(25):7398-405.
15. Bajaj SP, Schmidt AE, Mathur A, Padmanabhan K, Zhong D, Mastri M, et al. Factor IXa:Factor VIIIa Interaction HELIX 330–338 OF FACTOR IXa INTERACTS WITH RESIDUES 558–565 AND SPATIALLY ADJACENT REGIONS OF THE A2 SUBUNIT OF FACTOR VIIIa. *J Biol Chem.* 5 nov 2001;276(19):16302-9.
16. Enjolras N, Dargaud Y, Pérot E, Guillaume F, Becchi M, Négrier C. Human hepatoma cell line HuH-7 is an effective cellular system to produce recombinant factor IX with improved post-translational modifications. *Thromb Res.* nov 2012;130(5):e266-73.
17. Enjolras N, Rodriguez MH, Plantier JL, Maurice M, Attali O, Négrier C. The three in-frame ATG, clustered in the translation initiation sequence of human factor IX gene, are required for an optimal protein production. *Thromb Haemost.* oct 1999;82(4):1264-9.
18. Rodriguez MH, Enjolras N, Plantier JL, Réa M, Leboeuf M, Uzan G, et al. Expression of coagulation factor IX in a haematopoietic cell line. *Thromb Haemost.* mars 2002;87(3):366-73.
19. Hope MJ, Bally MB, Webb G, Cullis PR. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* 10 janv 1985;812(1):55-65.
20. Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoord R, et al. Calibrated Automated Thrombin Generation Measurement in Clotting Plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2003;33(1):4-15.
21. Dargaud Y, Béguin S, Lienhart A, Al Dieri R, Trzeciak C, Bordet JC, et al. Evaluation of thrombin generating capacity in plasma from patients with haemophilia A and B. *Thromb Haemost.* mars 2005;93(3):475-80.
22. Dargaud Y, Spronk HMH, Leenders P, Hemker HC, Ten Cate H. Monitoring platelet dependent thrombin generation in mice. *Thromb Res.* nov 2010;126(5):436-41.

23. Griffith MJ, Breitzkreutz L, Trapp H, Briet E, Noyes CM, Lundblad RL, et al. Characterization of the clotting activities of structurally different forms of activated factor IX. Enzymatic properties of normal human factor IXa alpha, factor IXa beta, and activated factor IX Chapel Hill. *J Clin Invest.* 1 janv 1985;75(1):4-10.
24. Chang Y-J, Wu H-L, Hamaguchi N, Hsu Y-C, Lin S-W. Identification of Functionally Important Residues of the Epidermal Growth Factor-2 Domain of Factor IX by Alanine-scanning Mutagenesis RESIDUES ASN89–GLY93 ARE CRITICAL FOR BINDING FACTOR VIIIa. *J Biol Chem.* 7 déc 2002;277(28):25393-9.
25. Lin H-F, Maeda N, Smithies O, Straight DL, Stafford DW. A Coagulation Factor IX-Deficient Mouse Model for Human Hemophilia B. *Blood.* 15 nov 1997;90(10):3962-6.
26. Cazenave J-P, Ohlmann P, Cassel D, Eckly A, Hechler B, Gachet C. Preparation of Washed Platelet Suspensions From Human and Rodent Blood. In: Gibbins JM, Mahaut-Smith MP, éditeurs. *Platelets and Megakaryocytes* [Internet]. Humana Press; 2004 [cité 23 juill 2014]. p. 13-28. Disponible sur: <http://link.springer.com/protocol/10.1385/1-59259-782-3%3A013>
27. Kolkman JA, Lenting PJ, Mertens K. Regions 301-303 and 333-339 in the catalytic domain of blood coagulation factor IX are factor VIII-interactive sites involved in stimulation of enzyme activity. *Biochem J.* 15 avr 1999;339(Pt 2):217-21.
28. Soeda T, Nogami K, Ogiwara K, Shima M. Interactions between residues 2228–2240 within factor VIIIa C2 domain and factor IXa Gla domain contribute to propagation of clot formation: *Thromb Haemost.* 22 sept 2011;106(5):893-900.
29. Griffiths AE, Rydkin I, Fay PJ. Factor VIIIa A2 Subunit Shows a High Affinity Interaction with Factor IXa CONTRIBUTION OF A2 SUBUNIT RESIDUES 707-714 TO THE INTERACTION WITH FACTOR IXa. *J Biol Chem.* 24 mai 2013;288(21):15057-64.
30. Ahmad SS, Rawala-Sheikh R, Walsh PN. Comparative interactions of factor IX and factor IXa with human platelets. *J Biol Chem.* 25 févr 1989;264(6):3244-51.
31. Ahmad SS, Rawala-Sheikh R, Cheung WF, Jameson BA, Stafford DW, Walsh PN. High-affinity, specific factor IXa binding to platelets is mediated in part by residues 3-11. *Biochemistry (Mosc).* 11 oct 1994;33(40):12048-55.

32. Wilkinson FH, Ahmad SS, Walsh PN. The Factor IXa Second Epidermal Growth Factor (EGF2) Domain Mediates Platelet Binding and Assembly of the Factor X Activating Complex. *J Biol Chem.* 22 févr 2002;277(8):5734-41.
33. Kurachi S, Pantazatos DP, Kurachi K. The Carboxyl-Terminal Region of Factor IX Is Essential for Its Secretion†. *Biochemistry (Mosc).* 1 avr 1997;36(14):4337-44.
34. Tanaka R, Nakashima D, Suzuki A, Miyawaki Y, Fujimori Y, Yamada T, et al. Impaired secretion of carboxyl-terminal truncated factor VII due to an F7 nonsense mutation associated with FVII deficiency. *Thromb Res.* mars 2010;125(3):262-6.
35. Katsumi A, Kojima T, Senda T, Yamazaki T, Tsukamoto H, Sugiura I, et al. The Carboxyl-Terminal Region of Protein C Is Essential for Its Secretion. *Blood.* 15 mai 1998;91(10):3784-91.
36. Branchini A, Campioni M, Mazzucconi MG, Biondo F, Mari R, Bicocchi MP, et al. Replacement of the Y450 (c234) phenyl ring in the carboxyl-terminal region of coagulation factor IX causes pleiotropic effects on secretion and enzyme activity. *FEBS Lett.* 1 oct 2013;587(19):3249-53.
37. Finn JD, Nichols TC, Svoronos N, Merricks EP, Bellenger DA, Zhou S, et al. The efficacy and the risk of immunogenicity of FIX Padua (R338L) in hemophilia B dogs treated by AAV muscle gene therapy. *Blood.* 29 nov 2012;120(23):4521-3.

Acknowledgements

The authors would like to thank Groupama Rhône-Alpes Auvergne for their financial involvement in this project.

Conflict of Interest Statement

No conflict of interest to declare.

Legends to Tables and Figures

Table 1. Thrombin generation capacity of FIX molecules. FIX deficient plasma (FIX<1 IU/dl) was supplemented with two different concentrations of FIX variants. ETP: endogenous thrombin potential corresponding to the area under the thrombin generation curve, thrombin peak height: maximal concentration of thrombin generated by the sample.

Table 2. In vitro kinetic properties of FIXa molecules. In presence of FVIIIa 0.3 nM, “Enzyme” indicates the FIXa.FVIIIa complex concentration. Assuming that the FX activation is proportional to the concentration of FIXa.FVIIIa, values were determined from experimental procedure and observed Kd. $k_{cat} = V_{max} / \text{Enzyme}$. The data were calculated from three separate experiments and represent the mean value \pm standard error. NA, not applicable; app, apparent.

Figure 1. Secretion of FIX molecules by Huh-7 cells. Cells were transfected by pcDNA-FIX-WT and pcDNA-FIX-E410 for stable clones development A. FIX antigen levels in supernatants were quantified using Asserachrom FIX:Ag ELISA kit. Values are representative of 8 samples for each FIX. B. Supernatants were pooled and subjected to electrophoresis on SDS-10%PAGE. FIX was detected using a polyclonal rabbit anti-human FIX antibody and visualized by autoradiography. Benefix® and molecular weight standards from Biorad were used as references. NT, not transfected.

Figure 2. Clotting activity of FIX compounds. Clotting activities of 4 FIX-E410 variants and FIX-WT were determined using a chromogenic FIX assay, showing significantly higher catalytic activity of all mutants compared to FIX-WT. Experiments were repeated three times.

Figure 3. Activations time course of FIX-WT (A) and FIX-E410H (B) by FXIa. At the indicated time intervals, subsamples were removed and the activation was quenched with the SDS-PAGE reducing loading buffer with EDTA. Samples were subjected to electrophoresis on SDS-10%PAGE and visualized by immunoblotting. FIXa from Haematologic Technologies Inc. and molecular weight standards from New England Biolabs (Ipswich, MA, USA) were used as references.

Figure 4. *In-vivo* plasma concentration and clotting activity of FIX molecules in hemophilia B mice.

FIX-WT and FIX-E410H were injected into the retro-orbital sinus of HB mice (n=5 per group) to get a FIX plasma concentration of 5 µg/ml. Benefix[®], the reference rhFIX molecule, was injected in the same conditions. Two minutes after infusion, samples were collected from the inferior vena cava. **A.** Concentrations of FIX (µg/ml) in mice plasma were determined by ELISA (white bars) and clotting activities of FIX (IU/dl) (horizontal striped bars) were determined using a chromogenic FIX assay. **B.** Thrombin generation measurements were performed using Calibrated Automated Thrombin generation assay, to determine endogenous thrombin potential (ETP) (black bars) and peak height of thrombin (vertical striped bars). The data represent the mean value ± standard error.

Figure 5. Five-hour time-course of factor IX protein levels in mice circulation. HB mice were injected with 10 µg/20 g body weight of Benefix[®] (▲), FIX-WT (■) or FIX-E410H (●) (n=6 per group). Mouse blood samples were collected from the retro-orbital sinus for each time point, and subjected to ELISA to determine residual plasma FIX levels (B). A chromogenic FIX activity assay was also performed to study FIX activity in mice plasma (B). The data represent the mean value ± standard error.

Figure 6. FIX-E410H binding to mice platelets. Different concentrations of washed mice platelets were incubated during one hour at 37°C with FIX-WT (black line) and FIX-E410H (grey line) at different concentrations. At any concentration tested, samples were collected at 2, 30 and 60 min after injection. Platelet rich plasma samples were centrifuged to remove platelets. Residual plasma FIX levels were quantified using ELISA and the percentage of FIX bound to platelets was calculated. Results are presented as mean value ± standard error. Results showed a rapid and higher binding of FIX-E410H to mice platelets compared to FIX-WT at 2 min (p=0.0087) and 30 min (p=0.0450) of incubation.

Tables

Table 1:

FIX (IU/dl)	Lag time (min)	ETP (nM/min)	Peak height (nM)	Time to peak (min)
<i>FIX 0 IU/dl</i>				
FIXa-WT	4.17	384.33	14.58	18.58
<i>FIX 5 IU/dl</i>				
FIXa-WT	5.62	957.50	88.60	10.50
FIXa-E410H	3.00	1631.50	461.36	4.38
FIXa-E410L	4.38	1371.50	295.27	6.62
FIXa-E410A	4.00	1583.50	395.99	5.75
FIXa-E410N	4.12	1340.50	318.72	6.25
<i>FIX 30 IU/dl</i>				
FIXa-WT	4.62	1460.50	288.78	7.12
FIXa-E410H	2.38	1623.50	478.28	3.62
FIXa-E410L	3.75	1449.50	398.32	5.38
FIXa-E410A	3.12	1610.50	472.93	4.38
FIXa-E410N	3.25	1488.50	456.70	4.62

Table 2:

Recombinant FIXa	Km (nM)	Vmax (nM FXa min⁻¹)	Enzyme (nM)	kcat* (s⁻¹)	kcat/Km (M⁻¹ s⁻¹)	Kd,app (nM)
<i>In absence of FVIIIa</i>						
FIXa-WT	447.8 ± 103.1	0.759 ± 0.092	10	1.27 × 10 ³	2825	NA
FIXa-E410H	231.0 ± 30.33	0.577 ± 0.032	10	0.96 × 10 ³	4163	NA
FIXa-E410L	232.8 ± 27.33	0.611 ± 0.029	10	1.20 × 10 ³	4374	NA
FIXa-E410A	224.1 ± 26.69	0.631 ± 0.030	10	1.05 × 10 ³	4693	NA
FIXa-E410N	222.7 ± 29.67	0.578 ± 0.031	10	0.96 × 10 ³	4326	NA
<i>In presence of FVIIIa</i>						
FIXa-WT	28.77 ± 4.73	09.91 ± 00.52	0.105	1.57	5.45 × 10 ⁷	3.50
FIXa-E410H	75.10 ± 7.96	38.78 ± 01.81	0.163	3.97	5.29 × 10 ⁷	1.55
FIXa-E410L	69.88 ± 6.62	37.10 ± 01.51	0.172	3.61	5.16 × 10 ⁷	1.37
FIXa-E410A	80.04 ± 8.70	37.88 ± 01.85	0.158	3.99	4.98 × 10 ⁷	1.65
FIXa-E410N	57.93 ± 7.24	19.75 ± 01.00	0.133	2.48	4.28 × 10 ⁷	2.35

Figures

Figure 1:

