



HAL
open science

Etude du mode d'action d'agents contournant l'action du facteur VIII dans l'hémophilie A

Stephen Ferrière

► **To cite this version:**

Stephen Ferrière. Etude du mode d'action d'agents contournant l'action du facteur VIII dans l'hémophilie A. Biochimie [q-bio.BM]. Université Paris-Saclay, 2020. Français. ⟨NNT : 2020UPASQ017⟩. ⟨tel-03220421⟩

HAL Id: tel-03220421

<https://theses.hal.science/tel-03220421v1>

Submitted on 7 May 2021

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.



HAL Authorization

Etude du mode d'action d'agents contournant l'action du facteur VIII dans l'hémophilie A

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°569, Innovation Thérapeutique,
du Fondamental à l'Appliqué (ITFA)
Spécialité de doctorat : physiologie, physiopathologie
Unité de recherche : Université Paris-Saclay, Inserm, HITH,
UMR_S1176, 94276, Le Kremlin Bicêtre, France
Référent : Faculté de Pharmacie

**Thèse présentée et soutenue en visioconférence totale
au Kremlin-Bicêtre, le 27 Novembre 2020, par**

Stephen FERRIERE

Composition du Jury

Delphine BORGEL

PU-PH, INSERM U1176
Université Paris Saclay

Présidente du jury

Véronique REGNAULT

Dr, INSERM U1148
Université de Lorraine

Rapporteur & Examinatrice

Philippe NGUYEN

PU-PH, Unité HERVI-EA 3801
Université de Reims Champagne-Ardenne

Rapporteur & Examineur

Marie-Christine BOUTON

Dr, INSERM U1148
Université de Paris

Examinatrice

Peter LENTING

Dr, INSERM U1176
Université Paris Saclay

Directeur de thèse

Alexandre KAUSKOT

CR, INSERM U1176
Université Paris Saclay

Co-Directeur de thèse

Table des matières

REMERCIEMENTS	5
LISTE D'ABREVIATIONS	6
INTRODUCTION	7
1) L'HEMOPHILIE A	8
1.1) Définition	8
1.2) Les causes génétiques de la maladie	8
1.3) Les signes cliniques et complications de la maladie	10
1.4) Le facteur VIII (FVIII) de la coagulation	10
1.4.1) Structure du FVIII	10
1.4.2) Synthèse et sécrétion du FVIII.....	12
1.4.3) Complexe FVIII/FvW	13
1.4.4) Clairance du FVIII.....	14
1.4.5) Activation et inactivation du FVIII	14
1.5) L'hémostase chez l'individu sain et chez le patient hémophile A	16
1.5.1) Hémostase primaire	16
1.5.2) Hémostase secondaire	16
1.6) Les traitements de l'hémophilie A	19
1.6.1) Traitements des saignements par la prophylaxie	19
1.6.2) Les produits thérapeutiques utilisés	20
1.6.3) La nouvelle génération de produits thérapeutiques.....	20
1.7) Le développement d'inhibiteurs anti-facteurs de la coagulation	22
1.8) Les traitements de l'hémophilie A avec inhibiteurs	22
1.9) Les modèles animaux expérimentaux dans l'hémophilie A	23
1.9.1) Les animaux avec une hémophilie A congénitale	23
1.9.2) Les modèles animaux d'hémophilie A génétiquement modifiés	24
1.9.3) Les modèles animaux d'hémophilie A acquise	26
2) LE FACTEUR VIIa (FVIIa) DE LA COAGULATION	28
2.1) Structure du gène F7 et ARN	28
2.2) La structure du FVII	28
2.2.1) Vitamine K, domaine Gla et γ -carboxylation	29
2.2.2) La β -hydroxylation et les domaines EGF-like	31
2.2.3) Le domaine sérine-protéase	32
2.3) L'activation du FVII en FVIIa	32
2.4) Son cofacteur : le facteur tissulaire	34
2.5) Les sites d'interactions et les changements de conformation du complexe FVIIa/FT	35
2.5.1) L'activation allostérique du FVIIa	35
2.5.2) L'importance des ions métalliques divalents.....	36
2.5.3) Le repositionnement du site actif du FVIIa	36
2.5.4) La stabilisation du FVIIa dans l'espace	37
2.5.5) Les interactions entre le FT et les substrats macromoléculaires	38
2.6) Utilisation du FVIIa recombinant (rFVIIa) dans l'hémophilie A	39
2.6.1) Le développement du rFVIIa.....	39

2.6.2) Le mécanisme d'action du rFVIIa	39
3) L'ANTICORPS BISPECIFIQUE EMICIZUMAB	40
3.1) Structure d'immunoglobuline conventionnelle	40
3.2) Synthèse et mode d'action de l'emicizumab	43
3.3) Comparaison des propriétés moléculaires de l'emicizumab et du FVIIIa	45
3.3.1) Interactions avec FIX/FX et stœchiométrie du complexe tenase	45
3.3.2) Spécificité de liaison et affinité d'interactions	46
3.3.3) Activité cofacteur et régulation	46
3.4) Détermination de l'effet de l'emicizumab dans des tests d'activité	47
3.5) Détermination de l'effet de l'emicizumab dans des essais cliniques.....	49
4) LES ANTICORPS À DOMAINE UNIQUE OU NANOBODIES	50
4.1) Mise en évidence des anticorps à chaîne lourde.....	50
4.1.1) Les anticorps à chaîne lourde chez les camélidés	50
4.1.2) Les anticorps à chaîne lourde chez d'autres espèces animales	52
4.2) Mise en évidence des nanobodies	52
4.2.1) Structure des nanobodies.....	52
4.2.2) Génétique des nanobodies	54
4.3) Utilisations et applications des nanobodies	56
4.3.1) Caractérisations des propriétés des nanobodies	56
4.3.2) Applications en recherche, diagnostic et thérapeutique	56
RESULTATS EXPERIMENTAUX ET ARTICLES	58
DISCUSSION	92
BIBLIOGRAPHIE	106

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Dr Véronique Regnault et le Pr Philippe Nguyen d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et d'avoir lu avec attention mon manuscrit. De la même manière, je tiens à remercier aussi le Dr Marie-Christine Bouton et le Pr Delphine Borgel d'avoir accepté d'examiner cette thèse.

Ma présence dans le laboratoire situé au rez-de-chaussée du numéro 47 bâtiment Grégory Pincus de l'hôpital du Kremlin-Bicêtre a été assez longue, j'ai la connaissance de très nombreuses personnes donc cette liste de remerciements est loin d'être exhaustive.

Je remercie tout d'abord le Dr Cécile Denis de m'avoir accepté dans cette unité INSERM 1176 il y a de cela près de 5 ans et de m'avoir offert un endroit où effectuer mes passionnants travaux de recherche dans les meilleures conditions.

Je remercie mes directeurs de thèse, les Dr Peter Lenting et Dr Alexandre Kauskot, pour leur efficace encadrement ainsi que leur soutien personnel dans le déroulement des différents travaux de recherche sur lesquels j'ai travaillé, ainsi que pour les intéressantes discussions scientifiques que nous avons eu au cours de ces années.

Je remercie tous mes collègues secrétaires, techniciens, ingénieurs et post-doctorants qui m'ont épaulé indirectement ou directement durant toutes ces années, en étant une aide complémentaire à celle déjà apportée par Peter et Alexandre, et que j'ai vu quitter le laboratoire un à un au cours de toutes ces années.

Je remercie mes collègues doctorants pour le temps passé à leur côté dans le bureau ainsi que la bonne atmosphère qui y régnait (et y règne encore très certainement), ce sera très bientôt votre tour d'écrire votre thèse mais cela devrait évidemment bien se passer.

Enfin, je remercie ma mère et mes sœurs pour le soutien infailible qu'elles m'ont toujours témoigné ainsi que pour avoir fait vivre ce chaleureux foyer qu'il était toujours appréciable de retrouver après une dure journée de travail.

PS : si tu ne te reconnais pas dans ces remerciements et que tu lis cette thèse par hasard, et bien je te remercie aussi pour y avoir consacré un peu de ton temps, en espérant que tu trouves la lecture passionnante.

LISTE D'ABREVIATIONS

CDR	Complementary-Determining Region
CH	Constant Region of Heavy Chain
CL	Constant Region of Light Chain
CLEC4M	C-type Lectin domain family 4 Member M
EGF	Epidermal Growth Factor
Fc	Fragment Cristallisable
FEIBA	Factor Eight Inhibitor Bypassing Activity
FR	Framework Region
FSAP	Factor Seven Activating Protease
FT	Facteur Tissulaire
FV	Facteur V
FVa	Facteur V activé
FVII	Facteur VII
FVIIa	Facteur VII activé
FVIII	Facteur VIII
FVIIIa	Facteur VIIIa
FIX	Facteur IX
FIXa	Facteur IX activé
FX	Facteur X
FXa	Facteur X activé
FXIa	Facteur XI activé
FXIII	Facteur XIII
FXIIIa	Facteur XIII activé
FvW	Facteur de von Willebrand
Gas6	Growth Arrest Specific gene 6
Ig	Immunoglobuline
kDa	kilo Dalton
LMAN1	Lectin Mannose binding 1
LRP1	LDL receptor-related protein-1
MCFD2	Multiple Coagulation Factor Deficiency 2
MGP	Matrix Gla Protein
PAR	Protease-Activated Receptor
Pb	Paire de base
PCa	Protéine C activée
PEG	Polyéthylène Glycol
PRGP1/PRGP2	Proline-rich Gla protein 1/2
RE	Réticulum endoplasmique
rFVIIa	Facteur VII activé recombinant
rFVIII	Facteur VIII activé recombinant
TCA	Temps de Céphaline avec Activateur
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
TGT	Test de Génération de Thrombine
TMG 3/TMG 4	Transmembrane Gla protein 3/4
VH	Variable Region of Heavy Chain
VHH	Heavy Chain only Variable Region
VL	Variable Region of Light Chain

INTRODUCTION

1) L'HEMOPHILIE A

1.1) Définition

L'hémophilie A est une maladie hémorragique due à un déficit en facteur VIII de la coagulation (FVIII), héréditaire liée à l'X dont l'occurrence est d'environ 1 sur 5000 naissances masculines (1). La sévérité de la maladie est variable et est corrélée au taux résiduel circulant du FVIII de la coagulation, il est ainsi possible de caractériser 3 groupes de patients : les patients avec une hémophilie A sévère ont un taux de FVIII inférieur à 1 UI/dL (<1%), les patients avec une hémophilie A modérée ou mineure ont respectivement leur taux de FVIII compris entre 1-5 UI/dL (1-5%) ou entre 5-40 UI/dL (5-40%) (2). Les patients avec une hémophilie A mineure représentent 50% de la population des patients, tandis que ceux atteints d'hémophilie modérée ou sévère représentent respectivement 10% et 40% de la population des patients (3). Le mode de transmission récessif lié à l'X a pour conséquence l'apparition de la maladie très majoritairement chez les individus masculins. Les individus féminins sont quant à eux généralement décrits comme des porteurs asymptomatiques de la maladie. Cependant, elles peuvent être symptomatiques et ainsi présenter un phénotype mineur de la maladie dans les cas où elles auraient des taux subnormaux de FVIII (4). Plus rarement, des phénotypes modérés ou sévères de la maladie ont été décrits (5). De plus, les individus féminins porteurs présentant des taux de FVIII normaux ou à la limite des taux normaux (40-60%) peuvent voir leur condition de vie se dégrader suite à des menstruations importantes (ménorragies) et une carence en fer en plus d'une augmentation des saignements suite à des traumatismes ou bien des épisodes chirurgicaux (6).

1.2) Les causes génétiques de la maladie

Le gène codant le FVIII (gène F8) est situé à l'extrémité du bras long du chromosome X, en position Xq28, et s'étend sur 186 kb. Ce gène F8 comprend 26 exons et 25 introns. Les anomalies génétiques à l'origine de l'hémophilie A sont extrêmement variées et participent à l'hétérogénéité phénotypique rencontrée dans cette pathologie (7). Les anomalies touchant le gène F8 comprennent des mutations ponctuelles, des délétions/insertions de séquences/nucléotides ainsi que des réarrangements géniques. Les mutations ponctuelles constituent la plus fréquente anomalie génétique et sont retrouvées chez plus de la moitié de la population hémophile. Elles comprennent des mutations faux-sens, des mutations non-sens ainsi que des mutations affectant l'épissage des ARNm (8–10). Les mutations faux-sens conservatives sont associées à un phénotype mineur sauf si elles touchent des régions importantes pour la fonction ou la structure du FVIII. A l'inverse, les substitutions non conservatives sont plutôt associées à un phénotype modéré voire sévère, en raison d'un risque accru de générer un FVIII dont la structure est déstabilisée. Les mutations non-sens, à

l'origine de codons stop prématurés, se traduisent par une protéine tronquée ayant de fortes chances de ne pas être fonctionnelle. Ces mutations sont de ce fait associées à une forme sévère d'hémophilie A. Les effets des mutations qui abolissent ou génèrent des sites d'épissage sont variables, selon que les transcrits produits sont convenablement traduits (hémophilie mineure/modérée) ou non (hémophilie sévère). Les délétions sont retrouvées chez 5 à 10% des patients. Elles peuvent éliminer une grande partie du gène F8 ou encore être à l'origine d'un décalage dans le cadre de lecture. Les délétions sont généralement associées à un phénotype sévère. Les réarrangements géniques sont des événements assez rares, à l'exception de l'inversion de l'intron 22, dont la prévalence est de 45-50% chez les patients hémophiles A sévères (11,12). Suite à une recombinaison homologue, le gène F8 se retrouve interrompu, avec les exons 1-22 dans une direction et les exons 23-26 dans l'autre direction. La production d'un ARNm contenant tous les exons n'est dès lors plus possible, il n'y a pas de production de FVIII et un phénotype sévère en résulte. Il a été récemment observé que des patients présentant une inversion de l'intron 22 arrivaient à synthétiser du FVIII sous la forme de deux chaînes polypeptidiques dépourvues d'activité et exclusivement retrouvées à l'intérieur de certains types cellulaires, comme les cellules mononucléées issues du sang périphérique mais les résultats sont controversés (13). Enfin, chez certains patients, le FVIII est produit mais n'est pas fonctionnel : 5% des patients hémophiles A possèdent du FVIII circulant à un niveau normal mais aucune activité biologique n'est détectable dans le plasma (14). Alors que la majorité des mutations touche le gène codant le FVIII (gène F8), il est intéressant de noter l'existence de cas d'hémophilie A consécutive à des mutations touchant des protéines impliquées dans le trafic intracellulaire du FVIII. En effet, dans l'exemple d'un trouble hémorragique nommé déficit combiné en facteur V (FV) de la coagulation et FVIII, le déficit en ces deux facteurs de coagulation est dû à des mutations touchant deux gènes différents, LMAN1 (Lectin Mannose binding 1) et MCFD2 (Multiple Coagulation Factor Deficiency 2). Ces deux gènes codent pour une protéine transmembranaire (LMAN1) et sa protéine cofacteur (MCFD2), le complexe des deux protéines agissant comme un récepteur cargo. Il permet en outre le transfert du FV et du FVIII du réticulum endoplasmique (RE) vers le Golgi et un manque de fonctionnalité de ce complexe impacte directement la sécrétion des deux facteurs de coagulation, se traduisant des faibles taux circulants (5-20%) et donc dans le cas du FVIII par un phénotype hémophile A modéré (15,16). Ainsi, le fait que les patients présentent un large spectre d'anomalies génétiques, qui se manifestent de manière variée sur le plan phénotypique, fait de l'hémophilie A une maladie très hétérogène.

1.3) Les signes cliniques et complications de la maladie

Les manifestations cliniques associées à l'hémophilie A correspondent à des épisodes hémorragiques internes non contrôlés. La gravité et la fréquence de ces manifestations dépendent directement du taux de FVIII plasmatique circulant. Chez les patients hémophiles mineurs, les saignements ne sont pas spontanés et font suite en général à un traumatisme grave ou à une intervention chirurgicale, tandis que chez les patients hémophiles modérés, des saignements peuvent survenir après des traumatismes peu importants. Enfin, dans les formes les plus sévères de la maladie, des hémorragies spontanées en particulier au niveau des articulations et des tissus mous (peau, tendons, ligaments, muscles etc) sont observées. Des manifestations hémorragiques notamment intracrâniennes peuvent parfois se produire à la naissance, mais en général, les manifestations hémorragiques n'apparaissent que lors de l'apprentissage de la marche. Les saignements chroniques au niveau des articulations, appelés hémarthroses, conduisent au développement d'arthropathies fortement invalidantes, en particulier au niveau des hanches et des genoux, et à une morbidité élevée (17). Dans les pays développés, l'hémorragie intracérébrale est la principale cause de mortalité chez les patients hémophiles A, en dehors des maladies infectieuses telles que les infections au VIH (virus de l'immunodéficience humaine) et au VHC (virus de l'hépatite C) transmises dans les années 1980 par les traitements dérivés de plasma.

1.4) Le facteur VIII (FVIII) de la coagulation

1.4.1) Structure du FVIII

Le FVIII est une glycoprotéine synthétisée sous la forme d'une chaîne polypeptidique simple de 330 kilo Dalton (kDa) et dont la structure s'organise en différents domaines : 3 domaines A (A1, A2, A3), un domaine B et 2 domaines C (C1, C2) (18). Chacun des 3 domaines A délimite une région d'environ 330 acides aminés, répartie de la manière suivante sur la protéine : le domaine A1 des acides aminés 1-336, le domaine A2 des acides aminés 373-710 et le domaine A3 des acides aminés 1690-2019. Le domaine B, de 907 acides aminés, a une place centrale et s'intercale entre les domaines A2 et A3, des acides aminés 741-1648. Enfin, les 2 domaines C correspondent à des régions d'environ 160 acides aminés : le domaine C1 des acides aminés 2020-2172 et le domaine C2 des acides aminés 2173-2332 (19). Il est aussi important de noter l'existence de petites régions (a1, a2, a3) riches en acides aminés acides Glu et Asp. Ces régions sont situées en position C-terminale des domaines A1 et A2, et en position N-terminale du domaine A3 (a1 337-372, a2 711-740, a3 1649-1689) (20). Ces régions acides favorisent la sulfatation d'un certain nombre de tyrosines, aux positions Tyr 346, Tyr 718, Tyr 719, Tyr 721, Tyr 1664 et Tyr 1680. Cette sulfatation est un processus très important dans l'interaction du FVIII avec la thrombine et le facteur de von Willebrand (FvW)

(21,22). La chaîne polypeptidique du FVIII s'organise donc ainsi : A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2. Les domaines A présentent environ 30% d'homologie de séquence entre eux, mais aussi avec d'autres protéines telles que le FV (40% d'homologie) ou encore la céruloplasmine (30% d'homologie), une protéine impliquée dans le transport du cuivre dans le sang (19,23). L'homologie de séquence avec la céruloplasmine entraîne que chaque molécule de FVIII est capable de lier un ion cuivre (24). Le domaine B est un domaine unique car il ne présente pas d'homologie de séquence avec d'autres protéines. Bien qu'il représente presque 40% de la protéine, sa fonction n'a pas été réellement caractérisée. En effet, il ne semble pas être nécessaire à l'activité pro-coagulante du FVIII (25), mais il pourrait avoir un rôle dans le transport intracellulaire du FVIII (26). Les domaines C1 et C2 présentent des homologies de séquence avec la discoidine I (20%), lectine tétramérique du *Dictyostelium discoidium*, qui présente une aptitude à lier les phospholipides chargés négativement (27). Les domaines A et C contiennent 19 des 23 cystéines présentes dans la séquence protéique et les ponts disulfures formés sont à l'intérieur des domaines plutôt qu'entre eux (28). Il est aussi important de noter que le motif consensus Asn-X-Ser/Thr, motif caractéristique des sites de N-glycosylation, apparaît 25 fois dans la séquence du FVIII, 19 sont situés dans le domaine B, ce qui suggère que ce domaine est extrêmement glycosylé comparé au reste de la protéine (Figure 1).

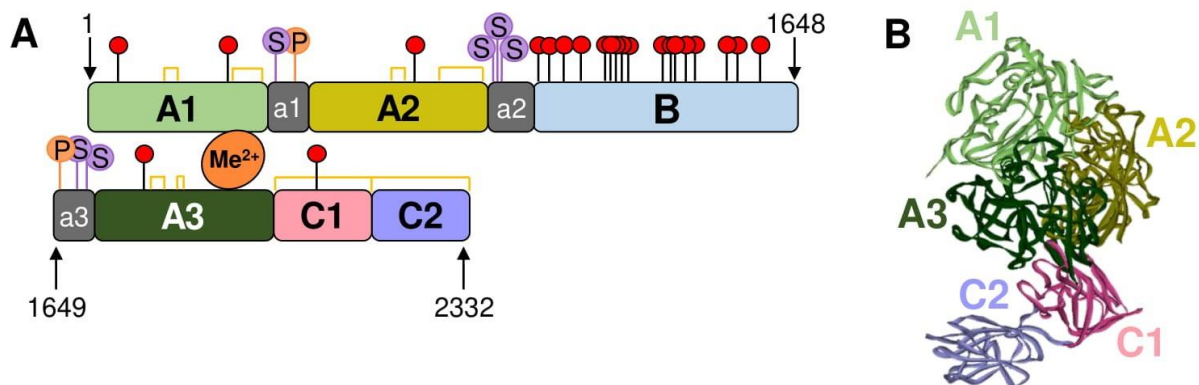


Figure 1 : A) Structure schématique du FVIII inactif. La protéine est représentée sous forme de deux chaînes, la première comprenant les domaines A1, A2 et B, tandis que la seconde comprend les domaines A3, C1 et C2. Les deux chaînes sont reliées par des liaisons électrostatiques dépendantes d'ions métalliques divalents indiqués Me^{2+} . Les sites de N-glycosylations sont indiqués par les symboles rouges. Les acides aminés modifiés par sulfatation ou phosphorylation sont respectivement indiqués par les symboles violets ou orange. Les ponts disulfures intra- ou inter-domaines sont représentés par les crochets orange. B) Structure cristallisée de la protéine permettant de situer les différents domaines dans l'espace. Le domaine B n'est pas structuré et n'est donc pas visible dans cette structure cristallisée.

1.4.2) Synthèse et sécrétion du FVIII

La détection d'ARNm et de protéine du FVIII au niveau hépatique ont permis de suggérer que le foie constitue le site majeur de production du FVIII circulant (29–31). Ainsi, il existe des cas de patients hémophiles qui ont pu voir une correction plus ou moins efficace de leur niveau de FVIII après une transplantation hépatique, ce qui corrobore cette hypothèse (32). D'autres observations ont montré la présence d'ARNm au niveau d'autres organes tels que la rate, les poumons, les ganglions ou encore les reins (31,33) suggérant que ces organes pourraient contribuer aux taux circulants de FVIII. En effet, une étude a mis en évidence une production extra-hépatique de FVIII chez des animaux ayant subi une hépatectomie totale (34) et d'autres études menées sur des cellules endothéliales pulmonaires ont montré que les poumons étaient capables de produire des quantités significatives de FVIII (35). Le type cellulaire dans le foie producteur du FVIII circulant a longtemps été sujet à débats, avec des études montrant la présence d'ARNm soit au niveau des hépatocytes (36), soit au niveau de populations de cellules endothéliales sinusoidales du foie (37,38). Grâce à l'utilisation de modèles souris présentant une délétion du gène F8 restreinte à certains types cellulaires spécifiques, il a été démontré que la protéine de FVIII n'est pas produite dans les hépatocytes mais dans les cellules endothéliales (39,40). Plus précisément, cette production de protéine FVIII est principalement limitée à des cellules endothéliales présentes dans le foie (cellules endothéliales sinusoidales) et dans les poumons (cellules endothéliales de la microvasculature pulmonaire). Des cellules endothéliales d'autres organes tels que les reins peuvent aussi contribuer à cette production de FVIII, mais dans une moindre mesure. La chaîne polypeptidique du FVIII est composée de 2351 acides aminés avec un peptide signal (19 acides aminés) permettant la translocation dans la lumière du RE. Au cours de son transport dans le système vésiculaire intracellulaire, le FVIII subit successivement plusieurs modifications post-traductionnelles : clivage du peptide signal, N-glycosylations et création de ponts disulfures dans le RE (41), O-glycosylations et sulfatations de tyrosines (42) et maturation des N-glycosylations après son transport dans l'appareil de Golgi (43). Le transport des molécules de FVIII du RE vers le Golgi requiert les protéines LMAN1/MCFD2. Il faut néanmoins noter que ce transport de la protéine vers le Golgi est limité par la rétention d'une certaine quantité de FVIII dans le RE, à cause d'interactions entre le domaine A1 du FVIII et différentes protéines chaperonnes (calréticuline, calnexine, Ig-binding protein BiP etc) (26). Enfin, les modifications post-traductionnelles du FVIII se concluent par des clivages protéolytiques au niveau des régions centrale et C-terminale du domaine B. En effet, celles-ci contiennent un motif consensus Arg-X-X-Arg reconnu par des endoprotéases de la famille des subtilisines-like (41,44). Il s'en suit alors deux clivages protéolytiques, au niveau des acides aminés Arg 1313 et Arg 1648, ce qui conduit à la sécrétion d'un FVIII hétérodimérique de 280 kDa. Ce FVIII hétérodimérique est composé d'une chaîne lourde (A1-a1-A2-a2-B) et d'une

chaîne légère (a3-A3-C1-C2). Les deux chaînes restent liées de façon non-covalente entre les domaines A1 et A3 grâce à des interactions électrostatiques dépendantes d'ions métalliques (45), notamment les ions cuivre, dont deux sites de liaison ont été retrouvés dans les domaines A1 et A3, et les ions calcium, dont le site de liaison est présent dans le domaine A3 (46,47).

1.4.3) Complexe FVIII/FvW

Précédemment nous avons évoqué que la production de FVIII se déroulait majoritairement dans différentes populations endothéliales, il est suggéré que le FVIII soit co-exprimé dans ces cellules avec le FvW, protéine chaperonne du FVIII (48,49). D'autres études semblent au contraire reporter des sites cellulaires distincts d'expression des deux protéines, en effet l'expression de FVIII a été observée dans certains types cellulaires endothéliales n'exprimant que peu ou pas le FvW (33,50). Néanmoins, une fois les deux protéines sécrétées dans la circulation sanguine, le FVIII s'associe directement au FvW (51). La formation de ce complexe non-covalent est extrêmement importante pour le maintien du FVIII dans la circulation, comme le montre sa demi-vie très courte lorsqu'il est injecté à des patients présentant une maladie de Willebrand de type 2N (défaut de liaison du FvW au FVIII) ou de type 3 (défaut de production du FvW) (52,53). Le FvW agit comme une protéine chaperonne du FVIII et permet d'allonger la durée de vie du FVIII en le protégeant d'une clairance trop rapide. Il assure aussi la stabilité et la disponibilité du FVIII dans la circulation grâce à différents mécanismes. Il protège le FVIII d'une dégradation par des protéases circulantes telles que le facteur X activé (FXa) ou la protéine C activée (PCa) (54,55). Il permet aussi d'éviter une éventuelle liaison prématurée du FVIII au facteur IX activé (FIXa) (56), une liaison prématurée aux plaquettes activées (57,58), et même l'endocytose du FVIII par des cellules (59,60). Enfin, il permet le transport du FVIII vers les sites de brèches vasculaires. {Kaufman, 1997} Cette association FVIII/FvW fait intervenir la chaîne légère du FVIII, et plus précisément la tyrosine sulfatée en position 1680 de la région acide a3 ainsi que le domaine C2 (61–63). Par ailleurs, des analyses par microscopie électronique et spectrométrie de masse ont montré que le domaine C1 du FVIII interagit également avec le FvW (64,65). Chaque monomère de FvW est capable de lier une molécule de FVIII avec une forte affinité inférieure à 1nM (66,67). Le ratio physiologique de molécules de FVIII par molécule de FvW est de 50:1 (68). Dans les conditions physiologiques, il est estimé que 2 à 5% du FVIII circule sous forme libre, non complexé au FvW (69,70).

1.4.4) Clairance du FVIII

La clairance du FVIII est dictée d'une part par sa liaison à sa molécule chaperonne le FvW, comme vu précédemment, et d'autre part par son interaction à des récepteurs d'endocytose exprimés à la surface des cellules « scavenger » (macrophages, cellules endothéliales). Le premier récepteur de clairance du FVIII a été identifié en 1999, il s'agit du LRP1 (LDL receptor-related protein-1) ou aussi appelé CD91 (59,71). La pertinence physiologique de ce récepteur dans la clairance du FVIII a été démontrée *in vivo* dans un modèle murin, dans lequel la délétion induite de LRP1 entraîne l'augmentation du FVIII plasmatique endogène et l'allongement de sa demi-vie (72). De plus, des études de deux polymorphismes dans le gène codant pour LRP1 (LRP1/D2080N et LRP1/A217V) ont démontré le rôle de ce récepteur dans la régulation du taux de FVIII plasmatique chez l'Homme (73). Le FVIII présente 3 sites potentiels de liaison au LRP1 : un site de faible affinité, situé au niveau du domaine C2 (59), et deux sites de haute affinité localisés au niveau des domaines A2 et A3 (74,75). En conditions physiologiques, le site de liaison situé au niveau du domaine A2 de la chaîne lourde n'est exposé qu'après clivage protéolytique du FVIII (76). Il semble ainsi que le FVIII intact se lie au LRP1 seulement via sa chaîne légère, tandis que le FVIII activé (FVIIIa) se lie au LRP1 via sa chaîne lourde et légère. Par ailleurs, la liaison entre le FvW et le FVIII au niveau de sa chaîne légère de ce dernier interfère avec la liaison de LRP1 au domaine C2 du FVIII (59). D'autres études ont montré le rôle d'un composant de la matrice extracellulaire, les protéoglycanes d'héparines sulfatées, dans la clairance des ligands du LRP1. Ces protéoglycanes conduiraient à une augmentation de la concentration locale du FVIII à la surface cellulaire, permettant ainsi une diffusion latérale vers LRP1 (71,77). De plus, le blocage des protéoglycanes d'héparines sulfatées entraînait une diminution de la clairance du FVIII par LRP1 (78). Hormis LRP1, un certain nombre d'autres récepteurs pouvant lier et endocyter le FVIII ont été identifiés, tels que CLEC4M (C-type Lectin domain family 4 Member M) et Siglec-5 (79,80). Il faut aussi prendre note que la clairance du FVIII est majoritairement régulée par sa protéine chaperonne le FvW. En effet, plus de 95% du FVIII est en complexe avec cette protéine (81). Il est intéressant de noter que certains des récepteurs qui peuvent lier le FVIII peuvent aussi reconnaître le FvW (tels que les récepteurs LRP1, CLEC4M et Siglec-5 précédemment cités) (81).

1.4.5) Activation et inactivation du FVIII

Bien que le FVIII soit capable de transloquer jusqu'au site de la lésion vasculaire sans l'aide du FvW, être en complexe avec le FvW facilite toutefois son transport vers les sites de formation de thrombus. Le FVIII ainsi accumulé sur le site de saignement est activé par la thrombine. Cette activation se fait par des clivages protéolytiques au niveau des acides aminés Arg 372 et Arg 740 de la chaîne lourde, et de l'acide aminé Arg 1689 de la chaîne légère, cette

dernière coupure dissociant le FVIII du FvW. La protéolyse du FVIII par la thrombine génère 3 fragments différents, un fragment A1-a1, un fragment A2-a2 et un dernier fragment A3-C1-C2. Des interactions électrostatiques relient le fragment A1-a1 au fragment A2-a2, le FVIII devient donc du FVIIIa (Figure 2). Ce changement de conformation du FVIII en FVIIIa augmente son affinité pour les phospholipides d'un facteur 10 (82). Le FVIIIa se lie à la membrane phospholipidique via son domaine C2 (83). Pour obtenir des interactions optimales, un alignement correct avec le domaine C1 est nécessaire. En effet, des mutations dans le domaine C1 peuvent perturber les interactions entre le domaine C2 et la surface de phospholipides (84). Concernant l'inactivation du FVIIIa, elle est essentiellement due à la dissociation spontanée de la liaison ionique entre le fragment A2-a2 et le dimère de fragments A1-a1/A3-C1-C2 (45,85,86). Le FVIIIa peut aussi être inactivé après dégradation protéolytique par la PCa, le FXa et la plasmine (87,88).

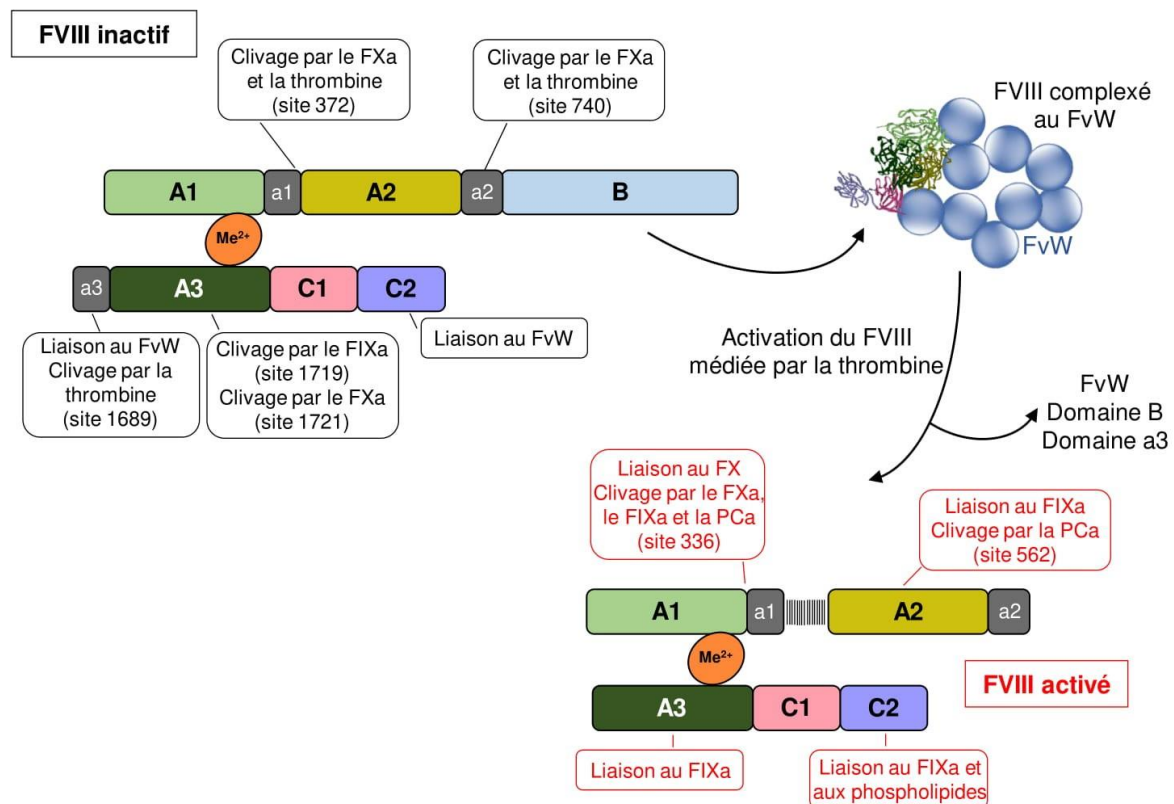


Figure 2 : Schéma d'activation du FVIII et recensement des différents sites d'interaction d'intérêt présents sur la molécule. Le FVIII inactif circule très majoritairement dans le sang en étant complexé à son cofacteur FvW. Le clivage par la thrombine sur différents sites clés du FVIII entraîne sa libération du FvW puis son activation. Les annotations dans les encadrés de couleur noire correspondent à des interactions dépendantes du FVIII inactif, tandis que les annotations dans les encadrés de couleur rouge correspondent à des interactions dépendantes du FVIII activé.

1.5) L'hémostase chez l'individu sain et chez le patient hémophile A

Le FVIII est un des composants clés du processus complexe et intriqué que constitue l'hémostase. L'hémostase comprend l'ensemble des mécanismes qui concourent à la formation d'un caillot de fibrine destiné à stopper les pertes de sang et réguler le flux sanguin. C'est un processus qui est continu et en équilibre permanent. Classiquement, la distinction est faite entre l'hémostase dite primaire qui inclut une étape vasculaire et une étape plaquettaire, et l'hémostase secondaire qui comporte la cascade de coagulation.

1.5.1) Hémostase primaire

Lors d'une lésion vasculaire, chez un individu normal, l'hémostase primaire est déclenchée en seulement quelques secondes. Le sous-endothélium est ainsi exposé permettant le recrutement des plaquettes. La première phase est initiée par le FvW, qui forme un pont entre le complexe plaquettaire GPIIb/IX et les fibres de collagène présentes dans la matrice sous-endothéliale (89). Les plaquettes vont ensuite adhérer stablement au sous-endothélium par l'intermédiaire des glycoprotéines membranaires $\alpha_2\beta_1$ et GPVI (récepteurs du collagène). Les plaquettes activées libèrent le contenu de leurs granules contenant des éléments qui favorisent la vasoconstriction et l'agrégation plaquettaire. Dans le même temps, la membrane plaquettaire subit des transferts de phospholipides anioniques de la couche interne vers la couche externe, permettant ainsi l'activation de la cascade de la coagulation et un début de génération de thrombine. Ces traces de thrombine formées permettent de débiter la génération de fibrine et donc a fortiori la génération du « clou plaquettaire ». Chez les patients hémophiles A, l'adhésion et l'activation plaquettaire sont normales et permettent la génération des premières molécules de thrombine et la formation du « clou plaquettaire ».