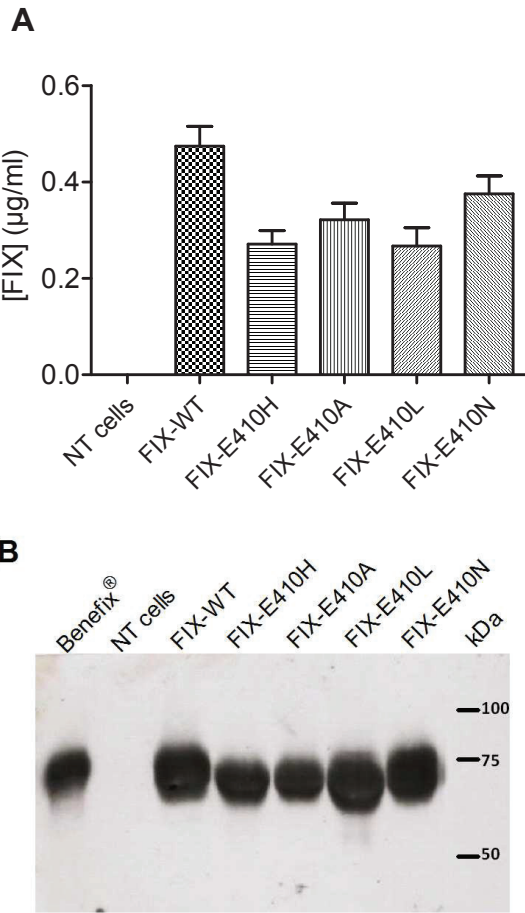


Figure 2:

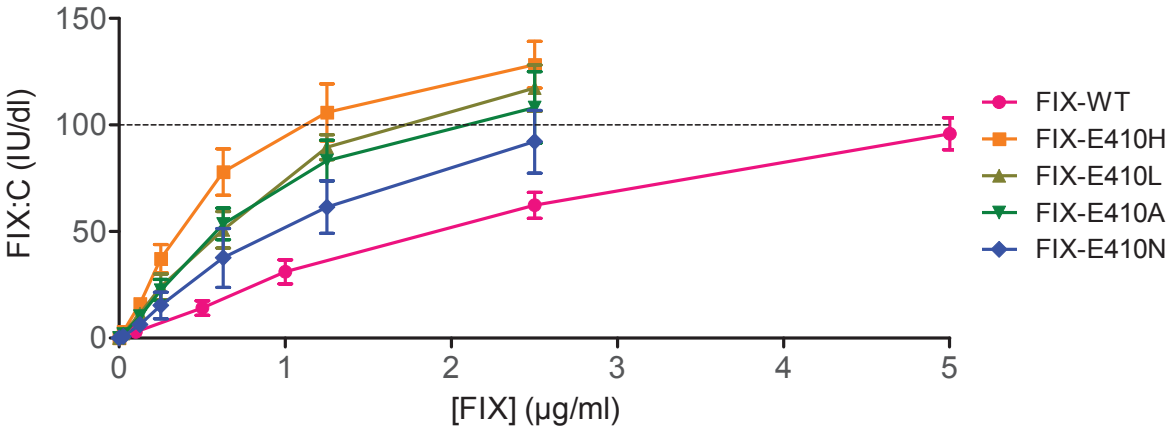


Figure 3:

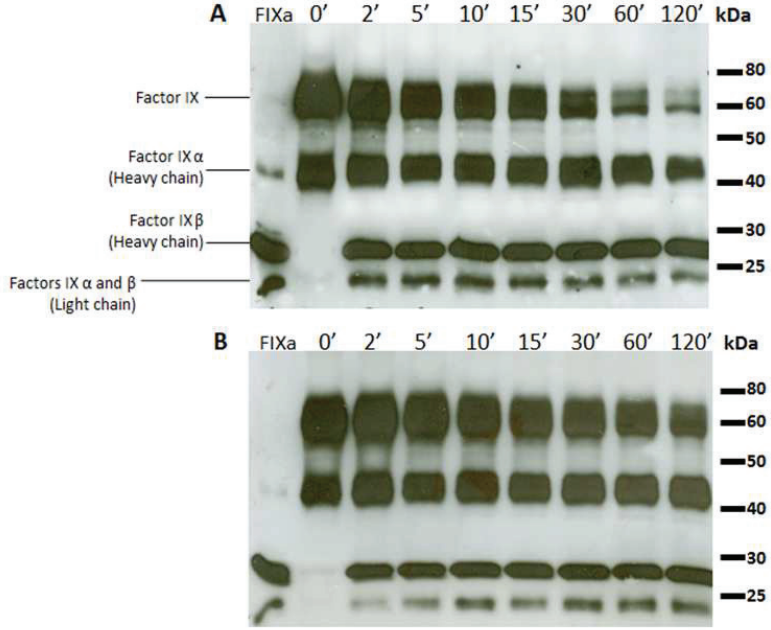


Figure 4:

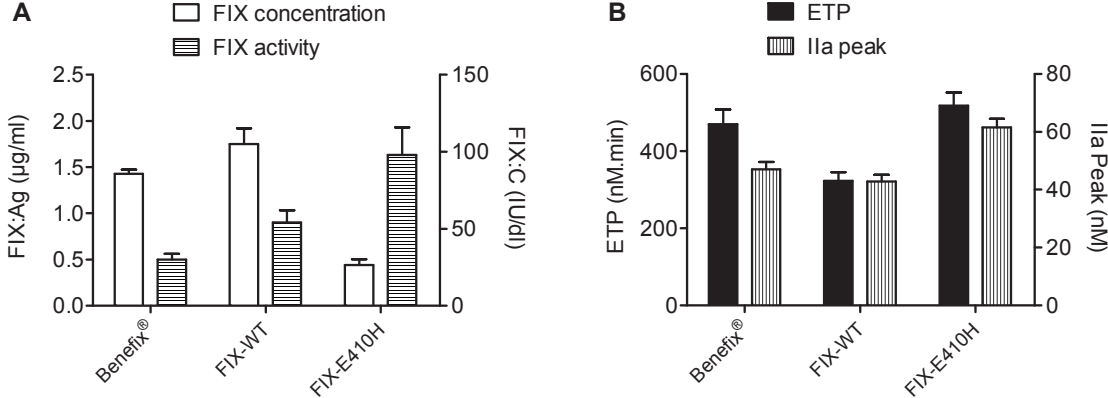


Figure 5:

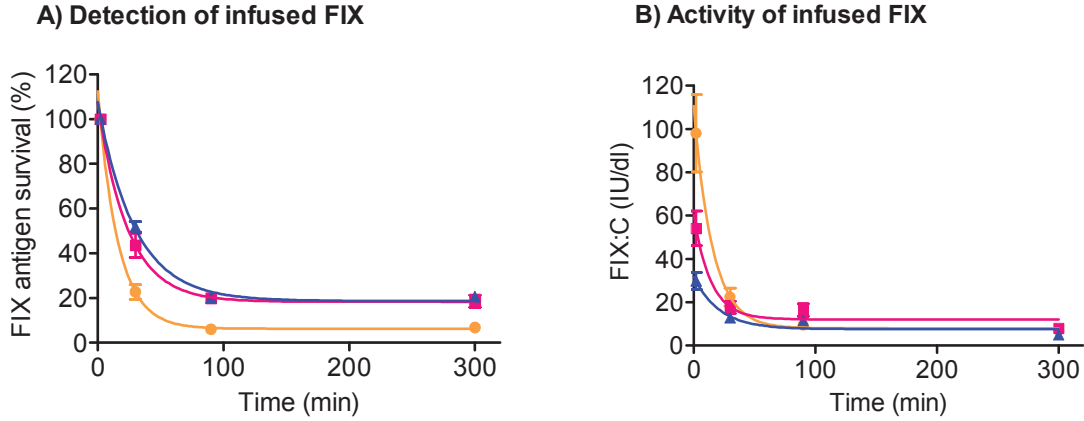
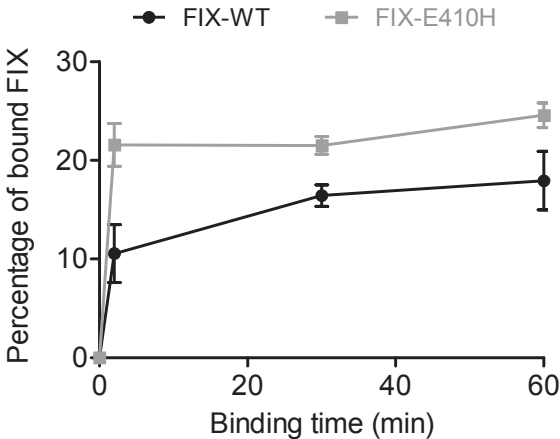


Figure 6:



Chapitre III : Amélioration de la demi-vie et de l'efficacité du facteur IX recombinant. Travaux préliminaires de caractérisation de la protéine de fusion FIX-FXIII-B.

Après l'obtention d'un nouveau facteur IX recombinant (rFIX) à activité augmentée, notre objectif était ici de développer une nouvelle molécule de rFIX présentant une demi-vie allongée. L'approche retenue pour mener à bien ce projet a été de mettre au point une protéine de fusion entre le rFIX et une seconde protéine plasmatique connue pour sa forte demi-vie, le FXIII-B.

III.1- Production des molécules de FIX par la lignée cellulaire Huh-7

De la même façon que lors des travaux sur les FIX-E410, une étude a d'abord été réalisée afin de vérifier la capacité de la lignée Huh-7 à exprimer les constructions chimériques. Les taux de FIX-FXIII-B sécrétés dans les surnageants cellulaires après transfection transitoire sont représentés dans la Figure 43.

Les concentrations en FIX-FXa-FXIII-B \emptyset PS et FIX-FIIa-FXIII-B \emptyset PS (respectivement $0.063 \pm 0.036 \mu\text{g/ml}$ et $0.095 \pm 0.044 \mu\text{g/ml}$) étaient nettement plus faibles que celles du FIX-WT ($0.868 \pm 0.147 \mu\text{g/ml}$) avec des $p\text{-value} = 0.0022$. En effet, les ADNc des molécules chimériques codent pour des protéines de plus de 1 100 résidus, leur synthèse est ainsi plus lente et plus complexe pour le trafic intracellulaire au sein des cellules Huh-7 que celle du FIX-WT dont le précurseur est constitué de seulement 461 résidus. En outre, la protéine de fusion FIX-FIIa-FXIII-B n'était pas détectée dans les milieux extracellulaires. L'existence de deux peptides signaux (celui du FIX et celui du FXIII-B) au sein de la même protéine a certainement réfréné la sécrétion de la protéine. L'étude de cette construction a été abandonnée.

Les mêmes surnageants cellulaires ont également été analysés par électrophorèse suivi d'un western blot, utilisant des anticorps dirigés contre le FIX ou le FXIII-B (Figure 44). Aucun signal n'était détecté pour le FIX-FIIa-FXIII-B, confirmant ainsi son absence dans le milieu extracellulaire. Les protéines de fusion FIX-FXIII-B \emptyset PS ont été visualisées sous la forme d'une bande correspondant au poids moléculaire attendu soit environ 150 kDa. Cependant, les analyses ont révélé la présence de formes clivées, au niveau du *linker*, dans les surnageants des cellules transfectées par pcDNA-FIX-FIIa-FXIII-B \emptyset PS, avec un signal correspondant au FIX après western blot anti-FIX, et un signal correspondant au FXIII-B (environ 80 kDa) après western blot utilisant un anticorps dirigé contre le

FXIII-B. Afin de ne pas complexifier les étapes de purification ultérieures, cette chimère a donc également été abandonnée pour la suite de l'étude et seul le FIX-FXa-FXIII \emptyset PS a fait l'objet d'une production à grande échelle après génération d'un clone cellulaire Huh-7 capable de produire cette chimère de façon stable.

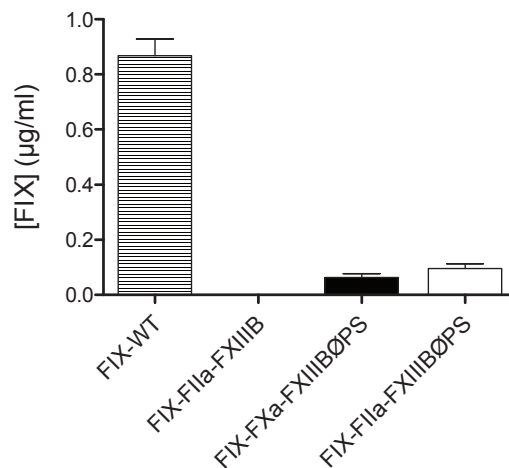


Figure 43. Taux de FIX-WT et des chimères sécrétés par les cellules Huh-7. Les cellules ont été transfectées transitoirement par les plasmides pcDNA-FIX-WT, pcDNA-FIX-FIIa-FXIII B, pcDNA-FIX-FIIa-FXIII B∅PS et pcDNA-FIX-FXa-FXIII B∅PS. Les surnageants cellulaires de 6 expériences de transfections transitoires ont ensuite été analysés par test ELISA anti-FIX.

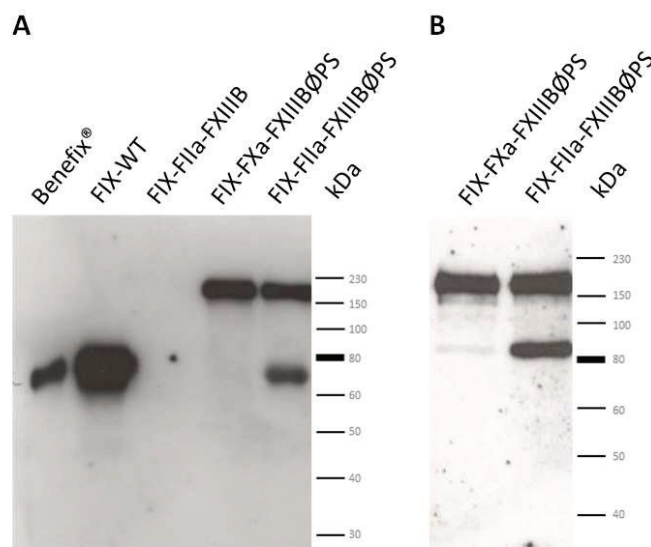


Figure 44. Sécrétion du FIX-WT et des chimères par les cellules Huh-7 après transfection transitoire. Les surnageants de culture ont été analysés par une électrophorèse SDS-PAGE suivie d'un western blot anti-FIX (A) ou anti-FXIII B (B).