1.5.2) Hémostase secondaire

D'un point de vue pratique, deux voies principales de coagulation peuvent être distinguées : la voie extrinsèque qui est initiée par l'exposition du facteur tissulaire (FT), et la voie intrinsèque qui est initiée via l'activation de contact par des surfaces chargées négativement telles que la silice (90). Cependant, l'existence de deux voies séparées l'une de l'autre n'est pas réaliste d'un point de vue biologique, et en effet il a été montré qu'il existe de nombreuses interactions entre ces deux voies (91). Ces deux voies sont composées d'une série de réactions protéolytiques successives dites « en cascade » dans lesquelles un zymogène d'une sérine protéase est activé pour devenir une enzyme active qui catalyse la réaction suivante. Outre l'activation des zymogènes de sérine protéases, nous retrouvons aussi l'activation de glycoprotéines cofacteurs en cofacteurs actifs et parmi eux, le FVIII est décrit comme un acteur majeur de la voie intrinsèque de la coagulation. Lors d'une brèche vasculaire, le FT forme, en

présence d'ions Ca^{2+} , un complexe avec le FVII activé (FVIIa) présent à l'état de traces dans le plasma. Ce complexe FVIIa/FT active alors le facteur X (FX) en FXa et le facteur IX (FIX) en FIXa. Le FXa active ensuite la prothrombine, permettant la génération des premières molécules de thrombine (92). Une boucle d'amplification de l'activation de la prothrombine en thrombine est alors établie. La thrombine est utilisée pour activer le facteur XIa (FXIa), ce qui permet par la suite une génération additionnelle de FIXa. Il est à noter que les polyphosphates relargués par les plaquettes ont été montrés comme pouvant accélérer l'activation du facteur XI médiée par la thrombine (93). De plus, la thrombine convertit aussi le FVIII et le FV en leurs formes activées. Le FIXa forme un complexe avec son cofacteur FVIIIa, à raison d'une molécule de FIXa liant une molécule de FVIIIa, en présence d'ions Ca^{2+} et d'une surface de phospholipides chargés négativement (par exemple les phosphatidylsérines de la membrane des plaquettes activées). Ce complexe est alors appelé complexe tenase et il accélère l'activation du FX. Le FXa forme à son tour un complexe avec son propre cofacteur, le FVa, un complexe que l'on nomme « prothrombinase ». Comme le nom le suggère, le rôle de ce complexe est d'amplifier l'activation de la prothrombine et donc de finalement former assez de thrombine pour transformer le fibrinogène soluble en fibrine insoluble. Cette fibrine peut alors consolider le caillot sanguin avec l'aide du facteur XIII activé (FXIIIa) (94). Chez les patients hémophiles A, le déficit en FVIII entraîne un défaut de formation du complexe « tenase ». Les quantités de thrombine générées sont faibles et ne permettent pas une consolidation suffisante du « clou plaquettaire », expliquant les hémorragies observées chez ces patients (Figure 3).

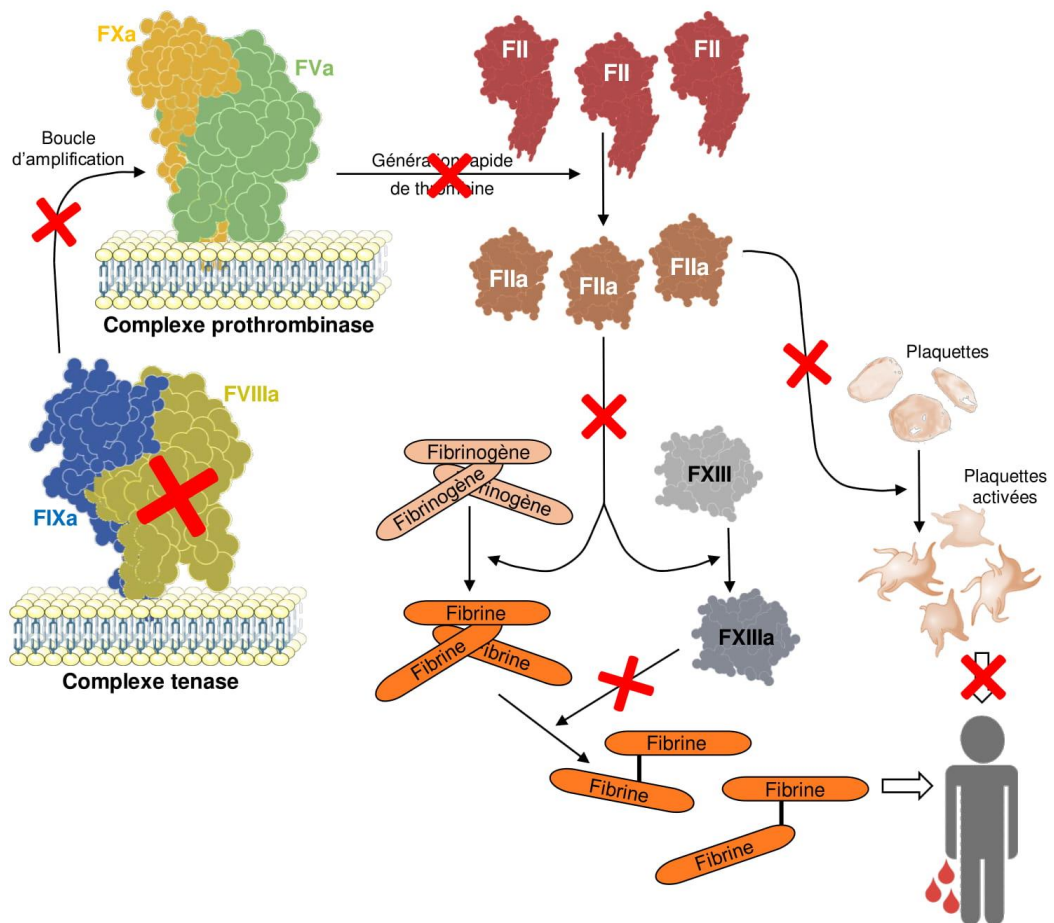
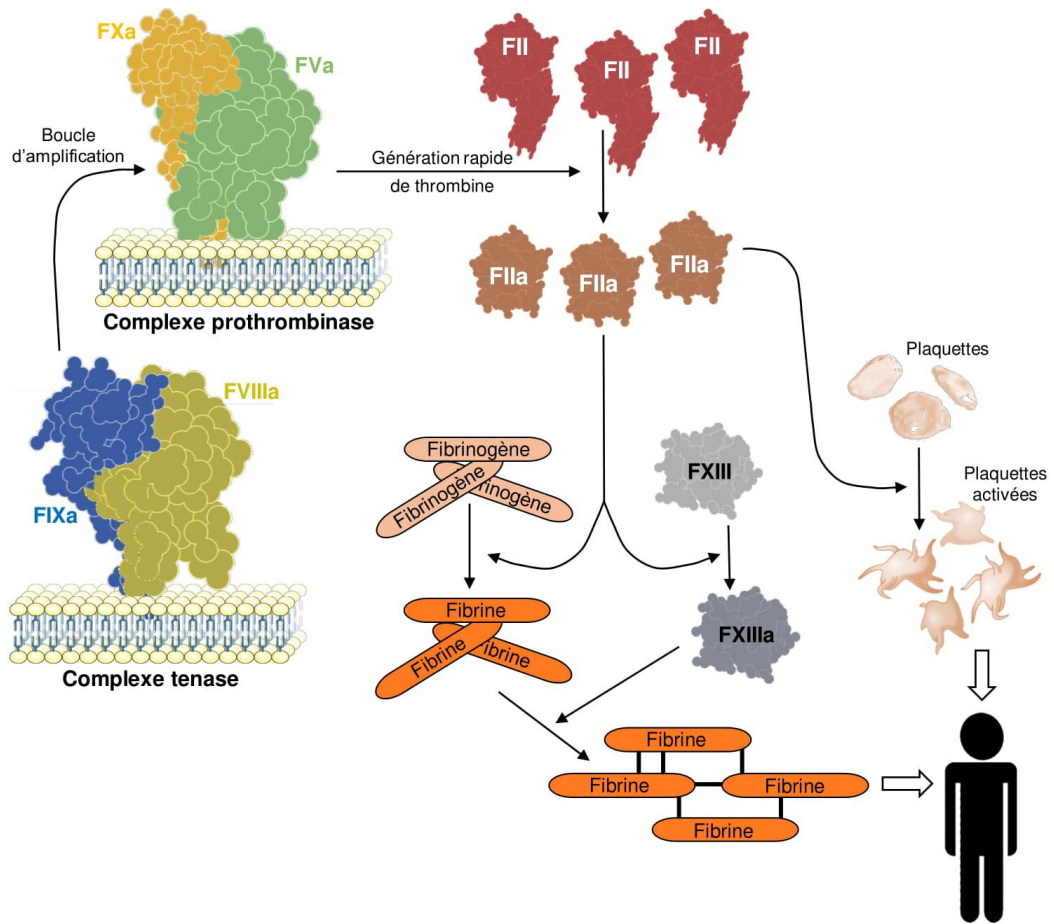


Figure 3 : Schémas comparant l'hémostase chez un sujet sain (schéma du haut) ou chez un patient hémophile A (schéma du bas) dans le cadre d'une lésion vasculaire. Chez le sujet sain, le FIX et le FVIII sont tous deux activés après la génération des premières traces de thrombine. En retour, le complexe tenase formé par le FIXa et son cofacteur FVIIIa (en présence d'une surface de phospholipides et d'ions Ca^{2+}) a pour rôle de générer de plus grandes quantités de FXa à partir de FX. À son tour, le complexe prothrombinase formé par le FXa et son cofacteur FVa (en présence d'une surface de phospholipides et d'ions Ca^{2+}) amplifie la génération de thrombine (indiquée FIIa). Cette thrombine remplit trois rôles principaux : la génération de fibrine insoluble à partir de fibrinogène soluble ; l'activation du FXIII en FXIIIa ; l'activation des plaquettes sanguines par interactions avec des récepteurs de surfaces. Le FXIIIa nouvellement formé va permettre la structuration des molécules de fibrine en un réseau stable. La présence simultanée de ce réseau stable de fibrine et des plaquettes activées formant un caillot permet l'arrêt rapide du saignement chez le sujet sain. En revanche chez le patient hémophile A, l'absence de FVIII entraîne la formation d'un complexe tenase déséquilibré où le FIXa doit remplir son rôle seul. Cela se traduit par une génération significativement plus faible de FXa, et donc a fortiori une génération plus faible de thrombine. En répercussion, moins de fibrine et moins de FXIIIa sont générés et cela a pour conséquence la formation d'un réseau de fibrine totalement instable et désorganisé. En conséquence, le patient hémophile est amené à saigner significativement plus longtemps que le sujet sain.

1.6) Les traitements de l'hémophilie A

1.6.1) Traitements des saignements par la prophylaxie

Pour soigner ou prévenir les saignements qui surviennent chez les patients hémophiles A, la stratégie thérapeutique la plus courante consiste en l'administration de FVIII exogène dit thérapeutique par voie intraveineuse substitutive. Le traitement vise à restaurer la quantité de FVIII fonctionnel dans la circulation sanguine. Le FVIII peut être administré aux patients soit à la demande, soit de manière prophylactique (c'est-à-dire de manière préventive). Les traitements à la demande font référence aux injections de FVIII lors d'un saignement. La dose appropriée à administrer et la durée du traitement dépendent de l'ampleur du saignement. Ainsi, pour des hémorragies mineures (hématomes mineurs, épistaxis), il suffit d'atteindre 40-60% du niveau normal de FVIII pour arrêter le saignement (95). En revanche, pour des hémorragies plus sévères (hématomes étendus, saignements gastro-intestinaux), les doses administrées sont beaucoup plus fortes (80-100%) et le traitement peut durer plusieurs semaines pour prévenir la survenue de saignements ultérieurs. Les traitements prophylactiques visent à empêcher les épisodes hémorragiques spontanés et la survenue de complications invalidantes chez les patients hémophiles A sévères. La prophylaxie consiste en des injections intraveineuses répétées de FVIII, à hauteur de 2 à 3 fois par semaine. Le pic des niveaux circulants de FVIII est atteint dans les 15 minutes suivant une injection, se traduisant souvent par une activité FVIII comprise entre 80 et 100%. Au cours du temps, les niveaux d'activité diminuent jusqu'à l'injection suivante. Selon les réactifs utilisés, les niveaux

circulants de FVIII varient entre moins d'1% jusqu'à 5% (96). D'un point de vue thérapeutique, il était recommandé dans un premier temps d'avoir des niveaux circulants de FVIII supérieurs à 1% car 1% d'activité FVIII est suffisant pour réduire énormément l'occurrence des saignements spontanés mais aussi le développement de problèmes articulaires chez les patients (97,98). Plus récemment, il a été proposé d'augmenter les niveaux circulants de FVIII à au moins 3% afin de protéger encore plus efficacement les patients de ce type de complications (99).

1.6.2) Les produits thérapeutiques utilisés

Jusqu'au début des années 1960, le traitement de l'hémophilie A était compliqué à cause d'un manque de thérapeutiques contenant suffisamment de quantités concentrées de FVIII. Ceci changea grâce à la découverte des cryoprécipités par le Dr Judith Poole. Dans cette technique, le plasma congelé est décongelé à basse température (4°C), résultant en la précipitation de plusieurs protéines plasmatiques dont le complexe FVIII/FvW. Dans les années 1970-1980, la production de concentrés de FVIII a grandement évolué ce qui permit d'obtenir des concentrés de FVIII très purifiés (100). L'utilisation de concentrés de FVIII dérivés de plasma est devenue très compliquée dans le début des années 1980 lorsqu'il a été découvert que ces concentrés étaient contaminés avec des virus tels que le VIH et le VHC. Aujourd'hui, la sélection des donneurs et les méthodes d'inactivation virale appliquées au FVIII dérivés de plasma ont pratiquement éliminé ce risque infectieux. D'autres incertitudes demeurent, telles que la transmission du prion et de la maladie de Creutzfeldt Jacob (101). La contamination de patients hémophiles par des agents infectieux a favorisé le développement industriel de FVIII recombinants (rFVIII) clonés à partir de la séquence ADN de deux donneurs (102). Les FVIII recombinants actuellement utilisés sont produits soit par des cellules Chinese Hamster Ovary dans le cas de l'Advate®, soit par des cellules Baby Hamster Kidney dans le cas du Kogenate®. Un FVIII recombinant délété de son domaine B (car il ne participe pas à la fonction pro-coagulante de la protéine) est également utilisé, il se nomme Refacto®. La demi-vie moyenne des différents FVIII thérapeutiques est d'environ 8 à 12 heures.

1.6.3) La nouvelle génération de produits thérapeutiques

Plus récemment, de nouvelles générations de FVIII recombinant « à longue durée de vie » ont été développées afin de diminuer la fréquence d'injections de FVIII. Pour cela, deux stratégies différentes ont été utilisées. La première est de lier de manière covalente le FVIII à différents polymères de polyéthylène glycol (PEG) par liaison à une cystéine libre spécifique (au niveau des domaines A2, A3 ou B) ou à un résidu glycane spécifique (103). Cependant, l'augmentation de la demi-vie observée chez les patients reste assez modeste, une

augmentation d'environ 1,5 fois ce qui équivaut à environ 18h (104). La seconde stratégie consiste à fusionner le FVIII au fragment cristallisable Fc de l'IgG1 humaine, en tirant avantage de l'interaction du Fc des IgG avec le récepteur Fc néonatal (FcRn), car c'est un mécanisme physiologique qui protège les IgG de la dégradation lysosomale. Cependant, là encore, la demi-vie de la protéine de fusion ne dépasse pas plus qu'environ 18h (105). L'amélioration limitée de la demi-vie du FVIII par ces techniques est due aux interactions FVIII/FvW qui régissent la clairance du facteur de coagulation (81). Afin de dépasser cette limitation, de nouvelles molécules sont en développement, telles qu'une protéine de fusion FVIII-nanobody ou une protéine de fusion FVIII-Fc/FvW, toutes deux ayant le potentiel de pouvoir circuler indépendamment du FvW (106,107) (Figure 4).

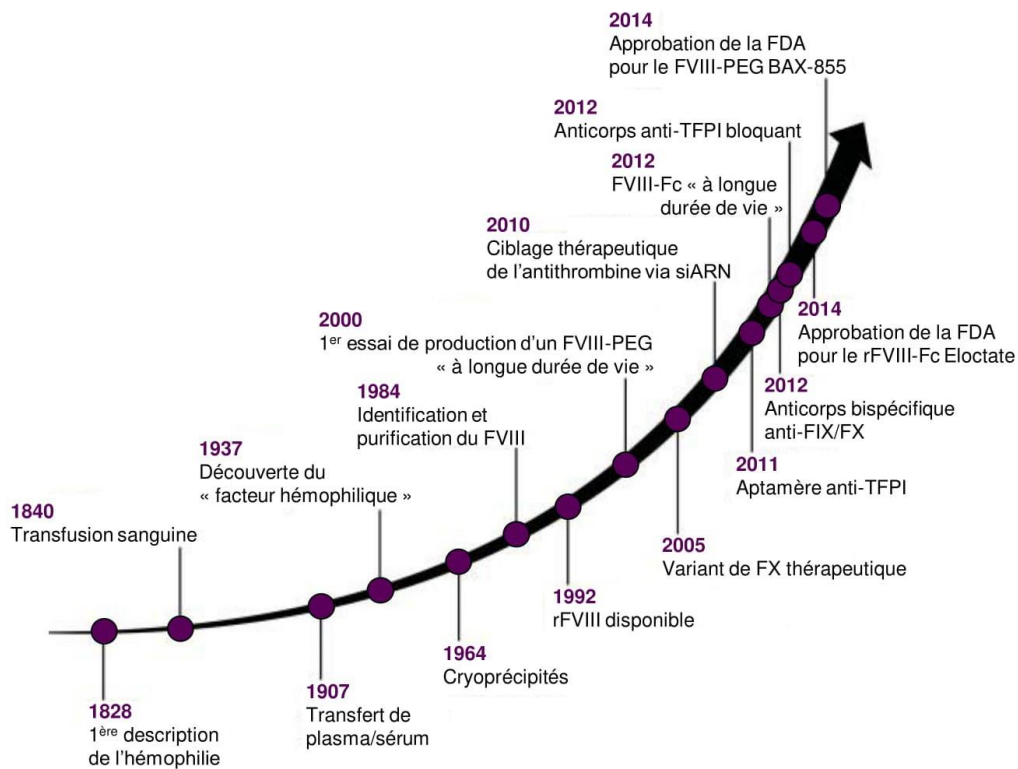


Figure 4 : Frise chronologique des traitements de l'hémophilie A (adaptée de Muczynski et al., 2017) (100). De nombreuses avancées scientifiques ont permis depuis la description de la maladie l'émergence des plus récentes stratégies thérapeutiques.

1.7) Le développement d'inhibiteurs anti-facteurs de la coagulation

La principale complication de l'injection de FVIII est le déclenchement d'une réponse immunitaire qui se manifeste par la génération d'anticorps dirigés contre le FVIII thérapeutique administré. Certains anticorps, dits inhibiteurs, neutralisent l'activité pro-coagulante du FVIII injecté (108,109). Les patients deviennent réfractaires au traitement, qui perd alors son efficacité. Ceci entraîne une dégradation de leur qualité de vie ainsi qu'une complication de leur prise en charge clinique. Le développement d'anticorps inhibiteurs survient chez près de 30% des patients hémophiles A sévères. Ces anticorps apparaissent généralement après 15-20 jours cumulés d'exposition au FVIII (110,111). Les anticorps inhibiteurs sont également générés chez les hémophiles A mineurs et modérés, avec une incidence de 5-10% après 50 jours d'exposition au FVIII (112,113).

1.8) Les traitements de l'hémophilie A avec inhibiteurs

La réponse inhibitrice est évaluée par une variante de la méthode Bethesda développée à Nijmegen. Le titre inhibiteur est estimé en unités Bethesda (UB), 1 UB correspondant à la dilution du plasma testé capable de neutraliser 50% de l'activité pro-coagulante du FVIII d'un plasma normal. Le seuil de positivité est fixé à 0,6 UB. Parmi les patients hémophiles A ayant développé des inhibiteurs, on distingue les « faibles » répondeurs (<5UB), et les forts « répondeurs » (>5UB). Les faibles répondeurs gardent un titre inhibiteur inférieur à 5UB, malgré la poursuite des injections de FVIII, tandis que les forts répondeurs présentent un titre inhibiteur qui peut augmenter après chaque nouvelle exposition au FVIII (réponse anamnestic). Dans le cas d'un patient hémophile A « faible répondeur », les doses de FVIII sont augmentées pour saturer les inhibiteurs. En revanche, cette stratégie s'avère inefficace chez les patients hémophiles A « forts répondeurs ». Ces patients sont traités avec des agents dépourvus de FVIII, tels que des facteurs activés du complexe prothrombinase (Factor Eight Inhibitor Bypassing Activity FEIBA ®) (114,115), ou du FVIIa recombinant (Novoseven ®) (116,117). Toutefois, l'utilisation de ces produits, qui court-circuitent le FVIII dans la cascade de la coagulation, n'est pas aussi efficace que le traitement substitutif. Enfin, un protocole d'induction de tolérance immunitaire est également proposé au patient. Ce protocole consiste en l'administration répétée de fortes doses de FVIII, pouvant parfois être associée à un traitement immunosuppresseur (cyclophosphamide). Ces traitements font disparaître les inhibiteurs chez 65-70% des patients, mais sont contraignants pour le patient et extrêmement coûteux (118). De plus, le risque d'échec n'est pas négligeable (30-35% des patients traités) et jusqu'à 30% des patients rendus tolérants au FVIII développent à nouveau des anticorps inhibiteurs (119). Pour les 30-35% de patients chez qui les inhibiteurs subsistent car l'induction de tolérance immunitaire a échoué, les approches plus modernes consistent en soit une

thérapie avec un anticorps monoclonal anti-CD20 appelé Rituximab (120), soit un nouveau protocole d'induction de tolérance immunitaire avec un FVIII contenant du FvW (121). Enfin plus récemment, un anticorps bi-spécifique mimant l'activité du FVIIIa (emicizumab, Hemlibra®) a été développé (122). Ainsi, l'apparition d'inhibiteurs du FVIII chez le patient hémophile A pose à la fois un problème clinique et sociétal. D'une part, la qualité de vie des patients est dramatiquement affectée, et les taux de morbidité et de mortalité augmentent (123), et d'autre part, le coût de la prise en charge de ces patients est très largement augmenté (124).

1.9) Les modèles animaux expérimentaux dans l'hémophilie A

Les modèles animaux dans l'hémophilie A ont été et sont toujours essentiels dans le développement de nouveaux traitements contre la maladie. Ils sont divisés en trois groupes, les animaux qui présentent une hémophilie A congénitale et ceux avec un phénotype hémophile A induit expérimentalement, que cela soit par modifications génétiques ou à l'aide d'anticorps.

1.9.1) Les animaux avec une hémophilie A congénitale

Les espèces animales décrites présentant une hémophilie A congénitale sont le chien, le mouton, le chat ou encore le cheval. Néanmoins, le modèle canin est sans aucun doute le modèle animal principal d'hémophilie A, en plus d'être le premier modèle animal décrit pour la maladie en 1946 (125). En 1949, une équipe de Chapel Hill aux Etats Unis a été la première à obtenir une colonie de chiens hémophiles A de type Setter irlandais (126). D'autres colonies réalisées sur d'autres races de chiens ont par la suite vu le jour. Ces différentes colonies ont permis d'avancer considérablement les recherches de thérapie pour l'hémophilie A. En effet, le chien hémophile A présente le même mode de transmission de la maladie que l'Homme ainsi que les mêmes manifestations cliniques (hémarthroses, hématomes sous-cutanés et hémorragies post-trauma) (127). L'hémophilie A peut donc également être classée chez le chien selon la même échelle de sévérité de phénotype, allant de mineur à sévère. De plus, l'apparition d'inhibiteurs du FVIII exogène a aussi été observée chez le chien hémophile A, à des fréquences relativement similaires à celles observées chez les patients hémophiles A. En effet, dans une étude de 1984, après plusieurs administrations de FVIII canin (obtenu à partir de cryoprécipités de plasma canin), 5 chiens parmi un groupe de 15 chiens hémophiles A ont développé des anticorps inhibiteurs dirigés contre ce FVIII (128). Le modèle canin est donc un modèle proche de la pathologie humaine mais qui toutefois possède certaines limites conséquentes. Par exemple, il a été montré que ces animaux présentaient une réponse immunitaire très rapide à l'égard des protéines humaines, ce qui limite les essais de nouvelles thérapies utilisant des facteurs de coagulation d'origine humaine dans ces animaux (129). De

plus, le nombre limité d'animaux disponibles et le coût élevé du maintien d'une colonie de chiens hémophiles sont des facteurs limitant de leur utilisation. Ainsi de nos jours, les deux seules colonies de chiens hémophiles A qui sont maintenues sont celle de Chapel Hill et celle de la Queens University de Toronto au Canada (130). En ce qui concerne les autres espèces évoquées précédemment, je donnerais quelques informations sur l'hémophilie A chez le mouton et le cheval. Concernant le cheval, l'hémophilie A est une maladie très sévère chez cette espèce et la survie de ces animaux est extrêmement faible, trop pour être compatible avec une utilisation en tant que modèle animal (131). L'hémophilie A chez le mouton a été décrite plus tardivement que chez le chien (132,133), néanmoins cette espèce a pourtant été utilisée comme modèle animal dans plusieurs études concernant la thérapie cellulaire et/ou génétique dans l'hémophilie A (134,135). Malheureusement, le modèle ovin reprend les mêmes limitations que le modèle canin, en ajoutant aussi une disponibilité plus que limitée de FVIII ovin, ce qui empêche une utilisation extensive de ce modèle animal. Récemment, un modèle de rats hémophiles A a été obtenu suite à l'apparition d'une mutation spontanée au sein d'une lignée de rats WAG/RijY (136,137). La caractérisation de cette nouvelle lignée de rats nommée WAG/RijYcb permet de mettre en évidence une unique mutation faux-sens dans le gène F8 de ces rats. Contrairement à l'humain ou à la plupart des autres modèles animaux précédemment évoqués, le gène F8 se trouve sur le chromosome 18 chez le rat. De ce fait, la maladie est autosomale récessive et non liée à l'X. La mutation faux-sens entraîne une substitution d'acide aminé p.Leu176Pro dans le domaine A1 du FVIII des rats. Ces rats hémophiles A présentent un phénotype de la maladie similaire à celui observé chez les chiens et moutons hémophiles A. Il s'agit d'un modèle animal à l'interface entre les gros modèles animaux d'hémophilie A congénitale et les petits modèles animaux d'hémophilie A génétiquement modifiés.

1.9.2) Les modèles animaux d'hémophilie A génétiquement modifiés

Comme les petits mammifères sont simples à élever et relativement peu chers à maintenir en grand nombre, les souris sont des animaux populaires pour la recherche médicale et les essais précliniques. Bien que les souris ne présentent pas d'hémophilie A congénitale, les technologies d'édition du génome ont contribué au développement de plusieurs modèles murins d'hémophilie A. Leurs petites tailles en font de très bons modèles pour des études initiales lors du développement de nouvelles thérapies car la quantité de molécules tests à administrer reste faible. En 1995, les deux premiers modèles murins d'hémophilie A ont été établis, avec un fond génétique mixte entre souris 129/SV et souris C57Bl/6. Les deux souches de souris rendues déficientes en FVIII obtenues ont été générées grâce à la technique de « gene targeting » ainsi qu'à des manipulations de cellules souches embryonnaires (138). Une

cassette néomycine fût insérée au niveau de l'extrémité 3' de l'exon 16 du gène F8 de la première souche de souris, appelées souris E16, tandis que l'exon 17 du gène F8 de la seconde souche de souris, appelées souris E17, fût totalement perturbé par la technique de « gene disruption ». Ces deux exons ont été choisis comme cibles car de nombreuses mutations dans ces exons du gène F8 humain entraîne l'apparition d'une hémophilie A congénitale sévère (3). Les ARNm de FVIII obtenus dans les deux souches de souris se sont retrouvés tronqués et en accord avec cette observation, les niveaux de FVIII tronqué circulant dans ces souris ne sont pas détectables et l'activité FVIII dans leur plasma est inférieure à 1% (139). Contrairement à l'hémophilie A chez l'Homme, les saignements spontanés sont très rares chez ces souris. En revanche, le temps de saignement observé dans ces modèles par exemple avec la technique de « tail-clip », est très significativement augmenté, pouvant même entraîner la mort par exsanguination. Ces modèles murins ont été largement utilisés pour déterminer l'efficacité de traitements à base de FVIII (140,141), pour étudier le mécanisme de formation des inhibiteurs (142–144) ou encore pour développer des protocoles d'induction de tolérance immunitaire pour le FVIII (145). Un modèle murin total d'hémophilie A a aussi été généré afin de reproduire le plus fidèlement possible le phénotype de patients hémophiles A sévères dits « cross-reacting material », c'est-à-dire des patients qui n'expriment aucun FVIII endogène et qui aussi sont les plus prompts à former des inhibiteurs. En effet, les modèles murins présentés précédemment produisent des niveaux indétectables de FVIII tronqué mais cela ne veut pas dire que ces niveaux sont nuls pour autant, contrairement à ce qui est observé chez les patients dits « cross-reacting material ». Ce nouveau modèle murin au fond génétique totalement C57Bl/6 a été généré grâce à une délétion totale du gène F8 médiée par la technique de recombinaison Cre/LoxP (145). Enfin, un modèle murin d'hémophilie A a été généré à partir de souris hémophiles A E16 et de souris transgéniques exprimant du FVIII humain muté p.R593C. Cette mutation p.R593C est une mutation qui a été retrouvée chez des patients avec une hémophilie A de type mineure et modérée (146). Le modèle murin résultant du couplage de ces deux lignées ne possède aucun niveau détectable de FVIII circulant, ce que ce soit le FVIII murin ou le FVIII humain muté. De manière surprenante, l'injection répétée de FVIII humain dans ces souris ne provoque aucun développement d'inhibiteurs dirigés contre le FVIII injecté. Cela fait donc de ce modèle murin un modèle tolérant au FVIII humain (147). Les modèles murins ont le désavantage de ne présenter que très rarement des saignements spontanés et d'avoir un volume de sang limité. Cependant, il existe un modèle de rat génétiquement modifié, avec un phénotype de saignements spontanés. Des rats hétérozygotes FVIII^{+/-} ont été générés grâce à la technologie des nucléases à doigt de zinc. Cette technologie d'édition ciblée du génome permet de faire une délétion de l'exon 16, d'une taille de 13 paires de bases, provoquant un arrêt de traduction prématuré dans la partie C-terminale du domaine A3 du FVIII. Au terme de l'élevage, une population de rats homozygotes

FVIII^{-/-} ont été obtenus et 70% d'entre eux présentaient des saignements spontanés intra- et extra-articulaires. L'analyse plasmatique a permis de mettre en évidence une absence d'activité FVIII chez ces rats. Les animaux répondent correctement au traitement avec du FVIII humain mais le développement d'anticorps inhibiteurs suite au traitement doit encore être étudié. Il est parfois compliqué d'extrapoler les résultats observés dans les modèles murins à cause des différences de système de coagulation et de système immunitaire qui existent entre la souris et l'Homme. Le porc, bien qu'il ne présente pas les nombreux avantages du modèle murin, a l'intérêt d'avoir un système de la coagulation très homologue à celui retrouvé chez l'Homme. Cette homologie a même permis d'utiliser le FVIII porcin pour traiter des patients hémophiles A présentant des inhibiteurs (148,149). Un modèle de porc génétiquement modifié a été développé grâce à l'insertion d'une cassette néomycine au niveau de l'extrémité 3' de l'exon 16 du gène F8 porcin (150). Ce modèle porcin a l'avantage de pouvoir développer des arthropathies suite à des saignements intra-articulaires répétés, tout comme les patients hémophiles A. Ils peuvent donc être une option supplémentaire pour évaluer l'efficacité de nouvelles thérapeutiques (151).

1.9.3) Les modèles animaux d'hémophilie A acquise

L'hémophilie A dite acquise est une maladie hémorragique non héréditaire rare due à la présence d'anticorps (auto-anticorps) dirigés contre le FVIII qui diminuent drastiquement l'activité du facteur de coagulation et prédisposent donc à de sévères épisodes hémorragiques. Cette maladie chez l'Homme se développe tardivement et est extrêmement rare, avec une occurrence d'un cas pour plusieurs millions. Des modèles animaux présentant une hémophilie A de ce type ont été générés, les principaux étant le modèle de lapin et de primate non humain. Ces modèles sont très utiles dans le cadre de la thérapie génique, ainsi que pour le développement et l'étude d'agents contournant l'activité du FVIII. Le modèle lapin a notamment été utilisé dans le cadre du développement d'un anticorps anti-TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor) nommé Concizumab (152). Ce modèle animal est un modèle transitoire d'hémophilie A acquise, c'est-à-dire que le phénotype hémophile est exprimé que durant un laps de temps donné, dépendant de la durée de vie de ces anticorps inhibiteurs dans la circulation des lapins. Le phénotype hémophile A est induit par l'injection d'anticorps inhibiteurs dirigés contre le FVIII humain mais reconnaissant tout de même le FVIII de lapin. En comparaison de lapins contrôles, les lapins hémophiles A présentent un temps de saignement significativement augmenté. Le modèle primate non humain a quant à lui été développé plus récemment par l'injection d'un anticorps inhibiteur dirigé contre le FVIII murin mais cross-réagissant avec le FVIII de ces primates. Le temps de coagulation est significativement allongé chez les primates ayant reçu l'anticorps inhibiteur. Ce modèle a été

utilisé pour la caractérisation de l'anticorps bispécifique emicizumab (153) reconnaissant spécifiquement les facteurs de coagulation humains et de primates. L'ensemble des modèles animaux décrits sont répertoriés dans la figure ci-dessous (Figure 5).


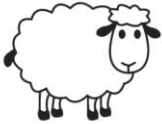
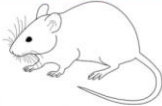

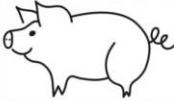
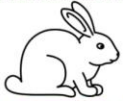

Espèce animale	Type d'hémophilie A	Références
	Mutation naturelle	<i>Brinkhous KM et al. Science 1950</i> <i>Giles AR et al. Blood 1982</i>
	Mutation naturelle	<i>Neuenschwander S et al. Thromb Haemost 1992</i>
	Mutation naturelle Modification génétique	<i>Booth CJ et al. J Thromb Haemost 2010</i> <i>Nielsen LN et al. J Thromb Haemost 2014</i>
	Modification génétique	<i>Bi L et al. Nat Genet 1995</i> <i>Chao BN et al. J Thromb Haemost 2016</i>
	Modification génétique	<i>Kashiwakura Y et al. PLoS One 2012</i>
	Induction par des anticorps	<i>Erhardtsen E et al. Blood Coagul Fibrinolysis 1995</i>
	Induction par des anticorps	<i>Kitazawa T et al. Nat Med 2012</i>

Figure 5 : Les différents modèles animaux les plus utilisés pour l'étude de l'hémophilie A.

Nous allons maintenant nous intéresser plus particulièrement à deux agents contournant l'activité du FVIII *in vivo*, à savoir le FVIIa recombinant et l'anticorps bi-spécifique emicizumab.

2) LE FACTEUR VIIa (FVIIa) DE LA COAGULATION

2.1) Structure du gène *F7* et ARN

Le gène codant le FVII (F7) est situé sur le chromosome 13 en position q34qter9 et s'étend sur 12,8 kb. Ce gène F7 comprend 9 exons et 8 introns dont les tailles sont respectivement comprises entre 25-1600 paires de bases (pb) et 68-2600 pb (154). La transcription de ce gène entraîne la production d'un ARNm de 2,7 kb, qui par la suite sera traduit en une protéine mature de 406 acides aminés. Les exons 1a et 1b du gène F7 codent pour un peptide signal de 38 ou 60 acides aminés. Celui-ci contient une région hydrophobe, permettant d'adresser la protéine de FVII à la sécrétion, et une région d'intérêt pour la γ -carboxylation des protéines. La différence de taille du peptide signal s'explique par un épissage alternatif au niveau des exons 1a et 1b, cependant l'exon 1b est absent de la très grande majorité des ARNm (155). L'exon 2 quant à lui code pour le propeptide du FVII, ainsi que son domaine Gla. Le domaine Gla est suivi d'une courte région hydrophobe codée par l'exon 3 et connue sous le nom d'« empilement aromatique hydrophobe ». Enfin, les exons 4 et 5 codent respectivement pour les domaines EGF1 et EGF2, tandis que les exons 6 à 8 codent pour le domaine d'activation et le domaine catalytique de type sérine-protéase. Il existe une grande similitude avec les autres facteurs vitamine K-dépendants surtout au niveau des exons, la région la moins conservée étant l'exon 6, codant pour la zone d'activation. En effet, à la différence des facteurs II, IX, X et de la protéine C, le facteur VII ne libère aucun peptide lors des phases d'activation.