III.2- Caractérisation *in vitro* du FIX-FXa-FXIII \emptyset PS

III.2.1- Fonctionnalité du linker clivable par le FXa

Après purification de la chimère, les premiers résultats de caractérisation du FIX-FXa-FXIII \emptyset PS ont concerné la fonctionnalité du *linker* clivable par le FXa. La Figure 45 présente l'étude du clivage de la chimère en fonction de la concentration en FXa. L'intensité du signal entre 60 et 70 kDa correspondant au FIX, libéré du *linker* et du FXIII-B, était proportionnelle à la quantité de FXa utilisée lors du clivage. La séparation du *linker* et du FXIII-B lors de la phase d'initiation de la coagulation, dès la génération des premières traces de FXa, est essentielle pour obtenir un FIX pleinement actif. Cette séparation sera intensifiée lors de la phase de propagation de la coagulation et nous pensons que le FIX pourra ainsi jouer son rôle enzymatique au sein du complexe *tenase* intrinsèque.

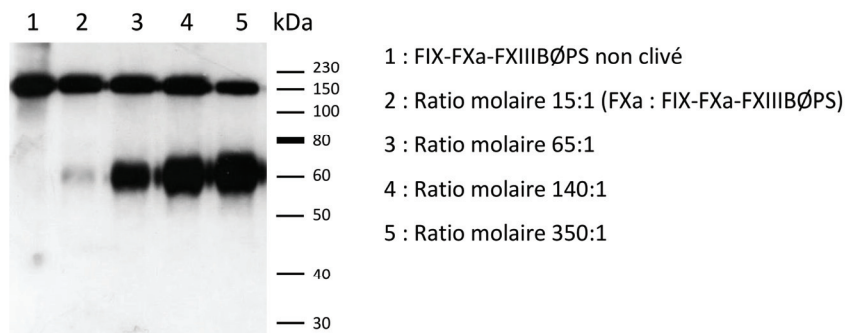


Figure 45. Etude du clivage du FIX-FXa-FXIII \emptyset PS en fonction de la concentration en FXa. Le FIX-FXa-FXIII \emptyset PS (0.016 nM final) a été incubé avec des concentrations croissantes en FXa (0.22 à 5.45 nM final) pendant 1h à 37°C puis analysés par électrophorèse suivi d'un western blot anti-FIX.

III.2.2- Amélioration de l'activité spécifique

L'efficacité du FIX-WT et celle du FIX-FXa-FXIII \emptyset PS ont été évaluées par méthode chromogénique afin de déterminer si la présence du FXIII-B avait une influence sur l'activité spécifique du FIX. Les résultats sont présentés dans le Tableau 11. Pour une concentration de 0.5 μ g/ml, le FIX-WT présentait une activité de 19.72 ± 3.569 UI/dl ce qui équivaut à la valeur obtenue lors de l'étude des FIX-E410 lors de laquelle l'activité du FIX-WT était de 14.02 ± 3.394 (p -value = 0.4818). Pour une même concentration en FIX (0.5 μ g/ml), l'activité du FIX-FXa-FXIII \emptyset PS (79.97 ± 18.12 UI/dl) était 4 fois plus élevée que celle du FIX-WT (p -value = 0.004). Les poids moléculaires des deux molécules de FIX étant très différents (FIX-WT à 57 kDa *versus* FIX-FXa-FXIII \emptyset PS à 137 kDa), l'efficacité a été exprimée en activité molaire spécifique. L'activité du FIX-FXa-FXIII \emptyset PS (219.1 ± 49.65 UI/nmol) était 10 fois supérieure à celle du FIX-WT (22.49 ± 4.063 UI/nmol).

FIX recombinant	FIX:C (UI/dl)	Activité spécifique (UI/mg)	Activité molaire spécifique (UI/nmol)
FIX-WT	19.72 ± 3.569	394.4 ± 71.39	22.49 ± 4.063
FIX-FXa-FXIII \emptyset PS	79.97 ± 18.12	1600 ± 362.4	219.1 ± 49.65
<i>p-value</i>	0.004	0.004	< 0.0001

Tableau 11. Etude de l'activité spécifique du FIX-WT et du FIX-FXa-FXIII \emptyset PS. Des échantillons purifiés de rFIX à 0,5 μ g/ml ont été analysés par méthode chromogénique. Les activités spécifiques ont été déterminées en fonction de la concentration en rFIX. Les activités molaires spécifiques ont été déterminées en fonction du poids moléculaire des rFIX, les poids moléculaires utilisés pour les calculs étaient 57 kDa (FIX-WT) et 137 kDa (FIX-FXa-FXIII \emptyset PS).

Les études précliniques sur les chimères rFIX-Fc [173] et rFIX-FP [181] ont reporté des activités molaires spécifiques diminuées d'un facteur 2 en comparaison au rFIX-WT. Concernant le rFIX-Fc, la baisse d'activité n'a pu être expliquée ni par l'étude des modifications post-traductionnelles, ni par les différentes interactions du rFIX-Fc au sein du complexe *tenase*. Lors de l'étude utilisant le rFIX-FP, aucune expérience supplémentaire n'a été menée. Cependant, des résultats plus encourageants, en terme d'activité, ont été obtenus par la suite dans des expériences *in vivo* menées chez le chien hémophile B et le singe [182].

Notre molécule de FIX sur laquelle le FXIII-B est fusionné ne comporte, à priori, aucune modification qui pourrait engendrer une telle amélioration de l'activité. L'activité spécifique des molécules étant directement fonction de la quantité de FIX, nous nous sommes dans un premier temps interrogés quant à la méthode de détermination de la concentration en FIX-FXa-FXIII \emptyset PS dans nos échantillons. Ainsi, les valeurs des concentrations en FIX-FXa-FXIII \emptyset PS obtenues à l'aide du kit ELISA commercial (Asserachrom[®]IX:Ag, Diagnostica Stago) ont été comparées à celles obtenues via une autre technique de dosage ELISA en sandwich. L'anticorps de capture utilisé était un anticorps polyclonal anti-FIX (Kordia Life Sciences). Les valeurs obtenues pour chacune de ces deux méthodes sont représentées dans la Figure 46. Il n'existait pas de différences significatives entre les deux types de quantification (*p-values* > 0.05), entérinant ainsi notre méthode de dosage du FIX-FXa-FXIII \emptyset PS et ainsi l'amélioration de l'activité spécifique de cette nouvelle protéine de fusion.

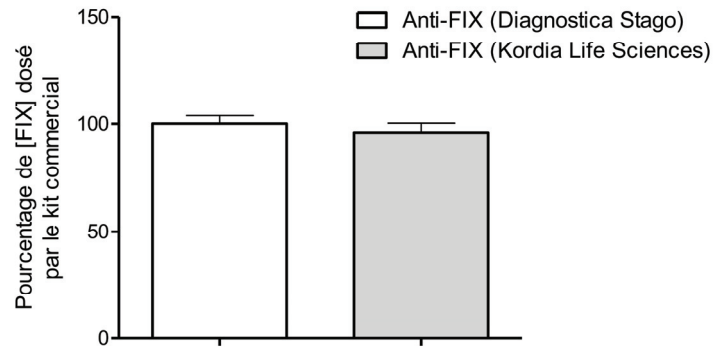


Figure 46. Comparaison des techniques de dosage du FIX-FXa-FXIII \emptyset PS. Au total, huit dilutions ont été réalisées à partir de deux échantillons de FIX-FXa-FXIII \emptyset PS de concentrations différentes. Les résultats sont exprimés en pourcentage de [FIX] obtenue à l'aide du kit ELISA Asserachrom[®]IX:Ag (Diagnostica Stago). *p-value* = 0.4418.

Une amélioration des rendements enzymatiques des complexes impliquant le FIX dans le processus de la coagulation pourrait expliquer une telle augmentation de l'activité spécifique. La présence de FXIII-B apporté de manière significative par le FIX-FXa-FXIII \emptyset PS sur le site des réactions permettrait une favorisation stérique de l'ensemble des acteurs. Des expériences de cristallographie pourraient confirmer cette théorie. L'hypothèse d'une amélioration des interactions du FIX-FXa-FXIII \emptyset PS avec le FVIIIa et le FXa doit également être vérifiée par des expériences de génération de FXa permettant la détermination des paramètres cinétiques *in vitro*. De plus, si le FXIII-B complexé au FXIII-A a un rôle connu dans la stabilisation du FXIII, la fonction du FXIII-B non complexé et libre dans la circulation n'a pas encore été décrite avec précision. Nous pouvons alors nous interroger quant à l'influence du FXIII-B dans l'amélioration de l'efficacité du FIX auquel il est fusionné. Des expériences en SPR pourraient nous éclairer quant à l'affinité du FXIII-B avec les acteurs principaux du complexe tels que le FIX, le FX, le FVIII ou FVIIIa, en utilisant comme témoin la sous-unité FXIII-A.

Enfin, avant de mener les expérimentations afin d'expliquer cette augmentation d'activité, il conviendra de confirmer ce résultat par une évaluation de l'activité par méthode chronométrique et par la détermination de la capacité du FIX-FXa-FXIII \emptyset PS à générer la thrombine. Dans ce but, une nouvelle production de la protéine en grandes quantités est actuellement en cours de réalisation.

III.2.3- Etude de l'activation du FIX-FXa-FXIII \emptyset PS

Des expériences d'activation du FIX-FXa-FXIII \emptyset PS par le complexe FVIIa-FT ont été menées afin de vérifier la fonctionnalité du peptide d'activation. Contrairement au FIX-WT et au FIX-E410, après une incubation de 5h à 37°C, le FIX-FXa-FXIII \emptyset PS n'était pas pleinement activé (Figure 47). Cependant, les trois signaux observés indiquaient une activation partielle de la protéine. La bande à 130 kDa,

légèrement plus basse que celle du FIX-FXa-FXIII \emptyset PS non activé, correspondait au FIX dépourvu de sa chaîne légère mais encore fusionné au FXIII-B via la partie C-terminale de sa chaîne lourde. La présence de FIXa s'est traduite par une bande entre 20 et 25 kDa correspondant à celle du FIXa commercial. Le FIXa ainsi généré a permis l'activation du FX en FXa dans le mélange réactionnel. En effet, de très faibles quantités de FX sont observées dans les surnageants des cellules Huh-7. Le FXa pouvait alors cliver une partie du FIX-FXa-FXIII \emptyset PS et engendrer la présence de FIX seul comme l'a montré la bande observée à environ 60 kDa.

Il est important de noter que l'anticorps monoclonal anti-FIX de souris utilisé pour ce western blot et permettant la détection du FIX chimérique ne permettait pas la détection des deux chaînes du FIXa, mais uniquement de la chaîne lourde. De plus, cette étude préliminaire n'était pas destinée à réaliser une analyse quantitative mais bien qualitative de la réaction d'activation du FIX-FXa-FXIII \emptyset PS.

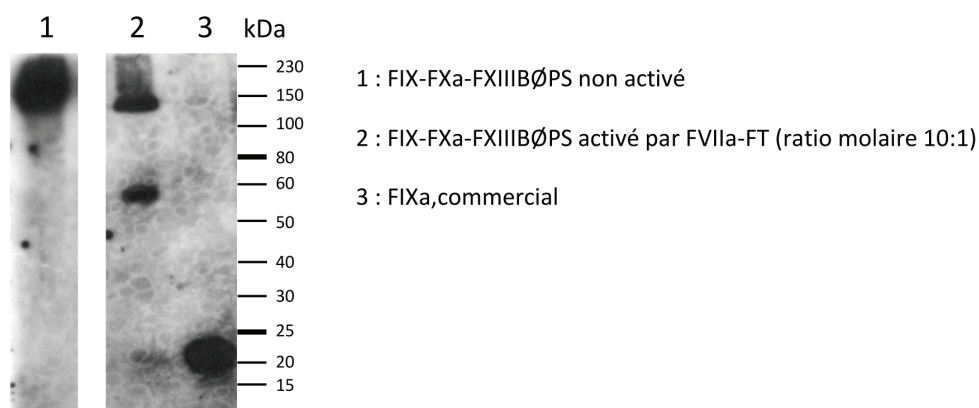


Figure 47. Etude de l'activation du FIX-FXa-FXIII \emptyset PS par le complexe FVIIa-FT. Le FIX-FXa-FXIII \emptyset PS (930 pM final) a été incubé 5h à 37°C en présence de FVIIa (93 pM final) et de FT (9 pM final) puis analysé par électrophorèse suivi d'un western blot anti-FIX (anticorps monoclonal de souris).

III.3- Détermination des paramètres pharmacocinétiques *in vivo*

La détermination de la demi-vie et l'évaluation de l'efficacité *in vivo* du FIX-FXa-FXIII \emptyset PS ont été réalisées par injection à des souris C57BL/6J *wild-type* non hémophiles, sachant que le FIX murin n'est pas reconnu par le kit ELISA Asserachrom[®]IX:Ag. Les temps de prélèvements de cette expérimentation, indiqués dans le protocole N°BH2013-03, ont été adaptés afin d'observer une demi-vie allongée. Pour cela, les temps de prélèvements après injection du FIX-FXa-FXIII \emptyset PS étaient : 2min, 2h, 5h, 24h et 30h, alors que ceux après injection du FIX-WT étaient inchangés (2min, 30min, 1h30 et 5h). En effet, lors d'études précédentes effectuées au laboratoire, aucun FIX-WT n'était détecté dans le plasma murin 5 heures après injection.

Les courbes de pharmacocinétique sont présentées dans la Figure 48 et les valeurs des demi-vies obtenues dans le Tableau 12. Les taux antigéniques de FIX-FXa-FXIII \emptyset PS détectés dans le plasma étaient similaires à ceux du FIX-WT. Aucune différence significative n'a été observée aux temps 2 minutes et 5 heures, les taux de récupération des deux molécules étaient identiques. Cependant, la demi-vie déterminée à partir de ces premiers résultats était de 31,6 minutes pour notre molécule chimérique soit 1,8 fois plus longue que celle du FIX-WT (17,2 minutes).