2.2) La structure du FVII

Le facteur VII, aussi appelé proconvertine, est une glycoprotéine vitamine K-dépendante synthétisée par le foie. Comme d'autres facteurs de la coagulation vitamine K-dépendants, le facteur VII est synthétisé sous forme d'un précurseur, une chaîne polypeptidique comprenant un peptide signal suivi d'un pro-peptide qui seront tous deux libérés lors des différentes étapes de maturation de la protéine, vient ensuite la protéine mature de 406 acides aminés (156,157). Le facteur VII mature est un zymogène de sérine protéase simple chaîne dont le poids moléculaire est de 50 kDa. Il circule dans le plasma à une concentration d'environ 0,5 $\mu\text{g/mL}$ ou 10 nM, soit bien inférieure à celle des autres facteurs vitamine K-dépendants (158). De plus, sa demi-vie est aussi trois à quatre fois plus courte que celles des autres facteurs vitamine K-dépendants, entre 4 à 6 heures (159). Le FVII est composé de trois grands types de domaines que nous allons détailler un à un (Figure 6).

coagulantes telles que la prothrombine, les facteurs VII, IX et X (163) mais aussi les protéines anticoagulantes telles que la protéine C, la protéine S ou encore la protéine Z (164,165). Ce domaine Gla est aussi retrouvé dans d'autres protéines hors du domaine de l'hémostase, telles que Gas6 (Growth arrest specific gene 6) (166), les protéines transmembranaires PRGP1/PRGP2 (Proline-rich Gla protein) et TMG 3/TMG 4 (Transmembrane Gla protein) (167,168), ou encore l'ostéocalcine et MGP (Matrix Gla protein), impliquées dans la minéralisation tissulaire (169,170). L'apport de vitamine K par l'alimentation se fait sous une forme oxydée, dite vitamine K quinone, qui doit être réduite en vitamine K hydroquinone afin de rendre possible son utilisation comme cofacteur de la γ -carboxylation. La γ -carboxylation consiste en la substitution, au niveau du carbone γ d'un acide glutamique Glu, d'un atome d'hydrogène par un groupement carboxyle, le modifiant ainsi en acide γ -carboxyglutamique Gla (171). La vitamine K carboxylase ou γ -glutamyl carboxylase est une protéine à 5 domaines transmembranaires de 758 acides aminés, présente dans le RE (172–174). Cette enzyme utilise la vitamine K hydroquinone pour catalyser la réaction de γ -carboxylation, transformant dans le même temps la vitamine K hydroquinone en vitamine K époxyde (Figure 7). La réaction de γ -carboxylation est dite processive, ce qui veut dire que tous les acides aminés Glu du domaine sont γ -carboxylés avant que les protéines soient libérées par l'enzyme (175). Dans la séquence du FVII, les acides aminés Glu qui sont γ -carboxylés sont situés en position Glu6, Glu7, Glu14, Glu16, Glu19, Glu20, Glu25, Glu26, Glu29, Glu35. La séquence propeptide est ensuite clivée par protéolyse dans le Golgi (176).

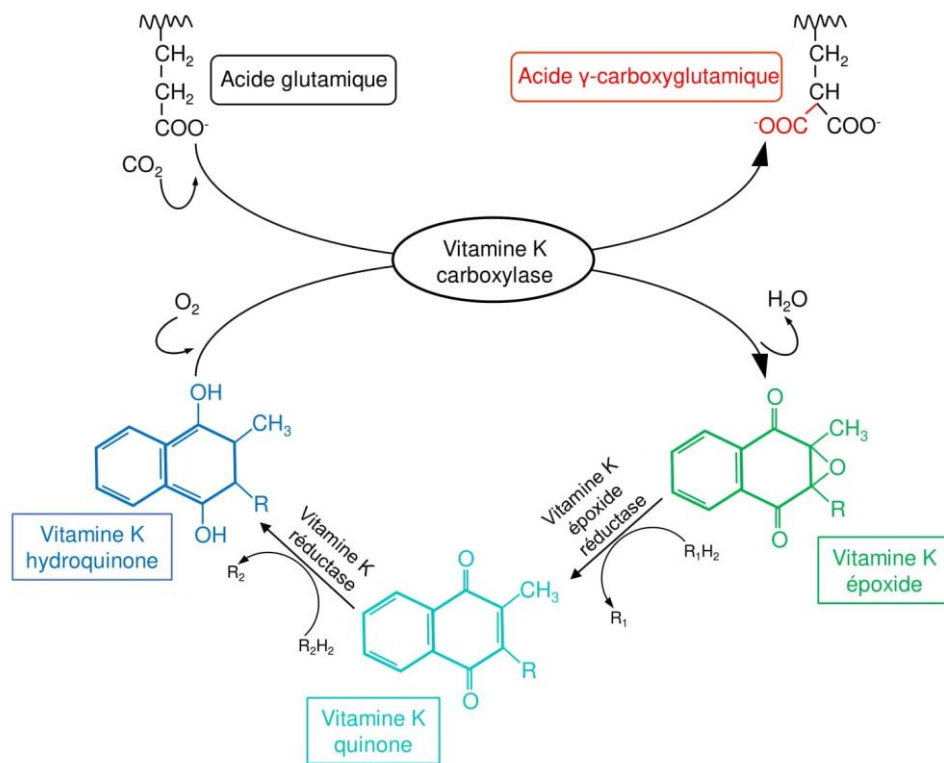


Figure 7 : Représentation schématique du cycle de la vitamine K permettant la γ -carboxylation d'acides glutamiques spécifiques situés dans le domaine Gla des facteurs de la coagulation vitamine K-dépendants. La vitamine K est apportée dans l'organisme sous forme de vitamine K quinone qui doit d'abord être réduite en vitamine K hydroquinone avant de pouvoir être utilisée comme cofacteur par l'enzyme vitamine K carboxylase (γ -glutamyl carboxylase). Le produit de la réaction de carboxylation donne de la vitamine K époxyde qui est ensuite recyclée par réduction en vitamine K quinone.

2.2.2) La β -hydroxylation et les domaines EGF-like

Les domaines EGF-like (Epidermal Growth Factor) sont des domaines très conservés dans l'évolution et aussi parmi les types de domaines les plus communs retrouvés dans les protéines extracellulaires ou transmembranaires. Ils sont généralement longs d'environ 45 acides aminés et comportent 6 cystéines qui sont liées par des ponts disulfures (162,177). Environ 25% des domaines EGF-like contiennent au moins un acide aminé β -hydroxylé. La β -hydroxylation est une réaction transformant les acides aminés Asp et Asn en respectivement acides aminés acide β -hydroaspartique Hya et β -hydroasparagine Hyn. Dans le cas du FVII, il s'agit de l'acide aminé Asp63 qui est β -hydroxylé. Une séquence consensus caractéristique Cys-X-Asp/Asn-X-X-X-X-Tyr-Phe-X-Cys est essentielle pour la β -hydroxylation (178) qui est catalysée par une hydroxylase de la famille des hydroxylases dépendantes de α -cétoglutarate. Il a été montré que les domaines EGF-like contenant des acides aminés Hya et/ou Hyn sont capables de lier les ions Ca^{2+} (179,180), permettant d'orienter le domaine Gla adjacent par rapport aux domaines EGF-like de façon à être compatible avec une activité biologique (181,182).

2.2.3) Le domaine sérine-protéase

Le domaine sérine-protéase du FVII est un domaine catalytique de type « trypsin-like » ce qui signifie qu'il possède une importante homologie de séquence et de structure avec le domaine catalytique de la trypsine et de la chymotrypsine (183). De plus, le domaine catalytique du FVII est aussi homologue à celui des autres facteurs de coagulation vitamine K-dépendants. Le domaine catalytique de ces enzymes est caractérisé par la présence d'un site actif composé d'une triade d'acides aminés. Ceux-ci sont extrêmement cruciaux pour l'activité enzymatique des protéases une fois qu'elles sont activées (184,185). Ces trois acides aminés sont une histidine, un acide aspartique et une sérine, et dans le cas du FVII ils occupent respectivement les positions 193, 242 et 344. Bien que les facteurs de coagulation aient un site actif quasiment semblable à celui de la trypsine, les surfaces moléculaires situées autour leur site actif sont arrangées différemment. Cela leur confère en comparaison de la trypsine une capacité et spécificité de liaison à leurs substrats, augmentée (186). Le site actif du FVII, aussi appelé site de liaison S1, est formé par le regroupement de trois boucles nommées respectivement boucle 1, boucle 2 et boucle 140s. L'agencement de ces boucles entre elles, mais aussi vis-à-vis d'une quatrième boucle située à proximité de la boucle 2 et nommée boucle 170s, joue un rôle important dans la détermination de la spécificité de substrat du FVII (187). Le domaine sérine-protéase du FVII possède aussi trois sites allostériques en plus du site S1 : il s'agit de la région de liaison avec le FT, d'un site de liaison aux ions métalliques divalents et d'une région exosite de liaison aux substrats macromoléculaires. Cette dernière région est située à proximité du site de liaison aux ions métalliques divalents (188).

2.3) L'activation du FVII en FVIIa

Un certain nombre de protéines sont capables d'activer le FVII, tels que les facteurs de coagulation Xa, IXa mais aussi VIIa (156,189–191), ou encore la protéase FSAP (Factor Seven Activating Protease) (192). Néanmoins, le FXa semble être tout de même l'activateur le plus puissant du lot (193). L'activation du FVII par chacune de ces enzymes fait intervenir le clivage d'une unique liaison peptidique entre les acides aminés Arg152 et Ile153 localisés dans la région de jonction entre le domaine EGF2 et le domaine sérine-protéase. Ce clivage protéolytique résulte en la formation d'une molécule de FVIIa composée de deux chaînes, une chaîne légère de 152 acides aminés qui comprend le domaine Gla, les domaines EGF-like et une courte hélice hydrophobe, et une chaîne lourde de 254 acides aminés qui porte le site catalytique. Ces deux chaînes sont reliées ensemble par un unique pont disulfure présent entre les cystéines 135 et 262 (Figure 8).

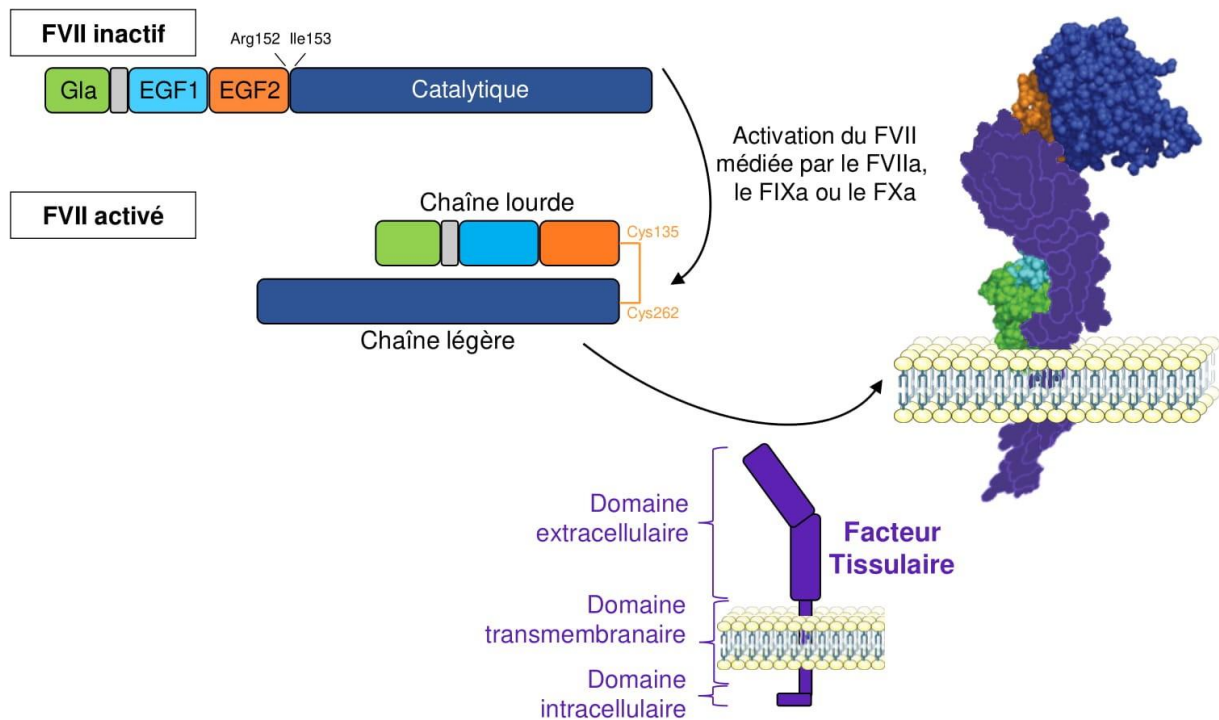


Figure 8 : Schéma d'activation du FVII zymogène. Un clivage protéolytique est effectué par différents facteurs de coagulation activés entre l'arginine 152 et l'isoleucine 153 du FVII. Cela entraîne un réarrangement complet de sa structure et son activation. Le FVIIa est organisé en deux chaînes, légère et lourde, la première comprenant le domaine catalytique et la seconde comprenant les domaines Gla, EGF1, EGF2. Les deux chaînes sont reliées par un pont disulfure entre les cystéines 135 et 262, celui-ci est représenté par un crochet orange. L'interaction du FVIIa avec son cofacteur facteur tissulaire est nécessaire pour son efficacité enzymatique maximale. Le facteur tissulaire fixé à la membrane est composé de trois domaines, extracellulaire, transmembranaire et intracellulaire.

L'acide aminé Ile153, présent dans la partie N-terminale de la chaîne lourde nouvellement formée, enfouit alors sa chaîne latérale dans l'environnement hydrophobe du site actif du FVIIa tout en formant un pont salin avec la chaîne latérale de l'acide aminé Asp194. Cet acide aminé est adjacent à la sérine 195, membre de la triade catalytique, et la formation du pont salin entre Ile153 et Asp194 permet ainsi la correcte structuration du site actif. Pour la trypsine, la chymotrypsine et les autres protéases ayant un domaine catalytique similaire, cette série d'évènements est suffisante pour obtenir une enzyme complètement active. Cependant dans le cas du FVIIa, d'autres conditions sont nécessaires pour obtenir un FVIIa complètement actif, telles que la complexation avec son cofacteur FT. En effet, la chaîne latérale de l'isoleucine 153 est susceptible d'être modifiée chimiquement et son insertion dans le site actif du FVIIa est incomplète tant que le FT ne lie pas sur le FVIIa (194). Le FVIIa libre existe donc sous deux formes zymogène et complètement activée. La plupart des formes activées des facteurs de coagulation de type sérine protéase ont des demi-vies extrêmement courtes dans le plasma, de l'ordre de la minute, car le plasma contient des concentrations élevées d'inhibiteurs

de protéases. Cependant, le FVIIa libre circule majoritairement sous forme zymogène, moins d'1% circule sous forme complètement activée (195). Grâce à cette propriété, le FVIIa est moins sensible à l'action de la plupart des inhibiteurs de protéases plasmatiques (196). En conséquence, la demi-vie du FVIIa est extrêmement proche de celle du FVII, entre 2 et 3 heures (197,198).

2.4) Son cofacteur : le facteur tissulaire

Le facteur tissulaire (FT) est une glycoprotéine transmembranaire impliquée dans l'initiation de la coagulation sanguine ainsi que dans la migration cellulaire et l'angiogenèse. Le FT, aussi appelé thromboplastine, facteur de la coagulation III ou CD142, est le principal initiateur de la génération de la thrombine via la fixation avec une très forte affinité au facteur VII activé ou non. Le gène codant le FT est situé sur le chromosome 1 en position 1p21-p22 (199). Il est constitué de 12400 pb et comprend 6 exons séparés par 5 introns. La partie codante du gène comprend 885 pb. L'expression du gène du FT est très complexe et régulée par de nombreux facteurs, comme l'hypoxie (200). Le facteur tissulaire est une glycoprotéine de 263 acides aminés dont la masse moléculaire est d'environ 46 kDa. Elle fait partie de la famille des récepteurs aux cytokines de classe II et est structurée en 3 domaines : un domaine extracellulaire N-terminal de 219 acides aminés (1 à 219), un domaine transmembranaire de 22 acides aminés (220 à 242) et un domaine cytoplasmique C-terminal de 21 acides aminés (242 à 263) (201,202). La cristallisation du domaine extracellulaire du FT (203) nous renseigne qu'il est constitué de deux domaines, N- et C-terminaux, reliés par un pont polypeptidique entre la proline 102 et l'asparagine 107. Chaque domaine est constitué de 7 brins β repartis en feuillets antiparallèles. Le domaine extracellulaire contient aussi 3 des 4 sites de N-glycosylation que compte le FT (Asn 11, Asn 124, Asn 137) (204). La glycosylation protège le FT de sa dégradation protéolytique (205) et augmente son activité pro-coagulante (206). Le domaine extracellulaire contient également 2 domaines fibronectines de type III possédant chacun un pont disulfure. Le pont disulfure en N-terminal, Cystéine49- Cystéine57 (Cys49-Cys57), est un pont de structure. En revanche, le pont disulfure en C-terminal, Cys186-Cys209, est un pont fonctionnel de type allostérique (207). Des études de mutagenèse dirigée ont démontré le rôle du pont disulfure Cys186-Cys209 dans l'affinité du FT pour son ligand, le FVIIa (208,209). Il est également démontré que la suppression de ce pont disulfure modifie la structure conformationnelle du FT, avec une double conséquence fonctionnelle : la perte de l'activité pro-coagulante du FT et un « switch » vers une fonction de signalisation (210). L'implication du pont disulfure Cys186-Cys209 dans la dé-encryption du FT reste controversée. Le domaine intracytoplasmique du FT est très court, seulement 21 acides aminés. Il contient deux sites de phosphorylation : le site sérine 253(Ser253), site consensus

qui implique la protéine kinase C (PKC), et le site Ser258, indépendant de la PKC (211). Le domaine transmembranaire, riche en acides aminés hydrophobes, joue un rôle important dans l'ancrage du complexe FT/FVIIa à la surface cellulaire et donc dans l'expression de l'activité pro-coagulante du FT. En effet, une molécule de FT privée de domaine transmembranaire est incapable de lier et d'activer le FVII (212,213). De plus, ce domaine transmembranaire est requis pour l'auto-activation du FVII (214). Cet ancrage à la membrane se fait via une structure en hélice α , néanmoins cette hélice α n'a pas été décrite comme réellement important pour l'activité pro-coagulante du FT (215). En effet, l'ancrage du domaine extracellulaire du FT aux lipides de la membrane semble être suffisant pour rétablir une activité pro-coagulante de la protéine (216). Le domaine extracellulaire du FT est composé de deux domaines fibronectine de type III et est lié au domaine transmembranaire grâce à une séquence linker de 6 acides aminés. Cette séquence linker est suffisamment flexible pour permettre au domaine extracellulaire d'être découplé des domaines transmembranaire et intracellulaire au niveau conformationnel (217). L'activité pro-coagulante du FT n'est pas nécessairement corrélée à son niveau d'expression à la surface des cellules. Une importante proportion du FT est exprimée à la surface des cellules sous forme encryptée et il doit d'abord passer sous forme non encryptée.

2.5) Les sites d'interactions et les changements de conformation du complexe FVIIa/FT

2.5.1) L'activation allostérique du FVIIa

L'association du FT avec le FVIIa entraîne une activation allostérique de la protéase, ce qui crée un dimère enzymatique dans lequel le FT est une sous-unité régulatrice et le FVIIa une sous-unité catalytique. L'activité amidolytique du FVIIa est augmentée d'environ 50 fois lorsque celui-ci est complexé au FT, ce qui indique que la formation de ce complexe entraîne des changements conformationnels à l'intérieur du site actif de l'enzyme (218). Le FVIIa en solution existe sous deux formes, une forme active dans laquelle la partie N-terminale de la chaîne lourde est insérée dans le site actif, et une forme dite zymogène dans laquelle cette partie N-terminale serait insérée incorrectement ou de manière incomplète dans le site actif. De nombreuses boucles dans le domaine protéase du FVIIa sont stabilisés après la liaison de l'enzyme au FT, grâce au réarrangement et au renforcement du réseau de liaisons hydrogènes (219,220). Ces changements structurels ne sont pas limités au domaine catalytique du FVIIa et concerne la majorité de la protéine, ce qui indique que la modulation allostérique du FVIIa par le FT est très importante.

2.5.2) L'importance des ions métalliques divalents

Les ions Ca^{2+} sont requis pour l'assemblage et la fonctionnalité du complexe FVIIa/FT. Bien que le FT ne possède aucun site de liaison aux ions métalliques divalents, les ions Ca^{2+} peuvent occuper jusqu'à neuf sites de liaison sur le FVIIa. Parmi eux, sept sont présents dans le domaine Gla de l'enzyme et ils sont d'une importance critique pour la structure et la fonctionnalité de ce domaine. En particulier, la fixation des ions Ca^{2+} sur les acides aminés animés Gla induit la formation d'une boucle omega qui expose des acides aminés hydrophobes devant par la suite s'insérer dans la membrane phospholipidique (163,221). Les ions Ca^{2+} n'occupent tous les sites présents uniquement lorsqu'ils sont les seuls ions métalliques divalents présents. D'autres études de cristallographie ont montré que dans des concentrations physiologiques d'ions métalliques divalents, le domaine Gla du FVIIa lie entre 4 à 5 ions Ca^{2+} et 2 à 3 ions Mg^{2+} (222,223). Néanmoins, il est important de noter que les ions Mg^{2+} seuls ne sont pas capables d'induire la structuration correcte du domaine Gla. Le fait que certains sites soient occupés *in vivo* par des ions Mg^{2+} malgré l'excès d'ions Ca^{2+} suggère l'existence d'un sous-groupe de sites liant de manière préférentielle les ions Mg^{2+} . Les différences de spécificité des différents de liaison sont certainement dues à la géométrie de chaque site de liaison ainsi qu'aux différences de propriété de dureté entre les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} (224). Les ions Mg^{2+} ont été montrés comme étant capable de moduler la liaison à la membrane et les propriétés enzymatiques des facteurs VIIa et IX (225,226). En dehors du domaine Gla du FVIIa, il existe aussi dans le domaine EGF1 de l'enzyme un site de liaison où se lie un ion Ca^{2+} et celui-ci ne peut pas être substitué par un ion Mg^{2+} (222). Cet ion Ca^{2+} est impliqué dans l'optimisation des interactions entre le FVIIa et le FT, en modulant l'orientation du domaine Gla du FVIIa par rapport au domaine EGF1 (227). Enfin, le dernier site de liaison aux ions métalliques divalents se trouve dans le domaine sérine-protéase du FVIIa. Ce site est occupé par un ion Ca^{2+} après l'activation allostérique de l'enzyme qui produit un réarrangement d'une boucle contenant ce site de liaison (219). Deux sites de liaison aux ions Zn^{2+} ont aussi été identifiés dans le domaine catalytique du FVIIa et la liaison d'ions Zn^{2+} dans ces sites provoque une inhibition de l'activité enzymatique du FVIIa ainsi que de sa liaison au FT (228).

2.5.3) Le repositionnement du site actif du FVIIa

In vivo, l'activité enzymatique du complexe FVIIa/FT intervient exclusivement à la surface des membranes de phospholipides. L'activité enzymatique du complexe est aussi dépendante des interactions des facteurs VIIa, IX et X avec la membrane de phospholipides via leurs domaines Gla. Des expériences de transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET) ont révélé que le FVIIa libre adopte une structure stable lorsqu'il est lié à la membrane de phospholipides, avec son site actif positionné approximativement 80 ångström (Å) au-dessus de la membrane

(229). Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus sur les protéines homologues FIXa et FXa (230,231). Lorsque le FT est lié au FVIIa, le site actif de celui-ci devient 6Å plus proche de la membrane que lorsque l'enzyme est libre, ce qui permet alors un alignement optimal de la triade d'acides aminés du site catalytique avec le site de clivage protéolytique du substrat. De manière surprenant, ce résultat n'est pas modifié dans d'autres expériences de FRET utilisant un FVIIa dépourvu de domaine Gla, ce qui démontre que le FT exerce son action de repositionnement du site actif du FVIIa même en absence d'interactions entre l'enzyme et la membrane de phospholipides (232). Au contraire, lorsque la distance entre le site actif du FVIIa et la membrane de phospholipides est supérieure à 80Å, l'activité protéolytique du complexe FVIIa/FT est grandement réduite sans pour autant que l'activité amidolytique soit elle diminuée. Cela indique que le repositionnement du site actif médié par le FT est extrêmement important pour l'activité de l'enzyme à l'encontre de substrats physiologiques tels que le FX (233).

2.5.4) La stabilisation du FVIIa dans l'espace

Le FVIIa libre est une molécule dynamique disposant une grande flexibilité entre ses différents domaines mais aussi à l'intérieur de ceux-ci (217). Outre le repositionnement du site actif du FVIIa, le FT intervient aussi dans une autre modulation allostérique importante du FVIIa, à savoir sa stabilisation dans l'espace. En effet, des simulations de dynamique moléculaire du complexe FVIIa/FT en présence de membrane de phospholipides montre que le FT réduit la flexibilité entre les domaines du FVIIa. Que ce soit en solution ou lié sur la membrane, le degré de mouvement du FVIIa est significativement réduit en présence de FT. La stabilisation de la boucle 170s, localisée dans le domaine catalytique au niveau du site d'interaction avec le FT, est importante pour l'activité amidolytique de l'enzyme (234,235). Le remplacement de cette boucle 170s par une boucle 170s tronquée provenant de la trypsine entraîne une augmentation de l'activité amidolytique du FVIIa même en absence de FT. Cela suggère que la stabilisation de la boucle 170 joue un rôle important dans l'activation allostérique du FVIIa par le FT (236). D'autres simulations de dynamique moléculaire ont permis de mettre en évidence que la liaison du FT au FVIIa aide l'insertion de l'isoleucine 153 dans le site actif du FVIIa et donc la stabilisation de la structure, même lorsque la partie N-terminale de la chaîne lourde n'est pas insérée dans ce même site actif. Enfin, des données de cristallographie ont démontré que la méthionine 306 du FVIIa joue à un rôle important dans les interactions avec le FT, notamment la diminution de flexibilité de la boucle 170 après formation du complexe FVIIa/FT (237,238).

2.5.5) Les interactions entre le FT et les substrats macromoléculaires

En plus du rôle du FT dans l'activation allostérique du FVIIa, les interactions entre la région exosite du FT et des substrats macromoléculaires sont aussi impliquées dans l'activité catalytique du complexe FVIIa/FT. Les substrats physiologiques connus du complexe FVIIa/FT sont les facteurs VII, IX et X, ainsi que certains récepteurs de la famille des PAR (Protease Activated Receptor). La mutation de certains acides aminés du FT entraîne une diminution de l'activation des substrats physiologiques précédemment cités sans pour autant impacter l'activité amidolytique du FVIIa (239). Plusieurs structures cristallographiques ont mis en évidence une boucle flexible du FT entre les acides aminés 159 à 165, et les acides aminés présents à l'intérieur ou à proximité de cette boucle ont été montrés comme ayant une importance critique pour l'activité protéolytique du complexe FVIIa/FT (222,237). De manière intéressante, la mutation de la glycine 164 du FT par une alanine perturbe grandement l'activité protéolytique du complexe FVIIa/FT, suggérant ainsi que la flexibilité apportée par la présence de la glycine à cette position de la séquence est très importante pour la reconnaissance des substrats macromoléculaires (240). Les deux lysines 165 et 166 du FT ont aussi été montrées comme étant importantes pour la reconnaissance et la liaison des substrats. En effet, la mutation d'un seul de ces deux acides aminés est suffisante pour entraîner une diminution significative de l'activité cofacteur du FT (239,241,242). Des structures cristallographiques ont permis de montrer que ces deux lysines sont orientées à l'opposé l'une de l'autre, avec la lysine 165 pointant vers le FVIIa et la lysine 166 pointant vers la région exosite de liaison aux substrats du FT (237). La formation d'un pont salin entre la lysine 165 du FT et l'acide γ -carboxyglutamique 35 du FVIIa démontre que l'interaction du FT avec le domaine Gla du FVIIa module la reconnaissance des substrats par le complexe (223). L'ensemble de ces observations suggèrent que la partie C-terminale du domaine extracellulaire du FT interagit directement avec les facteurs IX et X via leur domaine Gla et que la présence du domaine Gla du FVIIa module ces interactions, que ce soit directement ou indirectement. De plus, les acides aminés du FT impliqués dans les interactions avec les substrats FIX et FX sont similaires ou identiques à ceux qui interagissent avec le FVII lors de l'autoactivation du FVII médiée par le FT, ce qui indique que le mécanisme de liaison est similaire (243).

2.6) Utilisation du FVIIa recombinant (rFVIIa) dans l'hémophilie A

Comme il l'a été évoqué dans une partie précédente, le rFVIIa est utilisé comme traitement chez les patients hémophiles A présentant des inhibiteurs afin qu'ils puissent être à nouveau traités tout comme les patients ne présentant pas d'inhibiteurs.

2.6.1) Le développement du rFVIIa

Dans le début des années 1980, il a été montré que le FVIIa pouvait être exprimé dans des cellules BHK (244,245). Ce qui est intéressant, c'est que le FVIIa a été identifié comme l'un des facteurs de coagulation actifs ayant le moins de risques de provoquer des effets secondaires thromboemboliques (246). C'est pourquoi la firme Novo Nordisk développa l'idée de produire du FVIIa de manière recombinante afin de l'utiliser pour le traitement des patients hémophiles et ce projet fût approuvé en 1985. Dans la même période de temps, l'effet hémostatique du FVIIa exogène purifié à partir de plasma a pu être observé sur des patients hémophiles A présentant des inhibiteurs (246,247). Après un travail de caractérisation de la pharmacodynamique et de la pharmacocinétique du rFVIIa pendant plusieurs années (129,197,248,249), les premiers patients hémophiles avec inhibiteurs ont pu être traités avec succès avec du rFVIIa en 1988 (250,251). Après une série d'essais cliniques effectués par Novo Nordisk, le rFVIIa de la firme, renommé Novoseven®, fût finalement approuvé comme traitement en Europe, aux Etats-Unis et au Japon, entre les années 1996 et 2000.

2.6.2) Le mécanisme d'action du rFVIIa

Malgré son efficacité en tant que traitement, le mécanisme d'action du rFVIIa n'était pas parfaitement connu. En effet, il a été observé que le rFVIIa était capable de normaliser des tests de temps de coagulation dans des plasmas de patients hémophiles avec inhibiteurs si des phospholipides artificiels étaient aussi ajoutés au milieu réactionnel. Des résultats similaires ont été observés dans un autre test de temps de coagulation réalisé en absence de FT (252). Ces observations ont permis d'émettre l'hypothèse que le rFVIIa est capable de lier soit le FT, soit les phospholipides membranaires ou soit les deux et que cette capacité est à l'origine de son efficacité en tant que traitement (253). Le rFVIIa est capable de se lier aux plaquettes avec une faible affinité et c'est cette propriété qui est utilisée lorsque des doses de rFVIIa sont administrées aux patients hémophiles (254). Il a été montré que la fonction pro-coagulante des plaquettes varie grandement entre les individus, ainsi il a été suggéré que suivant les individus, la contribution plaquettaire peut être plus importante que la simple formation d'une surface propice à la génération de thrombine (255). Un certain nombre d'études ont par la suite corroboré l'importance de la liaison aux plaquettes pour l'activité du rFVIIa (253,255,256). Des données cliniques ont montré un effet hémostatique prolongé du

rFVIIa chez les patients hémophiles avec inhibiteurs traités (257). Cela a soulevé la problématique de comprendre comment cet effet pouvait être prolongé compte tenu de la courte demi-vie du rFVIIa dans la circulation (197). Des études dans des modèles murins ont suggéré que ce phénomène pouvait être dû à une localisation extravasculaire du rFVIIa (258,259). En effet, le rFVIIa s'associerait rapidement à l'endothélium via un récepteur endothélial à la protéine C. Une fois lié aux cellules endothéliales, le rFVIIa serait transféré dans les tissus périvasculaires entourant les vaisseaux sanguins, entraînant ainsi une rétention de rFVIIa dans les tissus pendant une certaine période de temps. La localisation du rFVIIa dans ces espaces extravasculaires, et surtout dans des régions contenant des cellules exprimant du FT (259), permettrait ainsi de résoudre rapidement les micro-saignements et ainsi prolonger son effet hémostatique apparent.

3) L'ANTICORPS BISPECIFIQUE EMICIZUMAB

L'emicizumab, aussi appelé ACE910 ou Hemlibra®, est un anticorps bispécifique, c'est-à-dire un anticorps capable de reconnaître deux épitopes d'antigènes différents. Il s'agit d'un anticorps monoclonal mimant l'activité du FVIIIa. Dans ce chapitre je décrirai comment l'emicizumab a été produit et comment il fonctionne.

3.1) Structure d'immunoglobuline conventionnelle

Les immunoglobulines, ou anticorps, sont des glycoprotéines présentes à des concentrations élevées dans la partie sérique du sang. De par leur statut de glycoprotéines, les immunoglobulines sont composées en majorité de polypeptides mais aussi de différents sucres se liant à la structure protéique. Le système immunitaire des mammifères à sa disposition 5 grandes classes ou isotypes d'immunoglobulines qui se différencient par la structure de leurs régions constantes mais aussi leur fonction dans la réponse immunitaire. Ce sont les immunoglobulines de classe A, D, E, G et M (IgA, IgD, IgE, IgG et IgM) (260). Il est aussi important de noter qu'en plus d'isotypes d'immunoglobulines, il existe aussi des allotypes pouvant être considérés comme des sous-classes des différents isotypes précédemment mentionnés. Ainsi la classe d'IgG peut être divisée en quatre allotypes principaux, IgG1 à IgG4, numérotés suivant l'ordre décroissant de leur abondance dans le plasma (261). Dans le cadre d'une partie concernant l'anticorps emicizumab, seule la structure conventionnelle d'une IgG sera brièvement présentée ici. Les IgG représentent la majorité des immunoglobulines présentes dans le plasma, environ 80% d'entre elles. Ce sont des molécules en forme de Y constituées de quatre chaînes polypeptidiques, deux chaînes lourdes H (pour Heavy) d'environ 50 kDa et deux chaînes légères L (pour Light) d'environ 25 kDa, ce qui donne des IgG ayant un poids moléculaire d'environ 150 kDa. Les deux chaînes lourdes sont identiques entre elles, tout comme les deux

chaînes légères, et ces différentes chaînes sont reliées entre elles par des ponts disulfures. Ces ponts disulfures servent à la fois à relier les deux chaînes lourdes entre elles mais aussi à relier chaque chaîne lourde à une chaîne légère et fonctionnent de la même manière que des charnières flexibles, permettant aux différentes chaînes d'avoir un certain degré de liberté les unes par rapport aux autres. Chaque chaîne lourde ou légère est constituée de plusieurs domaines globulaires d'environ 110 acides aminés organisés en deux séries de feuillets β -plissés antiparallèles. Le repliement de chacun de ces domaines globulaires est stabilisé par un pont disulfure qui est cette fois intra-chaîne. Une fois correctement repliés les domaines des chaînes lourdes s'alignent avec ceux des chaînes légères pour former une structure cylindrique caractéristique des immunoglobulines, appelée « immunoglobulin fold » (262,263). Les immunoglobulines représentent la famille de protéines dont il existe le plus de séquences connues. Grâce à l'analyse des séquences de milliers de molécules d'immunoglobulines, il est possible de distinguer plusieurs régions dans ces protéines. La partie N-terminale des différentes chaînes présente une variabilité très importante de séquences, alors que dans la partie restante des différentes chaînes les séquences ne présentent que peu de variation. Il est alors distingué des régions hypervariables (VH ou VL suivant la chaîne en question) et des régions constantes (CH1/CH2/CH3 ou CL suivant la chaîne en question) (264). La combinaison des régions hypervariables d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère forme le paratope, c'est à dire le site de reconnaissance et de liaison de l'anticorps à une partie de l'antigène appelée l'épitope. Au vu de leur structure en Y les immunoglobulines disposent donc de deux paratopes, un par bras. Le squelette de l'immunoglobuline, formé des trois régions constantes de chaque chaîne lourde et de la région constante de chaque chaîne légère, est quant à lui impliqué dans des fonctions effectrices telles que l'activation du système du complément ou la fixation à des récepteurs spécifiques ou encore la régulation de la demi-vie de la protéine (265) (Figure 9).

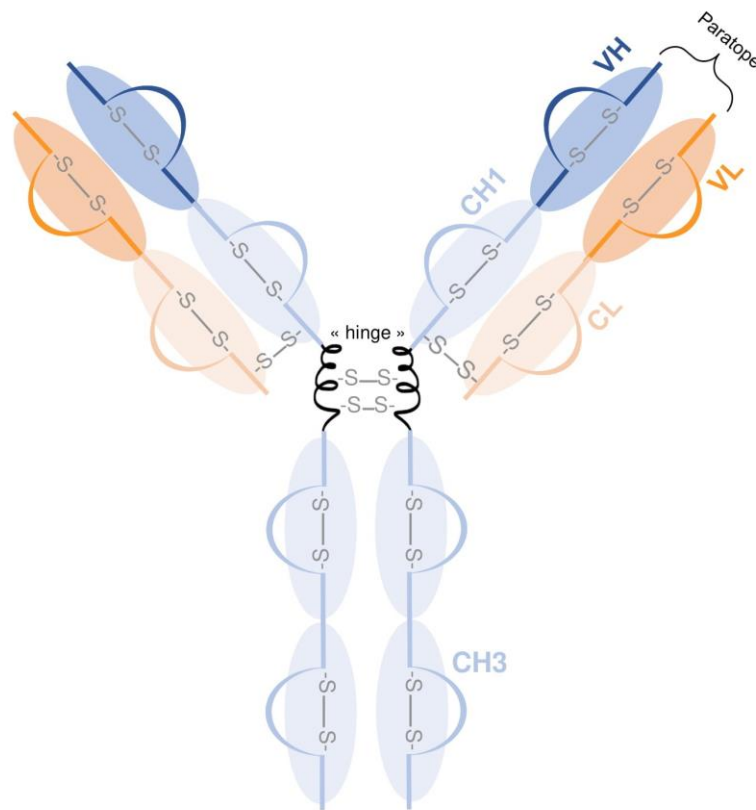


Figure 9 : Structure conventionnelle d'IgG. L'immunoglobuline est formée par deux chaînes lourdes (en bleu) et deux chaînes légères (en orange). Les deux chaînes lourdes sont reliées entre elles par deux ponts disulfures présents au niveau de la région charnière dite "hinge". Cette région charnière relie les deux parties d'une même chaîne lourde. Les couples de chaîne lourde et chaîne légère sont aussi reliés entre eux par un pont disulfure. Chaque chaîne lourde ou légère est composée d'une partie constante et d'une partie hypervariable. Les domaines de la partie constante de la chaîne lourde sont nommés CH et ils sont au nombre de trois, de CH1 à CH3 (en bleu clair). Des ponts disulfures sont présents dans chaque domaine CH. Le domaine hypervariable VH (en bleu foncé) est directement adjacent au domaine CH1. L'organisation des chaînes légères est similaire, un domaine constant unique CL (en orange clair) et un domaine hypervariable VL (en orange foncé). La région formée par un couple de domaine VH/VL est appelé paratope, elle constitue le lieu d'interaction spécifique avec l'épitope d'un antigène donné.