L'étude pharmacocinétique cinétique réalisée par détermination de l'activité a confirmé l'amélioration de l'efficacité de la protéine de fusion *in vivo*. En effet, aux temps 2 minutes et 5 heures, les taux de FIX-FXa-FXIII \emptyset PS étaient significativement plus élevés que ceux de FIX-WT. De plus, les valeurs obtenues dans cette première étude ont confirmé l'allongement de la demi-vie du FIX-FXa-FXIII \emptyset PS d'un facteur 2,8 par rapport à celle du FIX-WT.

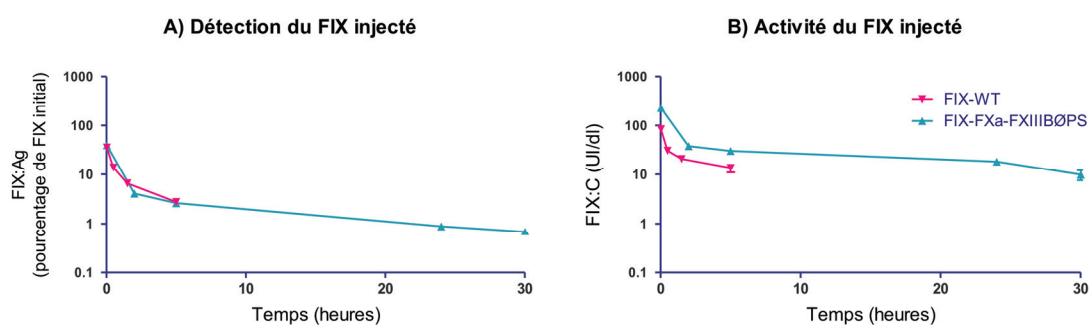


Figure 48. Etude pharmacocinétique des taux de molécules de FIX dans le plasma murin. Les FIX-WT et FIX-FXa-FXIII \emptyset PS ont été injectées à des souris saines à raison de 10 μ g de FIX / 20 g (n=4 par groupe). Des échantillons de sang ont été récoltés par le sinus rétro-orbital à chaque temps et soumis à un test ELISA (A) et à un test d'activité par méthode chromogénique (B). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm écart-type. (A) A 2 minutes et 5 heures, *p-value*>0.05. (B) A 2 minutes, *p-value*=0.0003 et 5 heures, *p-value*=0.0087.

	FIX-WT	FIX-FXa-FXIII \emptyset PS	Amélioration
Demi-vie en FIX:Ag (min)	17,2	31,6	x 1,8
Demi-vie en FIX:C (min)	12,0	33,8	x 2,8

Tableau 12. Demi-vies du FIX-WT et du FIX-FXa-FXIII \emptyset PS. Les valeurs des demi-vies ont été déterminées à l'aide des courbes présentées dans la Figure 48 par un modèle à un compartiment via le logiciel *GraphPad Prism 5*[®].

Les premières expérimentations *in vivo* des études menées sur le rFIX-Fc [173] et le rFIX-FP [181] révélait que les valeurs de demi-vie déterminées chez la souris *wild-type* et la souris hémophile B n'étaient pas les plus représentatives des demi-vies retrouvées ensuite chez l'Homme lors des essais cliniques [174,176,183]. En effet, pour les deux molécules, les études chez la souris entraînaient parmi les plus faibles améliorations de demi-vie par rapport au rFIX (Tableau 13). Les valeurs de demi-vie obtenues pour le FIX-FXa-FXIII BØPS sont donc très encourageantes pour la suite du projet. Le FIX-FXa-FXIII BØPS a par ailleurs présenté une activité spécifique augmentée, atout majeur non-observé pour le rFIX-FP et le rFIX-Fc. Une étude pharmacocinétique du FIX-FXa-FXIII BØPS injecté chez le rat est ainsi envisagée afin de confirmer l'allongement de la demi-vie par rapport au FIX-WT.

Espèces	rFIX-Fc	rFIX-FP	FIX-FXa-FXIII BØPS
Souris	x 3,8 ^[173]	-	x 1,8 à 2,8
Souris hémophile B	x 3,5 ^[173]	x 1,2 ^[181]	
Rat	x 6 ^[173]	x 3,4 ^[181]	
Lapin	-	x 3,2 ^[181]	
Chien hémophile B	x 2,7 ^[173]	x 3,0 ^[182]	
Singe	x 3,7 ^[173]	-	
Homme – essais clinique de phase I (IIa)	x 3,2 ^[174]	x 5,3 ^[183]	
Homme – essais clinique de phase III	x 4,6 ^[176]	-	

Tableau 13. Comparaison des améliorations de demi-vies observées pour le rFIX-Fc, le rFIX-FP et le FIX-FXa-FXIII BØPS, les valeurs ont été comparées à celle obtenues pour le rFIX.

III.4- Conclusion et perspectives

Lors de cette étude, nous avons pu produire et caractériser une nouvelle molécule de rFIX fusionnée au FXIII-B. Contrairement aux FIX fusionnés à l'albumine ou au fragment Fc, pour lesquels les expériences préalables avaient validé l'intérêt de ces molécules dans l'allongement de la demi-vie, notre étude est la première à rapporter la fusion d'une protéine au FXIII-B. Nos résultats ont montré que cette nouvelle protéine de fusion FIX-FXIII B est fonctionnelle et présente un allongement de la demi-vie chez la souris d'un facteur 1,8 à 2,8 par rapport au FIX-WT. De plus, l'activité du FIX-FXIII B a été nettement augmentée par rapport à celle du FIX-WT. Ce deuxième axe d'amélioration tend à être expliqué par des expériences supplémentaires de cristallographie, de SPR et de générations de thrombine et de FXa pour la suite de ce projet.

Par ailleurs, après une étude *in vivo* complète sur plusieurs modèles animaux, cette nouvelle molécule pourrait être utilisée en prophylaxie ou lors d'expériences de thérapie génique. Comme pour le FIX-E410H nous envisageons prochainement de cloner l'ADNc de ce nouveau FIX-FXIIIB dans un vecteur viral afin de mener des essais précliniques de thérapie génique sur des souris hémophiles B.

Enfin, l'insertion de la mutation E410H au sein de cette protéine de fusion FIX-FXIIIB paraît très prometteuse pour générer une molécule de FIX recombinant alliant des améliorations à la fois en termes d'activité et de stabilité.

La perspective de ce projet se détache ainsi des autres essais en cours puisqu'elle pourrait mener à injecter de moindres quantités d'un FIX recombinant à demi-vie allongée. De ce fait nous envisageons une demande de brevet de façon à protéger cette invention. L'utilisation de la sous-unité FXIII-B pourrait aussi être une issue pour améliorer la demi-vie de molécules recombinantes à visée thérapeutiques qui avaient perdu leur activité suite à la fusion à l'albumine ou au fragment Fc.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 Broos K, Feys HB, De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Rev* **2011**; 25: 155–67.
- 2 Nuyttens BP, Thijs T, Deckmyn H, Broos K. Platelet adhesion to collagen. *Thromb Res* **2011**; 127, Supplement 2: S26–9.
- 3 Maynard DM, Heijnen HFG, Horne MK, White JG, Gahl WA. Proteomic analysis of platelet α -granules using mass spectrometry. *J Thromb Haemost* **2007**; 5: 1945–55.
- 4 Ogletree ML. Overview of physiological and pathophysiological effects of thromboxane A₂. *Fed Proc* **1987**; 46: 133–8.
- 5 Rawala-Sheikh R, Ahmad SS, Monroe DM, Roberts HR, Walsh PN. Role of gamma-carboxyglutamic acid residues in the binding of factor IXa to platelets and in factor-X activation. *Blood* **1992**; 79: 398–405.
- 6 Hayward CPM, Rao AK, Cattaneo M. Congenital platelet disorders: overview of their mechanisms, diagnostic evaluation and treatment. *Haemophilia* **2006**; 12: 128–36.
- 7 Favaloro EJ, Bodó I, Israels SJ, Brown SA. von Willebrand disease and platelet disorders. *Haemophilia* **2014**; 20: 59–64.
- 8 López JA, Andrews RK, Afshar-Kharghan V, Berndt MC. Bernard-Soulier Syndrome. *Blood* **1998**; 91: 4397–418.
- 9 Les Cahiers d'Orphanet. Série Maladies Rares. Prévalence des maladies rares : Données bibliographiques. **2014**.
- 10 Favaloro E. von Willebrand Disease: Local Diagnosis and Management of a Globally Distributed Bleeding Disorder. *Semin Thromb Hemost* **2011**; 37: 440–55.
- 11 Sadler JE, Budde U, Eikenboom JCJ, Favaloro EJ, Hill FGH, Holmberg L, Ingerslev J, Lee CA, Lillicrap D, Mannucci PM, Mazurier C, Meyer D, Nichols WL, Nishino M, Peake IR, Rodeghiero F, Schneppenheim R, Ruggeri ZM, Srivastava A, Montgomery RR, et al. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. *J Thromb Haemost* **2006**; 4: 2103–14.
- 12 Rauch A, Caron C, Susen S, Goudemand J. Facteur von Willebrand et maladie de Willebrand : nouvelles approches. *Rev Francoph Lab* **2014**; 2014: 53–63.
- 13 Michiels JJ, Budde U, van der Planken M, van Vliet HHDM, Schroyens W, Berneman Z. Acquired von Willebrand syndromes: clinical features, aetiology, pathophysiology, classification and management. *Best Pract Res Clin Haematol* **2001**; 14: 401–36.
- 14 Tefferi MD A, Nichols MD WL. Acquired von Willebrand Disease: Concise Review of Occurrence, Diagnosis, Pathogenesis, and Treatment. *Am J Med* **1997**; 103: 536–40.
- 15 Presnell SR, Stafford DW. The vitamin K-dependent carboxylase. *Thromb Haemost* **2002**; 87: 937–46.

- 16 Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry (Mosc)* **1991**; 30: 10363–70.
- 17 Higashi S, Matsumoto N, Iwanaga S. Molecular Mechanism of Tissue Factor-mediated Acceleration of Factor VIIa Activity. *J Biol Chem* **1996**; 271: 26569–74.
- 18 Monroe DM, Hoffman M. What Does It Take to Make the Perfect Clot? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2006**; 26: 41–8.
- 19 Suzuki H, Shima M, Nogami K, Sakurai Y, Nishiya K, Saenko EL, Tanaka I, Yoshioka A. Factor V C2 domain contains a major thrombin-binding site responsible for thrombin-catalyzed factor V activation. *J Thromb Haemost* **2006**; 4: 1354–60.
- 20 Fay PJ. Activation of factor VIII and mechanisms of cofactor action. *Blood Rev* **2004**; 18: 1–15.
- 21 Baglia FA, Walsh PN. Prothrombin Is a Cofactor for the Binding of Factor XI to the Platelet Surface and for Platelet-Mediated Factor XI Activation by Thrombin†. *Biochemistry (Mosc)* **1998**; 37: 2271–81.
- 22 Matafonov A, Sarilla S, Sun M, Sheehan JP, Serebrov V, Verhamme IM, Gailani D. Activation of factor XI by products of prothrombin activation. *Blood* **2011**; 118: 437–45.
- 23 Mann KG, Butenas S, Brummel K. The Dynamics of Thrombin Formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2003**; 23: 17–25.
- 24 Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost* **2005**; 3: 1894–904.
- 25 Ariens RAS. Role of factor XIII in fibrin clot formation and effects of genetic polymorphisms. *Blood* **2002**; 100: 743–54.
- 26 Rao LV, Nordfang O, Hoang AD, Pendurthi UR. Mechanism of antithrombin III inhibition of factor VIIa/tissue factor activity on cell surfaces. *Blood* **1995**; 85: 121–9.
- 27 Doi T, Tokuda H, Matsushima-Nishiwaki R, The Cuong N, Kageyama Y, Iida Y, Kondo A, Akamatsu S, Otsuka T, Iida H, Kozawa O, Ogura S. Effect of antithrombin III on glycoprotein Ib/IX/V activation in human platelets: Suppression of thromboxane A2 generation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **2012**; 87: 57–62.
- 28 Mertens G, Cassiman JJ, Berghe HV den, Vermeylen J, David G. Cell surface heparan sulfate proteoglycans from human vascular endothelial cells. Core protein characterization and antithrombin III binding properties. *J Biol Chem* **1992**; 267: 20435–43.
- 29 Bedsted T, Swanson R, Chuang Y-J, Bock PE, Björk I, Olson ST. Heparin and Calcium Ions Dramatically Enhance Antithrombin Reactivity with Factor IXa by Generating New Interaction Exosites†. *Biochemistry (Mosc)* **2003**; 42: 8143–52.
- 30 Yang L, Manithody C, Rezaie AR. Localization of the Heparin Binding Exosite of Factor IXa. *J Biol Chem* **2002**; 277: 50756–60.
- 31 Yang L, Manithody C, Olson ST, Rezaie AR. Contribution of Basic Residues of the Autolysis Loop to the Substrate and Inhibitor Specificity of Factor IXa. *J Biol Chem* **2003**; 278: 25032–8.

- 32 Johnson DJD, Langdown J, Huntington JA. Molecular basis of factor IXa recognition by heparin-activated antithrombin revealed by a 1.7-Å structure of the ternary complex. *Proc Natl Acad Sci* **2010**; 107: 645–50.
- 33 Yang L, Manithody C, Qureshi SH, Rezaie AR. Role of the Residues of the 39-Loop in Determining the Substrate and Inhibitor Specificity of Factor IXa. *J Biol Chem* **2010**; 285: 28488–95.
- 34 Stavenuiter F, Bouwens EAM, Mosnier LO. Down-regulation of the clotting cascade by the protein C pathway. *Hematol Educ Congr Eur Hematol Assoc Eur Hematol Assoc Congr Educ Program* **2013**; 7: 365.
- 35 Wildhagen KCAA, Lutgens E, Loubele STGB, ten Cate H, Nicolaes GAF. The structure-function relationship of activated protein C. Lessons from natural and engineered mutations. *Thromb Haemost* **2011**; 106: 1034–45.
- 36 Hackeng TM, Seré KM, Tans G, Rosing J. Protein S stimulates inhibition of the tissue factor pathway by tissue factor pathway inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**; 103: 3106–11.
- 37 Reglińska-Matveyev N, Andersson HM, Rezende SM, Dahlbäck B, Crawley JTB, Lane DA, Ahnström J. TFPI cofactor function of protein S: essential role of the protein S SHBG-like domain. *Blood [Internet]* **2014 [cited 2014 Sep 25]**; . Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/early/2014/04/16/blood-2014-01-551812>
- 38 Trzeciak MC, Denninger MH. L'hémostase en question. *Biomérieux*. **2003**.
- 39 Yang L, Rezaie AR. Residues of the 39-Loop Restrict the Plasma Inhibitor Specificity of Factor IXa. *J Biol Chem* **2013**; 288: 12692–8.
- 40 Broze GJ, Jr. Protein Z-Dependent Regulation of Coagulation. *Thromb Haemost* **2001**; 86: 8–13.
- 41 Bertina RM, Koeleman BPC, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* **1994**; 369: 64–7.
- 42 Lane DA, Kunz G, Olds RJ, Thein SL. Molecular genetics of antithrombin deficiency. *Blood Rev* **1996**; 10: 59–74.
- 43 Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol* **2005**; 129: 307–21.
- 44 Favier R, Aoki N, De Moerloose P. Congenital α 2-plasmin inhibitor deficiencies: a review. *Br J Haematol* **2001**; 114: 4–10.
- 45 Institut de veille sanitaire. Réseau Francecoag. Statistiques nationales. Données démographiques : hémophile A et hémophilie B. Mise à jour le 15 juil 2014 [Internet]. **[cited 2014 Sep 2]**. Available from: http://www.francecoag.org/SiteWebPublic/public/stats/stats_page.jsp?stat2=on&stat3=on
- 46 Lakich D, Kazazian HH, Antonarakis SE, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nat Genet* **1993**; 5: 236–41.

- 47 Rallapalli PM, Kemball-Cook G, Tuddenham EG, Gomez K, Perkins SJ. An interactive mutation database for human coagulation factor IX provides novel insights into the phenotypes and genetics of hemophilia B. *J Thromb Haemost* **2013**; 11: 1329–40.
- 48 Hamasaki-Katagiri N, Salari R, Simhadri VL, Tseng SC, Needlman E, Edwards NC, Sauna ZE, Grigoryan V, Komar AA, Przytycka TM, Kimchi-Sarfaty C. Analysis of F9 point mutations and their correlation to severity of haemophilia B disease. *Haemophilia* **2012**; 18: 933–40.
- 49 Puck JM, Willard HF. X Inactivation in Females with X-Linked Disease. *N Engl J Med* **1998**; 338: 325–8.
- 50 Favier R, Lavergne J-M, Costa J-M, Caron C, Mazurier C, Viémont M, Delpech M, Valleix S. Unbalanced X-chromosome inactivation with a novel FVIII gene mutation resulting in severe hemophilia A in a female. *Blood* **2000**; 96: 4373–5.
- 51 Valleix S, Vinciguerra C, Lavergne J-M, Leuer M, Delpech M, Negrier C. Skewed X-chromosome inactivation in monozygotic diamniotic twin sisters results in severe and mild hemophilia A. *Blood* **2002**; 100: 3034–6.
- 52 Venceslá A, Fuentes-Prior P, Baena M, Quintana M, Baiget M, Tizzano EF. Severe haemophilia A in a female resulting from an inherited gross deletion and a de novo codon deletion in the F8 gene. *Haemophilia* **2008**; 14: 1094–8.
- 53 Windsor S, Lyng A, Taylor SA, Ewenstein BM, Neufeld EJ, Lillicrap D. Severe haemophilia A in a female resulting from two de novo factor VIII mutations. *Br J Haematol* **1995**; 90: 906–9.
- 54 Chambost H, Meunier S. Enjeux d'une prise en charge pédiatrique précoce de l'hémophilie sévère. *Arch Pédiatrie* **2006**; 13: 1423–30.
- 55 Giannelli F, Green PM, Sommer SS, Poon M-C, Ludwig M, Schwaab R, Reitsma PH, Goossens M, Yoshioka A, Brownlee GG. Haemophilia B (Sixth Edition): A Database of Point Mutations and Short Additions and Deletions. *Nucleic Acids Res* **1996**; 24: 103–18.
- 56 Lebreton A, Lavigne G. Les anticorps anti-FVIII et anti-FIX. *Rev Francoph Lab* **2012**; 2012: 55–62.
- 57 Simpson ML, Valentino LA. Management of joint bleeding in hemophilia. *Expert Rev Hematol* **2012**; 5: 459–68.
- 58 Darby SC, Kan SW, Spooner RJ, Giangrande PLF, Hill FGH, Hay CRM, Lee CA, Ludlam CA, Williams M. 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: 815–25.
- 59 Siboni SM, Mannucci PM, Gringeri A, Franchini M, Tagliaferri A, Ferretti M, Tradati FC, Santagostino E, Von MACKENSEN S, For the Italian Association of Haemophilia Centres (aice). Health status and quality of life of elderly persons with severe hemophilia born before the advent of modern replacement therapy. *J Thromb Haemost* **2009**; 7: 780–6.
- 60 Gringeri A, Mantovani LG, Scalone L, Mannucci PM. Cost of care and quality of life for patients with hemophilia complicated by inhibitors: the COCIS Study Group. *Blood* **2003**; 102: 2358–63.
- 61 Armstrong EP, Malone DC, Krishnan S, Wessler MJ. Costs and utilization of hemophilia A and B patients with and without inhibitors. *J Med Econ* **2014**; : 1–5.

- 62 Fressinaud E, Goudemand J, Gruel Y, Guérois C, Lambert T, Laurian Y, Négrier C, Polack B, Rotschild C, Saint-Rémy J-M, Sié P. Développement des inhibiteurs et prise en charge chez les patients hémophiles traités par Facteur VIII ou IX d'origine plasmatique ou recombinante. Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé; **2006**.
- 63 Wootla B, Christophe OD, Mahendra A, Dimitrov JD, Repessé Y, Ollivier V, Friboulet A, Borel-Derlon A, Levesque H, Borg J-Y, Andre S, Bayry J, Calvez T, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S. Proteolytic antibodies activate factor IX in patients with acquired hemophilia. *Blood* **2011**; 117: 2257–64.
- 64 Paul S. Two-faced catalytic autoantibodies. *Blood* **2011**; 117: 2084–6.
- 65 Christophe OD, Lenting PJ, Cherel G, Boon-Spijker M, Lavergne J-M, Boertjes R, Briquel M-E, Goede-Bolder A de, Goudemand J, Gaillard S, d' Oiron R, Meyer D, Mertens K. Functional mapping of anti-factor IX inhibitors developed in patients with severe hemophilia B. *Blood* **2001**; 98: 1416–23.
- 66 Dargaud Y. Pathologies hématologiques. *Réanimation Urgences Springer*. **2010**.
- 67 Kasper CK. Concentrate safety and efficacy. *Haemophilia* **2002**; 8: 161–5.
- 68 Chitlur M, Lusher JM. Treatment of hemophilia: plasma-derived clotting factors. *Contemp Approaches Hemoph [Internet]* Future Medicine Ltd; **2014 [cited 2014 Sep 6]**. p. 34–44. Available from: <http://www.futuremedicine.com.docelec.univ-lyon1.fr/doi/abs/10.2217/fmeh2013.13.170>
- 69 White GC, Beebe A, Nielsen B. Recombinant factor IX. *Thromb Haemost* **1997**; 78: 261–5.
- 70 White G, Shapiro A, Ragni M, Garzone P, Goodfellow J, Tubridy K, Courter S. Clinical evaluation of recombinant factor IX. *Semin Hematol* **1998**; 35: 33–8.
- 71 Kurachi K, Davie EW. Isolation and characterization of a cDNA coding for human factor IX. *Proc Natl Acad Sci* **1982**; 79: 6461–4.
- 72 Anson DS, Austen DEG, Brownlee GG. Expression of active human clotting factor IX from recombinant DNA clones in mammalian cells. *Nature* **1985**; 315: 683–5.
- 73 Björkman S. Pharmacokinetics of plasma-derived and recombinant factor IX – implications for prophylaxis and on-demand therapy. *Haemophilia* **2013**; 19: 808–13.
- 74 Aledort L m. Making a therapeutic choice: human versus recombinant fractions – can we do it? *Haemophilia* **2001**; 7: 1–3.
- 75 Srivastava A. Factor replacement therapy in haemophilia – are there models for developing countries? *Haemophilia* **2003**; 9: 391–6.
- 76 Noone D, O'Mahony B, van Dijk JP, Prihodova L. A survey of the outcome of prophylaxis, on-demand treatment or combined treatment in 18–35-year old men with severe haemophilia in six countries. *Haemophilia* **2013**; 19: 44–50.
- 77 Ljung R. Prophylactic therapy in haemophilia. *Blood Rev* **2009**; 23: 267–74.

- 78 DiMichele D. Inhibitor development in haemophilia B: an orphan disease in need of attention. *Br J Haematol* **2007**; 138: 305–15.
- 79 Negrier C, Dargaud Y, Bordet JC. Basic aspects of bypassing agents. *Haemophilia* **2006**; 12: 48–53.
- 80 DiMichele DM. Immune tolerance induction in haemophilia: evidence and the way forward. *J Thromb Haemost* **2011**; 9: 216–25.
- 81 Teitel JM, Sholzberg M. Current status and future prospects for the prophylactic management of hemophilia patients with inhibitor antibodies. *Blood Rev* **2013**; 27: 103–9.
- 82 Yoshitake S, Schach BG, Foster DC, Davie EW, Kurachi K. Complete nucleotide sequences of the gene for human factor IX (antihemophilic factor B). *Biochemistry (Mosc)* **1985**; 24: 3736–50.
- 83 Anson DS, Choo KH, Rees DJ, Giannelli F, Gould K, Huddleston JA, Brownlee GG. The gene structure of human anti-haemophilic factor IX. *EMBO J* **1984**; 3: 1053.
- 84 Funnell APW, Crossley M. Hemophilia B Leyden and once mysterious cis-regulatory mutations. *Trends Genet TIG* **2014**; 30: 18–23.
- 85 Davies N, Austen DEG, Wilde MD, Darlington GJ, Brownlee GG. Clotting factor IX levels in C/EBP α knockout mice. *Br J Haematol* **1997**; 99: 578–9.
- 86 Reijnen MJ, Sladek FM, Bertina RM, Reitsma PH. Disruption of a binding site for hepatocyte nuclear factor 4 results in hemophilia B Leyden. *Proc Natl Acad Sci* **1992**; 89: 6300–3.
- 87 Funnell APW, Wilson MD, Ballester B, Mak KS, Burdach J, Magan N, Pearson RCM, Lemaigre FP, Stowell KM, Odom DT, Flicek P, Crossley M. A CpG Mutational Hotspot in a ONECUT Binding Site Accounts for the Prevalent Variant of Hemophilia B Leyden. *Am J Hum Genet* **2013**; 92: 460–7.
- 88 Crossley M, Ludwig M, Stowell KM, Vos PD, Olek K, Brownlee GG. Recovery from hemophilia B Leyden: an androgen-responsive element in the factor IX promoter. *Science* **1992**; 257: 377–9.
- 89 Bond M, Jankowski M, Patel H, Karnik S, Strang A, Xu B, Rouse J, Koza S, Letwin B, Steckert J, Amphlett G, Scoble H. Biochemical characterization of recombinant factor IX. *Semin Hematol* **1998**; 35: 11–7.
- 90 Kaufman RJ. Post-translational Modifications Required for Coagulation Factor Secretion and Function. *Thromb Haemost* **1998**; 79: 1068–79.
- 91 White I, Gilbert C, Pickens EM, Liles DK, Roberts HR. Mammalian Recombinant Coagulation Proteins: Structure and Function. *Transfus Sci* **1998**; 19: 177–89.
- 92 Stenflo J, Holme E, Lindstedt S, Chandramouli N, Huang LH, Tam JP, Merrifield RB. Hydroxylation of aspartic acid in domains homologous to the epidermal growth factor precursor is catalyzed by a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci* **1989**; 86: 444–7.
- 93 Chevreux G, Faid V, Andre M-H, Tellier Z, Bihoreau N. Differential investigations from plasma-derived and recombinant Factor IX revealed major differences in post-translational modifications of activation peptides. *Vox Sang* **2012**; 104: 171–4.