Les régions hypervariables de chaque chaîne lourde ou légère VH ou VL sont constituées de trois petites régions hypervariables qui ont un rôle majeur dans la détermination de la complémentarité de reconnaissance avec l'épitope de l'antigène. Il s'agit des régions CDR (Complementary-Determining Regions) 1 à 3 dont la numérotation est déterminée d'après leur position dans la séquence peptidique. Ces trois régions CDR sont séparées et encadrées par quatre régions très conservées ayant un rôle de charpente et de stabilisation, les régions FR (Framework Regions) 1 à 4 : FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Les régions CDR

forment des boucles à l'extrémité des immunoglobulines, créant ainsi une surface propice à la liaison avec un antigène. Ces boucles formées varient en composition d'acides aminés ou encore en longueur selon les anticorps, elles sont donc à l'origine de la spécificité de liaison des anticorps. Le site de liaison à l'antigène de chaque anticorps n'est cependant déterminé et formé qu'après juxtaposition des six régions CDR d'un bras (3 sur la chaîne lourde et 3 sur la chaîne légère) (266). Néanmoins, bien que les régions CDR soient les actrices majeures responsables de la spécificité des anticorps, les régions hypervariables dans leur entièreté sont nécessaires pour une présentation correcte du site de liaison. En effet, des mutations dans la séquence en dehors des séquences CDR sont capables d'influencer plus ou moins l'affinité d'un anticorps pour son antigène d'intérêt (267).

3.2) Synthèse et mode d'action de l'emicizumab

L'emicizumab contient un bras capable de reconnaître le FIX humain activé ou non et un bras capable de reconnaître le FX humain activé ou non. Pour arriver à la génération de cet anticorps bispécifique, 200 anticorps monoclonaux ont été obtenus à partir d'animaux immunisés avec soit du FIXa humain, soit du FX humain. Les régions hypervariables VH de ces anticorps ont ensuite été combinées à des chaînes lourdes d'IgG2 ou IgG4 humaines. Les régions hypervariables VL de ces mêmes anticorps ont quant à elles été fusionnées à des chaînes légères humaines d'isotype κ ou λ . Suite aux différentes combinaisons possibles à partir de ces anticorps obtenus après immunisation, 40000 IgG bispécifiques comprenant différentes combinaisons de chaînes lourdes et chaînes légères avec des régions hypervariables anti-FIXa humain et anti-FX humain ont été exprimées. Chaque IgG bispécifique a été exprimée après transfections simultanées de 4 plasmides (2 codants pour une chaîne lourde et une chaîne légère anti-FIXa humain et 2 codants pour une chaîne lourde et une chaîne légère anti-FX humain) dans des cellules HEK293. Parmi tous ces IgG, un total de 94 anticorps bispécifiques présentant une activité mimétique du FVIIIa humain, et donc favorisant avec succès la génération de FXa humain, ont été identifiés. Après de multiples étapes visant à identifier les chaînes légères et les charpentes d'IgG ayant une correspondance optimale avec les différentes chaînes lourdes sélectionnées, un anticorps nommé BS15L a été choisi comme candidat principal (268). Ce BS15L a pour caractéristiques d'être constitué d'une chaîne lourde de rat avec une région hypervariable anti-FIX humain et d'une chaîne lourde de souris avec une région hypervariable anti-FX humain, toutes deux greffées sur une charpente d'IgG4 humain. Afin de former un anticorps bispécifique conventionnel, cet anticorps à chaîne lourde bispécifique a été combiné avec une chaîne légère humaine d'isotype κ dont la région hypervariable a été substituée par une région hypervariable hybride rat/souris.

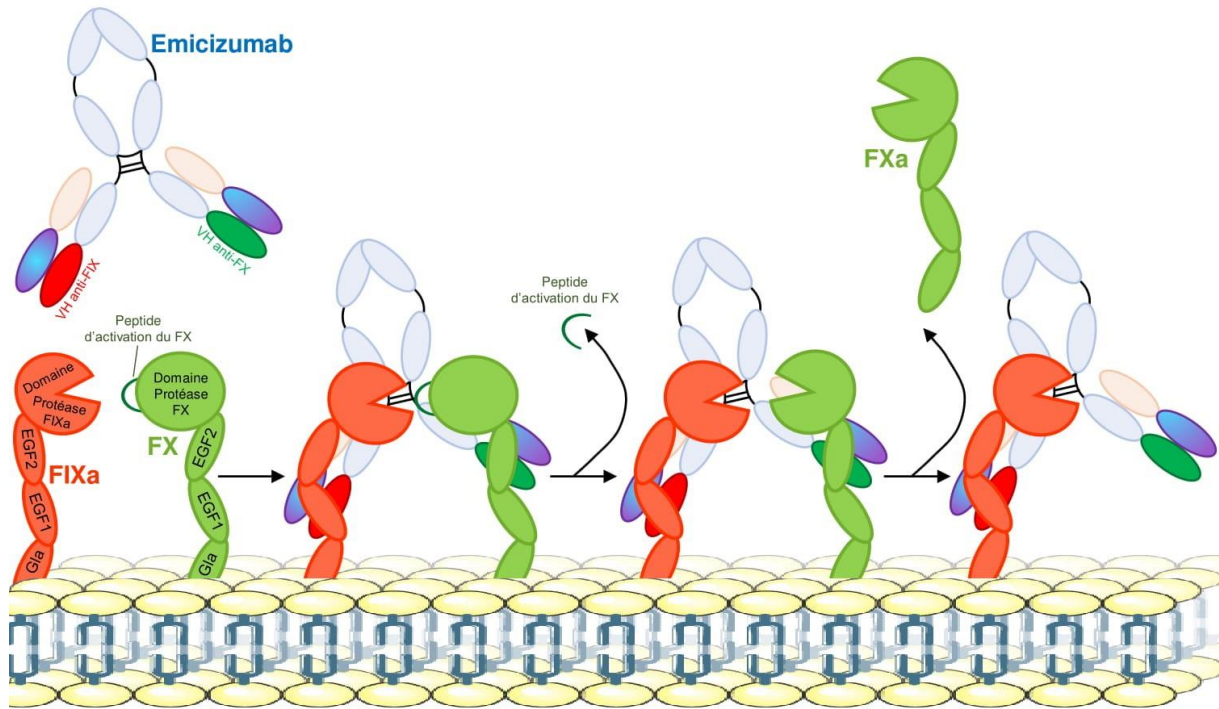


Figure 10 : Schéma d'interaction de l'emicizumab avec le FIXa (en orange) et le FX (en vert). Le FIXa et le FX sont fixés à la membrane de phospholipides via leur domaine Gla. L'emicizumab est un anticorps bispécifique, il peut donc reconnaître deux épitopes différents. Un premier paratope dirigé contre le FIXa reconnaît le domaine EGF1 du FIXa, tandis que le second paratope dirigé contre le FX reconnaît le domaine EGF2 du FX. La présence de l'emicizumab permet un rapprochement du FIXa et du FX suffisant pour que le FX soit activé. Le FIXa clive le peptide d'activation du FX, ce qui entraîne un changement de conformation du zymogène qui devient une enzyme active.

Par la suite, ce BS15L a subi plusieurs étapes d'optimisation telles qu'une étape d'humanisation, une amélioration de son activité mimétique du FVIIIa humain par mutagenèse dirigée sur certains acides aminés spécifiques, une amélioration de ses propriétés pharmacocinétiques ou encore une amélioration de sa capacité à être purifié et de sa solubilité (268). Après toutes ces étapes, l'anticorps BS15L devint l'anticorps ACE910 avant d'être connu sous son actuel nom d'emicizumab. En comparaison du FVIII, le mécanisme d'action de l'emicizumab est relativement simple : celui-ci interagit simultanément avec le FIXa et le FX humains et facilite ainsi la génération de FXa humain en augmentant la proximité de l'enzyme et de son substrat (153) (Figure 10). Plus de détails seront donnés dans une revue que je présenterai dans la partie « Résultats expérimentaux et articles ».

3.3) Comparaison des propriétés moléculaires de l'emicizumab et du FVIIIa

Puisque le FVIIIa humain et l'emicizumab sont tous deux capables d'augmenter la génération de FXa humain, je vais faire une comparaison plus approfondie des propriétés moléculaires des deux protéines. En effet, ce sont deux protéines très différentes en termes de structure et de régulation, c'est pourquoi elles peuvent agir différemment durant la coagulation (Figure 11).

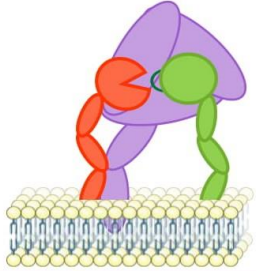
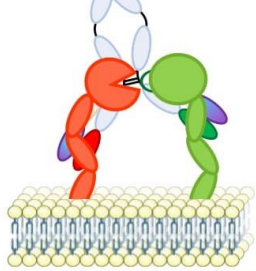
<u>FVIIIa/FIXa/FX</u>	<u>Emicizumab/FIXa/FX</u>
	
Sites d'interaction multiples avec le FIXa et le FX	Site d'interaction unique avec le FIXa et le FX
<u>Activité cofacteur:</u> <ul style="list-style-type: none"> • Capacité d'ancrage aux phospholipides • Stabilisation du domaine protéase du FIXa • Formation d'un pont entre le FIXa et le FX 	<u>Activité cofacteur:</u> <ul style="list-style-type: none"> • Formation d'un pont entre le FIXa et le FX
Reconnaissance spécifique du FIXa et du FX	Reconnaissance spécifique du FIX et du FX sans distinction de leur activation (FIX/FX ou FIXa/FX ou FIX/FXa ou FIXa/FXa)
Activité FVIIIa régulable	Activité FVIIIa non régulable
Le FVIIIa est le facteur limitant de la réaction	Le FIXa est le facteur limitant de la réaction

Figure 11 : Comparaison des caractéristiques du complexe FVIIIa/FIXa/FX à celles du complexe emicizumab/FIXa/FX.

3.3.1) Interactions avec FIX/FX et stœchiométrie du complexe tenase

Les sites d'interaction du FVIIIa humain et de l'emicizumab avec les facteurs IXa et X humains se sont pas identiques. En effet, les interactions du FVIIIa avec le FIXa ou le FX se font toutes deux par l'intermédiaire de plusieurs sites distincts localisés sur les chaînes légères et lourdes des différentes protéines. A titre de comparaison, l'emicizumab ne se lie qu'à un seul site sur chaque protéine qu'il reconnaît, un site dans le domaine EGF1 du FIX/FIXa humain et un site dans le domaine EGF2 du FX/FXa humain (269). Les concentrations plasmatiques des différents acteurs du complexe tenase sont d'environ 90 nM pour le FIX, environ 135 nM pour le FX et environ 0,4 nM pour le FVIII. Cela implique donc que la quantité de FXa générée par le complexe tenase est directement corrélée et limitée par la quantité de FVIIIa formée lors de la coagulation. Concernant l'emicizumab, la concentration lors d'un traitement prophylactique est de l'ordre de 370 nM dans le plasma (122). Par conséquent, le facteur limitant de la réaction

n'est plus la quantité de FVIIIa formée mais la quantité de FIXa formée. C'est une notion importante à retenir pour l'interprétation de l'activité de l'emicizumab dans différents tests d'activité car la génération de FIXa est variable entre ces différents tests.

3.3.2) Spécificité de liaison et affinité d'interactions

Les FIX et FVIII nécessitent une activation protéolytique avant que le complexe tenase puisse s'assembler. Ces activations protéolytiques sont nécessaires pour libérer le FVIII du FvW mais aussi pour convertir les FIX et FVIII dans leur conformation active. De plus, le FVIIIa n'est pas capable d'interagir avec le FX non activé (56). Ainsi, l'activation du FVIII peut être considérée comme la mise en fonctionnement du complexe tenase. L'affinité du FVIIIa pour le FIXa et le FX est bien plus forte que celle mesurée entre l'emicizumab et les acteurs du complexe tenase. En effet, le FVIIIa lie le FIXa avec une affinité d'environ 15 nM et le FX avec une affinité d'environ 300 nM (56,270). Dans le cas de l'emicizumab ces affinités de liaison sont respectivement d'environ 1,5 μ M et 1,8 μ M (269). Il est aussi crucial de noter que la distinction entre protéines zymogènes et protéines activées n'existe pas pour l'emicizumab car celui-ci est capable de lier avec des affinités similaires le FIX/FIXa humain (Kd respectivement égal à 1,6 μ M et 1,5 μ M) mais aussi le FX/FXa humain (Kd respectivement égal à 1,9 μ M et 1,0 μ M) (269). Puisque l'anticorps bispécifique reconnaît à la fois le FIX humain zymogène et le FIX humain activé, cela implique que l'anticorps est toujours actif tant que du FIXa humain est présent.

3.3.3) Activité cofacteur et régulation

Activité cofacteur : Le FVIIIa participe à l'augmentation de génération de FXa de trois manières différentes, c'est-à-dire en favorisant la localisation du FIXa à la surface de phospholipides, en permettant la correcte stabilisation et orientation du site actif du FIXa et en formant un pont entre le FIXa et le FX. En revanche, l'emicizumab lui est incapable de réaliser les deux premiers rôles du FVIIIa et son rôle se retrouve limiter à uniquement former un pont entre l'enzyme et son substrat. L'amplitude de l'effet cofacteur du FVIIIa sur l'augmentation de l'activité catalytique du FIXa est souvent déterminée dans des tests utilisant des protéines purifiées. En général, le FVIIIa est capable d'augmenter entre 1000 à 1 million de fois l'activité du FIXa. A titre de comparaison, la détermination de l'effet cofacteur de l'emicizumab donne des valeurs environ 10 fois plus faibles que celles obtenues avec le FVIIIa (153).

Régulation : L'activité du complexe tenase peut être inhibée de différentes manières. Le complexe tenase naturel ou par le complexe tenase avec l'emicizumab ont pour similarité que le FIXa est sensible à l'inhibition par des protéines anticoagulantes telles que l'antithrombine ou la protéase nexine 2 (271,272). Néanmoins, le complexe tenase naturel possède un second mécanisme de régulation où l'activité cofacteur du FVIIIa est neutralisée par deux voies

d'inactivation, l'une due à la dissociation spontanée du domaine A2 du FVIIIa et l'autre due à la dégradation protéolytique provoquée par différentes sérine-protéases, telles que la protéine C activée.

3.4) Détermination de l'effet de l'emicizumab dans des tests d'activité

Plusieurs tests d'activité existent pour mesurer l'activité du FVIII, tels que le test de temps de céphaline avec activateur (TCA), le test de génération de thrombine (TGT), le test chromogénique du FVIII ou encore l'analyse des formes d'onde des caillots formés. La difficulté principale concernant l'emicizumab est d'obtenir un équivalent FVIII, c'est-à-dire de corrélérer son activité dans les différents tests d'activité à une valeur comparable d'activité FVIII. En effet, tous ces tests ont été conçus sur le fait que le FVIII est le facteur limitant du complexe tenase. De plus, les quantités de FIXa générées au cours de ces tests est sensiblement variable d'un test à un autre mais aussi d'un réactif à un autre. Puisque nous savons que le FIXa devient le facteur limitant de la réaction dans le cadre d'un complexe tenase avec emicizumab, des variations de sa concentration impacte directement l'efficacité de l'emicizumab. Il est alors aisé de déduire qu'une même concentration d'emicizumab peut être équivalente à une activité FVIII plus ou moins élevée, suivant les tests et réactifs utilisés (273,274) (Figure 12).

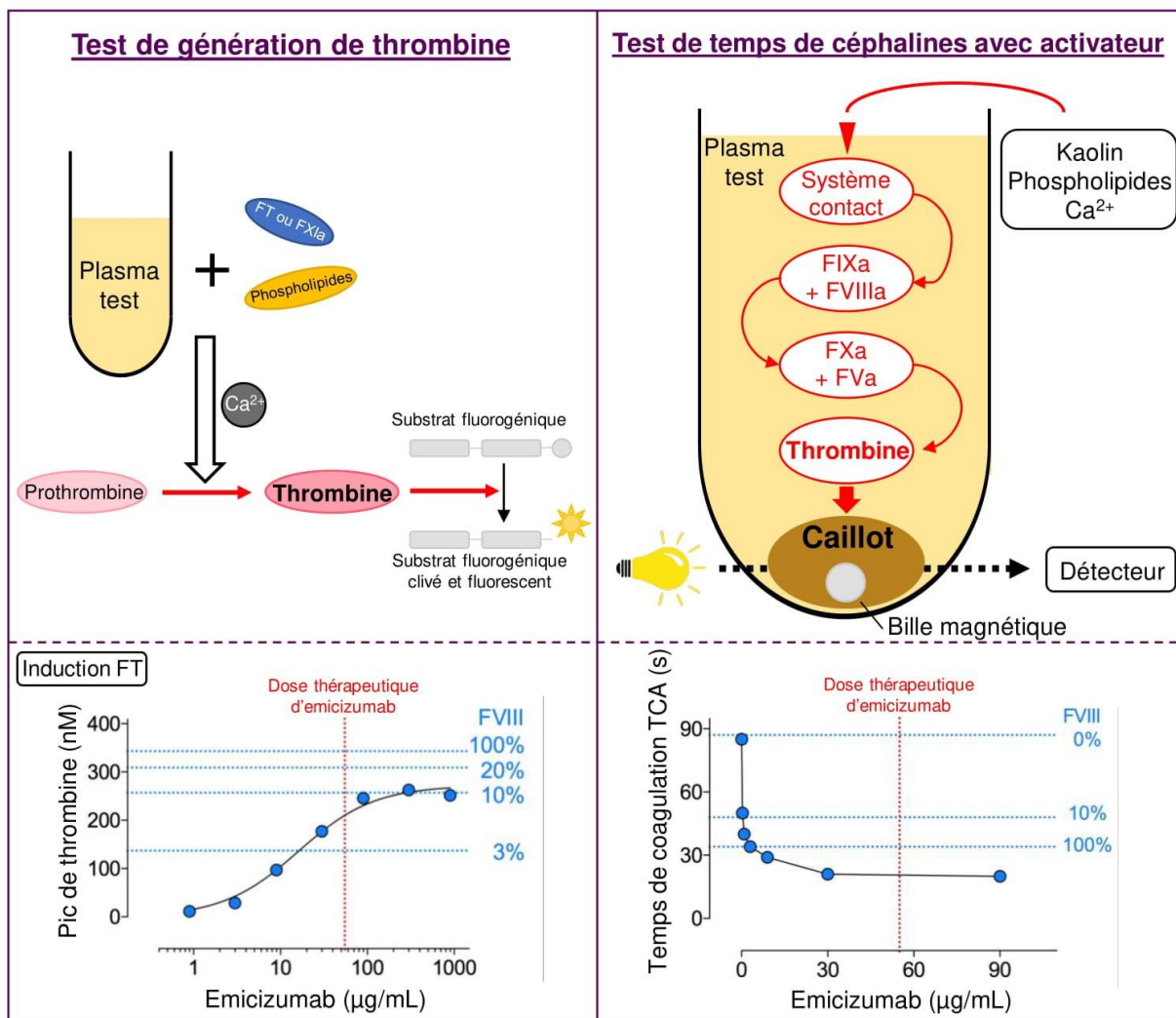


Figure 12 : Schéma explicatif des tests *in vitro* de génération de thrombine (TGT, à gauche) et de temps de céphalines avec activateur (TCA, à droite). Ces tests sont utilisés pour déterminer l'effet de l'emicizumab *in vitro*. Dans le test TGT, l'ajout de phospholipides, d'ions calcium et d'un activateur (ici le facteur tissulaire) permet de déclencher la coagulation dans le plasma testé. Un substrat fluorescent clivable par la thrombine est ajouté au plasma testé. La génération de thrombine au cours du temps à partir de prothrombine est directement corrélée au clivage de ce substrat fluorescent par cette même thrombine. Dans le test TCA, la coagulation est déclenchée par le système contact via l'ajout dans le plasma testé de phospholipides, d'ions calcium et d'une surface chargée négativement (ici le kaolin). L'activation du système contact entraîne l'activation des facteurs VIII et IX, et a fortiori la génération de thrombine. Cette thrombine générée déclenche la formation d'un caillot de fibrine au fond de la cuve qui va être en mesure d'arrêter le mouvement de la bille magnétique. Le temps nécessaire à l'arrêt de la bille magnétique correspond ainsi au temps de coagulation du plasma testé. L'utilisation de l'emicizumab dans ces deux tests donnent des résultats extrêmement variables. Ainsi, pour une concentration thérapeutique d'emicizumab de 3 mg/kg, l'effet de l'emicizumab dans le test TGT est équivalent à 5-10% de FVIII alors qu'il est équivalent à 100% de FVIII dans le test TCA (données tirées de Soeda et al. WFH, 2014).

3.5) Détermination de l'effet de l'emicizumab dans des essais cliniques

Le premier essai clinique de phase I réalisé chez l'Homme a été complété en 2015 sur 64 volontaires sains et non-hémophiles. Ces individus reçurent une unique injection sous-cutanée de placebo ou d'emicizumab à des doses comprises entre 0,001 et 1 mg/kg (275). La distribution de l'emicizumab suit un profil pharmacocinétique linéaire et la demi-vie de la protéine est estimée à approximativement 30 jours, indépendamment de la dose injectée. Aucun effet indésirable sévère et aucun trouble d'hypercoagulation n'ont été enregistrés. Des tests *ex vivo* ont été effectués sur les plasmas des participants, dont le FVIII a été préalablement neutralisé. La présence d'emicizumab dans le plasma permet un raccourcissement du temps de coagulation dans le cadre d'un test TCA, ainsi qu'une augmentation de la hauteur du pic de génération de thrombine dans le cadre d'un test TGT, de manière dose-dépendante dans chacun des tests. Un autre essai clinique de phase I a été réalisé en 2016, cette fois sur 18 patients hémophiles A dont 11 qui présentaient des anticorps inhibiteurs. Ces patients reçurent une fois par semaine pendant douze semaines une injection sous-cutanée d'emicizumab à des doses comprises entre 0,3 et 3 mg/kg (276). Le principal sujet d'étude de l'essai clinique était le nombre d'évènements hémorragiques annualisés. Une diminution très importante du nombre d'évènements hémorragiques annualisés médian a été observé dans l'ensemble des groupes traités. Une absence de saignements a été observé chez 8 patients sur 11 dans le groupe présentant des inhibiteurs anti-FVIII et chez 5 patients sur 7 dans le groupe ne présentant pas d'inhibiteurs. Aucun effet indésirable sévère et aucun trouble d'hypercoagulation n'ont été enregistrés. Enfin, une étude pivot de phase III multicentrique nommée HAVEN a été réalisée sous la forme de quatre essais cliniques (HAVEN 1 à 4) afin d'évaluer l'efficacité, l'absence de risque et la pharmacocinétique d'une prophylaxie utilisant l'emicizumab en comparaison d'une absence de prophylaxie chez des patients hémophiles A (122,277–279). Les volontaires étaient soit des patients hémophiles A avec inhibiteurs (HAVEN 1 et HAVEN 2), soit des patients hémophiles A sans inhibiteurs (HAVEN 3 et HAVEN 4). Les patients, quel que soit l'essai clinique, reçurent une dose initiale d'emicizumab de 3 mg/kg une fois par semaine pendant quatre semaines. Ils reçurent ensuite différentes doses d'emicizumab en prophylaxie, soit 1,5 mg/kg chaque semaine, soit 3 mg/kg toutes les deux semaines, soit 6 mg/kg toutes les quatre semaines. Les résultats obtenus sur les quatre essais cliniques concordent entre eux, une diminution significative du nombre d'évènements hémorragiques annualisés est enregistrée, entre 87% à 99% en comparaison de groupes contrôles n'ayant pas reçu de traitement prophylactique. Cinq effets indésirables sévères ont été enregistrés dans l'essai HAVEN 1 (trois microangiopathies thrombotiques et deux évènements thrombotiques). Ils concernent des patientes hémophiles A et ils ont été associés à l'utilisation de doses de complexe

prothrombotique activé supérieures à 100 U/kg/24h dans le cadre du traitement de saignements intermenstruels. Néanmoins, aucun effet indésirable sévère et aucun trouble d'hypercoagulation n'ont été enregistrés dans les trois autres essais cliniques de l'étude.

4) LES ANTICORPS À DOMAINE UNIQUE OU NANOBODIES

Les anticorps conventionnels sont des outils thérapeutiques très utiles de par leurs propriétés intéressantes. Il existe cependant dans certaines espèces des anticorps particuliers dont les propriétés sont à la fois similaires et différentes de celles des anticorps conventionnels. Tout comme les anticorps conventionnels, ces anticorps particuliers peuvent être des outils thérapeutiques très intéressants.

4.1) Mise en évidence des anticorps à chaîne lourde

4.1.1) Les anticorps à chaîne lourde chez les camélidés

En 1987, des protéines de bas poids moléculaires ont été découvertes dans des préparations de plasma de dromadaires visant à l'étude des immunoglobulines de ces animaux. Ces protéines présentaient un poids moléculaire plus bas que les immunoglobulines de dromadaires et ont donc été nommées dans un premier temps protéines immunoglobuline-like (280). Puis il a été décrit que les animaux de la famille des camélidés (*Camelidae*) produisent aussi d'autres sortes d'anticorps fonctionnels et structurellement différents des anticorps conventionnels. Cette famille des camélidés regroupe entre autres les dromadaires (*Camelus dromedarius*), les chameaux (*Camelus bactrianus*), les lamas (*Lama glama*), les alpaca (*Lama pacos*), les guanacos (*Lama guanicoe*) et les vigognes (*Lama vicugna*). Ces anticorps sont uniquement formés de deux chaînes lourdes identiques et ils sont aussi dépourvus de chaînes légères dans leur structure. Ils furent donc nommés anticorps à chaîne lourde (281). Chez les camélidés, il existe trois isotopes d'immunoglobulines G, les immunoglobulines G₁ correspondent aux immunoglobulines conventionnelles tandis que G₂ et G₃ correspondent à des anticorps à chaîne lourde. Ainsi, la proportion d'anticorps à chaîne lourde a été estimée entre 25 et 50% suivant les espèces d'animaux de cette famille (282,283). Ces anticorps particuliers ont un poids moléculaire d'environ 80 kDa. Cette différence de poids en comparaison des anticorps conventionnels s'explique par l'absence de chaînes légères dans leur structure, mais aussi par le fait que leurs chaînes lourdes sont seulement organisées en 3 domaines, et non 4 comme chez les anticorps conventionnels. En effet, leurs chaînes lourdes sont composées d'un domaine hypervariable VHH et deux domaines constants CH2 et CH3, mais le domaine constant CH1 est lui absent de leur structure. De par cette absence de chaînes légères, les propriétés de reconnaissance et liaison d'antigènes de ces anticorps sont uniquement dues à

l'unique région hypervariable VHH (Heavy chain only Variable domain) et non pas à un couple de régions hypervariables VH/VL comme dans les anticorps conventionnels (281). L'absence de domaine constant CH1 fait que le domaine hypervariable VHH est directement relié au domaine constant CH2 au niveau de la région charnière flexible. Deux séquences distinctes de région charnière sont retrouvées chez les camélidés et elles codent pour des régions charnières de tailles différentes. La région charnière dite « longue » est retrouvée chez les anticorps à chaîne lourde d'isotype IgG₂ et la région charnière dite « courte » est retrouvée chez les anticorps à chaîne lourde d'isotype IgG₃ (284) (Figure 13).

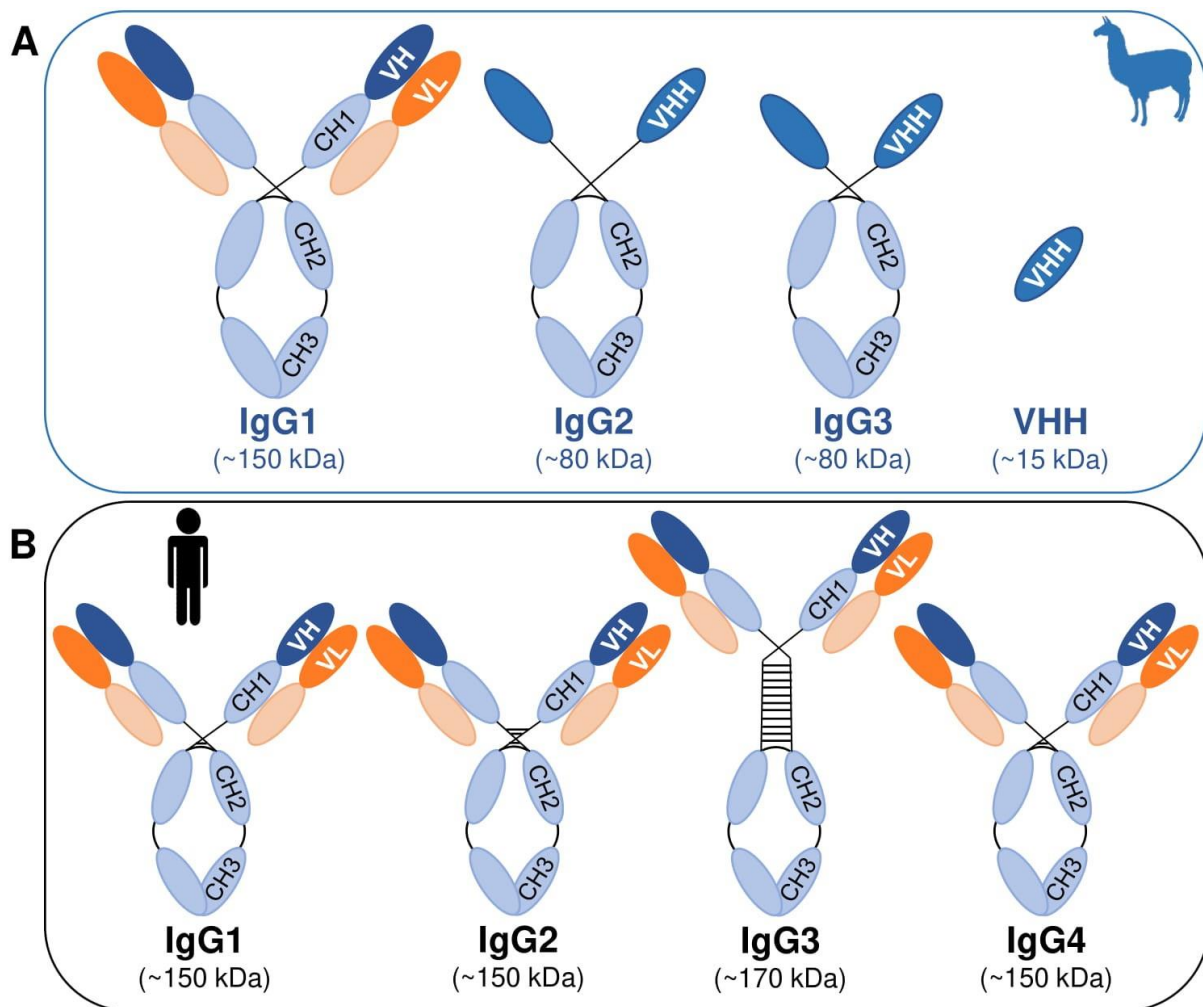


Figure 13 : A) Représentation schématique des différentes sous-classes d'IgG présentes chez la famille des camélidés. Les camélidés possèdent des anticorps conventionnels IgG1 et des anticorps à chaîne lourde, dits à "charnière longue" IgG2 ou à "charnière courte" IgG3. Ces anticorps à chaîne lourde ne possèdent pas de chaînes légères, leurs chaînes lourdes sont plus courtes d'un domaine CH et le domaine hypervariable est un domaine VHH différent du domaine hypervariable VH. B) Représentation schématique des différentes sous-classes d'IgG présentes chez l'humain, numérotées de IgG1 à IgG4 selon leur abondance relative décroissante dans le plasma.

L'absence du domaine constant CH1 dans les anticorps à chaîne lourde est probablement directement liée à l'absence de chaîne légère. En effet, lors de la synthèse d'anticorps conventionnels, les chaînes lourdes sont retenues dans un premier temps dans le RE, par l'interaction de leur domaine constant CH1 avec des protéines chaperonnes. Par la suite, ces protéines chaperonnes sont déplacées par les chaînes légères afin de permettre la formation puis la sécrétion des anticorps conventionnels (285). Dans le cas des anticorps à chaîne lourde, la suppression du domaine constant CH1 est donc essentielle à leur sécrétion, pour pallier à l'absence des chaînes légères. En effet, une mutation est présente dans le gène codant pour la chaîne lourde d'isotype IgG2 ou IgG3 au niveau de la séquence d'épissage bordant l'exon CH1, ce qui conduit à la suppression de celui-ci lors de l'épissage de l'ARNm correspondant (284,286).

4.1.2) Les anticorps à chaîne lourde chez d'autres espèces animales

Des immunoglobulines dépourvues de chaînes légères d'environ 175 kDa ont aussi été observés dans certaines espèces de poissons cartilagineux tels que le requin-nourrice (*Ginglymostoma cirratum*) ou le requin-tapis (*Orectolobus maculatus*) (287,288). Ces immunoglobulines sont appelées IgNAR (Novel Antigen Receptor) et diffèrent quelque peu des anticorps à chaîne lourde des camélidés dans leur structure (289). En effet, les chaînes lourdes de ces IgNAR comptent cinq domaines constants CH1 à 5, contre seulement deux chez les camélidés. De plus, leur région hypervariable nommée V-NAR ne présente que 25% d'homologie de séquence avec des régions hypervariables de chaînes lourdes de mammifères. De manière surprenante, elles ne présentent pas non plus une homologie très élevée avec des régions hypervariables de chaînes lourdes provenant d'autres immunoglobulines de poissons cartilagineux (288,290). Au contraire, elles présentent une homologie de séquence avec des régions hypervariables de chaînes légères mais aussi des régions variables de récepteurs de cellules T (287).

4.2) Mise en évidence des nanobodies

4.2.1) Structure des nanobodies

Comme expliqué précédemment, le site de reconnaissance et fixation à l'antigène des anticorps à chaîne lourde est constitué uniquement par le domaine hypervariable VHH. L'expression recombinante d'un domaine hypervariable VHH permet d'obtenir un anticorps à domaine unique soluble de dimensions nanométriques, aussi appelé pour cette raison Nanobody. Malgré leur petite taille et leur poids moléculaire de l'ordre de 15 kDa, ces nanobodies présentent

des caractéristiques fonctionnelles, telles que l'affinité et la spécificité, très similaires et comparables à celles d'anticorps conventionnels (291). En termes d'affinité, ils sont capables de reconnaître des antigènes avec des affinités de l'ordre du nanomolaire ou même inférieur au nanomolaire (292,293). Des analyses de séquences et de structures de ces domaines VHH ont révélé qu'ils partageaient plusieurs caractéristiques avec les domaines VH conventionnels (294,295). En effet, tout comme les domaines VH, les domaines VHH sont organisés en trois régions CDR1 à 3, impliquées dans la liaison à l'antigène, et quatre régions FR1 à 4 qui forment le cœur structural du domaine hypervariable. Les acides aminés qui déterminent le repliement du domaine hypervariable des anticorps sont conservés dans les domaines VHH. Ainsi, une bonne homologie peut être observée lors de la superposition de la structure tridimensionnelle d'un domaine VHH sur celle d'un domaine VH conventionnel (294,296,297). Cependant, il existe certaines différences notables entre les domaines VHH et VH (298). Premièrement, la différence la plus caractéristique concerne quatre acides aminés dans la région FR2 qui sont substitués dans le domaine VHH. Dans le domaine VH, ces quatre acides aminés sont extrêmement conservés et forment une interface hydrophobe permettant des interactions hydrophobes entre les domaines VH et VL des anticorps conventionnels (295,299). Au contraire dans le domaine VHH, la substitution de ces quatre acides aminés augmente l'hydrophilie globale de la région FR2, ce qui se traduit par la solubilité accrue des domaines VHH dans des milieux aqueux. En effet, les domaines VH ont tendance à agréger lorsqu'ils sont exprimés en absence de partenaires VL (300). Deuxièmement, la partie N-terminale des régions CDR1 sont plus variables dans un domaine VHH que dans un domaine VH (301,302). Les régions CDR1 et 2 de domaine VHH sont capables d'adopter des structures canoniques alternatives, différentes de celles observées dans un domaine VH (298,303). De plus, les régions CDR de domaine VHH sont en général plus longues que leurs équivalents de domaine VH (301,302). Enfin, la diversité des paratopes des anticorps conventionnels provient principalement de la combinaison d'un domaine VH et d'un domaine VL, il serait donc juste de s'attendre à ce que cette diversité soit moins élevée dans les anticorps à chaîne lourde. Néanmoins, grâce à leur plus grande taille des régions CDR1 et CDR3, les domaines VHH voient leur diversité de conformations augmentaient, compensant ainsi la limite précédemment évoquée (304). Dans les anticorps conventionnels les six régions CDR de chaque couple de domaines VH/VL contribuent quasiment à parts égales à la reconnaissance de l'épitope. En revanche dans les anticorps à chaîne lourde, la part du CDR3 prédomine puisqu'il participe pour 60 à 80 % au contact avec l'épitope (304) (Figure 14).