- 94 Griffith MJ, Monroe DM, van Cott KE, Walker A, Waugh S, Kumar A, Drohan WN. N-glycan sialylation is important for in vivo recovery of recombinant factor IX. **2007**.
- 95 Atoda H, Yokota E, Morita T. Characterization of a Monoclonal Antibody B1 That Recognizes Phosphorylated Ser-158 in the Activation Peptide Region of Human Coagulation Factor IX. *J Biol Chem* **2006**; 281: 9314–20.
- 96 Arruda VR, Hagstrom JN, Deitch J, Heiman-Patterson T, Camire RM, Chu K, Fields PA, Herzog RW, Couto LB, Larson PJ, High KA. Posttranslational modifications of recombinant myotube-synthesized human factor IX. *Blood* **2001**; 97: 130–8.
- 97 Bristol JA, Furie BC, Furie B. Propeptide processing during factor IX biosynthesis. Effect of point mutations adjacent to the propeptide cleavage site. *J Biol Chem* **1993**; 268: 7577–84.
- 98 Kurachi S, Pantazatos DP, Kurachi K. The Carboxyl-Terminal Region of Factor IX Is Essential for Its Secretion†. *Biochemistry (Mosc)* **1997**; 36: 4337–44.
- 99 Branchini A, Campioni M, Mazzucconi MG, Biondo F, Mari R, Bicocchi MP, Bernardi F, Pinotti M. Replacement of the Y450 (c234) phenyl ring in the carboxyl-terminal region of coagulation factor IX causes pleiotropic effects on secretion and enzyme activity. *FEBS Lett* **2013**; 587: 3249–53.
- 100 Branchini A, Rizzotto L, Mariani G, Napolitano M, Lapecorella M, Giansily-Blaizot M, Mari R, Canella A, Pinotti M, Bernardi F. Natural and engineered carboxy-terminal variants: decreased secretion and gain-of-function result in asymptomatic coagulation factor VII deficiency. *Haematologica* **2012**; 97: 705–9.
- 101 Cheung WF, Straight DL, Smith KJ, Lin SW, Roberts HR, Stafford DW. The role of the epidermal growth factor-1 and hydrophobic stack domains of human factor IX in binding to endothelial cells. *J Biol Chem* **1991**; 266: 8797–800.
- 102 Mayhew M, Handford P, Brownlee GG. The binding of natural variants of human factor IX to endothelial cells. *FEBS Lett* **1994**; 341: 74–8.
- 103 Stenflo J, Stenberg Y, Muranyi A. Calcium-binding EGF-like modules in coagulation proteinases: function of the calcium ion in module interactions. *Biochim Biophys Acta BBA - Protein Struct Mol Enzymol* **2000**; 1477: 51–63.
- 104 Enjolras N, Plantier J-L, Rodriguez M-H, Rea M, Attali O, Vinciguerra C, Negrier C. Two novel mutations in EGF-like domains of human factor IX dramatically impair intracellular processing and secretion. *J Thromb Haemost* **2004**; 2: 1143–54.
- 105 Johansson L, Karpf DM, Hansen L, Pelzer H, Persson E. Activation peptides prolong the murine plasma half-life of human factor VII. *Blood* **2011**; 117: 3445–52.
- 106 Guéguen P, Cherel G, Badirou I, Denis CV, Christophe OD. Two residues in the activation peptide domain contribute to the half-life of factor X in vivo. *J Thromb Haemost* **2010**; 8: 1651–3.
- 107 Ahmad SS, Rawala-Sheikh R, Walsh PN. Comparative interactions of factor IX and factor IXa with human platelets. *J Biol Chem* **1989**; 264: 3244–51.

- 108 Ahmad SS, Rawala-Sheikh R, Cheung WF, Jameson BA, Stafford DW, Walsh PN. High-affinity, specific factor IXa binding to platelets is mediated in part by residues 3-11. *Biochemistry (Mosc)* **1994**; 33: 12048–55.
- 109 Ahmad SS, Wong MY, Rawala R, Jameson BA, Walsh PN. Coagulation Factor IX Residues G4–Q11 Mediate Its Interaction with a Shared Factor IX/IXa Binding Site on Activated Platelets but Not the Assembly of the Functional Factor X Activating Complex†. *Biochemistry (Mosc)* **1998**; 37: 1671–9.
- 110 Wilkinson FH, London FS, Walsh PN. Residues 88–109 of Factor IXa Are Important for Assembly of the Factor X Activating Complex. *J Biol Chem* **2002**; 277: 5725–33.
- 111 Wilkinson FH, Ahmad SS, Walsh PN. The Factor IXa Second Epidermal Growth Factor (EGF2) Domain Mediates Platelet Binding and Assembly of the Factor X Activating Complex. *J Biol Chem* **2002**; 277: 5734–41.
- 112 Cheung WF, Hamaguchi N, Smith KJ, Stafford DW. The binding of human factor IX to endothelial cells is mediated by residues 3-11. *J Biol Chem* **1992**; 267: 20529–31.
- 113 Cheung WF, Born J van den, Kühn K, Kjellén L, Hudson BG, Stafford DW. Identification of the endothelial cell binding site for factor IX. *Proc Natl Acad Sci* **1996**; 93: 11068–73.
- 114 Wolberg AS, Stafford DW, Erie DA. Human Factor IX Binds to Specific Sites on the Collagenous Domain of Collagen IV. *J Biol Chem* **1997**; 272: 16717–20.
- 115 Gui T, Lin H-F, Jin D-Y, Hoffman M, Straight DL, Roberts HR, Stafford DW. Circulating and binding characteristics of wild-type factor IX and certain Gla domain mutants in vivo. *Blood* **2002**; 100: 153–8.
- 116 Gui T, Rehemian A, Ni H, Gross PL, Yin F, Monroe D, Monahan PE, Stafford DW. Abnormal hemostasis in a knock-in mouse carrying a variant of factor IX with impaired binding to collagen type IV. *J Thromb Haemost* **2009**; 7: 1843–51.
- 117 Neels JG, Berg BMM van den, Mertens K, Maat H ter, Pannekoek H, Zonneveld A-J van, Lenting PJ. Activation of factor IX zymogen results in exposure of a binding site for low-density lipoprotein receptor-related protein. *Blood* **2000**; 96: 3459–65.
- 118 Neels JG, Berg BMM van den, Lookene A, Olivecrona G, Pannekoek H, Zonneveld A-J van. The Second and Fourth Cluster of Class A Cysteine-rich Repeats of the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein Share Ligand-binding Properties. *J Biol Chem* **1999**; 274: 31305–11.
- 119 Pieper-Fürst U, Lammert F. Low-density lipoprotein receptors in liver: Old acquaintances and a newcomer. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids* **2013**; 1831: 1191–8.
- 120 Rohlena J, Kolkman JA, Boertjes RC, Mertens K, Lenting PJ. Residues Phe342–Asn346 of Activated Coagulation Factor IX Contribute to the Interaction with Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein. *J Biol Chem* **2003**; 278: 9394–401.
- 121 Di Scipio RG, Kurachi K, Davie EW. Activation of human factor IX (Christmas factor). *J Clin Invest* **1978**; 61: 1528–38.
- 122 Vadivel K, Bajaj SP. Structural biology of factor VIIa/tissue factor initiated coagulation. *Front Biosci Landmark Ed* **2012**; 17: 2476–94.

- 123 Ndonwi M, Broze G, Bajaj SP. The first epidermal growth factor-like domains of factor Xa and factor IXa are important for the activation of the factor VII–tissue factor complex. *J Thromb Haemost* **2005**; 3: 112–8.
- 124 Lu G, Broze GJ, Krishnaswamy S. Formation of Factors IXa and Xa by the Extrinsic Pathway DIFFERENTIAL REGULATION BY TISSUE FACTOR PATHWAY INHIBITOR AND ANTITHROMBIN III. *J Biol Chem* **2004**; 279: 17241–9.
- 125 Zhong D, Bajaj MS, Schmidt AE, Bajaj SP. The N-terminal Epidermal Growth Factor-like Domain in Factor IX and Factor X Represents an Important Recognition Motif for Binding to Tissue Factor. *J Biol Chem* **2002**; 277: 3622–31.
- 126 Kirchhofer D, Lipari MT, Moran P, Eigenbrot C, Kelley RF. The Tissue Factor Region That Interacts with Substrates Factor IX and Factor X. *Biochemistry (Mosc)* **2000**; 39: 7380–7.
- 127 Zhong D, Smith KJ, Birktoft JJ, Bajaj SP. First epidermal growth factor-like domain of human blood coagulation factor IX is required for its activation by factor VIIa/tissue factor but not by factor XIa. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**; 91: 3574–8.
- 128 Ndonwi M, Broze GJ, Agah S, Schmidt AE, Bajaj SP. Substitution of the Gla Domain in Factor X with That of Protein C Impairs Its Interaction with Factor VIIa/Tissue Factor LACK OF COMPARABLE EFFECT BY SIMILAR SUBSTITUTION IN FACTOR IX. *J Biol Chem* **2007**; 282: 15632–44.
- 129 Chen SW, Pellequer J-L, Schved J-F, Giansily-Blaizot M. Model of a ternary complex between activated factor VII, tissue factor and factor IX. *Thromb Haemost* **2002**; 88: 74–82.
- 130 Geng Y, Verhamme IM, Sun MF, Bajaj SP, Emsley J, Gailani D. Analysis of the factor XI variant Arg184Gly suggests a structural basis for factor IX binding to factor XIa. *J Thromb Haemost* **2013**; 11: 1374–84.
- 131 Geng Y, Verhamme IM, Messer A, Sun M, Smith SB, Bajaj SP, Gailani D. A Sequential Mechanism for Exosite-mediated Factor IX Activation by Factor XIa. *J Biol Chem* **2012**; 287: 38200–9.
- 132 Smith SB, Verhamme IM, Sun M, Bock PE, Gailani D. Characterization of Novel Forms of Coagulation Factor XIa INDEPENDENCE OF FACTOR XIa SUBUNITS IN FACTOR IX ACTIVATION. *J Biol Chem* **2008**; 283: 6696–705.
- 133 Marcinkiewicz MM, Sinha D, Walsh PN. Productive Recognition of Factor IX by Factor XIa Exosites Requires Disulfide Linkage between Heavy and Light Chains of Factor XIa. *J Biol Chem* **2012**; 287: 6187–95.
- 134 Gailani D, Geng Y, Verhamme I, Sun M, Bajaj SP, Messer A, Emsley J. The mechanism underlying activation of factor IX by factor XIa. *Thromb Res* **2014**; 133, Supplement 1: S48–51.
- 135 Guella I, Soldà G, Spena S, Asselta R, Ghiotto R, Tenchini ML, Castaman G, Duga S. Molecular characterization of two novel mutations causing factor XI deficiency: A splicing defect and a missense mutation responsible for a CRM+ defect. *Thromb Haemost* **2008**; 99: 523–30.
- 136 Bajaj SP, Schmidt AE, Mathur A, Padmanabhan K, Zhong D, Mastro M, Fay PJ. Factor IXa:Factor VIIIa Interaction HELIX 330–338 OF FACTOR IXa INTERACTS WITH RESIDUES 558–565 AND SPATIALLY ADJACENT REGIONS OF THE A2 SUBUNIT OF FACTOR VIIIa. *J Biol Chem* **2001**; 276: 16302–9.

- 137 Ngo JCK, Huang M, Roth DA, Furie BC, Furie B. Crystal Structure of Human Factor VIII: Implications for the Formation of the Factor IXa-Factor VIIIa Complex. *Structure* **2008**; 16: 597–606.
- 138 Celie PHN, Stempvoort G van, Fribourg C, Schurgers LJ, Lenting PJ, Mertens K. The Connecting Segment between Both Epidermal Growth Factor-like Domains in Blood Coagulation Factor IX Contributes to Stimulation by Factor VIIIa and Its Isolated A2 Domain. *J Biol Chem* **2002**; 277: 20214–20.
- 139 Chang Y-J, Wu H-L, Hamaguchi N, Hsu Y-C, Lin S-W. Identification of Functionally Important Residues of the Epidermal Growth Factor-2 Domain of Factor IX by Alanine-scanning Mutagenesis RESIDUES ASN89–GLY93 ARE CRITICAL FOR BINDING FACTOR VIIIa. *J Biol Chem* **2002**; 277: 25393–9.
- 140 Fribourg C, Meijer AB, Mertens K. The Interface between the EGF2 Domain and the Protease Domain in Blood Coagulation Factor IX Contributes to Factor VIII Binding and Factor X Activation. *Biochemistry (Mosc)* **2006**; 45: 10777–85.
- 141 Lenting PJ, Loo J-WHP van de, Donath M-JSH, Mourik JA van, Mertens K. The Sequence GluLys of Human Blood Coagulation Factor VIII Comprises a Binding Site for Activated Factor IX. *J Biol Chem* **1996**; 271: 1935–40.
- 142 Mertens K, Celie PH, Kolkman JA, Lenting PJ. Factor VIII-factor IX interactions: molecular sites involved in enzyme-cofactor complex assembly. *Thromb Haemost* **1999**; 82: 209–17.
- 143 Freedman SJ, Blostein MD, Baleja JD, Jacobs M, Furie BC, Furie B. Identification of the Phospholipid Binding Site in the Vitamin K-dependent Blood Coagulation Protein Factor IX. *J Biol Chem* **1996**; 271: 16227–36.
- 144 Foster PA, Fulcher CA, Houghten RA, Zimmerman TS. Synthetic factor VIII peptides with amino acid sequences contained within the C2 domain of factor VIII inhibit factor VIII binding to phosphatidylserine. *Blood* **1990**; 75: 1999–2004.
- 145 Pratt KP, Shen BW, Takeshima K, Davie EW, Fujikawa K, Stoddard BL. Structure of the C2 domain of human factor VIII at 1.5 [Å] resolution. *Nature* **1999**; 402: 439–42.
- 146 Christophe OD, Lenting PJ, Kolkman JA, Brownlee GG, Mertens K. Blood Coagulation Factor IX Residues Glu78 and Arg94 Provide a Link between Both Epidermal Growth Factor-like Domains That Is Crucial in the Interaction with Factor VIII Light Chain. *J Biol Chem* **1998**; 273: 222–7.
- 147 Blostein MD, Furie BC, Rajotte I, Furie B. The Gla Domain of Factor IXa Binds to Factor VIIIa in the Tenase Complex. *J Biol Chem* **2003**; 278: 31297–302.
- 148 Soeda T, Nogami K, Nishiya K, Takeyama M, Ogiwara K, Sakata Y, Yoshioka A, Shima M. The Factor VIIIa C2 Domain (Residues 2228–2240) Interacts with the Factor IXa Gla Domain in the Factor Xase Complex. *J Biol Chem* **2009**; 284: 3379–88.
- 149 Soeda T, Nogami K, Ogiwara K, Shima M. Interactions between residues 2228–2240 within factor VIIIa C2 domain and factor IXa Gla domain contribute to propagation of clot formation: *Thromb Haemost* **2011**; 106: 893–900.
- 150 Fay PJ, Koshiyama K. The A2 Subunit of Factor VIIIa Modulates the Active Site of Factor IXa. *J Biol Chem* **1998**; 273: 19049–54.