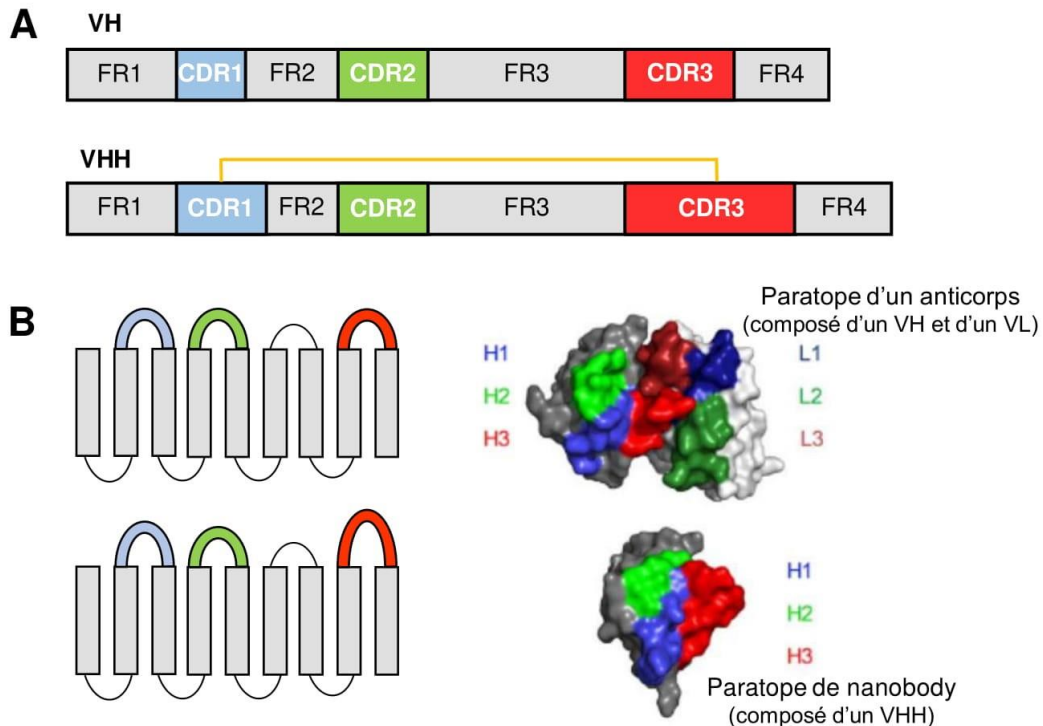


Figure 14 : A) Schéma de comparaison des structures des domaines VH et VHH. Les deux domaines hypervariables sont composés de la même manière de quatre domaines constants FR1 à FR4 et de trois domaines variables CDR1 à CDR3. Néanmoins, les domaines CDR1 et CDR3 sont significativement plus longs dans les domaines VHH. De plus, ils sont reliés par un pont disulfure stabilisateur, représenté par le crochet orange. B) Structure cristallisée des domaines VH et VHH montrent que l'agencement des domaines dans l'espace est similaire entre les deux types de domaines.

4.2.2) Génétique des nanobodies

La diversité du répertoire des anticorps a été mise en évidence avec la découverte dans les années 1970 de gènes dits de variabilité V, de diversité D et de jonctions JH et leur réarrangement au cours du développement des lymphocytes B, cet événement est appelé réarrangement VDJ (305,306). Les régions variables des anticorps conventionnels sont obtenues par le réarrangement soit de fragments génomiques V, D et J pour les chaînes lourdes, soit de fragments génomiques V et J pour les chaînes légères. Ces fragments génomiques se situent dans le locus H du génome des camélidés, en amont des séquences codant pour les domaines constants CH1 à 3. Pour les anticorps à chaîne lourde, ce sont des fragments génomiques V spécifiques qui sont réarrangés avec les fragments D et J classiques (307). De plus, comme nous l'avons évoqué précédemment, le domaine constant CH1 est éliminé de l'ARNm par épissage alternatif. Cet épissage ne semble pas nécessiter de facteurs cellulaires propres aux camélidés puisque le transfert d'un gène réarrangé d'anticorps à chaîne

lourde dans des cellules de souris en culture a abouti à la production d'anticorps à chaîne lourde fonctionnels (307). Cela indique que l'environnement nucléotidique de l'exon codant pour le domaine constant CH1 contient son propre signal d'épissage. Puisque la jonction des fragments génomiques V-D-J permet la formation de la région CDR3 et que les fragments génomiques D et J sont communs aux domaines VH et VHH, des domaines VHH avec des régions CDR3 courtes doivent aussi être générés en même temps que les domaines VHH présentant des régions CDR3 longues. Cependant, leur faible proportion dans la population de domaines VHH suggère que les lymphocytes B les exprimant sont probablement moins sélectionnés lors de l'amplification clonale des lymphocytes après l'exposition à l'antigène. En plus de cette diversité due aux réarrangements de gènes au cours du développement des lymphocytes B dans les organes lymphoïdes centraux, la diversité du répertoire peut être encore augmentée grâce à l'hypermutation somatique qui intervient dans les organes lymphoïdes périphériques lors de la réponse immunitaire. Enfin, les régions CDR1 des domaines VHH contiennent deux sites d'hypermutation somatique supplémentaires par rapport à leurs homologues présents dans les domaines VH. Cela contribue à ce que les anticorps à chaîne lourde aient un répertoire de reconnaissance comparable à celui des anticorps conventionnels (304) (Figure 15).

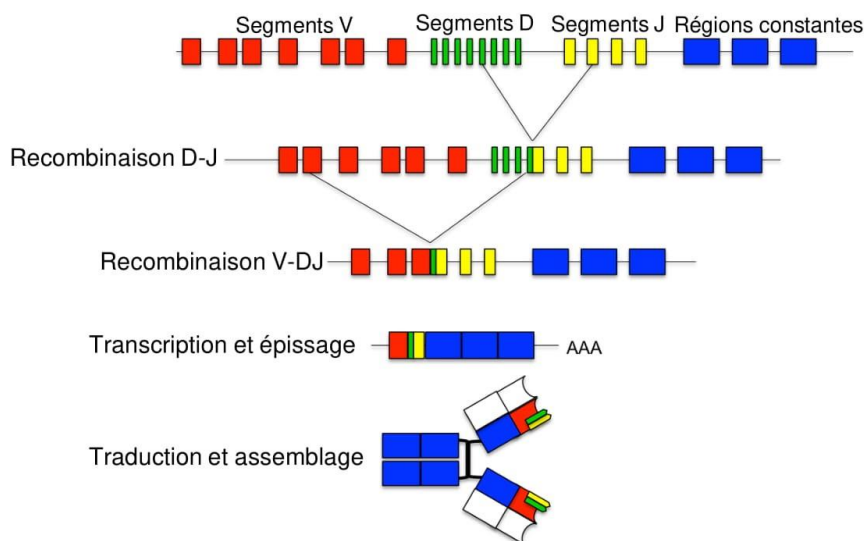


Figure 15 : Schéma explicatif de la recombinaison VDJ. Un certain nombre de segments V, D et J sont présents dans le génome, en amont des séquences codant les domaines constants (en bleu) des anticorps. Il se produit tout d'abord une recombinaison entre un segment D (en vert) et un segment J (en jaune) particuliers, parmi tous ceux disponibles. Ce segment DJ va ensuite être recombinaison avec un segment V (en rouge) particulier. La juxtaposition de ces trois segments particuliers forme la séquence du futur VH. Ces séquences d'ADN sont ensuite transcrites en ARNm, qui sera à son tour traduit en protéine. Cette protéine est un anticorps disposant un domaine hypervariable VH unique, obtenu grâce à la recombinaison VDJ.

4.3) Utilisations et applications des nanobodies

4.3.1) Caractérisations des propriétés des nanobodies

Le premier et principal avantage des nanobodies réside dans leur petite structure monomérique. Cela simplifie considérablement leur clonage à partir des ARNm des lymphocytes B mais aussi leur expression recombinante, sous différentes formes et dans différents organismes (bactéries, levures, plantes, cellules animales) (308,309). Leur petite taille leur confère une pénétration tissulaire bien meilleure que celle des anticorps classiques et leur permet même de passer la barrière hémato-encéphalique (310). Le domaine VHH peut se lier dans les sites actifs d'enzymes et les épitopes cryptiques, bien souvent hors d'atteinte des anticorps conventionnels (311,312). Cet accès à des épitopes enfouis est possible grâce à leur propension à reconnaître des structures concaves grâce à leur forme convexe (313). Les domaines VHH possèdent aussi certains avantages physico-chimiques tels qu'une stabilité thermique à haute température. Les domaines VHH semblent être capables d'endurer de longues incubations à des températures pouvant approcher 90°C, un dépliement structurel provoqué par les hautes températures est réversible et les domaines VHH redeviennent fonctionnels lorsque la température baisse suffisamment pour que le repliement de leur structure s'effectue (314). Certains nanobodies sont même capables de conserver leur capacité de liaison à l'antigène malgré ces hautes températures (291). De la même manière, le dépliement structurel des domaines VHH provoqué par des agents chimiques est aussi parfaitement réversible (315). A titre de comparaison, les anticorps conventionnels perdent leur fonctionnalité dans des conditions similaires car le dépliement structurel est irréversible dans leur cas.

4.3.2) Applications en recherche, diagnostic et thérapeutique

Il ne s'agit pas ici d'établir une liste exhaustive des applications des nanobodies mais simplement de montrer la diversité de leurs applications. La première application des nanobodies qui peut être citée est leur utilisation dans le domaine de l'imagerie. En effet l'une des premières applications dans ce domaine a été de marquer des antigènes *in vivo* au niveau de différents compartiments intracellulaires grâce à des nanobodies fusionnés à une protéine fluorescente (316) ou à des fluorochromes de type Alexa®, à des quantum dots (317), à des atomes d'or (318) ou encore des radio-isotopes (319). Leurs applications en tant qu'outils d'imagerie sont multiples, allant de la biologie cellulaire à l'imagerie médicale (320). D'autres avancées font état de la possibilité d'utiliser les nanobodies pour l'imagerie cellulaire dynamique à très haute résolution (318,321). Dans un domaine tout à fait différent, les nanobodies sont aussi des bons outils pour les études de structure de protéines, notamment

en raison de leur capacité à favoriser la cristallisation de protéines récalcitrantes, soit en augmentant leur solubilité, soit en stabilisant des régions flexibles (322). Ainsi, des nanobodies ont par exemple permis l'obtention de la structure cristallographique de la protéine PrP du prion humain par le blocage de sa région N-terminale flexible (323). De plus, les nanobodies sont des protéines présentant une grande solubilité, ce qui réduit le risque des cristaux de nanobodies non complexés à leur cible. Cette propriété permet le développement de la cristallographie dite « assistée par des nanobodies » et donc l'obtention de structures cristallographiques dans des délais plus courts que les délais habituels (324). Enfin, les propriétés de liaison des nanobodies sont aussi utilisées dans des différentes approches *in vitro* et *in vivo*. *In vitro*, ces propriétés sont applicables à des approches biochimiques, telle que la purification de protéines ou de complexes protéiques. *In vivo*, des approches d'immunomodulation ont été développées afin de modifier la fonction de protéines cellulaires (325,326). Il est aussi possible d'induire la dégradation spécifique de protéines fusionnées à la GFP en les adressant au protéasome (327), de suivre et cibler des enzymes *in vivo* (328) ou encore de relocaliser des protéines voire des organites entiers dans des cellules (329,330).

RESULTATS EXPERIMENTAUX ET ARTICLES

L'objectif de ma thèse a été de travailler sur deux types d'anticorps : un nanobody dirigé car le FVIIa et l'emicizumab. Dans la première partie, je me suis intéressé à cribler, identifier et caractériser un nanobody fixant et inhibant le FVIIa et dans la seconde partie j'ai évalué dans un modèle de saignement chez la souris, l'effet de l'emicizumab en combinaison avec du FVIII.

Avant de présenter les différents articles sur lesquels j'ai travaillé, je vais présenter une revue traitant des anticorps en tant que traitements dans le cadre de l'hémophilie A. La thérapie de remplacement utilisant du FVIII a été prouvée comme étant efficace dans le traitement de la maladie. Cependant, cette approche n'est pas exempte d'inconvénients, tels que les injections fréquentes de FVIII ou encore le développement d'anticorps inhibiteurs chez 20-30% des patients avec une hémophilie A sévère. De nouvelles thérapies de l'hémophilie A utilisant des anticorps et non pas des facteurs de coagulation ont été développées, afin d'élargir le choix de traitements disponibles. Dans cette revue nous nous sommes intéressés plus particulièrement à un anticorps bispécifique servant de pont entre le FIXa et le FX, à des anticorps monoclonaux bloquant la fonction du TFPI et à une protéine de fusion FVIII/nanobody ayant une liaison significativement augmentée pour le FvW.

Antibodies in the Treatment of Haemophilia A— A Biochemical Perspective

Stephen Ferrière¹ Peter J. Lenting¹

¹Unité Mixte de Recherche Scientifique 1176, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Le Kremlin-Bicêtre, France

Address for correspondence Peter J. Lenting, PhD, Unité Mixte de Recherche Scientifique 1176, INSERM U1176, 80 rue du General Leclerc, 94276 Le Kremlin-Bicêtre, France (e-mail: peter.lenting@inserm.fr).

Hämostasieologie 2019;39:36–41.

Abstract

Replacement therapy has been proven effective in the management of bleedings in haemophilia A. Nevertheless, this approach comes with several shortcomings, like the need for frequent intravenous infusions and the development of neutralizing antibodies in 20 to 30% of the patients with severe haemophilia A replacement. This has led to the development of novel strategies to expand the spectrum of treatment options, some of which are based on antibody technology. These include a bispecific antibody that bridges enzyme factor IXa and substrate factor X, monoclonal antibodies that block the function of tissue factor pathway inhibitor, and a factor VIII–nanobody fusion protein with strongly enhanced von Willebrand factor binding. In this review, functional and mechanistic considerations on the use of these antibody variants will be discussed.

Keywords

- haemophilia
- factor VIII
- antibody

Zusammenfassung

Die Ersatztherapie hat sich bei der Behandlung von Blutungen bei Hämophilie A als wirksam erwiesen. Dennoch bringt dieser Ansatz einige Nachteile mit sich, wie beispielsweise die Notwendigkeit häufiger intravenöser Infusionen und die Entwicklung von neutralisierenden Antikörpern bei 20 bis 30% der Patienten mit schwerer Hämophilie A. Dies hat zur Entwicklung neuer Strategien geführt, um das Spektrum der Behandlungsoptionen zu erweitern, von denen einige auf der Antikörpertechnologie basieren. Dazu gehören ein bispezifischer Antikörper, der den Enzymfaktor IXa und den Substratfaktor X überbrückt, monoklonale Antikörper, die die Funktion des Tissue factor-Pathway-Inhibitors blockieren, und ein Faktor-VIII-Nanobody-Fusionsprotein mit stark verstärktem von Willebrand-Faktor. In dieser Übersichtsarbeit werden funktionale und mechanistische Überlegungen zur Verwendung dieser Antikörpervarianten diskutiert.

Schlüsselwörter

- Hämophilie
- Faktor VIII
- Antikörper

Introduction

The activated derivative of factor VIII (FVIIIa) participates in the coagulation cascade as a nonenzymatic cofactor for activated factor IX (FIXa) in the generation of activated factor X (FXa).¹ Its physiological relevance in this enzymatic reaction is illustrated by the notion that the functional absence of FVIII predisposes to a severe bleeding diathesis, known as haemophilia A.

For decades, the treatment of haemophilia A has mainly consisted of replacement therapy using FVIII concentrates of varying purity. As of today highly purified plasma-derived or recombinant FVIII concentrates are broadly used for the prophylactic treatment of haemophilia A, thereby not only markedly reducing spontaneous bleeding events but also enabling home therapy.^{2,3} Although effective, replacement therapy comes with several disadvantages, like the need for frequent

received
September 13, 2018
accepted after revision
November 26, 2018

© 2019 Georg Thieme Verlag KG
Stuttgart · New York

DOI <https://doi.org/10.1055/s-0038-1677521>.
ISSN 0720-9355.

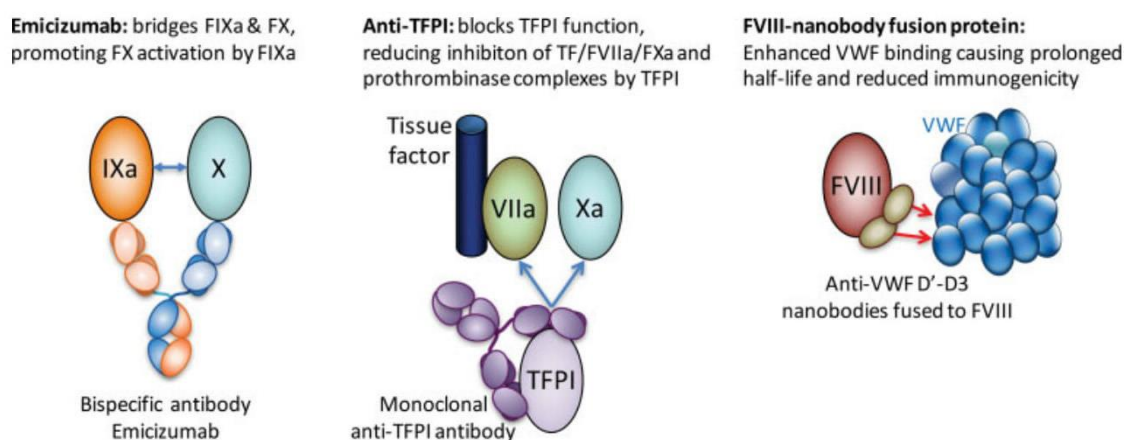


Fig. 1 Antibodies in haemophilia treatment. The mechanisms of action of three different types of antibodies that are or may be useful in the management of haemophilia are schematically depicted.

intravenous applications and the development of anti-FVIII antibodies in 20 to 30% of the patients with severe haemophilia A.⁴⁻⁶ It is not surprising therefore that a search for alternative strategies to improve haemophilia A treatment has been ongoing. In this review, we will focus on antibody-based treatment options, and three examples will be discussed (–Fig. 1). First, a bispecific antibody (emicizumab) that combines FIXa and FX to enhance FXa generation; second, antibodies that block the function of tissue factor pathway inhibitor (TFPI), thereby promoting activity of the tissue factor/factor VIIa (TF/FVIIa) and prothrombinase complex; and third, a FVIII–nanobody fusion protein that displays prolonged survival and reduced immunogenicity.⁷⁻⁹ Importantly, this review will limit itself to the functional and mechanistic aspects of the antibodies, and will not discuss clinical efficacy.

Bispecific Antibody Emicizumab: Comparison with FVIII

Emicizumab (also known as ACE910 or Hemlibra) is a bispecific antibody that interacts with FIX/FIXa and FX/FXa.⁸ The rationale behind this antibody is that it brings the enzyme FIXa and its substrate FX in close proximity, favouring conversion of FX into FXa. To some extent, this antibody resembles FVIIIa, the cofactor within the tenase complex that is also capable of simultaneously interacting with FIXa and FX. Nevertheless, emicizumab and FVIII are very different proteins in terms of structure and regulation, and consequently they will act differently during coagulation. To understand these differences, it is perhaps convenient to first provide a reminder of how FVIII actually functions. We have recently described the mode of action of FVIII in great detail,¹⁰ and will therefore only provide a summary of the key points in this regard.

On/off switch: FVIII circulates as a pre-cofactor that requires activation by thrombin and/or FXa before it becomes an active cofactor. However, because FVIIIa is a very labile protein, it will lose its function by just falling apart within minutes following activation.¹¹ Also, FVIIIa is an

efficient substrate for activated protein C, which is able to inactivate FVIIIa via site-specific proteolysis.¹² FVIIIa activity is thus regulated by an on/off switch.

Specific cofactor functions: FVIIIa's cofactor function consists of different explicit tasks. FVIIIa initiates formation of the tenase complex by recruiting FIXa to the phospholipid surface, limiting the movement of the proteins to a two-dimensional space.¹³ While interacting with FIXa, FVIIIa stabilizes the protease domain of FIXa.¹⁴ This interaction has two main functions: to reduce the flexible movements of the surface loops that surround the active centre and to position the active centre at the appropriate height from the phospholipid surface. Both functions are crucial to optimize the catalytic capacity of FIXa. Once in place, the complex is ready to receive FX. By interacting with FVIIIa, the activation peptide of FX is optimally aligned to the active site of FIXa, which further promotes FXa generation.¹⁵ Thus, multiple aspects of FVIIIa cofactor function define its enhancing potential within the tenase complex.

Specificity: Although FIXa binds equally well to FVIII or FVIIIa (with this interaction only being limited by the presence of von Willebrand factor [VWF]), the opposite is untrue. FVIIIa (or FVIII) is unable to interact with the FIX zymogen.¹⁶ This restricts the formation of the complex to one between the enzyme and cofactor, rather than between the zymogen and cofactor. Furthermore, FVIIIa is able to interact with FX, while less so with FXa.¹⁵ Indeed, the low affinity for FXa compared with FX allows the release of FXa from the FIXa/FVIIIa complex, making the tenase complex available for a next substrate molecule. Hence, FVIIIa displays specificity toward both the enzyme and substrate.

Stimulating activity: The magnitude by which FVIIIa enhances the catalytic activity of FIXa is often determined in assays using purified components. Accordingly, variables like phospholipid concentration and composition, as well as concentrations of the proteins, are determinant for the catalytic efficiency that is measured. In general, FVIIIa enhances FIXa activity by 1,000- to 1 million-fold.

Limiting factor within the tenase complex: To establish what is the limiting factor within the tenase complex, it is of

relevance to consider the respective protein concentrations. It is obvious that FVIII concentrations (0.3–1 nM) are considerably lower than those of FIX (90 nM) or FX (135 nM). The actual concentrations of FVIIIa and FIXa during *in vivo* coagulation are difficult to establish, but even if we consider that 50% of FVIII is activated versus 5% of FIX, this would still mean 9 to 30-fold less FVIIIa than FIXa (0.15–0.5 vs. 4.5 nM). It is thus fair to assume that FVIIIa is the limiting factor within the tenase complex.

In view of this complex mechanism of action and regulation of FVIIIa, it is obvious that the characteristics of the antibody-based protein emicizumab will be rather different. A first important difference is that emicizumab has similar affinity for FIX versus FIXa and for FX versus FXa.¹⁷ This indicates that the specificity of FVIIIa toward FIXa and FX is no longer present in the bispecific antibody. It is therefore possible that the following ternary complexes will be formed in the circulation: emicizumab/FIX/FX, emicizumab/FIXa/FX (which is the one that is relevant for FXa generation), emicizumab/FIX/FXa, and emicizumab/FIXa/FXa. How much of each complex is being formed is very much dependent on the respective concentrations of the individual constituents. Based on concentrations and respective affinities, it is possible to calculate how much of each complex is formed. In the normal circulation and at therapeutic emicizumab concentration of 55 µg/mL (370 nM), the emicizumab/FIX/FX complex will be the most abundant, with ~0.8 nM ternary complex.¹⁷

Interestingly, in normal individuals (and there is no reason to assume that this will be different in haemophilia A patients), there is ~120 pM of FIXa that is constitutively present in the circulation.¹⁸ Since emicizumab does not make any distinction between FIX and FIXa, only a small portion of these 120 pM of FIXa will bind to emicizumab. Indeed, the ternary complex relevant for FXa generation (emicizumab/FIXa/FX) present under basal conditions in these treated patients can be calculated to be ~2 pM. Of note, since emicizumab is not regulated by an on/off switch, this may indicate that there is a constitutive background activity of this emicizumab/FIXa/FX complex. It is not to be excluded that such low background activity may act already during small subclinical bleeds that do not provoke a full trigger of the coagulation cascade.

An important question is of course how efficiently does emicizumab enhance FIXa activity in comparison to FVIIIa? The antibody configuration of emicizumab will prevent it from capturing FIXa and FX to the phospholipid surface (something that does not exclude the activation reaction to be still phospholipid-dependent). Furthermore, with the emicizumab binding site being located in the epidermal growth factor 1 (EGF1)-like domain of FIXa, the bispecific antibody is also unlikely to modify the flexibility and position of the FIXa protease domain to a significant extent. It is therefore difficult to expect that emicizumab to be as efficient as FVIIIa in stimulating FX activation. Experiments using purified components showed that emicizumab was approximately 10-fold less efficient in enhancing the catalytic efficiency by which FIXa activates FX.^{8,17}

Emicizumab: Monitoring Using Activity Assays

To monitor emicizumab-based therapy in the patients, two issues are of relevance. First, one might want to verify levels of emicizumab during therapy. In the current clinical trials, a specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system using anti-idiotypic antibodies has been applied.¹⁹ Alternatively, one could also employ a chromogenic FVIII activity assay, with the necessity of such an assay to contain human FIXa and FX (for example Biophen FVIII:C by Hyphen Biomed), which uses emicizumab as standard. The main difficulty is to find a so-called FVIII-equivalence using activity assays. Several assays are available to measure FVIII activity, like the activated partial thromboplastin time (aPTT), thrombin generation assays (initiated by TF or factor XIa), or clot waveform analysis. Each of these assays is based on FVIII being the limiting factor, while the amount of FIXa that is generated in these tests is quite variable from one test to the other, and even depends on the activating reagent used. Knowing that emicizumab is present in large excess over all other relevant components (FIXa and FX) and is always in its “on”-mode, it will thus be the amount of FIXa present that will determine the activity of emicizumab. With the FIXa concentrations being different from one assay to the other, it will be complicated to assign a FVIII-like value to a certain emicizumab concentration. Care should therefore be taken to extrapolate findings concerning emicizumab in laboratory assays to the *in vivo* haemostatic potential of this molecule. We would like to emphasize that this does not mean that emicizumab activity *in vivo* is *per definition* lower than what will be measured in laboratory assays. It cannot be excluded that emicizumab has the intrinsic capacity to modulate the extent of FIXa formation in a way that goes unnoticed in the regular activity assays. For example, it is known that FXa is able to generate the FIX activation intermediate FIXα, which is a much better substrate than FIX for the TF/FVIIa complex. Akin to emicizumab promoting formation of FXa by FIX, it is theoretically possible that it also promotes FXa-mediated FIXα formation, which in the presence of TF/FVIIa is then readily converted into FIXa. This pathway could eventually explain why emicizumab seems to have higher activity in TF-based thrombin generation assays compared with FXIa-based thrombin generation assays.

Emicizumab in Combination with Other Procoagulant Agents

Under certain conditions, emicizumab has been or will be used in combination with other procoagulant proteins, such as FVIII concentrates or FVIII-bypassing agents like factor eight inhibitor bypassing activity (FEIBA) or FVIIa. It is of interest to consider how the co-use of such products impacts coagulation. In case of FEIBA use, several issues need to be considered. First, FEIBA consists of many different proteins, including high concentrations of prothrombin, FX, and FIX.²⁰ By adding FIX and FX to the circulation, one automatically increases levels of the ternary complexes. A dose of 100 U/kg

of FEIBA will more than double the concentration of the ternary emicizumab/FIX/FX complex in the circulation, assuming a therapeutic emicizumab level of 370 nM.¹⁷ Furthermore, FEIBA contains considerable amounts of FIXa and a dose of 100 U/kg may ultimately result in circulating FIXa levels that may reach 1 nM.^{21,22} Since emicizumab makes no distinction between FIX and FIXa, and does not require an on-switch to become active, the presence of FIXa may directly be used to trigger FXa generation: the ternary, FXa-generating emicizumab/FIXa/FX complex may rise to a concentration of 20 pM.

With regard to the use of FVIIa, it will be rather different. The use of FVIIa will not change the basal FIX or FX levels, suggesting ternary complex formation remains unaltered. However, FVIIa will cause the generation of both FIXa and FXa, thereby increasing the participation of these proteins in the complexes with emicizumab. Primate studies using a dose of 50 µg/kg FVIIa revealed that such a dose doubles the FIXa concentration in the circulation from ~120 to 240 pM.²³ This suggests that that FVIIa may contribute to an increase in active emicizumab/FIXa/FX complexes, albeit probably to a lesser extent compared with FEIBA.

As for the combination with FVIII, two distinct situations should be considered. First, in patients having no anti-FVIII antibodies receiving regular doses of FVIII concentrates (25–50 U/kg), FVIII will be present together with emicizumab and compete for the interaction with FIXa. Since FVIIIa displays much higher affinity for FIXa than emicizumab (2–15 nM vs. 1.5 µM), and will not be diluted to nonactivated FIX zymogen, it seems likely that any FIXa present will first choose to partner with FVIIIa. However, also in these situations, FIXa will be present in excess over FVIIIa. The remaining FIXa thus remains available to interact with emicizumab. Depending on the excess of FIXa, there might therefore be the formation of ternary complexes of emicizumab/FIXa/FX in addition to the tenase complex. However, these ternary complexes are 11-fold less efficient than the tenase complex in generating FXa. Will this be different under conditions where patients receive immune-tolerance therapy? Such patients have inhibitory antibodies against FVIII, and receive high doses of FVIII on a daily basis. Depending on the nature of the inhibitory antibodies and their concentrations, they may prevent FVIII from interacting with FIXa. As such, FIXa remains available for binding to emicizumab. Given the polyclonal character of the antibodies in most patients, it is probable that FVIII will not be interacting with FIXa in these inhibitor patients. Emicizumab will therefore be able to assist FIXa during immune tolerance therapy.

Monoclonal Antibodies Targeting TFPI

TFPI is a Kunitz-type inhibitor, known to interfere with the initial phase of coagulation.^{24,25} Two isoforms are present in humans: TFPI α , which contains three Kunitz domains and a basic C-terminal region, and TFPI β in which the third Kunitz domain and the basic region are replaced by a glycosylphosphatidylinositol-binding sequence. The mode of action of TFPI is perhaps less straightforward than many seem to

appreciate.^{24,26} At low concentrations, its Kunitz-2 domain interacts loosely with FXa, before isomerizing into a tight complex. This complex is then able to rapidly inhibit the activity of the TF/FVIIa complex, via interactions between the Kunitz-1 domain of TFPI and the FVIIa active site. TFPI alone is a less effective inhibitor of TF/FVIIa compared with FXa/TFPI.

The fact that TFPI plays an important role in the regulation of the initial phase of coagulation has sparked interest related to its use as a target in the treatment of haemophilia.⁷ The rationale would be that by blocking TFPI, more FXa and FIXa will be generated by the FVIIa/TF complex, which in turn will lead to increased thrombin generation and subsequent fibrin deposition and platelet activation. Preliminary studies indeed revealed that anti-TFPI antibodies shorten the coagulation time of haemophilic plasma and reduce the bleeding tendency in a rabbit model of acquired haemophilia A.^{27,28}

As to our knowledge, three monoclonal antibodies targeting TFPI are currently under clinical development: PF-06741086 by Pfizer, BAY1093884 by Bayer Healthcare, and concizumab by Novo Nordisk. Results from efficacy studies using these antibodies are awaited with great anticipation. Meanwhile, it is of interest to reflect on the various aspects of how such monoclonal antibodies affect TFPI biology. Several issues seem to be of relevance in this regard. First, TFPI is not only an inhibitor of the FXa/FVIIa/TF complex, but also recognized as a direct inhibitor of the prothrombinase complex.²⁹ At present, it is unclear which of the three clinical candidates is able to interfere with TFPI-mediated inhibition of the prothrombinase complex, and how this affects the prohaemostatic potential of such antibody.

The second issue relates to the biodistribution of TFPI. The majority of the TFPI molecules are located at the surface and within endothelial cells, while only a small percentage of TFPI is present in plasma, mostly associated to lipoproteins.³⁰ There is also a portion that is stored in platelets.³¹ It will thus be difficult to monitor how much of the total TFPI population will be inhibited by the therapeutic antibodies, while having only access to the patients' plasma. Moreover, in vivo studies using mice with a combined tissue-specific deficiency of TFPI and full deficiency of FVIII revealed that particularly platelet-stored TFPI α is of particular relevance to compensate for the absence of FVIII.³² At this point, it is uncertain which of the three monoclonal antibodies in clinical development is able to specifically target platelet-stored TFPI. Lastly, we know that the FVIIa/TF complex may exert functions beyond haemostasis, in part via protease activated receptor 2 (PAR-2) mediated signalling processes.³³ For example, animal studies have revealed that cell-bound TFPI contributes to reduce tumour metastasis and atherosclerosis.^{34,35} Furthermore, TFPI may also inhibit other proteases that are not involved in haemostasis, and the FVII-activating protease has been reported to be among them.³⁶ It would be important therefore to investigate how the prophylactic use of anti-TFPI antibodies modulates the extra-haemostatic activities of the TF/FVIIa complex and other proteases.

A Factor VIII–Nanobody Fusion Protein

For our third example of how antibodies could be used in the development of novel strategies in the treatment of haemophilia, we would like to focus on a specific kind of antibodies, namely heavy chain-only antibodies.³⁷ Such antibodies are found in members of the Camelid family, which include camels and llamas. These heavy chain-only antibodies lack the light chain that is present in classic immunoglobulin G (IgG) molecules, and consequently all the antigen-binding information is constrained within the variable heavy-chain region of the heavy chain-only antibodies. This variable region (also known as VHH or nanobody) can thus be used similar to the single-chain Fv fragments of classic IgGs. In isolated form, nanobodies have a molecular weight of ~15 kDa. Despite their small size, they can still display high affinity for their target antigen. In the present example of this review, nanobodies have been used as a fusion partner to FVIII.⁹ Of course, many other possibilities to use these specific antibody fragments do exist (see for instance reviews in Beghein and Gettemans 2017, Manglik et al 2017, and Vincke and Muyldermans 2012).^{38–40}

The rationale behind the use of nanobodies as a fusion partner for FVIII lies in the observation that although FVIII binds with high affinity to VWF, there is still 2 to 5% of FVIII that circulates as free protein.^{41,42} Free FVIII differs from VWF-bound FVIII in that it is cleared 6- to 10-fold more rapidly. Moreover, VWF modulates the anti-FVIII immune response by affecting the pathway by which FVIII is endocytosed by antigen-presenting cells.^{43,44} The underlying hypothesis in the design of the FVIII–nanobody fusion protein was therefore to create a FVIII molecule that forms a tighter complex with VWF, thereby reducing the amount of free FVIII. To do so, nanobodies were generated against the VWF^{D1}-D3 domain, the region that contains the FVIII-binding site. These nanobodies indeed display a ~50- to 100-fold slower dissociation rate constant from VWF compared with FVIII.⁹

Two copies of one of these nanobodies, i.e., KB-VWF-013, were cloned into the FVIII complementary DNA (cDNA), replacing the nonfunctional FVIII B-domain.⁹ The final protein, designated FVIII-KB013bv, was produced in mammalian cell lines as a single chain protein, and analysed for function in *in vitro* assays. In terms of activity, FVIII-KB013bv was having full cofactor activity in one stage and chromogenic assays. FVIII-KB013bv further had a 25-fold higher apparent affinity for VWF compared with wild-type FVIII (13 vs. 330 pM), confirming that the presence of the nanobodies considerably improves binding to VWF. This increased affinity means that at a concentration of 1 U/ml, more than 99.8% of FVIII-KB013 is bound to VWF, whereas this is ~96.7% for wild-type FVIII.⁹

The effect of improved VWF binding was evaluated in FVIII-deficient mice. When determining circulatory survival, it was observed that FVIII-KB013bv was cleared 2-fold slower than wild-type FVIII. The increased survival was further established by its capacity to correct bleeding in FVIII-deficient mice 24 hours after a single intravenous injection, whereas by using the same dose wild-type FVIII was no longer able to do so.⁹ Thus, the FVIII–nanobody fusion

protein is fully functional *in vivo* and has a prolonged half-life. With regard to the development of anti-FVIII antibodies, we observed that FVIII-KB013bv was less immunogenic than wild-type FVIII (15% of mice developed antibodies against FVIII-KB013bv vs. 85% developed antibodies against FVIII).⁹ The reason for this difference will require further studies, but may be related to the fact that upon binding of the classic FVIII/VWF complex to antigen-presenting cells, FVIII enters into these cells, whereas VWF remains mainly at the cell surface.⁴⁵ By having a FVIII molecule that sticks to VWF much more tightly, it is possible that less FVIII is able to enter the antigen-presenting cells, resulting in the formation of fewer anti-FVIII antibodies. In comparison to emicizumab and the anti-TFPI antibodies, FVIII-KB013bv is not yet ready to enter clinical evaluation. Nevertheless, it represents an interesting example of how antibodies can be used to optimize treatment in general and that of haemophilia A in particular.

Conclusion

This review has presented three different ways of how antibodies signify novel strategies to innovate the management of bleeding episodes in haemophilia. Importantly, the use of antibodies is not limited to a simple inhibition of the function of its target. Two of the three examples presented here, such as emicizumab that has procoagulant cofactor activity and the FVIII–nanobody fusion protein that ameliorates the molecular properties of the complex FVIII molecule, represent these options. The future will teach us if other types of application will become available to further improve the clinical management of haemophilia.

Disclosures

S.F. has no relevant conflict of interest. P.J.L. has received honorarium/speakers' fee from Bayer Healthcare, CSL Behring, Grifols, Kedrion, LFB, Novo Nordisk, Octapharma, Roche, Spark Therapeutics, Shire, and Sobi. He is also coinventor on patent applications related to treatment options for bleeding disorders, including a patent application describing the FVIII–nanobody fusion protein. P.J.L. is cofounder/coowner of Laelaps Therapeutics.

References

- Lenting PJ, van Mourik JA, Mertens K. The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. *Blood* 1998;92(11):3983–3996
- Nilsson IM, Berntorp E, Löfqvist T, Pettersson H. Twenty-five years' experience of prophylactic treatment in severe haemophilia A and B. *J Intern Med* 1992;232(01):25–32
- Manco-Johnson MJ, Abshire TC, Shapiro AD, et al. Prophylaxis versus episodic treatment to prevent joint disease in boys with severe hemophilia. *N Engl J Med* 2007;357(06):535–544
- Gouw SC, van der Bom JG, Ljung R, et al; PedNet and RODIN Study Group. Factor VIII products and inhibitor development in severe hemophilia A. *N Engl J Med* 2013;368(03):231–239
- Calvez T, Chambost H, Claeysens-Donadel S, et al; FranceCoag Network. Recombinant factor VIII products and inhibitor development in previously untreated boys with severe hemophilia A. *Blood* 2014;124(23):3398–3408

- 6 Peyvandi F, Mannucci PM, Garagiola I, et al. A randomized trial of factor VIII and neutralizing antibodies in hemophilia A. *N Engl J Med* 2016;374(21):2054–2064
- 7 Peterson JA, Maroney SA, Mast AE. Targeting TFPI for hemophilia treatment. *Thromb Res* 2016;141(Suppl 2):S28–S30
- 8 Kitazawa T, Igawa T, Sampei Z, et al. A bispecific antibody to factors IXa and X restores factor VIII hemostatic activity in a hemophilia A model. *Nat Med* 2012;18(10):1570–1574
- 9 Muczynski V, Casari C, Moreau F, et al. A factor VIII-nanobody fusion protein forming an ultrastable complex with VWF: effect on clearance and antibody formation. *Blood* 2018;132(11):1193–1197
- 10 Lenting PJ, Denis CV, Christophe OD. Emicizumab, a bispecific antibody recognizing coagulation factors IX and X: how does it actually compare to factor VIII? *Blood* 2017;130(23):2463–2468
- 11 Fay PJ, Beattie TL, Regan LM, O'Brien LM, Kaufman RJ. Model for the factor VIIIa-dependent decay of the intrinsic factor Xase. Role of subunit dissociation and factor IXa-catalyzed proteolysis. *J Biol Chem* 1996;271(11):6027–6032
- 12 Eaton D, Rodriguez H, Vehar GA. Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity. *Biochemistry* 1986;25(02):505–512
- 13 Duffy EJ, Parker ET, Mutucumarana VP, Johnson AE, Lollar P. Binding of factor VIIIa and factor VIII to factor IXa on phospholipid vesicles. *J Biol Chem* 1992;267(24):17006–17011
- 14 Fay PJ, Koshihbu K. The A2 subunit of factor VIIIa modulates the active site of factor IXa. *J Biol Chem* 1998;273(30):19049–19054
- 15 Lapan KA, Fay PJ. Localization of a factor X interactive site in the A1 subunit of factor VIIIa. *J Biol Chem* 1997;272(04):2082–2088
- 16 Lenting PJ, Donath MJ, van Mourik JA, Mertens K. Identification of a binding site for blood coagulation factor IXa on the light chain of human factor VIII. *J Biol Chem* 1994;269(10):7150–7155
- 17 Kitazawa T, Esaki K, Tachibana T, et al. Factor VIIIa-mimetic cofactor activity of a bispecific antibody to factors IX/IXa and X/Xa, emicizumab, depends on its ability to bridge the antigens. *Thromb Haemost* 2017;117(07):1348–1357
- 18 Bauer KA, Kass BL, ten Cate H, Hawiger JJ, Rosenberg RD. Factor IX is activated in vivo by the tissue factor mechanism. *Blood* 1990;76(04):731–736
- 19 Uchida N, Sambe T, Yoneyama K, et al. A first-in-human phase 1 study of ACE910, a novel factor VIII-mimetic bispecific antibody, in healthy subjects. *Blood* 2016;127(13):1633–1641
- 20 Varadi K, Tangada S, Loeschberger M, et al. Pro- and anticoagulant factors facilitate thrombin generation and balance the haemostatic response to FEIBA(®) in prophylactic therapy. *Haemophilia* 2016;22(04):615–624
- 21 Elödi S, Váradi K. Activation of clotting factors in prothrombin complex concentrates as demonstrated by clotting assays for factors IXa and Xa. *Thromb Res* 1978;12(05):797–807
- 22 Hultin MB. Activated clotting factors in factor IX concentrates. *Blood* 1979;54(05):1028–1038
- 23 ten Cate H, Bauer KA, Levi M, et al. The activation of factor X and prothrombin by recombinant factor VIIa in vivo is mediated by tissue factor. *J Clin Invest* 1993;92(03):1207–1212
- 24 Mast AE. Tissue factor pathway inhibitor: multiple anticoagulant activities for a single protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016;36(01):9–14
- 25 Maroney SA, Mast AE. New insights into the biology of tissue factor pathway inhibitor. *J Thromb Haemost* 2015;13(Suppl 1):S200–S207
- 26 Baugh RJ, Broze GJ Jr, Krishnaswamy S. Regulation of extrinsic pathway factor Xa formation by tissue factor pathway inhibitor. *J Biol Chem* 1998;273(08):4378–4386
- 27 Nordfang O, Valentin S, Beck TC, Hedner U. Inhibition of extrinsic pathway inhibitor shortens the coagulation time of normal plasma and of hemophilia plasma. *Thromb Haemost* 1991;66(04):464–467
- 28 Erhardtsen E, Ezban M, Madsen MT, et al. Blocking of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) shortens the bleeding time in rabbits with antibody induced haemophilia A. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1995;6(05):388–394
- 29 Wood JP, Bunce MW, Maroney SA, Tracy PB, Camire RM, Mast AE. Tissue factor pathway inhibitor-alpha inhibits prothrombinase during the initiation of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110(44):17838–17843
- 30 Maroney SA, Mast AE. Expression of tissue factor pathway inhibitor by endothelial cells and platelets. *Transfus Apheresis Sci* 2008;38(01):9–14
- 31 Novotny WF, Girard TJ, Miletich JP, Broze GJ Jr. Platelets secrete a coagulation inhibitor functionally and antigenically similar to the lipoprotein associated coagulation inhibitor. *Blood* 1988;72(06):2020–2025
- 32 Maroney SA, Cooley BC, Ferrel JP, et al. Absence of hematopoietic tissue factor pathway inhibitor mitigates bleeding in mice with hemophilia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(10):3927–3931
- 33 Mackman N. The many faces of tissue factor. *J Thromb Haemost* 2009;7(Suppl 1):136–139
- 34 Xiao J, Jin K, Wang J, et al. Conditional knockout of TFPI-1 in VSMCs of mice accelerates atherosclerosis by enhancing AMOT/YAP pathway. *Int J Cardiol* 2017;228:605–614
- 35 Wang J, Xiao J, Wen D, et al. Endothelial cell-anchored tissue factor pathway inhibitor regulates tumor metastasis to the lung in mice. *Mol Carcinog* 2016;55(05):882–896
- 36 Stephan F, Dienava-Verdoold I, Bulder I, et al. Tissue factor pathway inhibitor is an inhibitor of factor VII-activating protease. *J Thromb Haemost* 2012;10(06):1165–1171
- 37 Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 1993;363(6428):446–448
- 38 Beghein E, Gettemans J. Nanobody technology: a versatile toolkit for microscopic imaging, protein-protein interaction analysis, and protein function exploration. *Front Immunol* 2017;8:771
- 39 Manglik A, Kobilka BK, Steyaert J. Nanobodies to study G protein-coupled receptor structure and function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2017;57:19–37
- 40 Vincke C, Muyldermans S. Introduction to heavy chain antibodies and derived Nanobodies. *Methods Mol Biol* 2012;911:15–26
- 41 Noe DA. A mathematical model of coagulation factor VIII kinetics. *Haemostasis* 1996;26(06):289–303
- 42 Schambeck CM, Grossmann R, Zonnur S, et al. High factor VIII (FVIII) levels in venous thromboembolism: role of unbound FVIII. *Thromb Haemost* 2004;92(01):42–46
- 43 Hartholt RB, van Velzen AS, Peyron I, Ten Brinke A, Fijnvandraat K, Voorberg J. To serve and protect: the modulatory role of von Willebrand factor on factor VIII immunogenicity. *Blood Rev* 2017;31(05):339–347
- 44 Oldenburg J, Lacroix-Desmazes S, Lillicrap D. Alloantibodies to therapeutic factor VIII in hemophilia A: the role of von Willebrand factor in regulating factor VIII immunogenicity. *Haematologica* 2015;100(02):149–156
- 45 Sorvillo N, Hartholt RB, Bloem E, et al. von Willebrand factor binds to the surface of dendritic cells and modulates peptide presentation of factor VIII. *Haematologica* 2016;101(03):309–318

Premier article

Développement d'un nanobody inhibiteur du FVIIa de la coagulation

Publication : Ferrière S, Kawecki C, Ottavi JF, Denis CV, Kauskot A, Christophe OD, Lenting PJ. *J Thromb Haemost.* 2019 Dec;17(12):2035-2046. doi: 10.1111/jth.14615.



Etat de l'art et questions

L'hémophilie A résulte de l'absence fonctionnelle du facteur VIII (FVIII) de la coagulation. Le traitement fait appel à une thérapie de substitution utilisant des concentrés de FVIII. Toutefois des agents court-circuitant le FVIII sont parfois nécessaires, tels que le FVIIa. L'activité protéolytique et amidolytique du FVIIa est grandement augmentée lorsqu'il est lié à son cofacteur FT. Bien que cliniquement efficace, le mécanisme d'action du FVIIa *in vivo* est sujet à débats depuis de nombreuses années. Son activité est-elle dépendante ou indépendante de son cofacteur FT ? De nombreuses observations expérimentales montrent une activité du FVIIa localisée au niveau de la surface des plaquettes, selon un mécanisme indépendant du FT. Néanmoins, l'hypothèse que le FVIIa ait une activité dépendante du FT dans certaines conditions ne peut être écartée.

Afin de répondre à cette question, nous avons donc eu pour objectif d'isoler un nanobody spécifique pour le FVIIa libre plutôt que le FVIIa complexé au FT et de le caractériser. Pour cela nous avons criblé une banque de nanobodies de lama par phage display.

ORIGINAL ARTICLE

A single-domain antibody that blocks factor VIIa activity in the absence but not presence of tissue factor

Stephen Ferrière¹ | Charlotte Kawecki¹ | Jean-François Ottavi² | Cécile V. Denis¹   | Alexandre Kauskot¹ | Olivier D. Christophe¹ | Peter J. Lenting¹

¹Laboratory of Hemostasis-Inflammation-Thrombosis, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR_S 1176, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Le Kremlin-Bicêtre, France

²Inovation, Paris, France

Correspondence

Cécile V. Denis, INSERM U1176, 80 rue du General Leclerc, 94276 Le Kremlin-Bicêtre, France.

Email: cecile.denis@inserm.fr

Funding information

Société Française d'Hématologie

Abstract

Background: Activated factor VII (FVIIa) is pertinent to the initiation of blood coagulation. Proteolytic and amidolytic activity of FVIIa are greatly enhanced by its cofactor, tissue factor (TF).

Objective: We aimed to generate a single-domain antibody (sdAb) that recognizes free FVIIa rather than TF-bound FVIIa.

Methods: A llama-derived phage library was used to screen for anti-FVIIa sdAbs.

Results: One sdAb, KB-FVIIa-004, bound to FVIIa, but not to its precursor FVII or to homologous proteins (prothrombin, factor X, or their activated derivatives). FVIIa amidolytic activity was inhibited by KB-FVIIa-004 ($K_i = 28\text{--}45\text{ nM}$) in a competitive manner. KB-FVIIa-004 also inhibited FVIIa-mediated FX activation ($K_i = 26\text{ nM}$). In contrast, KB-FVIIa-004 was inefficient in prolonging the clotting time of the prothrombin time-test, which was prolonged by a maximum of 10 s at high sdAb concentrations (10 μM). Furthermore, FVIIa/TF amidolytic activity or FVIIa/TF-mediated FX activation remained unaffected up to a 50-fold to 1000-fold molar excess of KB-FVIIa-004. These data suggest that KB-FVIIa-004 loses its inhibitory activity in the presence of TF. A KB-FVIIa-004/albumin fusion-protein (004-HSA) was generated for *in vivo* testing. By using 004-HSA, we observed that this sdAb blocked the therapeutic capacity of FVIIa to correct bleeding in FVIII-deficient mice.

Discussion: This observation is compatible with the view that FVIIa functions independently of TF under these conditions. In conclusion, we have generated a sdAb that specifically blocks TF-independent activity of FVIIa. This antibody can be used to gain insight into the roles of TF-bound and TF-free FVIIa.

KEYWORDS

coagulation factor, factor VIIa, hemostasis, inhibitor, single-domain antibody, tissue factor

Olivier D. Christophe and Peter J. Lenting are equal contributors

Manuscript handled by: James Morrissey

Final decision: James Morrissey 12 August 2019

1 | INTRODUCTION

Human blood coagulation factor VII is a vitamin K-dependent serine protease precursor that is secreted as a 50-kDa protein consisting of 406 amino acid residues. Structurally, FVII is related to other vitamin K-dependent proteins, such as factor IX (FIX) and factor X (FX): it contains an N-terminal Gla domain enriched in γ -carboxylated Glu-residues, two epidermal growth factor-like domains, and a C-terminal serine protease domain.^{1,2} Activation of FVII is achieved via limited proteolysis at Arg¹⁵², generating a two-chain derivative that is covalently linked via a disulfide bridge.

Factor VIIa is responsible for the activation of its cognate substrates FIX and FX. Similar to many other vitamin K-dependent serine proteases, the enzymatic activity of FVIIa toward these substrates is relatively poor.³ Furthermore, the notion that FVIIa also displays low intrinsic activity toward small tripeptidyl-amide substrates suggests that the active site of FVIIa is not fully developed.⁴ Indeed, it appears that the N-terminal Ile¹⁵³ of the protease domain does not properly fold into the active site pocket, leaving the catalytic triad that consists of His¹⁹³, Asp²⁴², and Ser³⁴⁴ immature.⁵ It has been proposed that FVIIa exists in equilibrium between two states, one in which Ile¹⁵³ is inserted into the active site pocket and one that is more zymogenlike, with Ile¹⁵³ incorrectly inserted.

In order to develop physiologically relevant activity, FVIIa forms a complex with TF. Formation of the FVIIa/TF complex strongly promotes the insertion of Ile¹⁵³ into the active site pocket.⁶ This does not only result in a functional catalytic triad, but also induces a number of allosteric changes in FVIIa protease domain surface loops, including the S1 entrance frame (residues 365 to 372).⁷ Consequently, TF binding enhances amidolytic activity 20-fold to 100-fold, while proteolysis of macromolecular substrates FIX and FX is increased 10⁵-fold to 10⁶-fold.

Importantly, recombinant FVIIa is used as a therapeutic agent in the treatment of the bleeding disorder hemophilia A. Although clinically effective, its mechanism of action has been a matter of debate for many years, mainly regarding its function's being TF-dependent or independent.⁸ On the basis of *in vitro* and *in vivo* observations, there is accumulating evidence that this FVIIa activity is localized to the platelet surface, predominantly in a TF-independent manner.^{9,10} However, it cannot be excluded that therapeutic FVIIa also displays TF-dependent activity under some conditions.¹¹⁻¹³

Soon after the development of monoclonal antibody technology, antibodies against FVII and FVIIa were generated.¹⁴⁻¹⁸ Of note, many of them recognize both the active and zymogen forms of FVII. There are nevertheless some examples of FVIIa-specific antibodies. Philippou et al. generated a polyclonal antibody directed against the C-terminal part of the FVIIa light chain, which displayed >3000-fold greater reactivity to FVIIa than FVII.¹⁹ Andersen et al.¹⁸ reported on antibodies that show preferential binding to FVIIa and stimulated FVIIa activity. Most recently, a llama-derived single-domain antibody (sdAb) that binds to FVIIa but not to FVII has been described.²⁰ The antibody described by Philippou remains inhibitory in the presence of TF.¹⁹ With regard to the FVIIa-specific sdAb, it is not reported whether it is inhibitory or, if inhibitory, whether this is affected by the presence of TF.

Essentials

- Factor VIIa (FVIIa) is an enzyme that has both tissue factor (TF)-dependent and TF-independent activities.
- We describe a novel antibody (KB-FVIIa-004) that selectively blocks TF-independent activity of FVIIa.
- KB-FVIIa-004 interferes with the action of recombinant FVIIa (rFVIIa) in factor VIII (FVIII)-deficient mice.
- Our data suggest that rFVIIa acts as a FVIII-bypassing agent predominantly in a TF-independent fashion.

The aim of the present study was to generate sdAbs against FVIIa that display selectivity to free FVIIa rather than TF-bound FVIIa. Such antibodies could be helpful to gain insight into the role of TF-bound and TF-free FVIIa function.

2 | EXPERIMENTAL PROCEDURES

2.1 | Animals and ethics statement

Factor VIII-deficient mice with an exon 16-deletion²¹ have been backcrossed (>10 times) on a C57Bl/6 background. Males and females were used throughout the study (8-12 weeks old, 20-25 g). Housing and experiments were performed in accordance with French regulations and the experimental guidelines of the European Community. This project was approved by the local ethical committee of Université Paris-Sud (comité d'éthique en experimentation animale no 26) under the APAFIS number #4400-2016021716431023-V5.

2.2 | Materials

D-Phe-Pro-Arg-chloromethyl ketone (PPACK) was obtained from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX). Purified recombinant FVIIa was from NovoNordisk (Malov, Denmark). Purified plasma-derived FVII was from Haematologic Technologies, Inc. (Essex Junction, VT), and traces of FVIIa (<2%) were inactivated by incubation with PPACK and benzamidine. Purified plasma-derived FX was from Haematologic Technologies, Inc. Two sources of relipidated recombinant full-length human TF were used during the study (Siemens-Dade, Marburg, Germany, and American Diagnostica, Neuville-sur-Oise, France), giving similar results. Soluble murine TF (smTF) was obtained from Novusbio/Bio-Techne (Lille, France). Thrombin was purchased from Kordia (Leiden, the Netherlands). Control sdAb KB-VWF-006bv has been described previously.²² Bovine serum albumin (BSA) was from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO). Polyclonal goat anti-FVII/FVIIa antibodies and peroxidase-labeled polyclonal sheep anti-FVII/FVIIa antibodies were from R&D Systems (Minneapolis, MN). Phospholipid vesicles (75% L- α -phosphatidylcholine/25% L- α -phosphatidyl-L-serine) were prepared as described.²³ The PT and aPTT reagent were from Stago (Asnières, France). Chromogenic substrate CBS-34.47 was from Stago, and S-2222 and S-2238 were from Chromogenix (Mölnal, Sweden).

2.3 | Isolation of single-domain antibodies

The sdAb repertoire was amplified from lymphocyte cDNA, isolated from llamas immunized with human recombinant FVIIa, and cloned into the pHEN6-plasmid. This material was used to transform *E. coli* TG1 cells to generate a library containing $>1 \times 10^8$ clones. Via a phage-display approach, this library was used to select sdAbs against FVIIa. From a series of >10 sdAbs, one appeared specific for FVIIa and was named KB-FVIIa-004. KB-FVIIa-004 was cloned into the pET28-plasmid and was expressed with an N-terminal His-tag and C-terminal hemagglutinin-tag. Expression was performed in *E. coli* SHuffle-C3029H cells (New England Biolabs, Evry, France). Bacteria were grown in 330 mL of AUTHOR; PLEASE SPELL OUT LB.LB-medium at 30 °C until the culture had reached the logarithmic phase at an optical density between 0.4 and 0.6. Protein expression was then induced at 20 °C via the addition of isopropyl-thiogalactoside (0.1 mM final concentration). Twenty-four hours after induction of protein expression, cells were collected, and soluble proteins were released from the cells via sonication. His-tagged nanobodies were purified via Co^{2+} -affinity chromatography using PBS/0.3 M NaCl/0.5 M imidazole as elution reagent. Minor contaminants were removed from the preparations via size-exclusion chromatography using 20 mM Hepes (pH 7.4)/0.1 M NaCl as equilibrium buffer. Purified KB-FVIIa-004 displayed $>95\%$ homogeneity as assessed via sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Coomassie staining.

2.4 | FVII/FVIIa enzyme-linked immunosorbent assay

Wells were coated with polyclonal goat-anti FVII/FVIIa antibodies (10 $\mu\text{g/mL}$) and incubated with various dilutions of human plasma (1/2 to 1/128), purified human FVII (0-50 nM), or purified FVIIa (0-5 nM) in Tris-buffered saline (pH 7.4)/0.1% bovine serum albumin for 2 h at 37 °C. Bound FVII/FVIIa was probed with peroxidase-labeled polyclonal sheep-anti FVII/FVIIa antibodies and detected via hydrolysis of 3-3'-5-5'-tetramethylbenzidine.

2.5 | Amidolytic activity

Factor VIIa amidolytic activity was measured via hydrolysis of substrate CBS-34.47 (1.5 mM, unless indicated otherwise). Factor VIIa amidolytic activity in the absence of TF was performed using 75 nM FVIIa. In the presence of relipidated TF (10 nM), FVIIa concentrations were 7.5 nM. Concentrations of KB-FVIIa-004 were 0 to 600 nM in the absence of TF and 0 to 750 nM in the presence of TF. Substrate hydrolysis was monitored by measuring absorbance at 405 nm. Factor Xa (5 nM) and thrombin (5 nM) amidolytic activity were measured in a similar fashion, except that substrates S-2222 (1 mM) and S-2238 (1 mM) were used. All amidolytic activities were measured in 30 mM Hepes (pH 7.4), 125 nM NaCl, 6.5 mM CaCl_2 , and bovine serum albumin 0.125%.

2.6 | Schild regression analysis

The initial rates of CBS-34.47 (0-4 mM) hydrolysis by FVIIa (75 nM) in the presence of KB-FVIIa-004 (0-112.5 nM) were determined. Initial velocity values were then plotted versus $\log[\text{CBS-34.47}]$, and the preprogrammed EC50-Shift equation (GraphPrism-6, GraphPad Software, San Diego, CA) was used to determine the dose ratio for each sdAb concentration. These values were subsequently used for Schild regression analysis,²⁴ in which $\log(\text{dose ratio} - 1)$ is plotted versus $\log[\text{KB-FVIIa-004}]$. The shape of the curve represents the nature of the inhibitor (a linear curve represents a competitive inhibitor, whereas an exponential curve represents non-competitive inhibition). For a competitive inhibitor, the X-axis intercept of the linear fit corresponds to the K_i of the interaction.

2.7 | FX activation in absence of TF

Factor VIIa was preincubated for 60 min in the absence or presence of KB-FVIIa-004 and added to FX and phospholipids. Final concentrations were 25 nM FVIIa, 0.5 μM FX, 40 μM phospholipids, and 0 to 250 nM KB-FVIIa-004. Factor X activation was terminated after 15 min by the addition of EDTA (50 mM), and samples were analyzed for FXa formation by assessing hydrolysis of substrate S-2222. Assays were performed in 30 mM Hepes (pH 7.4), 125 nM NaCl, 6.5 mM CaCl_2 , and bovine serum albumin 0.125%.

2.8 | FX activation in presence of TF

Factor VIIa and relipidated TF were preincubated for 60 min in the absence or presence of KB-FVIIa-004 and added to FX. Final concentrations were 1 nM FVIIa, 2 nM TF, 0.2 μM FX, 10 μM phospholipids, and 0-1 μM KB-FVIIa-004. Factor X activation was terminated after 15 min by the addition of EDTA (50 mM), and samples were diluted 100-fold. The amount of FXa formed was determined via hydrolysis of substrate S-2222. Assays were performed in 30 mM Hepes (pH 7.4), 125 nM NaCl, 6.5 mM CaCl_2 , and bovine serum albumin 0.125%.

2.9 | Inactivation of FVIIa by PPACK

Factor VIIa (0.1 μM) was incubated with various concentrations of PPACK (0-10 μM) for 60 min at 37 °C. Samples were then analyzed in parallel for binding to KB-FVIIa-004 and for amidolytic activity.

2.10 | Bleeding time

Mouse tail-bleeding time was performed using the tail clip-bleeding assay. Briefly, immediately after tail vein injection, mice were anesthetized using ketamine (100 mg/kg)/xylazine (10 mg/kg) solution. Once they were anesthetized, the 3 mm of the distal tip of the tail was amputated. The amputated tail was immersed in pre-warmed physiological saline (37 °C) and blood was collected for 30 min. After 30 min, the mixture of blood and physiological saline was centrifuged at 1500 g. The red blood cell pellet was then lysed

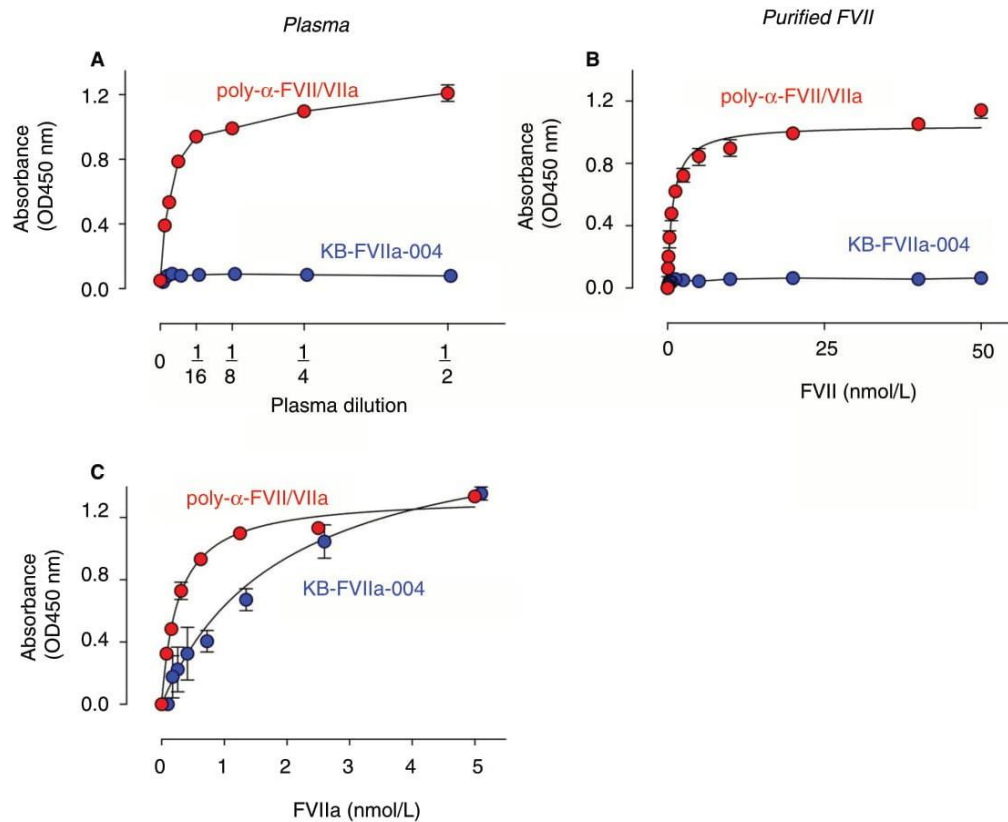


FIGURE 1 Binding of KB-FVIIa-004 to FVIIa. Microtiter wells coated with polyclonal anti-FVII/VIIa antibodies (red symbols) or KB-FVIIa-004 (blue symbols; both 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were incubated with various dilutions of human plasma (Panel A), or various concentrations of purified FVII (Panel B), or various concentrations of purified FVIIa (Panel C). Bound FVII/VIIa was probed with peroxidase-labeled polyclonal anti-FVII/VIIa antibodies and detected via hydrolysis of 3-3'-5-5'-tetramethylbenzidine. Plotted is the absorbance at 450 nm versus FVII/VIIa concentration. Data represent mean \pm SD of three experiments. FVII, factor VII; FVIIa, factor VIIa

in H_2O and the amount of hemoglobin was obtained by reading the absorbance at 416 nm. The volume of blood lost in each sample was calculated from a standard curve, which is obtained by lysing defined volumes (20, 40, 60, 80, and 100 μL) of mouse blood in H_2O to extract hemoglobin.

2.11 | Statistical analysis

Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance with Dunnett's or Tukey's correction for multiple comparisons. P values $< .05$ were considered significant.

3 | RESULTS

3.1 | Selection of FVIIa-specific sdAb KB-FVIIa-004

The sdAb libraries were constructed from lymphocytes obtained from a llama immunized against FVIIa. Factor VIIa-specific sdAbs were selected via phage-display screening using purified recombinant FVIIa. After two rounds of panning, 18 unique sequences were obtained. Following expression in *E. coli* SHuffle cells, one sdAb was identified

that seemed specific in interacting with human FVIIa. This nanobody, designated KB-FVIIa-004, was chosen for further analysis in this study. We first analyzed the capacity of KB-FVIIa-004 to recognize FVII/VIIa in plasma. Serial dilutions of normal plasma were added to immobilized polyclonal anti-FVII/VIIa antibodies or KB-FVIIa-004. Whereas a dose response was observed when plasma samples were incubated with polyclonal anti-FVII/VIIa antibodies, no signal above background levels could be detected for sdAb KB-FVIIa-004 (Figure 1A). In a second series of experiments, binding of purified FVII to KB-FVIIa-004 was tested. Factor VII efficiently bound to polyclonal anti-FVII/VIIa antibodies, whereas no binding to KB-FVIIa-004 was observed for FVII concentrations up to 50 nM (Figure 1B). In contrast, binding of FVIIa to KB-FVIIa-004 was already detected at 300-fold lower concentrations of 0.16 nM, and a dose-dependent binding was established using FVIIa concentrations up to 5 nM (Figure 1C). Apparently, KB-FVIIa-004 displays preferential binding to FVIIa over FVII.

3.2 | Effect of KB-FVIIa-004 on coagulation assays

To characterize KB-FVIIa-004 further, we tested the effect of this sdAb on FVIIa-dependent and FVIIa-independent clotting

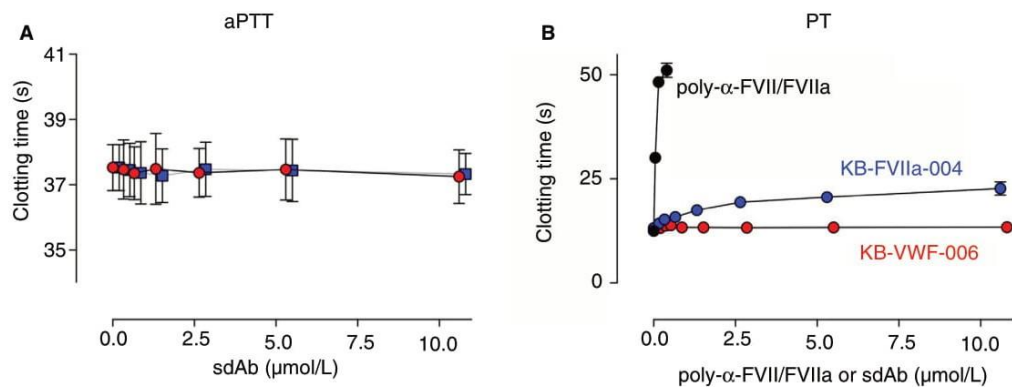


FIGURE 2 Prolongation of PT clotting time by KB-FVIIa-004. Panels A, B, Human plasma spiked with various concentrations of KB-FVIIa-004 (blue symbols), control sdAb KB-VWF-006 (red symbols; both 0–10 μM) or polyclonal anti-FVII/FVIIa antibodies (0–0.4 μM; panel B only) was analyzed in an aPTT (panel A) or PT (panel B). Plotted is clotting time versus antibody concentration. Data represent mean ± SD of three experiments. APTT, activated partial thromboplastin time; PT, prothrombin time; sdAb, single-domain antibody

assays, the prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT), respectively. Plasma was incubated with varying concentrations of KB-FVIIa-004, control sdAb KB-VWF-006bv (which is directed against von Willebrand factor),²² or affinity-purified polyclonal goat anti-FVII/FVIIa antibodies (PT only). As expected, control sdAb KB-VWF-006bv left both PT and aPTT unaffected (Figure 2A,B). Furthermore, no changes in clotting time were observed when KB-FVIIa-004 was tested in the aPTT, which functions independently of FVIIa (Figure 2A). Polyclonal anti-FVII/FVIIa antibodies efficiently prolonged PT clotting time, in agreement with the FVIIa-dependent nature of this assay. The clotting time was prolonged from 12.4 ± 0.5 s to 29.3 ± 0.5 s and 48.3 ± 1.0 s at concentrations of 0.05 μM and 0.15 μM polyclonal antibodies, respectively ($n = 3-6$; Figure 2B). A prolongation of the PT clotting time was also observed for KB-FVIIa-004, with the longest clotting time being prolonged <10 s [from 13.1 ± 0.6 to 22.7 ± 1.6 s ($n = 9$)] in the presence of 10 μM KB-FVIIa-004 (Figure 2B). These data suggest that KB-FVIIa-004 partially reduces the activity of FVIIa in the PT assay. However, it does so in a rather inefficient manner compared to polyclonal anti-FVII/FVIIa antibodies, since even a 200-fold higher sdAb concentration (10 μM sdAb compared to 0.05 nM polyclonal antibody) is unable to achieve a similar prolongation of the clotting time.

3.3 | Inhibition of FVIIa amidolytic activity by KB-FVIIa-004

To understand the inhibitory capacity of KB-FVIIa-004 toward FVIIa better, we next performed inhibition assays using purified FVIIa. First, the effect of KB-FVIIa-004 on the amidolytic activity of FVIIa was assessed. Whereas control sdAb KB-VWF-006bv did not interfere with substrate conversion, KB-FVIIa-004 efficiently inhibited amidolytic activity of FVIIa (Figure 3A,B). When plotted as residual FVIIa activity versus molar ratio sdAb/FVIIa, half-maximal inhibition

was obtained at a molar ratio of 0.7 ± 0.2 (Figure 3B). Of note, no inhibition of thrombin or FXa amidolytic activity could be detected in control experiments (Figure 3C). To analyze the nature by which KB-FVIIa-004 inhibits FVIIa amidolytic activity, a Schild regression analysis was performed.²⁴ When the log (dose ratio -1) was plotted against log [KB-FVIIa-004] in this analysis, a straight line was obtained (Figure 3D), compatible with KB-FVIIa-004 acting as competitive inhibitor. In addition, the intercept of this line on the X-axis at $Y = 0$ corresponds to the log (K_i) of the interaction, and the ensuing K_i was found to be 45 ± 2 nM in this analysis.

Given the competitive nature of KB-FVIIa-004, we were also able to calculate a K_i value from the half-maximal inhibition value of the data presented in Figure 3A,B, by applying the Cheng-Prusoff equation ($K_i = IC_{50}/(1 + [S]/[K_M])$).²⁵ Using a K_M of 1.6 mM for FVIIa-mediated hydrolysis of CBS-34.47 (determined in separate experiments), the resulting K_i was 28 ± 8 nM, which is in the same order of magnitude as the K_i value obtained from the Schild regression analysis.

3.4 | Effect of active site inhibitors on the interaction between FVIIa and KB-FVIIa-004

We next investigated whether binding of KB-FVIIa-004 is affected by the presence of the irreversible inhibitor PPACK. To this end, FVIIa was incubated with PPACK, and samples were subsequently tested in two separate assays. One portion of the sample was used to measure residual FVIIa activity, while a second portion of the sample was used to determine binding to immobilized sdAb KB-FVIIa-004. As expected, incubation with PPACK resulted in a dose-dependent loss of amidolytic activity ($>90\%$ loss at 10 μM PPACK; Figure 4, right Y-axis), compatible with PPACK forming a covalent bond with the active-site serine. When simultaneously tested for binding to immobilized KB-FVIIa-004, a similar dose-dependent decrease in binding to this sdAb was observed (Figure 4; left Y-axis). This indicates that inhibition of the FVIIa active site by PPACK coincides with a loss of

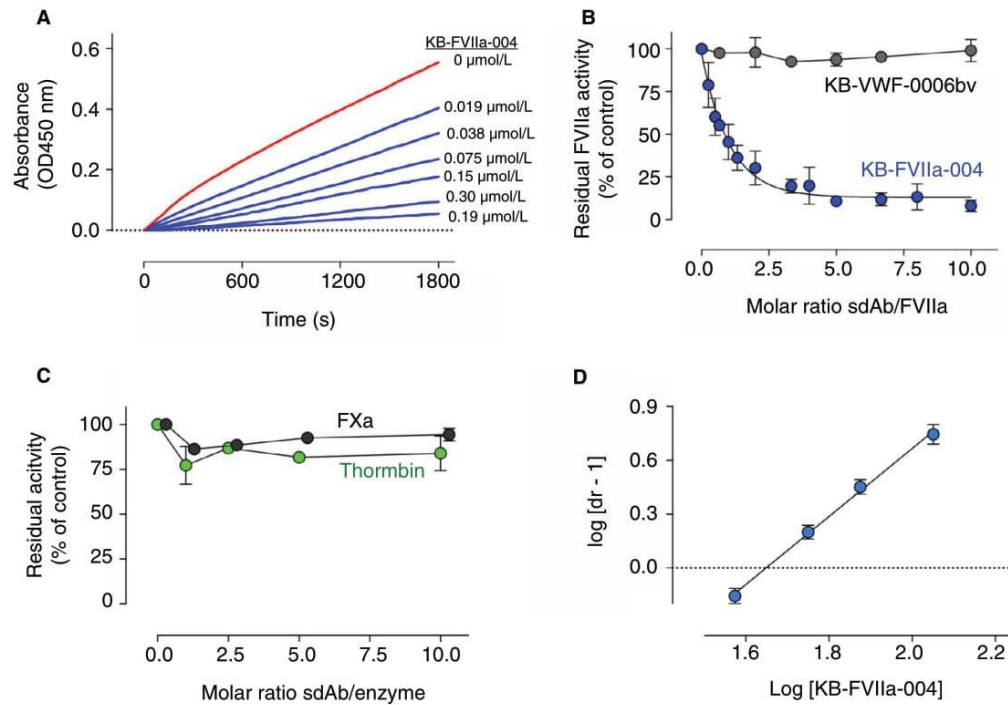


FIGURE 3 Inhibition of FVIIa amidolytic activity by KB-FVIIa-004. Panel A, FVIIa (75 nM) was incubated in the absence (red line) or presence (blue lines) of various concentrations of KB-FVIIa-004 (19-600 nM) for 60 min at 37 °C. CBS-34.47 (1.5 mM) was added and its hydrolysis was monitored for 30 min by measuring absorbance at 405 nm. A typical experiment is shown in which absorbance at 405 nm is plotted versus time (s). Panel B, Presented is the percentage of residual FVIIa amidolytic activity relative to activity in the absence of sdAb as function of the molar ratio sdAb/FVIIa. Data representing mean \pm SD of 3 to 10 experiments are shown for KB-FVIIa-004 (blue symbols) or KB-VWF-006bv (gray symbols). Panel C, Hydrolysis of substrates S-2222 by FXa (5 nM; black symbols) or S-2238 by thrombin (5 nM; green symbols) in the absence or presence of KB-FVIIa-004 was determined. Shown is percentage residual FVIIa amidolytic activity relative to activity in the absence of KB-FVIIa-004 versus the molar ratio KB-FVIIa-004/enzyme. Data represent mean \pm SD of three experiments. Panel D, Schild regression analysis of KB-FVIIa-004 mediated inhibition of FVIIa amidolytic activity. Plotted is the log [dose ratio - 1] versus log [KB-FVIIa-004]. Data represent mean \pm SD of three experiments. X-axis intercept ($Y = 0$) was calculated to be 1.65, corresponding to 44 nM KB-FVIIa-004. FVIIa, factor VIIa; sdAb, single-domain antibody

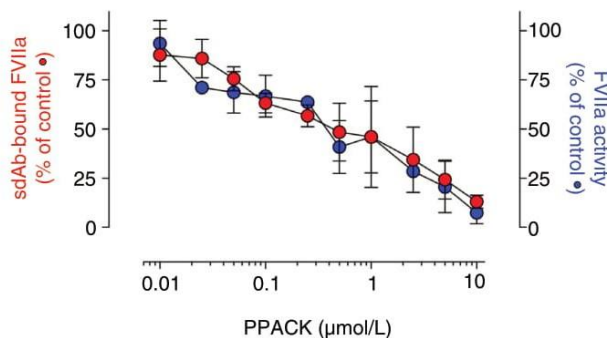


FIGURE 4 PPACK-mediated inhibition of FVIIa coincides with loss of binding to KB-FVIIa-004. FVIIa (0.1 μ M) was incubated with various concentrations of PPACK (0-10 μ M) for 60 min at 37 °C. Samples were then analyzed in parallel for residual binding to immobilized KB-FVIIa-004 (left Y-axis; red symbols) and residual amidolytic activity (right Y-axis; blue symbols). The percentage residual binding and activity relative to the absence of PPACK is plotted versus PPACK concentration. Data represent mean \pm SD of three to four experiments. FVIIa, factor VIIa; PPACK, D-Phe-Pro-Arg-chloromethyl ketone

binding to KB-FVIIa-004. It seems possible that the epitope for KB-FVIIa-004 is close to or within the active site of FVIIa.