- 151 Kolkman JA, Lenting PJ, Mertens K. Regions 301-303 and 333-339 in the catalytic domain of blood coagulation factor IX are factor VIII-interactive sites involved in stimulation of enzyme activity. *Biochem J* **1999**; 339: 217–21.
- 152 Griffiths AE, Rydkin I, Fay PJ. Factor VIIIa A2 Subunit Shows a High Affinity Interaction with Factor IXa CONTRIBUTION OF A2 SUBUNIT RESIDUES 707-714 TO THE INTERACTION WITH FACTOR IXa. *J Biol Chem* **2013**; 288: 15057–64.
- 153 Rawala-Sheikh R, Ahmad SS, Ashby B, Walsh PN. Kinetics of coagulation factor-X activation by platelet-bound factor IXa. *Biochemistry (Mosc)* **1990**; 29: 2606–11.
- 154 Ahmad SS, London FS, Walsh PN. Binding studies of the enzyme (factor IXa) with the cofactor (factor VIIIa) in the assembly of factor-X activating complex on the activated platelet surface. *J Thromb Haemost JTH* **2003**; 1: 2348–55.
- 155 Lapan KA, Fay PJ. Localization of a Factor X Interactive Site in the A1 Subunit of Factor VIIIa. *J Biol Chem* **1997**; 272: 2082–8.
- 156 Takeyama M, Wakabayashi H, Fay PJ. Factor VIII Light Chain Contains a Binding Site for Factor X That Contributes to the Catalytic Efficiency of Factor Xase. *Biochemistry (Mosc)* **2012**; 51: 820–8.
- 157 Celie PHN, Lenting PJ, Mertens K. Hydrophobic Contact between the Two Epidermal Growth Factor-like Domains of Blood Coagulation Factor IX Contributes to Enzymatic Activity. *J Biol Chem* **2000**; 275: 229–34.
- 158 Sichler K, Kopetzki E, Huber R, Bode W, Hopfner K-P, Brandstetter H. Physiological fIXa Activation Involves a Cooperative Conformational Rearrangement of the 99-Loop. *J Biol Chem* **2003**; 278: 4121–6.
- 159 Brandstetter H, Bauer M, Huber R, Lollar P, Bode W. X-ray structure of clotting factor IXa: active site and module structure related to Xase activity and hemophilia B. *Proc Natl Acad Sci* **1995**; 92: 9796–800.
- 160 Samis JA, Ramsey GD, Walker JB, Nesheim ME, Giles AR. Proteolytic processing of human coagulation factor IX by plasmin. *Blood* **2000**; 95: 943–51.
- 161 Samis JA, Kam E, Nesheim ME, Giles AR. Neutrophil Elastase Cleavage of Human Factor IX Generates an Activated Factor IX-Like Product Devoid of Coagulant Function. *Blood* **1998**; 92: 1287–96.
- 162 Björk I, Jackson CM, Jörnvall H, Lavine KK, Nordling K, Salsgiver WJ. The active site of antithrombin. Release of the same proteolytically cleaved form of the inhibitor from complexes with factor IXa, factor Xa, and thrombin. *J Biol Chem* **1982**; 257: 2406–11.
- 163 Schmaier AH, Dahl LD, Rozemuller AJ, Roos RA, Wagner SL, Chung R, Van Nostrand WE. Protease nexin-2/amyloid beta protein precursor. A tight-binding inhibitor of coagulation factor IXa. *J Clin Invest* **1993**; 92: 2540–5.
- 164 Ivens IA, Baumann A, McDonald TA, Humphries TJ, Michaels LA, Mathew P. PEGylated therapeutic proteins for haemophilia treatment: a review for haemophilia caregivers. *Haemophilia* **2013**; 19: 11–20.

- 165 Negrier C, Knobe K, Tiede A, Giangrande P, Møss J. Enhanced pharmacokinetic properties of a glycoPEGylated recombinant factor IX: a first human dose trial in patients with hemophilia B. *Blood* **2011**; 118: 2695–701.
- 166 Østergaard H, Bjelke JR, Hansen L, Petersen LC, Pedersen AA, Elm T, Møller F, Hermit MB, Holm PK, Krogh TN, Petersen JM, Ezban M, Sørensen BB, Andersen MD, Agersø H, Ahmadian H, Balling KW, Christiansen MLS, Knobe K, Nichols TC, et al. Prolonged half-life and preserved enzymatic properties of factor IX selectively PEGylated on native N-glycans in the activation peptide. *Blood* **2011**; 118: 2333–41.
- 167 Oldenburg J, Albert T. Novel products for haemostasis – current status. *Haemophilia* **2014**; 20: 23–8.
- 168 Pan J, Liu T, Kim J-Y, Zhu D, Patel C, Cui Z-H, Zhang X, Newgren JO, Reames A, Canivel D, Jesmok G, Pierce GF, Sommer JM, Jiang H. Enhanced efficacy of recombinant FVIII in noncovalent complex with PEGylated liposome in hemophilia A mice. *Blood* **2009**; 114: 2802–11.
- 169 Lencer WI, Blumberg RS. A passionate kiss, then run: exocytosis and recycling of IgG by FcRn. *Trends Cell Biol* **2005**; 15: 5–9.
- 170 Goebel NA, Babbey CM, Datta-Mannan A, Witcher DR, Wroblewski VJ, Dunn KW. Neonatal Fc Receptor Mediates Internalization of Fc in Transfected Human Endothelial Cells. *Mol Biol Cell* **2008**; 19: 5490–505.
- 171 Tying S, Gottlieb A, Papp K, Gordon K, Leonardi C, Wang A, Lalla D, Woolley M, Jahreis A, Zitnik R, Cella D, Krishnan R. Etanercept and clinical outcomes, fatigue, and depression in psoriasis: double-blind placebo-controlled randomised phase III trial. *The Lancet* **2006**; 367: 29–35.
- 172 Imbach P, Crowther M. Thrombopoietin-Receptor Agonists for Primary Immune Thrombocytopenia. *N Engl J Med* **2011**; 365: 734–41.
- 173 Peters RT, Low SC, Kamphaus GD, Dumont JA, Amari JV, Lu Q, Zarbis-Papastoitsis G, Reidy TJ, Merricks EP, Nichols TC, Bitonti AJ. Prolonged activity of factor IX as a monomeric Fc fusion protein. *Blood* **2010**; 115: 2057–64.
- 174 Shapiro AD, Ragni MV, Valentino LA, Key NS, Josephson NC, Powell JS, Cheng G, Thompson AR, Goyal J, Tubridy KL, Peters RT, Dumont JA, Ewart D, Li L, Hallén B, Gozzi P, Bitonti AJ, Jiang H, Luk A, Pierce GF. Recombinant factor IX-Fc fusion protein (rFIXFc) demonstrates safety and prolonged activity in a phase 1/2a study in hemophilia B patients. *Blood* **2012**; 119: 666–72.
- 175 Kontermann RE. Strategies for extended serum half-life of protein therapeutics. *Curr Opin Biotechnol* **2011**; 22: 868–76.
- 176 Powell JS, Pasi KJ, Ragni MV, Ozelo MC, Valentino LA, Mahlangu JN, Josephson NC, Perry D, Manco-Johnson MJ, Apte S, Baker RI, Chan GC, Novitzky N, Wong RS, Krassova S, Allen G, Jiang H, Innes A, Li S, Cristiano LM, et al. Phase 3 Study of Recombinant Factor IX Fc Fusion Protein in Hemophilia B. *N Engl J Med* **2013**; 369: 2313–23.
- 177 Powell JS, Apte S, Chambost H, Hermans C, Jackson S, Josephson NC, Mahlangu JN, Ozelo MC, Peerlinck K, Pasi J, Perry D, Ragni MV, Wang X, Jiang H, Li S, Cristiano LM, Innes A, Nugent K, Brennan A, Luk A, et al. Long-acting recombinant factor IX Fc fusion protein (rFIXFc) for perioperative management of subjects with haemophilia B in the phase 3 B-LONG study. *Br J Haematol* **2014**; : n/a – n/a.

- 178 Kratz F. DOXO-EMCH (INNO-206): the first albumin-binding prodrug of doxorubicin to enter clinical trials. *Expert Opin Investig Drugs* **2007**; 16: 855–66.
- 179 Sheffield WP, Smith IJ, Syed S, Bhakta V. Prolonged in vivo anticoagulant activity of a hirudin-albumin fusion protein secreted from *Pichia pastoris*. *Blood Coagul Fibrinolysis Int J Haemost Thromb* **2001**; 12: 433–43.
- 180 Sheffield WP, Mamdani A, Hortelano G, Gataiaince S, Eltringham-Smith L, Begbie ME, Leyva RA, Liaw PS, Ofosu FA. Effects of genetic fusion of factor IX to albumin on in vivo clearance in mice and rabbits. *Br J Haematol* **2004**; 126: 565–73.
- 181 Metzner HJ, Weimer T, Kronthaler U, Lang W, Schulte S. Genetic fusion to albumin improves the pharmacokinetic properties of factor IX. *Thromb Haemost* **2009**; 102: 634–44.
- 182 Nolte MW, Nichols TC, Mueller-Cohrs J, Merricks EP, Pragst I, Zollner S, Dickneite G. Improved kinetics of rIX-FP, a recombinant fusion protein linking factor IX with albumin, in cynomolgus monkeys and hemophilia B dogs. *J Thromb Haemost* **2012**; 10: 1591–9.
- 183 Santagostino E, Negrier C, Klamroth R, Tiede A, Pabinger-Fasching I, Voigt C, Jacobs I, Morfini M. Safety and pharmacokinetics of a novel recombinant fusion protein linking coagulation factor IX with albumin (rIX-FP) in hemophilia B patients. *Blood* **2012**; 120: 2405–11.
- 184 Martinowitz U, Lubetsky A. Phase I/II, open-label, multicenter, safety, efficacy and PK study of a recombinant coagulation factor IX albumin fusion protein (rIX-FP) in subjects with hemophilia B. *Thromb Res* **2013**; 131, Supplement 2: S11–4.
- 185 Santagostino E. PROLONG-9FP clinical development program – phase I results of recombinant fusion protein linking coagulation factor IX with recombinant albumin (rIX-FP). *Thromb Res* **2013**; 131, Supplement 2: S7–10.
- 186 Popovic V, Goth M, Vanuga P, Payer J, Pfeifer M, Bidlingmaier M, Fima E. Once-weekly, CTP-modified hGH (MOD-4023) is effective in growth hormone deficient adults: a phase II, dose and frequency finding study. **2012 [cited 2014 Sep 16]**; . Available from: <http://www.endocrine-abstracts.org/ea/0029/ea0029oc10.5.htm>
- 187 Hart G, Zakar M, Hershkovitz A, Bar-Ilan A, Fima E. FVIIa-CTP and FIX-CTP, a novel long-acting coagulation factors with prolonged haemostatic effect and improved recovery in FVIII^{-/-} and FIX^{-/-} mice In: Non-Speaker Abstracts. *Haemophilia* **2012**; 18: 11–51.
- 188 Fima UE, Hart G. Long-acting coagulation factors and methods of producing same [Internet]. **2012 [cited 2014 Sep 16]**. Available from: <http://www.google.com.docelec.univ-lyon1.fr/patents/US20120208759>
- 189 Deer JR, Allison DS. High-Level Expression of Proteins in Mammalian Cells Using Transcription Regulatory Sequences from the Chinese Hamster EF-1 α Gene. *Biotechnol Prog* **2004**; 20: 880–9.
- 190 Westwood AD, Rowe DA, Clarke HRG. Improved recombinant protein yield using a codon deoptimized DHFR selectable marker in a CHEF1 expression plasmid. *Biotechnol Prog* **2010**; 26: 1558–66.

- 191 Kim WH, Kim J-S, Yoon Y, Lee GM. Effect of Ca²⁺ and Mg²⁺ concentration in culture medium on the activation of recombinant factor IX produced in Chinese hamster ovary cells. *J Biotechnol* **2009**; 142: 275–8.
- 192 Houdebine L-M. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **2009**; 32: 107–21.
- 193 Pipe SW. Recombinant clotting factors. *Thromb Haemost* **2008**; 99: 840–50.
- 194 Lee M-H, Lin Y-S, Tu C-F, Yen C-H. Recombinant Human Factor IX Produced from Transgenic Porcine Milk. *BioMed Res Int* **2014**; 2014: e315375.
- 195 Chang JY, Monroe DM, Stafford DW, Brinkhous KM, Roberts HR. Replacing the first epidermal growth factor-like domain of factor IX with that of factor VII enhances activity in vitro and in canine hemophilia B. *J Clin Invest* **1997**; 100: 886–92.
- 196 Chang J, Jin J, Lollar P, Bode W, Brandstetter H, Hamaguchi N, Straight DL, Stafford DW. Changing Residue 338 in Human Factor IX from Arginine to Alanine Causes an Increase in Catalytic Activity. *J Biol Chem* **1998**; 273: 12089–94.
- 197 Simioni P, Tormene D, Tognin G, Gavasso S, Bulato C, Iacobelli NP, Finn JD, Spiezia L, Radu C, Arruda VR. X-Linked Thrombophilia with a Mutant Factor IX (Factor IX Padua). *N Engl J Med* **2009**; 361: 1671–5.
- 198 Brunetti-Pierri N, Grove NC, Zuo Y, Edwards R, Palmer D, Cerullo V, Teruya J, Ng P. Bioengineered Factor IX Molecules with Increased Catalytic Activity Improve the Therapeutic Index of Gene Therapy Vectors for Hemophilia B. *Hum Gene Ther* **2009**; 20: 479–85.
- 199 Lin CN, Kao CY, Miao CH, Hamaguchi N, Wu HL, Shi GY, Liu YL, High KA, Lin SW. Generation of a novel factor IX with augmented clotting activities in vitro and in vivo. *J Thromb Haemost* **2010**; 8: 1773–83.
- 200 Kao C-Y, Yang S-J, Tao M-H, Jeng Y-M, Yu I-S, Lin S-W. Incorporation of the factor IX Padua mutation into FIX-Triple improves clotting activity in vitro and in vivo: *Thromb Haemost* **2013**; 110: 244–56.
- 201 Hartmann R, Dockal M, Kammlander W, Panholzer E, Nicolaes GA, Fiedler C, Rosing J, Scheiflinger F. Factor IX mutants with enhanced catalytic activity. *J Thromb Haemost* **2009**; 7: 1656–62.
- 202 Kitazawa T, Igawa T, Sampei Z, Muto A, Kojima T, Soeda T, Yoshihashi K, Okuyama-Nishida Y, Saito H, Tsunoda H, Suzuki T, Adachi H, Miyazaki T, Ishii S, Kamata-Sakurai M, Iida T, Harada A, Esaki K, Funaki M, Moriyama C, et al. A bispecific antibody to factors IXa and X restores factor VIII hemostatic activity in a hemophilia A model. *Nat Med* **2012**; 18: 1570–4.
- 203 Muto A, Yoshihashi K, Takeda M, Kitazawa T, Soeda T, Igawa T, Sakamoto Y, Haraya K, Kawabe Y, Shima M, Yoshioka A, Hattori K. Anti-factor IXa/X bispecific antibody (ACE910): hemostatic potency against ongoing bleeds in a hemophilia A model and the possibility of routine supplementation. *J Thromb Haemost* **2014**; 12: 206–13.