3.5 | Effect of KB-FVIIa-004 on FX activation

Having observed that KB-FVIIa-004 interferes with FVIIa amidolytic activity, we were interested to analyze the effect of this antibody on FVIIa-mediated activation of the macromolecular substrate FX. Factor X was incubated with FVIIa and phospholipids and varying concentrations of KB-FVIIa-004. Activation was stopped by the addition of EDTA and FXa activity was monitored by following S-2222 proteolysis. Using this approach, we observed a dose-dependent inhibition of FXa formation in the presence of KB-FVIIa-004 (Figure 5A). Half-maximal inhibition was obtained at a sdAb/FVIIa molar ratio of 1.9 ± 0.7 (Figure 5C). Also for this inhibition, a K_i could be calculated from the Cheng-Prusoff equation, by using a K_M of 0.6 μ M for FVIIa-mediated FX activation.²⁶ This approach generated a K_i value of 26 ± 10 nM. Apparently, KB-FVIIa-004 displays a similar efficacy in blocking FVIIa activity toward small and macromolecular substrates.

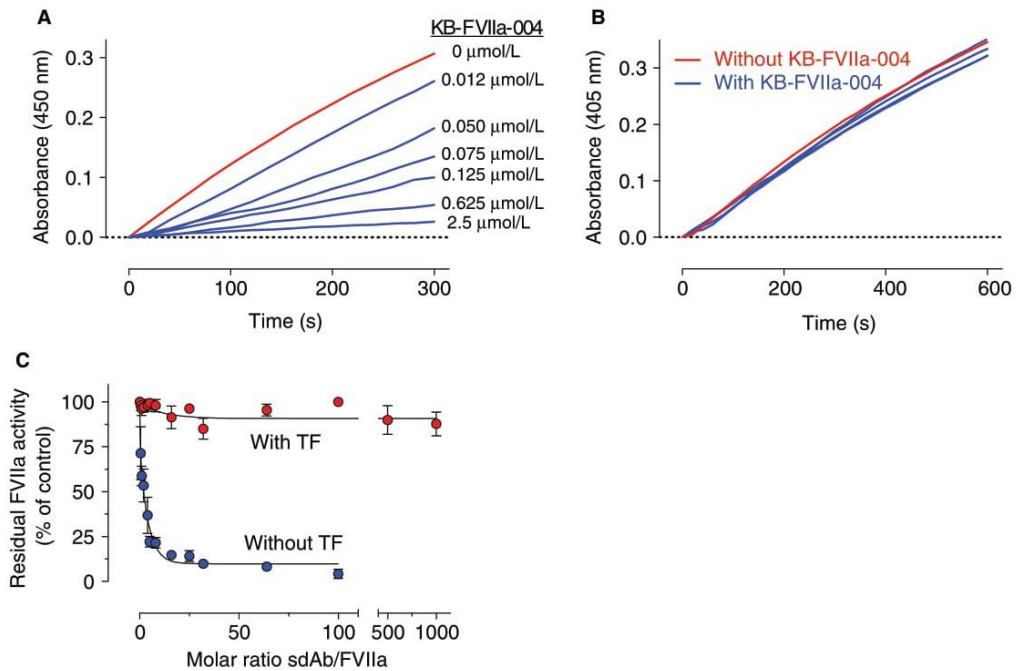


FIGURE 5 Inhibition of FVIIa-mediated FX activation by KB-FVIIa-004. Panels A, B, FVIIa was incubated in the absence (red line) or presence (blue lines) of KB-FVIIa-004 for 60 min at 37 °C, and samples were then added to a mixture containing relipidated TF, FX, and phospholipids. FX activation was stopped after 15 min by the addition of EDTA. The presence of FX was measured by monitoring hydrolysis of substrate S-2222 (1 mM) for 5 min. Concentrations used were Panel A, FVIIa: 25 nM, KB-FVIIa-004: 0–2.5 μM, FX: 0.5 μM, phospholipids: 40 μM; Panel B, FVIIa: 1 nM, relipidated TF: 2 nM, KB-FVIIa-004: 0–1 μM, phospholipids: 10 μM. Depicted are hydrolysis curves of a typical experiment in the absence or presence of relipidated TF. Hydrolysis curves were generated using undiluted samples for panel A and samples diluted 100-fold for panel B. Panel C, Percentage residual FVIIa activity relative to activity in the absence of KB-FVIIa-004 as function of the molar ratio sdAb/FVIIa. Shown are data representing mean ± SD of three to five experiments. FVIIa, Factor VIIa; sdAb, single-domain antibody; TF, tissue factor

3.6 | Effect of TF on KB-FVIIa-004-mediated FVIIa inhibition

In view of the notion that FVIIa activity is strongly enhanced by its cofactor TF, it was of interest to reassess both amidolytic and FX-activating activity of FVIIa in the presence of relipidated TF and varying concentrations of KB-FVIIa-004. Little inhibition of FXa generation (<15%) was detected at a 1000-fold molar excess of KB-FVIIa-004 over FVIIa (Figure 5B). With regard to amidolytic activity, some minor reduction in FVIIa activity was observed, which reached a maximum of 20% to 25% at a 50-fold to 100-fold molar excess of KB-FVIIa-004 (Figure 6A,B). These data suggest that the presence of TF eliminates or strongly reduces the inhibitory activity of KB-FVIIa-004. This was also explored in another experiment, in which the ability of TF to reverse KB-FVIIa-004-mediated inhibition of FVIIa was investigated. Factor VIIa (7.5 nM) was incubated with the amidolytic substrate CBS-34.47 and various concentrations of KB-FVIIa-004. Despite the inefficient hydrolysis of CBS-34.47 under these conditions, a clear dose-dependent inhibition of FVIIa activity was observed, with >85% inhibition at a 100-fold molar excess of KB-FVIIa-004 over FVIIa (Figure 6C,D). Upon the addition of relipidated TF, a rapid increase of substrate conversion was observed in both the absence and the presence of KB-FVIIa-004 (Figure 6C,D). Although some residual inhibition remained under

these conditions, this was <15% at the highest concentration tested (i.e. a 100-fold molar excess of KB-FVIIa-004 over FVIIa). Finally, we tested the direct effect of TF on binding of FVIIa to immobilized KB-FVIIa-004 in an immunosorbent assay (Figure 6E,F). The presence of relipidated TF dose-dependently interfered with binding of FVIIa to KB-FVIIa-004 (Figure 6E). Interestingly, recombinant soluble ectodomain of murine TF also reduced FVIIa binding to this antibody, albeit to a lesser extent (20 ± 5%; $P < .0001$) and at higher concentrations (Figure 6F).

3.7 | Effect of KB-FVIIa-004 on *in vivo* activity of FVIIa in FVIII-deficient mice

To apply KB-FVIIa-004 *in vivo*, we generated a variant in which this sdAb was fused to human albumin. KB-FVIIa-004 has a molecular weight of approximately 15 kDa and will thus be rapidly eliminated via renal clearance. Fusion to albumin was anticipated to improve its circulatory half-life. This fusion protein, designated 004-HSA, was identical to KB-FVIIa-004 in its inhibitory action toward FVIIa, in terms of both efficacy and specificity to inhibit free FVIIa but not TF-bound FVIIa. For the *in vivo* experiments, FVIII-deficient mice were divided into five groups: one group receiving vehicle, one group receiving low-dose FVIIa (0.6 mg/kg),

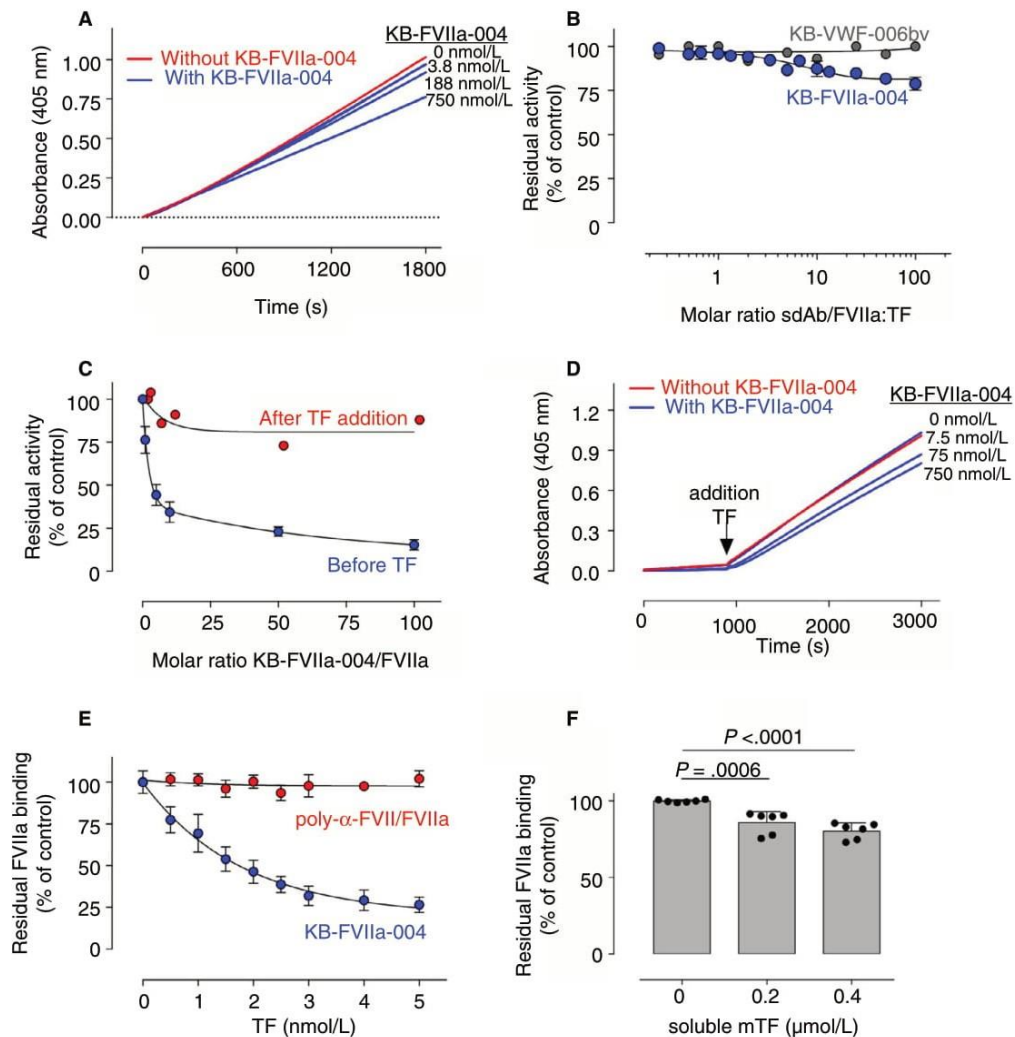


FIGURE 6 KB-FVIIa-004 has minimal effect on FVIIa activity in the presence of TF. Panel A, Amidolytic activity of FVIIa (7.5 nM) in the presence of relipidated TF (10 nM) was examined in the absence (red line) or presence (blue lines) of various concentrations of KB-FVIIa-004, and residual FVIIa activity was monitored via hydrolysis of substrate CBS-34.47. Panel B, Percentage of residual FVIIa amidolytic activity relative to activity in the absence of sdAb as function of the molar ratio sdAb/FVIIa. Data representing mean \pm SD of three experiments are shown for KB-FVIIa-004 (blue symbols) or KB-VWF-006bv (gray symbols). Panel C, Residual FVIIa amidolytic activity of FVIIa before (blue symbols) and after (red symbols) the addition of relipidated TF. Panel D, Representative progress curves of FVIIa amidolytic activity (7.5 nM) before and after the addition of relipidated TF (10 nM) in the absence (red line) or presence (blue lines) of KB-FVIIa-004 (0-750 nM). Panels E, F, Binding of FVIIa (1 nM) to immobilized KB-FVIIa-004 (10 μ g/mL) was performed as described in the legend of Figure 1. Binding was assessed in the absence or presence of relipidated TF (0-5 nM; panel E) or smTF (0.2 and 0.4 μ M; panel F). Half-maximal inhibition with relipidated TF was obtained at a concentration of 1.2 ± 0.4 nM. FVIIa binding was reduced by $14 \pm 7\%$ ($P = .0006$) and $20 \pm 5\%$ ($P < .0001$), for 0.2 and 0.4 μ M smTF, respectively. FVIIa, factor VIIa; smTF, soluble ectodomain of murine TF; TF, tissue factor

one group receiving high-dose FVIIa (3 mg/kg), one group receiving high-dose FVIIa (3 mg/kg) with a 3-fold molar excess of 004-HSA (5.3 mg/kg), and one group receiving high-dose FVIIa (3 mg/kg) with a 10-fold molar excess of 004-HSA (16 mg/kg). Five minutes after intravenous injection, the distal 3 mm of the tail was amputated, and blood was collected for 30 min. Blood loss in vehicle-treated mice was 805 ± 83 μ L (mean \pm SD; $n = 7$; Figure 7). Mice treated with low-dose FVIIa alone had mildly reduced blood loss (634 ± 71 μ L ($n = 5$; $P = .0325$ vs. vehicle), while those

treated with high-dose FVIIa had strongly reduced blood loss (139 ± 79 μ L; $n = 7$; $P < .0001$ vs. vehicle). Interestingly, the presence of low-dose 004-HSA increased blood loss in mice treated with high-dose FVIIa to the same amount as found for low-dose FVIIa: 546 ± 168 μ L ($n = 4$; $P = .0016$ vs. vehicle and $P = .62$ vs. 0.6 mg/kg FVIIa). Moreover, high-dose FVIIa in combination with high-dose 004-HSA resulted in blood loss that was indistinguishable from that in vehicle-treated mice (773 ± 42 μ L; $n = 4$; $P = .80$ vs. vehicle). Apparently, the activity of FVIIa *in vivo* is inhibited by

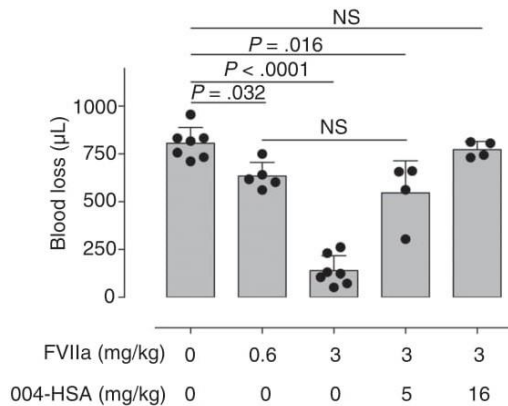


FIGURE 7 KB-FVIIa-004/albumin fusion protein interferes with FVIIa activity in FVIII-deficient mice. FVIII-deficient mice were given vehicle or FVIIa (0.6 or 3 mg/kg) via intravenous tail vein injection. Two series of mice received FVIIa (3 mg/kg) that was preincubated with a 3-fold or 10-fold molar excess of KB-FVIIa-004 fused to human albumin (004-HSA; 5 and 16 mg/kg, respectively) prior to infusion. Five minutes after injection, the distal 3-mm segment of the tail of anesthetized mice was removed. The tail was immersed in a prewarmed physiological salt solution (37 °C), and blood was collected for 30 min. Plotted is the amount of blood loss for each group. Bars represent mean \pm SD, and symbols individual mice. Statistical analysis was performed by one-way analysis of variance with Tukey's multiple comparison test. FVIIa, factor VIIa

the presence of 004-HSA, suggesting that its functioning under these conditions is predominantly independent of TF.

4 | DISCUSSION

Single-domain antibodies (sdAbs) have been shown to be useful tools for research, diagnostic, and therapeutic applications, partially because they can associate with epitopes that are inaccessible to regular monoclonal antibodies. For example, we have previously identified sdAbs that specifically recognize the active, platelet-binding conformation of Von Willebrand factor, while others have developed sdAbs to monitor conformation changes of G protein-coupled receptors.²⁷⁻²⁹ In this study, we have generated a sdAb, designated KB-FVIIa-004, that interferes with the enzymatic activity of FVIIa in the absence but not presence of its cofactor TF.

KB-FVIIa-004 was isolated from a sdAb library isolated from a FVIIa-immunized llama via standard procedures. Binding experiments using human plasma, purified FVII, or FVIIa revealed that the antibody recognizes FVIIa but not FVII (Figure 1). Interestingly, the ability of FVIIa to hydrolyze the small synthetic substrate CBS-34.47 was inhibited in a dose-dependent manner by KB-FVIIa-004 (Figure 3). By using the Schild regression analysis, we determined that KB-FVIIa-004 inhibited FVIIa activity in a competitive manner. The efficacy with which KB-FVIIa-004 inhibits activity of FVIIa was determined via two independent approaches: first, by the Schild

regression analysis, which is based on activity assays in which the concentration of the substrate CBS-34.47 is varied; second, by varying the KB-FVIIa-004 concentration at a fixed substrate concentration, which allows the calculation of the half-maximal inhibition, and subsequently the K_i by applying the Cheng-Prusnoff equation. Ultimately, three K_i values were obtained (two for amidolytic activity and one for proteolytic activity), which were all in the same range: 45 ± 2 nM, 28 ± 8 nM, and 26 ± 10 nM.

As mentioned, FVIIa requires interactions with TF to achieve full enzymatic activity, and this cofactor enhances both amidolytic activity and proteolytic activity of FVIIa.^{30,31} When KB-FVIIa-004 was tested for its inhibitory capacity toward FVIIa in the presence of TF, little if any inhibitory potential was observed (Figures 5 and 6). Even at a 100-fold to 1000-fold molar excess over FVIIa, inhibition was <15% toward FX and <25% toward CBS-34.47. The poor inhibitory capacity toward TF-bound FVIIa was confirmed in two control experiments. First, TF was added to KB-FVIIa-004-inhibited FVIIa, resulting in the reappearance of FVIIa amidolytic activity (Figure 6). Second, a prolongation of the clotting time in the plasma-based PT assay (which depends on FVIIa/TF activity to initiate coagulation) was only observed when using a >300-fold molar excess of KB-FVIIa-004 over the endogenous FVIIa concentration (Figure 2). It seems conceivable therefore that the binding of FVIIa to TF relieves FVIIa from the inhibitory effect of KB-FVIIa-004. To our knowledge, this is the first antibody that displays specific inhibition of FVIIa in the absence of TF. Several antibodies specific for FVIIa in comparison to FVII, with or without the capacity to modify FVIIa activity, have been reported. However, none of these interferes with FVIIa activity in the absence but not presence of TF.

Considering the specificity of KB-FVIIa-004 for FVIIa in combination with its capacity to block FVIIa activity in a competitive manner, it is likely that this sdAb binds within or close to the active site of FVIIa. This would be compatible with the observation that inhibition of FVIIa by the active site inhibitor PPACK, which covalently interacts with the active site serine residue, coincides with loss of FVIIa binding to KB-FVIIa-004 (Figure 4). However, at first sight this may seem incompatible with the notion that TF competes with the sdAb for FVIIa binding (Figure 6E). A reasonable explanation for this finding is that KB-FVIIa-004 binds to a cryptic epitope close to the active site that is exposed only in the zymogen state of FVIIa. When FVIIa engages in binding either to a substrate or to TF, it undergoes structural changes to adopt the active protease conformation. In this active conformation, the cryptic epitope for KB-FVIIa-004 is no longer exposed and results in loss of antibody binding. This mode of action (illustrated in Figure 8) would be compatible with the mutually exclusive binding of TF and the antibody to FVIIa and would appear to be competitive inhibition in conventional binding assays. Definitive insight into the binding epitope for KB-FVIIa-004 will be obtained via cocrystallization studies, which have been initiated recently in our laboratory.

The unique characteristic of KB-FVIIa-004 to block FVIIa activity in the absence but not presence of TF could be helpful to better understanding of the physiology of FVIIa activity

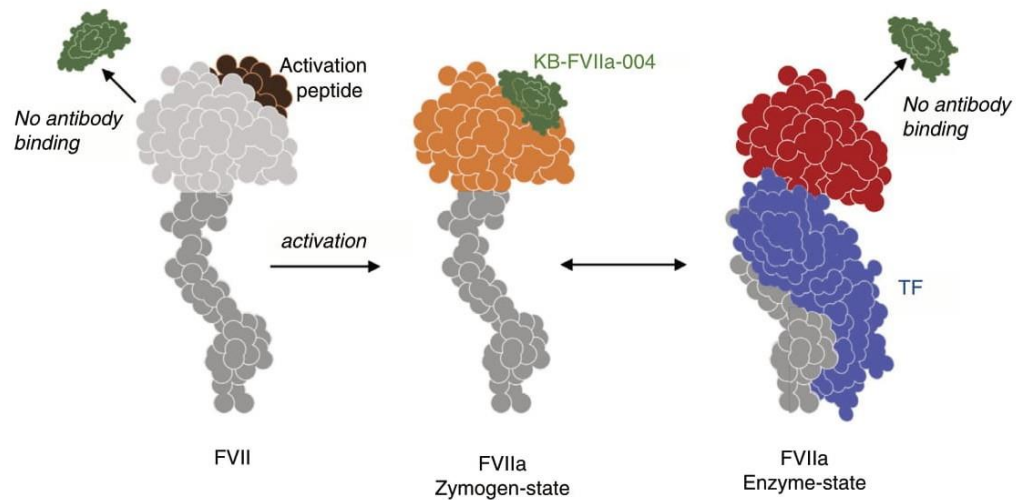


FIGURE 8 Possible mode of action of KB-FVIIa-004. Following conversion of FVII into FVIIa, the activated derivative exists in equilibrium between an inactive zymogen-like state and an active conformation (enzyme-like state). This equilibrium is forced into the active conformation upon binding of FVIIa to TF or via the incorporation of a substrate into the FVIIa active site. KB-FVIIa-004 does not interact with FVII or with TF-bound or PPACK-inactivated FVIIa. It seems possible therefore that KB-FVIIa-004 selectively binds to the zymogen-like state of FVIIa, and that its binding impairs conversion of FVIIa into the active conformation. Additional studies are needed to determine the exact binding epitope for this antibody. FVIIa, factor VIIa; PPACK, D-Phe-Pro-Arg-chloromethyl ketone; TF, tissue factor

under various conditions. In particular, it has been a matter of debate whether the activity of FVIIa to restore hemostasis in FVIII-deficient plasma involves a TF-dependent or a TF-independent process. However, relatively high concentrations of FVIIa are required to achieve efficient hemostatic activity in humans and even more in mice: Therapeutic dosing in humans is 90 to 270 $\mu\text{g}/\text{kg}$, resulting in FVIIa plasma levels of about 25 to 70 nM when assuming 50% *in vivo* recovery. Final plasma levels in mice are about 600 nM, when dosing 3 mg/kg and assuming 50% recovery. These concentrations exceed FVII plasma concentrations 2.5-fold to 7-fold and 60-fold, respectively. It was thought therefore that high FVIIa concentrations are needed to compete with endogenous FVII for binding to TF.^{11,32} The need for FVIIa for TF binding was further compatible with the observation that thrombin generation in FVIIa-infused primates could be neutralized in the presence of TF inhibitors.³³ However, other studies have contradicted these results, finding that FVIIa restores hemostasis in the absence of FVIII in a TF-independent manner. Evidence included efficient thrombin generation on TF-deficient platelets and the restoration of hemostasis in mice expressing minimal amounts of TF.^{9,34-36} We therefore used KB-FVIIa-004 to gain further insight into the *in vivo* mode of action of FVIIa in FVIII-deficient mice. As expected, a dose of 3 mg/kg FVIIa efficiently corrected bleeding in FVIII-deficient mice (Figure 7). Correction was less efficient in mice receiving 0.6 mg FVIIa/kg, a dose corresponding to 20% of the efficacious 3 mg/kg dose. Preincubation of FVIIa with a 3-fold molar excess of KB-FVIIa-004 was anticipated to result in an 80% inhibition of FVIIa. Indeed, mice receiving 3 mg/kg FVIIa in the presence of KB-FVIIa-004 displayed similar blood loss to mice that received 0.6 mg/kg (Figure 7). In addition, a 10-fold molar

excess of 004-HSA over FVIIa resulted in full reversion of FVIIa activity, with FVIII-deficient mice having similar blood loss to vehicle-treated mice (Figure 7). It is important to mention that human FVIIa interacts poorly with murine TF,^{37,38} suggesting that the contribution of murine TF in this FVIII-mouse model is limited. Nevertheless, the high concentration of FVIIa (600 nM) would allow for some interaction with murine TF. In experiments using smTF, we did observe some inhibition (15%-20%) of the FVIIa-antibody interaction by this protein. It seems plausible therefore that the *in vivo* data are compatible with the view that FVIIa generates its therapeutic effect in the absence rather than presence of TF.

Altogether, we have isolated a novel sdAb that interferes with FVIIa in the absence but not presence of its cofactor. This sdAb could be used to investigate the TF-independent activities of FVIIa *in vitro* and *in vivo*.

ACKNOWLEDGMENTS

Financial support of the Société Française d'Hématologie (Stephen Ferrière) is gratefully acknowledged.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest with the contents of this article.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

S. F., C. K., and J. F. O. performed experiments and analyzed data; C. V. D., A. K., O. D. C., and P.J.L. designed research, analyzed data,

and supervised the study. P. J. L. wrote the manuscript with input of all authors.

REFERENCES

1. Broze GJ Jr, Majerus PW. Purification and properties of human coagulation factor VII. *J Biol Chem*. 1980;255(4):1242-1247.
2. O'Hara PJ, Grant FJ, Haldeman BA, et al. Nucleotide sequence of the gene coding for human factor VII, a vitamin K-dependent protein participating in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987;84(15):5158-5162.
3. Pedersen AH, Lund-Hansen T, Komiyama Y, Petersen LC, Oestergaard PB, Kisiel W. Inhibition of recombinant human blood coagulation factor VIIa amidolytic and proteolytic activity by zinc ions. *Thromb Haemost*. 1991;65(5):528-534.
4. Silverberg SA, Nemerson Y, Zur M. Kinetics of the activation of bovine coagulation factor X by components of the extrinsic pathway: kinetic behavior of two-chain factor VII in the presence and absence of tissue factor. *J Biol Chem*. 1977;252(23):8481-8488.
5. Rand KD, Jorgensen TJ, Olsen OH, et al. Allosteric activation of coagulation factor VIIa visualized by hydrogen exchange. *J Biol Chem*. 2006;281(32):23018-23024.
6. Banner DW, D'Arcy A, Chene C, et al. The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor. *Nature*. 1996;380(6569):41-46.
7. Persson E, Olsen OH. Allosteric activation of coagulation factor VIIa. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2011;16:3156-3163.
8. Giansily-Blaizot M, Schved JF. Recombinant human factor VIIa (rFVIIa) in hemophilia: mode of action and evidence to date. *Ther Adv Hematol*. 2017;8(12):345-352.
9. Monroe DM, Hoffman M, Oliver JA, Roberts HR. Platelet activity of high-dose factor VIIa is independent of tissue factor. *Br J Haematol*. 1997;99(3):542-547.
10. Feng D, Whinna H, Monroe D, Stafford DW. FVIIa as used pharmacologically is not TF dependent in hemophilia B mice. *Blood*. 2014;123(11):1764-1766.
11. Rao LV, Williams T, Rapaport SI. Studies of the activation of factor VII bound to tissue factor. *Blood*. 1996;87(9):3738-3748.
12. Butenas S, Brummel KE, Branda RF, Paradis SG, Mann KG. Mechanism of factor VIIa-dependent coagulation in hemophilia blood. *Blood*. 2002;99(3):923-930.
13. Shibeko AM, Woodle SA, Lee TK, Ovanesov MV. Unifying the mechanism of recombinant FVIIa action: dose dependence is regulated differently by tissue factor and phospholipids. *Blood*. 2012;120(4):891-899.
14. Broze GJ Jr, Hickman S, Miletich JP. Monoclonal anti-human factor VII antibodies. Detection in plasma of a second protein antigenically and genetically related to factor VII. *J Clin Invest*. 1985;76(3):937-946.
15. Coppola R, Tombesi S, Valentini F, Alborali S, Albertini A, Mannucci PM. Characterization of a Ca (II)-independent monoclonal antibody that lacks reactivity with Gla-domainless human factor VII. *Thromb Res*. 1992;68(3):269-281.
16. Biemond BJ, Levi M, ten Cate H, et al. Complete inhibition of endotoxin-induced coagulation activation in chimpanzees with a monoclonal Fab fragment against factor VII/VIIa. *Thromb Haemost*. 1995;73(2):223-230.
17. Cheung WF, Stafford DW. Localization of an epitope of a calcium-dependent monoclonal antibody to the N-terminal region of the Gla domain of human factor VII. *Thromb Res*. 1995;79(2):199-206.
18. Andersen LM, Andreasen PA, Svendsen I, Keemink J, Ostergaard H, Persson E. Antibody-induced enhancement of factor VIIa activity through distinct allosteric pathways. *J Biol Chem*. 2012;287(12):8994-9001.
19. Philippou H, Adami A, Amersey RA, Stubbs PJ, Lane DA. A novel specific immunoassay for plasma two-chain factor VIIa: investigation of FVIIa levels in normal individuals and in patients with acute coronary syndromes. *Blood*. 1997;89(3):767-775.
20. Hyseni A, Kemperman H, de Lange DW, et al. Increased mortality in systemic inflammatory response syndrome patients with high levels of coagulation factor VIIa. *J Thromb Haemost*. 2013;11(12):2111-2117.
21. Bi L, Lawler AM, Antonarakis SE, High KA, Gearhart JD, Kazanian HH Jr. Targeted disruption of the mouse factor VIII gene produces a model of haemophilia A. *Nat Genet*. 1995;10(1):119-121.
22. Ayme G, Adam F, Legendre P, et al. A novel single-domain antibody against von Willebrand factor A1 domain resolves leukocyte recruitment and vascular leakage during inflammation: brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(9):1736-1740.
23. Thiec F, Chérel G, Christophe OD. Role of the Gla and first epidermal growth factor-like domains of factor X in the prothrombinase and tissue factor-factor VIIa complexes. *J Biol Chem*. 2003;278(12):10393-10399.
24. Arunlakshana O, Schild HO. Some quantitative uses of drug antagonists. *Br J Pharmacol Chemother*. 1959;14(1):48-58.
25. Cheng Y, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (K1) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol*. 1973;22(23):3099-3108.
26. Nielsen AL, Sorensen AB, Holmberg HL, et al. Engineering of a membrane-triggered activity switch in coagulation factor VIIa. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017;114(47):12454-12459.
27. Hulstein JJ, de Groot PG, Silence K, Veyradier A, Fijnheer R, Lenting PJ. A novel nanobody that detects the gain-of-function phenotype of von Willebrand factor in ADAMTS13 deficiency and von Willebrand disease type 2B. *Blood*. 2005;106(9):3035-3042.
28. Groot E, de Groot PG, Fijnheer R, Lenting PJ. The presence of active von Willebrand factor under various pathological conditions. *Curr Opin Hematol*. 2007;14(3):284-289.
29. Manglik A, Kobilka BK, Steyaert J. Nanobodies to study G protein-coupled receptor structure and function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2017;57:19-37.
30. Lawson JH, Butenas S, Mann KG. The evaluation of complex-dependent alterations in human factor VIIa. *J Biol Chem*. 1992;267(7):4834-4843.
31. Neuenschwander PF, Branam DE, Morrissey JH. Importance of substrate composition, pH and other variables on tissue factor enhancement of factor VIIa activity. *Thromb Haemost*. 1993;70(6):970-977.
32. Augustsson C, Persson E. In vitro evidence of a tissue factor-independent mode of action of recombinant factor VIIa in hemophilia. *Blood*. 2014;124(20):3172-3174.
33. ten Cate H, Bauer KA, Levi M, et al. The activation of factor X and prothrombin by recombinant factor VIIa in vivo is mediated by tissue factor. *J Clin Invest*. 1993;92(3):1207-1212.
34. Hoffman M, Monroe DM, Roberts HR. Human monocytes support factor X activation by factor VIIa, independent of tissue factor: implications for the therapeutic mechanism of high-dose factor VIIa in hemophilia. *Blood*. 1994;83(1):38-42.
35. Lisman T, Adelmeijer J, Cauwenberghs S, Van Pampus EC, Heemskerk JW, De Groot PG. Recombinant factor VIIa enhances platelet adhesion and activation under flow conditions at normal and reduced platelet count. *J Thromb Haemost*. 2005;3(4):742-751.
36. Keshava S, Sundaram J, Rajulapati A, Pendurthi UR, Rao LV. Pharmacological concentrations of recombinant factor VIIa restore hemostasis independent of tissue factor in antibody-induced hemophilia mice. *J Thromb Haemost*. 2016;14(3):546-550.

37. Fang CH, Lin TC, Guha A, Nemerson Y, Konigsberg WH. Activation of factor X by factor VIIa complexed with human-mouse tissue factor chimeras requires human exon 3. *Thromb Haemost.* 1996;76(3):361–368.
38. Petersen LC, Norby PL, Branner S, et al. Characterization of recombinant murine factor VIIa and recombinant murine tissue factor: a human-murine species compatibility study. *Thromb Res.* 2005;116(1):75–85.

How to cite this article: Ferrière S, Kaweckí C, Ottavi J-F, et al. A single-domain antibody that blocks factor VIIa activity in the absence but not presence of tissue factor. *J Thromb Haemost.* 2019;00:1–12. <https://doi.org/10.1111/jth.14615>

Résultats/conclusions

Le développement et la caractérisation d'un fragment d'anticorps à domaine unique a permis de mettre en évidence que ce VHH inhibe le facteur VIIa de la coagulation. Ce nanobody, nommé KB-FVIIa-004 a été sélectionné pour des études plus poussées. Ce nanobody se lie de manière spécifique au FVIIa mais pas à son précurseur le FVII ni à des protéines homologues telles que la prothrombine, le facteur X ou leurs dérivés actifs. Au niveau de son effet inhibiteur, le KB-FVIIa-004 s'est révélé être un inhibiteur efficace de l'activité du FVIIa dans différents tests (concentration inhibitrice à 50% à 60 ± 4 nM). Des analyses cinétiques ont révélé que le KB-FVIIa-004 agissait comme un inhibiteur compétitif, suggérant qu'il interagit avec une région très proche ou même dans le site actif du FVIIa. En effet, quasiment aucune liaison résiduelle du nanobody pour le FVIIa n'a été observée quand le site actif du FVIIa était bloqué par un inhibiteur général des sérines protéases. L'étape suivante a consisté à analyser l'effet du facteur tissulaire, le cofacteur qui stimule l'activité du FVIIa. De manière intéressante, l'effet inhibiteur du KB-FVIIa-004 était fortement réduit en présence de facteur tissulaire (concentration inhibitrice à 50% > 10 mM). Il semble donc que le facteur tissulaire induise un changement de conformation dans le site actif du FVIIa qui modifie le site de liaison du nanobody.

En conclusion, nous avons généré un nanobody se liant spécifiquement au site actif du FVIIa. L'intérêt de cet anticorps est qu'il pourrait nous permettre de détecter la présence et la pharmacocinétique du FVIIa libre après traitement des patients hémophiles A avec cette protéine.

Second article

Un modèle murin d'hémophilie A pour l'évaluation de la fonction de l'emicizumab *in vivo*

Publication : Ferrière S, Peyron I, Christophe OD, Kawecki C, Casari C, Muczynski V, Nathwani A, Kauskot A, Lenting PJ, Denis CV.