- 204 Muto A, Yoshihashi K, Takeda M, Kitazawa T, Soeda T, Igawa T, Sampei Z, Kuramochi T, Sakamoto A, Haraya K, Adachi K, Kawabe Y, Nogami K, Shima M, Hattori K. The anti-factor IXa/X bispecific antibody ACE910 prevents spontaneous joint bleeds in a long-term primate model of acquired hemophilia A. *Blood* **2014**; 20: 3165-3171.
- 205 Peyvandi F, Garagiola I, Seregni S. Future of coagulation factor replacement therapy. *J Thromb Haemost* **2013**; 11: 84–98.
- 206 Hilden I, Lauritzen B, Sørensen BB, Clausen JT, Jespersgaard C, Krogh BO, Bowler AN, Breinholt J, Gruhler A, Svensson LA, Petersen HH, Petersen LC, Balling KW, Hansen L, Hermit MB, Egebjerg T, Friederichsen B, Ezban M, Bjørn SE. Hemostatic effect of a monoclonal antibody mAb 2021 blocking the interaction between FXa and TFPI in a rabbit hemophilia model. *Blood* **2012**; 119: 5871–8.
- 207 Escobar MA. Advances in the treatment of inherited coagulation disorders. *Haemophilia* **2013**; 19: 648–59.
- 208 Prasad S, Lillicrap D, Labelle A, Knappe S, Keller T, Burnett E, Powell S, Johnson KW. Efficacy and safety of a new-class hemostatic drug candidate, AV513, in dogs with hemophilia A. *Blood* **2008**; 111: 672–9.
- 209 Toudjarska I, Cai Z, Racie T, Hettinger J, Milstein S, Bettencourt B, Sah D, Bumcrot D, Maraganore J, Vaishnav A. RNAi-mediated inhibition of activated protein C- a new approach for hemophilia treatment. *Blood ASH Annu Meet Abstr* **2011**; 118: 1204.
- 210 Sehgal A, Qin J, Racie T, Barros S, Sorensen B, Ivanciu L, Dargaud Y, Négrier C, Akinc A. ALN-AT3: an RNAi therapeutic targeting antithrombin for the treatment of hemophilia. *Haemophilia* **2014**; 20: 82.
- 211 Palmer TD, Thompson AR, Miller AD. Production of human factor IX in animals by genetically modified skin fibroblasts: potential therapy for hemophilia B. *Blood* **1989**; 73: 438–45.
- 212 Mount JD, Herzog RW, Tillson DM, Goodman SA, Robinson N, McClelland ML, Bellinger D, Nichols TC, Arruda VR, Clinton D, Lothrop J, High KA. Sustained phenotypic correction of hemophilia B dogs with a factor IX null mutation by liver-directed gene therapy. *Blood* **2002**; 99: 2670–6.
- 213 Manno CS, Glenn F, Pierce, Arruda VR, Pierce GF, Glader B, Ragni M, Rasko JJE, Ozelo MC, Hoots K, Blatt P, Konkle B, Dake M, Kaye R, Razavi M, Zajko A, Zehnder J, Pradip Rustagi, Nakai H, Chew A, Leonard D, et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* **2006**; 12: 342–7.
- 214 Monahan PE, Gui T. Gene therapy for hemophilia: advancing beyond the first clinical success. *Curr Opin Hematol* **2013**; 20: 410–6.
- 215 Nathwani AC, Tuddenham EGD, Rangarajan S, Rosales C, McIntosh J, Linch DC, Chowdary P, Riddell A, Pie AJ, Harrington C, O’Beirne J, Smith K, Pasi J, Glader B, Rustagi P, Ng CYC, Kay MA, Zhou J, Spence Y, Morton CL, et al. Adenovirus-Associated Virus Vector–Mediated Gene Transfer in Hemophilia B. *N Engl J Med* **2011**; 365: 2357–65.
- 216 Cantore A, Nair N, Valle PD, Matteo MD, Màtrai J, Sanvito F, Brombin C, Serio CD, D’Angelo A, Chuah M, Naldini L, VandenDriessche T. Hyperfunctional coagulation factor IX improves the efficacy of gene therapy in hemophilic mice. *Blood* **2012**; 120: 4517–20.

- 217 Finn JD, Nichols TC, Svoronos N, Merricks EP, Bellenger DA, Zhou S, Simioni P, High KA, Arruda VR. The efficacy and the risk of immunogenicity of FIX Padua (R338L) in hemophilia B dogs treated by AAV muscle gene therapy. *Blood* **2012**; 120: 4521–3.
- 218 Jallat S, Perraud F, Dalemans W, Balland A, Dieterle A, Faure T, Meulien P, Pavirani A. Characterization of recombinant human factor IX expressed in transgenic mice and in derived trans-immortalized hepatic cell lines. *EMBO J* **1990**; 9: 3295–301.
- 219 Kurachi S, Hitomi Y, Furukawa M, Kurachi K. Role of Intron I in Expression of the Human Factor IX Gene. *J Biol Chem* **1995**; 270: 5276–81.
- 220 Enjolras N, Rodriguez MH, Plantier JL, Maurice M, Attali O, Négrier C. The three in-frame ATG, clustered in the translation initiation sequence of human factor IX gene, are required for an optimal protein production. *Thromb Haemost* **1999**; 82: 1264–9.
- 221 Board PG, Webb GC, McKee J, Ichinose A. Localization of the coagulation factor XIII A subunit gene (F13A) to chromosome bands 6p24----p25. *Cytogenet Cell Genet* **1988**; 48: 25–7.
- 222 Bottenus RE, Ichinose A, Davie EW. Nucleotide sequence of the gene for the b subunit of human factor XIII. *Biochemistry (Mosc)* **1990**; 29: 11195–209.
- 223 Nagy JA, Henriksson P, McDonagh J. Biosynthesis of factor XIII B subunit by human hepatoma cell lines. *Blood* **1986**; 68: 1272–9.
- 224 Katona É, Ajzner É, Tóth K, Kárpáti L, Muszbek L. Enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of blood coagulation factor XIII A-subunit in plasma and in cell lysates. *J Immunol Methods* **2001**; 258: 127–35.
- 225 Ichinose A, Davie EW. Characterization of the gene for the a subunit of human factor XIII (plasma transglutaminase), a blood coagulation factor. *Proc Natl Acad Sci* **1988**; 85: 5829–33.
- 226 Ichinose A, McMullen BA, Fujikawa K, Davie EW. Amino acid sequence of the b subunit of human factor XIII, a protein composed of ten repetitive segments. *Biochemistry (Mosc)* **1986**; 25: 4633–8.
- 227 Muszbek L, Bereczky Z, Bagoly Z, Komáromi I, Katona É. Factor XIII: A Coagulation Factor With Multiple Plasmatic and Cellular Functions. *Physiol Rev* **2011**; 91: 931–72.
- 228 Katona É, Péntzes K, Csapó A, Fazakas F, Udvardy ML, Bagoly Z, Orosz ZZ, Muszbek L. Interaction of factor XIII subunits. *Blood* **2014**; 123: 1757–63.
- 229 Yorifuji H, Anderson K, Lynch GW, Water LV de, McDonagh J. B protein of factor XIII: differentiation between free B and complexed B. *Blood* **1988**; 72: 1645–50.
- 230 Souri M, Kaetsu H, Ichinose A. Sushi Domains in the B Subunit of Factor XIII Responsible for Oligomer Assembly†. *Biochemistry (Mosc)* **2008**; 47: 8656–64.
- 231 Tahlan A, Ahluwalia J. Factor XIII: Congenital Deficiency Factor XIII, Acquired Deficiency, Factor XIII A-Subunit, and Factor XIII B-Subunit. *Arch Pathol Lab Med* **2014**; 138: 278–81.
- 232 Rodeghiero F, Tosetto A. Factor Xiii Subunit B Deficiency. *Br J Haematol* **1990**; 76: 317–317.

- 233 Carrell NA, Erickson HP, McDonagh J. Electron microscopy and hydrodynamic properties of factor XIII subunits. *J Biol Chem* **1989**; 264: 551–6.
- 234 Hope MJ, Bally MB, Webb G, Cullis PR. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr* **1985**; 812: 55–65.
- 235 Dargaud Y, Spronk HMH, Leenders P, Hemker HC, Ten Cate H. Monitoring platelet dependent thrombin generation in mice. *Thromb Res* **2010**; 126: 436–41.
- 236 Lasa M, Chang P-L, Prince CW, Pinna LA. Phosphorylation of Osteopontin by Golgi Apparatus Casein Kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **1997**; 240: 602–5.
- 237 Lasa M, Marin O, Pinna LA. Rat Liver Golgi Apparatus Contains a Protein Kinase Similar to the Casein Kinase of Lactating Mammary Gland. *Eur J Biochem* **1997**; 243: 719–25.
- 238 Salvi M, Cesaro L, Tibaldi E, Pinna LA. Motif Analysis of Phosphosites Discloses a Potential Prominent Role of the Golgi Casein Kinase (GCK) in the Generation of Human Plasma Phospho-Proteome. *J Proteome Res* **2010**; 9: 3335–8.
- 239 Tagliabracci VS, Engel JL, Wen J, Wiley SE, Worby CA, Kinch LN, Xiao J, Grishin NV, Dixon JE. Secreted Kinase Phosphorylates Extracellular Proteins That Regulate Biomineralization. *Science* **2012**; 336: 1150–3.
- 240 Tagliabracci VS, Pinna LA, Dixon JE. Secreted protein kinases. *Trends Biochem Sci* **2013**; 38: 121–30.
- 241 Nalbant D, Youn H, Nalbant SI, Sharma S, Cobos E, Beale EG, Du Y, Williams SC. FAM20: an evolutionarily conserved family of secreted proteins expressed in hematopoietic cells. *BMC Genomics* **2005**; 6: 11.
- 242 Carrascal M, Gay M, Ovelleiro D, Casas V, Gelpí E, Abian J. Characterization of the Human Plasma Phosphoproteome Using Linear Ion Trap Mass Spectrometry and Multiple Search Engines. *J Proteome Res* **2010**; 9: 876–84.
- 243 Enjolras N, Dargaud Y, Pérot E, Guillaume F, Becchi M, Négrier C. Human hepatoma cell line HuH-7 is an effective cellular system to produce recombinant factor IX with improved post-translational modifications. *Thromb Res* **2012**; 130: e266–73.
- 244 Tanaka R, Nakashima D, Suzuki A, Miyawaki Y, Fujimori Y, Yamada T, Takagi A, Murate T, Yamamoto K, Katsumi A, Matsushita T, Naoe T, Kojima T. Impaired secretion of carboxyl-terminal truncated factor VII due to an F7 nonsense mutation associated with FVII deficiency. *Thromb Res* **2010**; 125: 262–6.
- 245 Katsumi A, Kojima T, Senda T, Yamazaki T, Tsukamoto H, Sugiura I, Kobayashi S, Miyata T, Umeyama H, Saito H. The Carboxyl-Terminal Region of Protein C Is Essential for Its Secretion. *Blood* **1998**; 91: 3784–91.
- 246 Buyue Y. The Effect of Factor IXa on Thrombin Generation Activity Determination: rFIXFc Vs. BeneFIX® [Internet]. **2011**. Available from: <https://ash.confex.com/ash/2011/webprogram/Paper42102.html>

- 247 Feng D, Stafford KA, Broze GJ, Stafford DW. Evidence of clinically significant extravascular stores of factor IX. *J Thromb Haemost JTH* **2013**; 11: 2176–8.
- 248 Ahmad SS, Rawala-Sheikh R, Monroe DM, Roberts HR, Walsh PN. Comparative platelet binding and kinetic studies with normal and variant factor IXa molecules. *J Biol Chem* **1990**; 265: 20907–11.
- 249 Griffith MJ, Breitskreutz L, Trapp H, Briet E, Noyes CM, Lundblad RL, Roberts HR. Characterization of the clotting activities of structurally different forms of activated factor IX. Enzymatic properties of normal human factor IXa alpha, factor IXa beta, and activated factor IX Chapel Hill. *J Clin Invest* **1985**; 75: 4–10.