Blood. 2020 May 5:blood.2019004334. doi: 10.1182/blood.2019004334.

Etat de l'art et questions

L'hémophilie A résulte de l'absence fonctionnelle du FVIII de la coagulation. Le traitement fait appel à une thérapie de substitution utilisant des concentrés de FVIII. Toutefois des agents court-circuitant le FVIII sont parfois nécessaires, tels que des concentrés de facteurs de la coagulation activés. Depuis quelques années, une nouvelle approche a été développée, consistant dans le développement d'outils anticorps capables de mimer l'activité cofacteur du FVIIIa, tels que l'anticorps bispécifique emicizumab. Bien qu'il soit actuellement de plus en plus utilisé dans le traitement de l'hémophilie A, la fonction de l'emicizumab *in vivo* reste encore à être étudiée. Les différents tests *in vitro* actuellement utilisés pour caractériser sa fonction ne sont pas adaptés et ne permettent pas une prédiction fiable de l'activité FVIII-like de l'emicizumab. De plus, la reconnaissance sélective de l'emicizumab pour les facteurs IX et X humains limite les modèles animaux dans lesquels sa fonction pourrait être étudiée. Nous avons eu pour objectif de développer un modèle murin hémophile A spécifique dans lequel la fonction de l'emicizumab pourrait être caractérisée *in vivo*. Pour vérifier la pertinence de ce modèle, nous avons évalué la perte de sang chez ces animaux en comparaison d'animaux contrôles dans différents tests de temps de coagulation.

THROMBOSIS AND HEMOSTASIS

A hemophilia A mouse model for the in vivo assessment of emicizumab function

Stephen Ferrière,^{1,*} Ivan Peyron,^{1,*} Olivier D. Christophe,^{1,*} Charlotte Kawecki,¹ Caterina Casari,¹ Vincent Muczynski,^{2,3} Amit Nathwani,^{2,3} Alexandre Kauskot,¹ Peter J. Lenting,^{1,†} and Cécile V. Denis^{1,†}

¹Unité Mixte de Recherche Scientifique (UMR_S) 1176, INSERM/Université Paris-Sud/Université Paris-Saclay, Le Kremlin-Bicêtre, France; ²Research Department of Haematology, University College London (UCL) Cancer Institute, London, United Kingdom; and ³Katharine Dormandy Haemophilia and Thrombosis Centre, Royal Free Hospital, London, United Kingdom

KEY POINTS

- Emicizumab (≥ 1.5 mg/kg) partially corrects blood loss in a hemophilia A bleeding model, with an FVIII equivalence of 9 U/dL.
- Emicizumab provides additive hemostatic activity when given in combination with low-dose FVIII.

The bispecific antibody emicizumab is increasingly used for hemophilia A treatment. However, its specificity for human factors IX and X (FIX and FX) has limited its in vivo functional analysis to primate models of acquired hemophilia. Here, we describe a novel mouse model that allows emicizumab function to be examined. Briefly, FVIII-deficient mice received IV emicizumab 24 hours before tail-clip bleeding was performed. A second infusion with human FIX and FX, administered 5 minutes before bleeding, generated consistent levels of emicizumab (0.7-19 mg/dL for 0.5-10 mg/kg doses) and of both FIX and FX (85 and 101 U/dL, respectively, after dosing at 100 U/kg). Plasma from these mice display FVIII-like activity in assays (diluted activated partial thromboplastin time and thrombin generation), similar to human samples containing emicizumab. Emicizumab doses of 1.5 mg/kg and higher significantly reduced blood loss in a tail-clip-bleeding model using FVIII-deficient mice. However, reduction was incomplete compared with mice treated with human FVIII concentrate, and no difference in efficacy between doses was observed. From this model, we deduced FVIII-like activity from emicizumab that corresponded to a dose of 4.5 U of FVIII per kilogram (ie, 9.0 U/dL). Interestingly, combined with a low FVIII dose (5 U/kg), emicizumab provided enough additive activity to allow complete bleeding arrest. This model could be useful for further in vivo analysis of emicizumab. (*Blood*. 2020;136(6):740-748)

Introduction

Limitations hampering factor VIII (FVIII)-replacement therapy in hemophilia A have spurred the development of novel therapeutic approaches, including the bispecific antibody emicizumab.^{1,2} Emicizumab bridges the enzyme FIXa and the substrate FX, thereby stimulating FX activation,³⁻⁵ and markedly reduces bleeding tendency in hemophilia A patients, with and without inhibitors.⁶⁻⁹ Unfortunately, current assays that measure emicizumab's FVIII-like activity are unfit to predict an unbiased equivalence to true FVIII activity.^{5,10,11} Furthermore, in vitro assays allow only limited insight into the interaction between emicizumab and other procoagulant drugs.^{12,13}

Because emicizumab selectively recognizes human and primate FIX and FX, reports that explored emicizumab in experimental models are scarce. We have therefore developed a first murine model that allows for a direct comparison between emicizumab and FVIII in vivo. In this model, emicizumab's cofactor activity mimics FVIII levels of 9 U/dL. Additionally, emicizumab provides additional procoagulant activity at low concentrations of FVIII, resulting in enhanced hemostasis in FVIII-deficient mice.

Materials and methods

Animals and ethics statement

F8-deficient mice¹⁴ were backcrossed (>10 times) on a C57Bl/6 background. Male and female mice were used throughout the study (8-12 weeks old, 20-25 g). Housing and experiments were performed in accordance with French regulations and the experimental guidelines of the European Community. This project was approved by the local ethical committee of Université Paris-Sud (Comité d'Éthique en Experimentation Animale no. 26, protocol APAFIS#4400-2016021716431023v5).

Blood collection and plasma preparation

Blood was collected from ketamine/xylazine-anesthetized animals (100 mg/kg and 10 mg/kg, respectively) by retro-orbital puncture with a glass capillary in one-tenth volume trisodium citrate (13.8 mM). Plasma was prepared by centrifugation for 20 minutes at 1500g and stored at -80°C .

Proteins

Emicizumab (marketed under Hemlibra) was obtained from F. Hoffman-La Roche (Basel, Switzerland). Recombinant FIX

(Benefix) was obtained from Pfizer Inc (Paris, France). Recombinant murine FIX was obtained from Sino Biologicals (Wayne, PA). Plasma-derived FIX and FX were obtained from Cryoep (Montpellier, France). Recombinant FVIII (Advate) was obtained from Shire France SAS (Paris, France). Polyclonal rabbit anti-FIX antibodies and polyclonal rabbit anti-human FX antibodies were isolated from serum obtained from rabbits immunized with human FIX or FX, respectively (Eurogentec, Seraing, Belgium). Purified antibodies were labeled with peroxidase using the EZ-link activated peroxidase antibody labeling kit as instructed (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France).

Antigen and activity assays

Human FIX antigen levels in murine plasma were determined in a FIX enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using commercially available polyclonal sheep anti-human FIX antibodies (5 µg/mL; Cryoep) as coating antibody and peroxidase-labeled polyclonal rabbit anti-human FIX antibodies (diluted 1/1000) as probing antibodies. Human FX antigen levels in murine plasma were determined in an FX ELISA using commercially available polyclonal goat anti-human FX antibodies (5 µg/mL; Cedarlane, Gateshead, United Kingdom) as coating antibody and peroxidase-labeled polyclonal rabbit anti-human FX antibodies (diluted 1/3000) as probing antibodies. For both ELISAs, murine plasma, spiked with purified human FIX and FX, respectively, were used as reference. The limit of detection was 0.32 U/dL and 0.16 U/dL for the FIX and FX ELISAs, respectively.

FVIII activity was measured in a chromogenic assay using the Biophen FVIII-assay kit (Hyphen, Neuville-sur-Oise, France) as instructed.

Determination of emicizumab levels after infusion

Isoflurane-anesthetized mice were given emicizumab (0-10 mg/kg; 100-µL volume; n = 6 mice per dose) via IV injection in the retro-orbital venous plexus. Twenty-four hours after infusion, blood samples were taken under anesthesia via retro-orbital puncture from the opposite eye from where the protein was infused. Plasma was prepared and analyzed for the presence of human immunoglobulin G (IgG) using an immunosorbent assay. Briefly, diluted plasma samples were incubated in wells coated with a monoclonal anti-human IgG Fc antibody (10 µg/mL; Clinisciences, Nanterre, France). Bound emicizumab was probed using a peroxidase-labeled anti-human IgG₄ Fc antibody (diluted 1/20 000; Abcam, Paris, France) and detected via peroxidase-mediated hydrolysis of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine. Murine plasma, spiked with known concentrations of emicizumab, was used as reference. The limit of detection was 0.02 µg/mL.

Emicizumab-compatible mouse model

Isoflurane-anesthetized FVIII-deficient mice were given emicizumab (0-10 mg/kg; 100-µL volume; n = 6-18 per dose) via IV injection in the retro-orbital venous plexus 24 hours before the tail amputation. A second retro-orbital injection was given 5 minutes before the tail-amputation procedure to mice anesthetized with ketamine (100 mg/kg)/xylazine (10 mg/kg), using a solution containing human FIX and FX (both 100 U/kg, unless indicated otherwise). Subsequently, 3 mm of the distal tip of the tail was amputated. The amputated tail was immersed in pre-warmed physiological saline (37°C) and blood was collected for 30 minutes. The mixture of collected blood and physiological

saline was centrifuged at 1500g. The red blood cell pellet was then lysed in H₂O and the amount of hemoglobin was determined by reading the absorbance at 416 nm. The volume of blood loss in each sample was calculated from a standard curve, which was obtained by lysing defined volumes of mouse blood (0.3-300 µL) in H₂O to extract hemoglobin. The limit of detection is 0.6 µL of murine blood.

In some control experiments, mice were given emicizumab with FIX alone or FX alone. For some mice (n = 3-5), blood samples were taken after infusion of the emicizumab/FIX/FX cocktail (with emicizumab given 24 hours and FIX/FX given 5 minutes before blood collection), while these mice were not exposed to the tail-clip assay. These samples were used to measure FIX and FX antigen levels, and to test hemostatic activity in the activated partial thromboplastin time (aPTT) and FXIa-induced thrombin-generation assays.

FVIII-mediated correction of bleeding

Mice were given FVIII (0-10 U/kg; 100-µL volume; n = 9-18 per dose) either in the absence or presence of human FIX and FX (both 100 U/kg) via IV infusion in the retro-orbital venous plexus. The tail-clip-bleeding assay was performed 5 minutes after infusion as described in the previous section for the emicizumab-compatible mouse model. FVIII activity levels using the 2.5 to 10 tU/kg dosing varied dose-dependently between 5 and 20 U/dL.

Diluted aPTT

One-stage clotting activity was determined using the STA-PTT assay kit (Stago, Asnières, France). Briefly, plasma samples were diluted fourfold in STA-Owren-Koller buffer (Stago) to a volume of 50 µL. Subsequently, 25 µL of aPTT reagent were added. Finally, the clotting reaction was started by the addition of a 50-µL CaCl₂ solution. Analysis was performed on a Diagnostica Stago ST4 Coagulation Analyzer.

FXIa-induced thrombin-generation assay

Thrombin generation in platelet-poor murine plasma was measured in a microtiter-plate fluorometer (Fluoroskan Ascent; Thermo Labsystems, Helsinki, Finland) according to the method described by Hemker et al, except that thrombin generation was initiated using phospholipids (4 µM) and FXIa (175 nM), respectively.¹⁵ Endogenous thrombin potential (ETP; ie, area under the curve) and thrombin peak as readouts for thrombin generation were determined using dedicated software (Thrombinoscope BV, Maastricht, The Netherlands). Plasma samples from the mice that received the emicizumab/FIX/FX or FVIII/FIX/FX cocktail, but did not undergo tail-clip bleeding, were used for this assay.

Statistical analysis

All data are presented as mean plus or minus standard deviation (SD) unless indicated otherwise. Number (n) refers to the number of independent experiments or animals. The statistical analysis was performed using GraphPad Prism 7 software for Mac (La Jolla, CA). One-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey or the Dunnett multiple comparison test was performed when comparing multiple groups. *P* < .05 was considered as statistically significant.

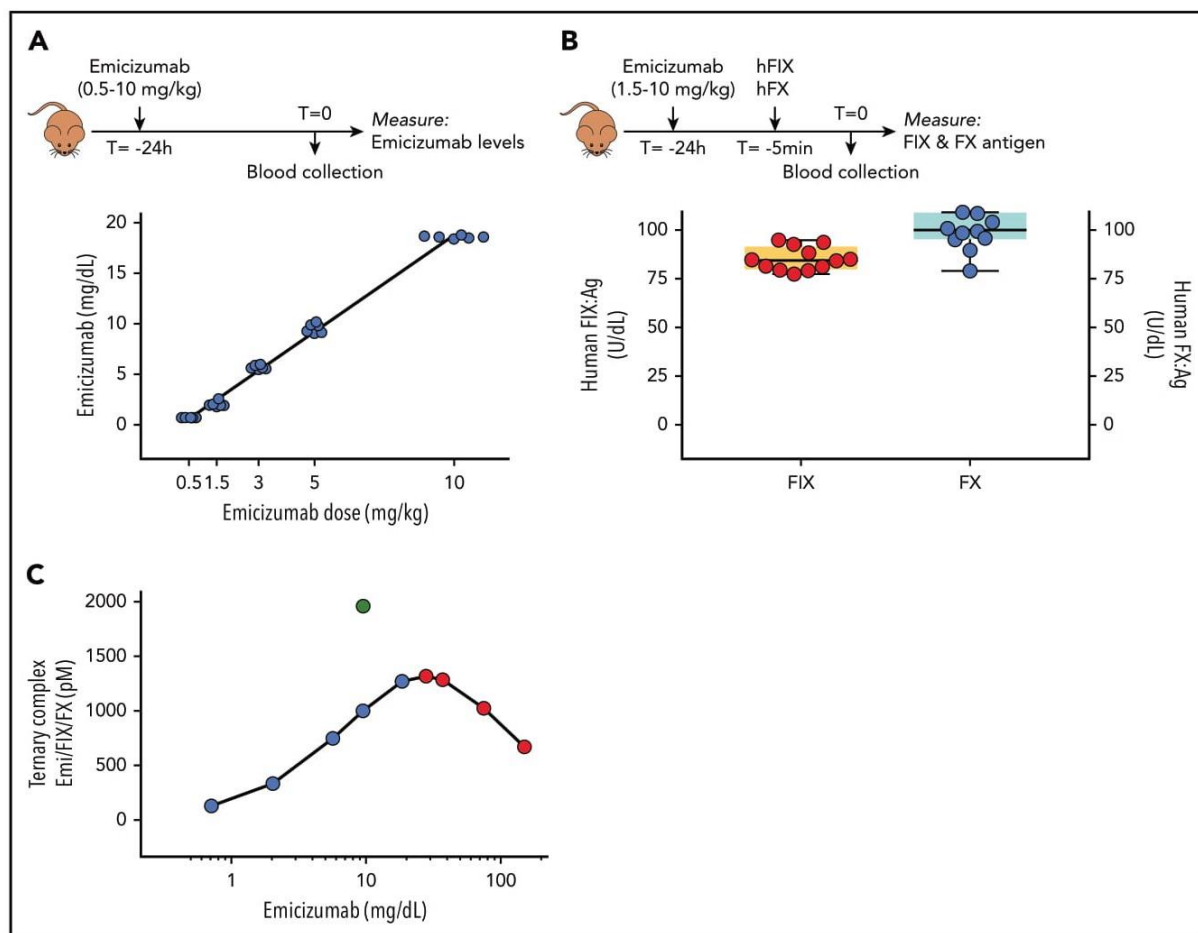


Figure 1. An emicizumab-responsive mouse model. (A) Mice received emicizumab (0-10 mg/kg) via retro-orbital infusion. Plasma samples obtained 24 hours after infusion were used to determine circulating emicizumab levels, expressed as milligrams per deciliter. Each data point represents an individual mouse. (B) FVIII-deficient mice previously infused with emicizumab (1.5-10 mg/kg), received a cocktail containing human FIX (hFIX) and FX (both 100 U/kg) via retro-orbital infusion. Plasma samples obtained 5 minutes after infusion were used to determine circulating levels of human FIX (left y-axis) and FX (right y-axis) antigen (Ag), expressed as units per deciliter. Each data point represents an individual mouse, and pooled data from the various emicizumab doses are shown. (C) Based on the reported affinity of emicizumab (Emi) for FIX (1.85 μ M) and FX (1.58 μ M) and the respective concentrations of emicizumab (0.7-18.6 mg/dL), FIX (85 U/dL), and FX (100 U/dL) in our model (see panels A-B), the concentration of the ternary emicizumab/FIX/FX complex for each emicizumab dose used in this study (blue symbols) was calculated as described.⁴ Higher doses of emicizumab will not further increase ternary complex formation, and may even lead to reduced ternary complex formation (red symbols). In contrast, increasing FIX and/or FX concentrations would allow for higher concentrations of ternary complexes (eg, green symbol: 9.6 mg/dL emicizumab, 200 U/kg FIX, 100 U/kg FX)

Results

An emicizumab-responsive mouse model

To test emicizumab in murine models, the presence of human FIX and FX is obligatory. Our approach therefore was to first administer emicizumab (0.5-10 mg/kg) via IV infusion into FVIII-deficient mice 24 hours before the tail-clip procedure. Subsequently, mice received a combined dose of human FIX and FX (both 100 U/kg) 5 minutes before tail amputation. Emicizumab levels 24 hours after infusion varied dose-dependently between 0.7 ± 0.1 mg/dL for the 0.5 mg/kg dose and 18.6 ± 14.1 mg/dL for the 10 mg/kg dose (Figure 1A). Dosing with 3 mg/kg generated plasma concentrations of 5.7 ± 0.2 mg/dL, similar to concentrations in patients who receive weekly subcutaneous dosing of 1.5 mg/kg.⁶ Human FIX and FX concentrations were measured in mice that received between 1.5 and 10 mg/kg emicizumab ($n = 3$ per dose), and pooled data revealed FIX and FX levels of 85 ± 6 U/dL ($n = 12$) and 100 ± 11 U/dL ($n = 12$;

Figure 1B), respectively, at the time of tail amputation. No differences in FIX and FX levels between emicizumab doses were observed. Circulating ternary emicizumab/FIX/FX complexes were calculated to range between 129 pM and 1270 pM, based on the actual emicizumab and human FIX and FX levels at the time of the intervention (Figure 1C).

Ex vivo analysis of emicizumab-treated FVIII-deficient mice

To investigate potential emicizumab cofactor activity under these conditions, murine plasma samples were analyzed for FVIII-like activity in a diluted aPTT assay and in an FXIa-dependent thrombin-generation assay. Diluted aPTT-clotting times were shortened dose-dependently and clotting times in the normal range were obtained at doses of 3 mg/kg or more (Figure 2A). Apparently, emicizumab fully corrects for FVIII deficiency in the diluted aPTT, akin to what was previously

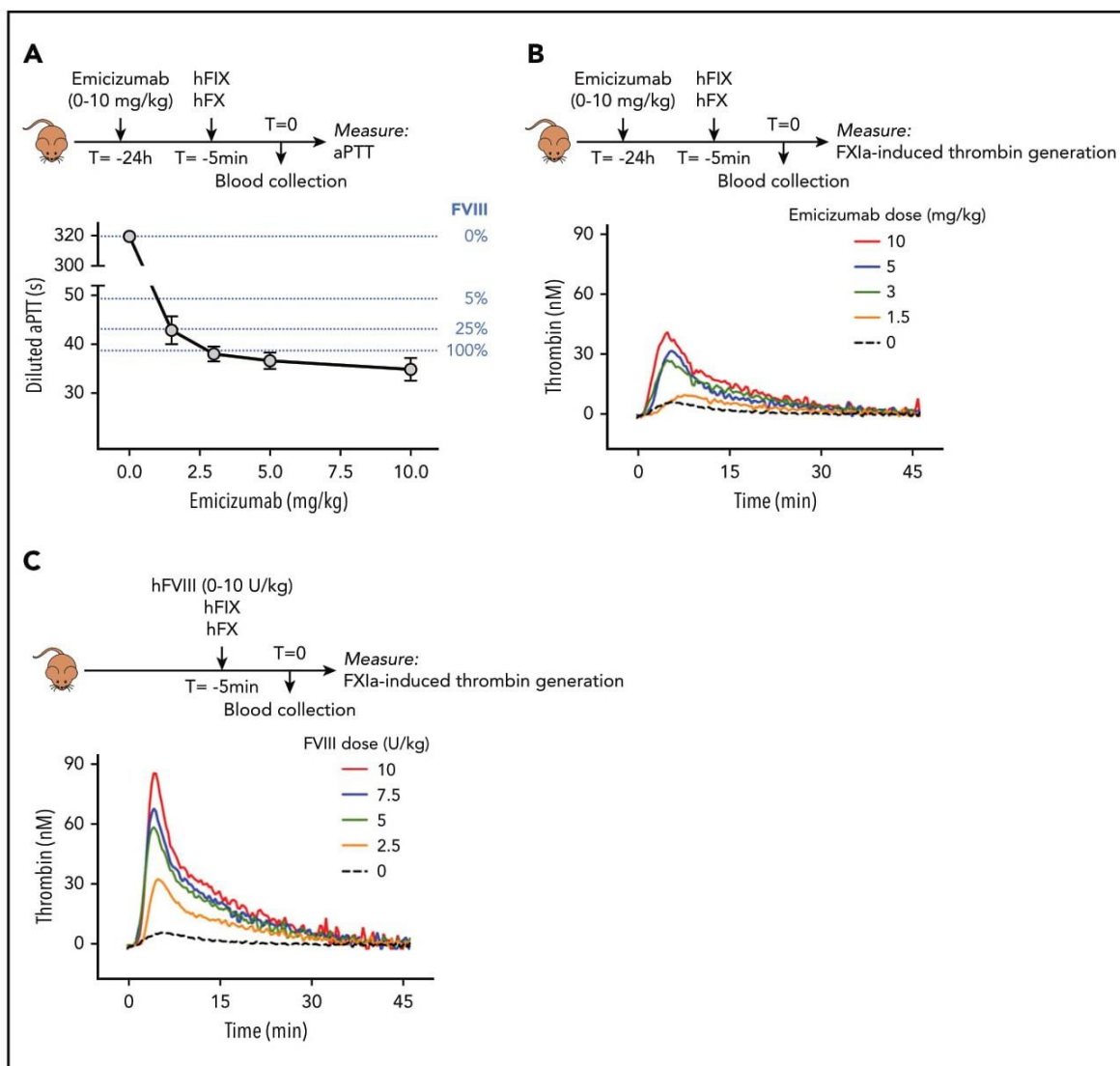


Figure 2. Ex vivo analysis of emicizumab activity in murine plasma samples. (A) Plasma samples obtained from FVIII-deficient mice receiving emicizumab combined with human FIX/FX were analyzed for procoagulant activity in a diluted aPTT assay. Clotting times for each emicizumab dose are presented. Data represent mean plus or minus SD of 3 to 9 samples. Clotting times of murine FVIII-deficient plasma, spiked with known FVIII concentrations, are indicated as dotted blue lines for comparison. (B-C) Plasma samples obtained from FVIII-deficient mice receiving emicizumab combined with human FIX/FX (B) or FVIII combined with human FIX/FX (C) were analyzed in a FXIa-induced thrombin-generation assay. Data represent mean of 3 to 5 mice. Thrombin generation in the absence of emicizumab or FVIII (black dotted line) is the same for both panels. Data on lag time, ETP, and thrombin peak are presented in Table 1.

reported.^{10,11,16} This activity in this clotting assay is generally considered as an overestimation of the true FVIII equivalence of emicizumab.^{10,11,16} As for the FXIa-dependent thrombin-generation assay, emicizumab also promoted thrombin generation in this assay (Figure 2B). Maximal ETP was 511 ± 82 nM/min at 10 mg of emicizumab per kilogram, similar to that observed for mice that received 5 U of FVIII per kilogram (622 ± 107 nM/min; $P = .149$; Figure 2B-C; Table 1). In contrast, peak thrombin levels were significantly lower for emicizumab (42.2 ± 5.1 nM for 10 mg of emicizumab per kilogram and 58.3 ± 9.3 nM for 5 U of FVIII per kilogram, respectively; $P = .0172$; Figure 2B-C; Table 1). Together, these data highlight that, in an ex vivo setting, laboratory assays also give very different FVIII-equivalent values for emicizumab, similar to what has been observed in

in vitro analyses.¹⁰ Nevertheless, confusing emicizumab with human FIX/FX allows for emicizumab-enhanced hemostasis in this mouse model.

Dose-response FVIII in a tail-clip-bleeding model

To compare emicizumab with FVIII in the tail-clip model, we first performed a dose-response study using FVIII. Mice received 2.5 to 10 U of FVIII per kilogram, resulting in plasma levels of 5 to 20 U of FVIII per deciliter (not shown). To remain completely in line with mice receiving the FIX/FX/emicizumab cocktail, mice were given FVIII in combination with human FIX/FX. To evaluate whether the presence of additional human FIX and FX would affect the activity of FVIII, a similar dose response was also performed in the absence of human FIX and FX. Five minutes after infusion of FVIII (with or

Table 1. Thrombin-generation parameters

Dose, mg/kg	n	Lag time, min	ETP, nM/min	Thrombin peak, nM
None	8	2.3 ± 0.3	73 ± 19	7.6 ± 1.2
FVIII				
2.5	3	2.7 ± 0.2	371 ± 106	32.7 ± 5.5
5.0	3	2.0 ± 0.3	622 ± 107	58.7 ± 9.1
7.5	3	2.0 ± 0.4	692 ± 41	68.3 ± 2.9
10	3	2.2 ± 0.3	827 ± 113	85.7 ± 11.0
Emicizumab				
1.5	3	3.6 ± 1.2	146 ± 78	10.8 ± 2.8
3.0	4	2.5 ± 0.4	374 ± 107	27.5 ± 9.3
5.0	3	2.5 ± 0.4	349 ± 111	33.0 ± 9.2
10	5	1.9 ± 0.2	511 ± 82	42.2 ± 5.1

Thrombograms are depicted in Figure 2B-C.

without human FIX/FX), the tail tip was amputated. Mice receiving only human FIX/FX displayed a strong bleeding tendency (blood loss, 852 ± 139 µL; mean plus or minus SD; n = 15; Figure 3A). This amount was unaffected upon infusion of the lowest FVIII dose (2.5 U/kg; 809 ± 61 µL; n = 6; P = .979). However, incremental doses of FVIII (5-7.5-10 U/kg) induced a dose-dependent decrease in blood loss (Figure 3A). No statistical difference in blood loss was observed for the 7.5 and 10 U/kg dose (174 ± 219 µL and 34 ± 34 µL; n = 8; P = .389), suggesting that blood loss is maximally corrected. The half-maximal effective dose was calculated to be 5.3 U/kg (Figure 3B). As depicted in Figure 3B, a similar dose response was observed in the absence of human FIX and FX, with the half-maximal effective dose being 4.6 ± 0.5 U/kg (P = .279 compared with the presence of human FIX/FX).

Dose-response emicizumab in a tail-clip-bleeding model

We next analyzed mice infused with emicizumab. Mice receiving emicizumab with human FIX or FX alone, but not both, displayed similar blood loss as mice receiving FIX/FX without emicizumab (862 ± 47 µL [n = 3; P = 1.0] and 817 ± 44 µL [n = 3; P = .99] vs 852 ± 139 µL [n = 15]; Figure 4A). Similar blood loss was also observed for the lowest dose of emicizumab (0.5 mg/kg) tested in the presence of human FIX and FX (849 ± 221 µL; n = 8; P = 1.0; Figure 4B). In contrast, a significant reduction in blood loss was observed in mice receiving any emicizumab dose between 1.5 mg/kg and 10 mg/kg (Figure 4B). Interestingly, blood loss was not significantly different between these emicizumab doses tested, that is, 1.5, 3, 5, and 10 mg/kg (P = .34). Furthermore, the bleeding profiles were also similar between these doses of emicizumab (supplemental Figure 1, available on the Blood Web site).

Because emicizumab activity is restricted by the concentrations of FIXa and FX available,⁵ we tested the emicizumab-mediated response at different doses of FIX and FX. Compared with the dose of 100 U/kg used throughout the study, no differences were observed with regard to doses of 50 and 200 U/kg: 700 ± 235 µL (P = .091) for 50 U/kg and 639 ± 65 µL (P = .531) for 200 U/kg, compared with 498 ± 217 µL for 100 U/kg (Figure 4C). In contrast, significantly more blood loss was observed at a dose of 25 U/kg (874 ± 67 µL; P = .0006 compared with 100 U/kg), an amount similar to that of vehicle-treated mice (852 ± 139 µL).

Together, these data show that this model may be used to analyze emicizumab-mediated hemostasis in an unbiased manner, and emicizumab shows relevant cofactor-like activity under these in vivo conditions. By using the dose-response curve for FVIII as a reference, we used the average amount of blood loss from emicizumab-treated mice (1.5-10 mg/kg) to calculate FVIII equivalence in this

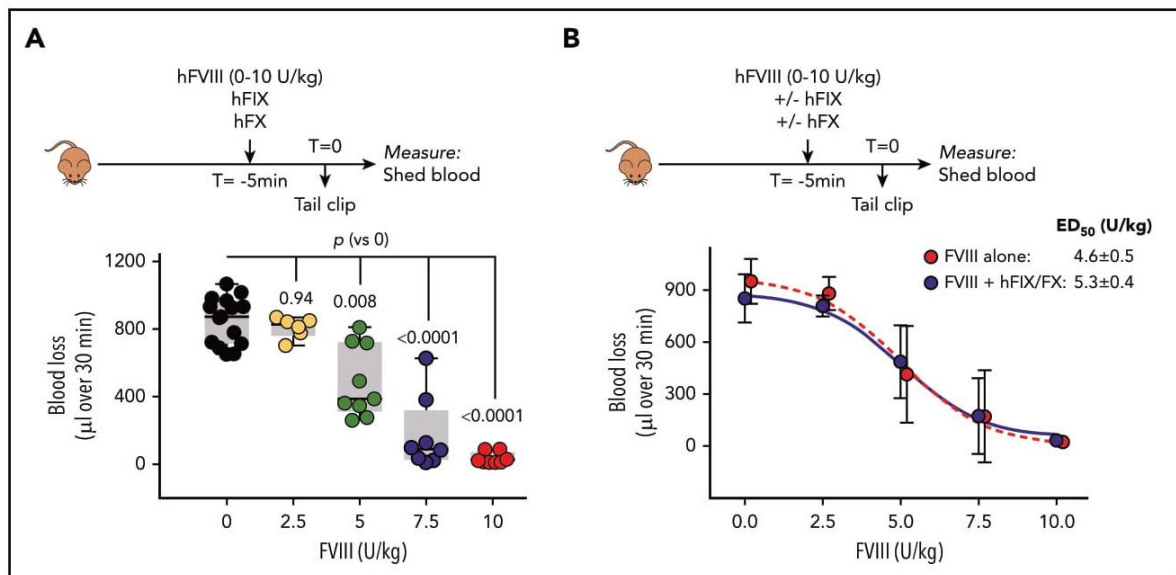


Figure 3. In vivo dose response of FVIII in FVIII-deficient mice. (A) FVIII-deficient mice received a mixture of FVIII (0-10 U/kg), human FIX (100 U/kg), and human FX (100 U/kg) via retro-orbital infusion. Five minutes after infusion, the terminal 3 mm of the tail was amputated, and shed blood was collected for 30 minutes. Presented is blood loss over 30 minutes vs FVIII dose. Each data point represents an individual mouse. Statistical analysis was performed via 1-way ANOVA with Dunnett multiple comparison. (B) Data presented in panel A but depicted as mean plus or minus SD (n = 6-9; blue symbols). A similar dose-response curve was generated in the absence of human FIX and FX (n = 6 per dose; red symbols). ED₅₀, half-maximal effective dose.

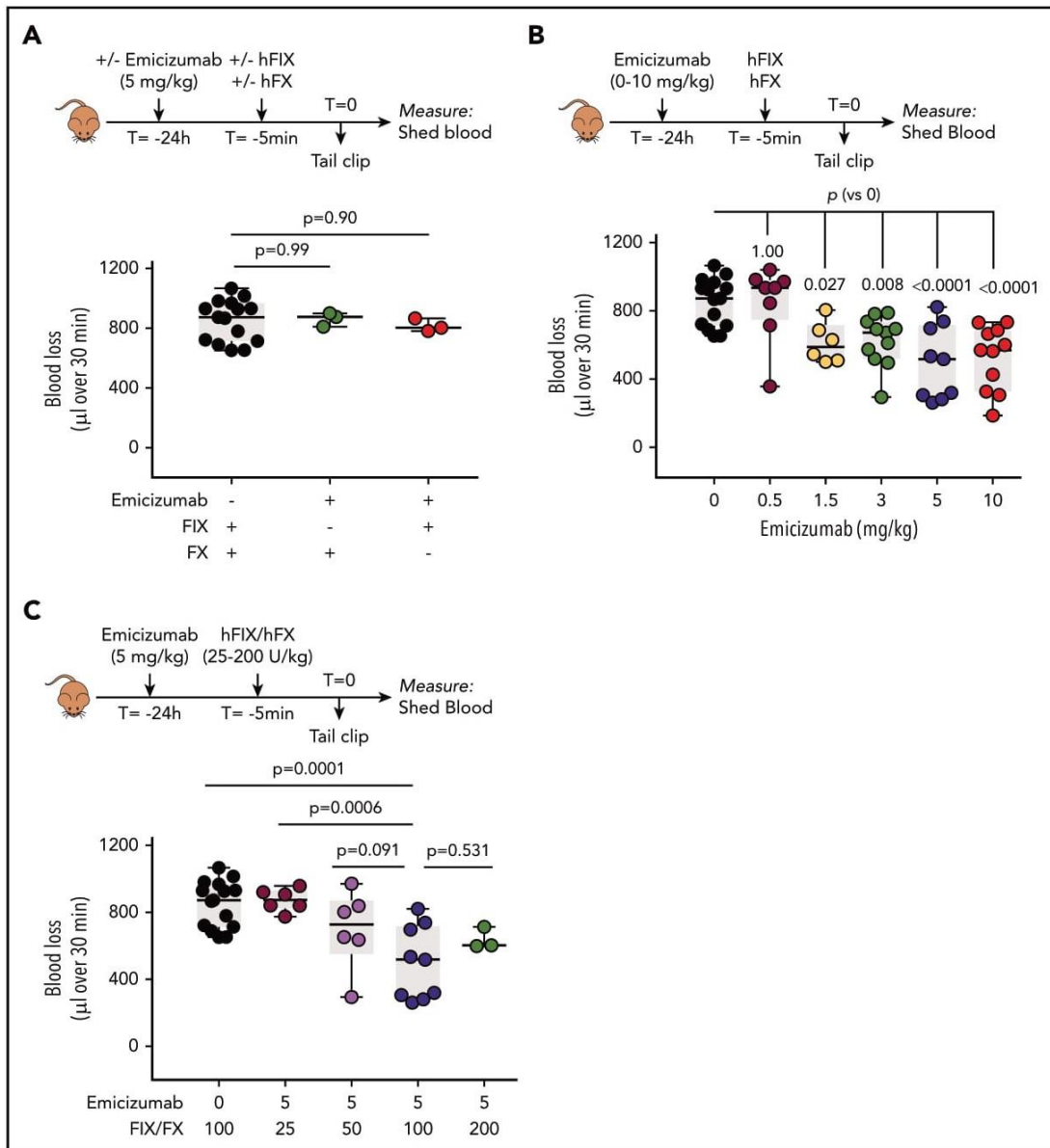


Figure 4. Emicizumab activity in FVIII-deficient mice. (A) FVIII-deficient mice were given incomplete combinations of emicizumab (3 mg/kg given 24 hours before tail amputation), FIX (100 U/kg given 5 minutes before tail amputation), and FX (100 U/kg given 5 minutes before tail amputation), each time with 1 of the 3 proteins missing. The tail bleeding was executed as described in the Figure 3 legend. Data represent individual mice. (B) FVIII-deficient mice were given emicizumab (0-10 mg/kg given 24 hours before tail amputation) and FIX/FX (both 100 U/kg given 5 minutes before tail amputation). Presented is blood loss over 30 minutes vs emicizumab dose. Data represent individual mice. Data for 0 mg/kg emicizumab are similar as those presented in Figure 3A. (C) Emicizumab (5 mg/kg) was given to FVIII-deficient mice in combination with different doses of FIX and FX (25-200 U/kg) prior to tail bleeding as described for panel B. Data for 0 mg/kg emicizumab are similar to those presented in Figure 3A and data for 100 U FIX-FX/kg are similar to those presented in panel B. Statistical analysis was performed via 1-way ANOVA with Dunnett multiple comparison.

model. The combined average blood loss was $566 \pm 177 \mu\text{L}$ ($n = 37$), and interpolating this amount into the FVIII-reference curve revealed a FVIII equivalence of $4.5 \pm 1.3 \text{ U/kg}$ (which relates to an FVIII plasma concentration of $9.0 \pm 0.3 \text{ U/dL}$). The bleeding profiles of the mice receiving these emicizumab doses were similar to those of the 5 U/kg FVIII dose (supplemental Figure 1).

Combining emicizumab with FVIII

Compared with emicizumab, FVIII has a superior affinity for FIXa,⁵ and it is often assumed that FVIII will outcompete

emicizumab during coagulation when both FVIII and emicizumab are present. We investigated, therefore, how hemostasis in FVIII-deficient mice is affected when FVIII and emicizumab are applied together. As shown in Figures 3 and 4, a single dose of 5 U of FVIII per kilogram or 3 mg of emicizumab per kilogram is insufficient to fully correct bleeding. We therefore tested what would happen if both were given simultaneously (Figure 5). Interestingly, when a FVIII dose of 5 U/kg was combined with an emicizumab dose of 3 mg/kg, blood loss was corrected to the same extent as observed for an FVIII dose of 7.5 U/kg or higher

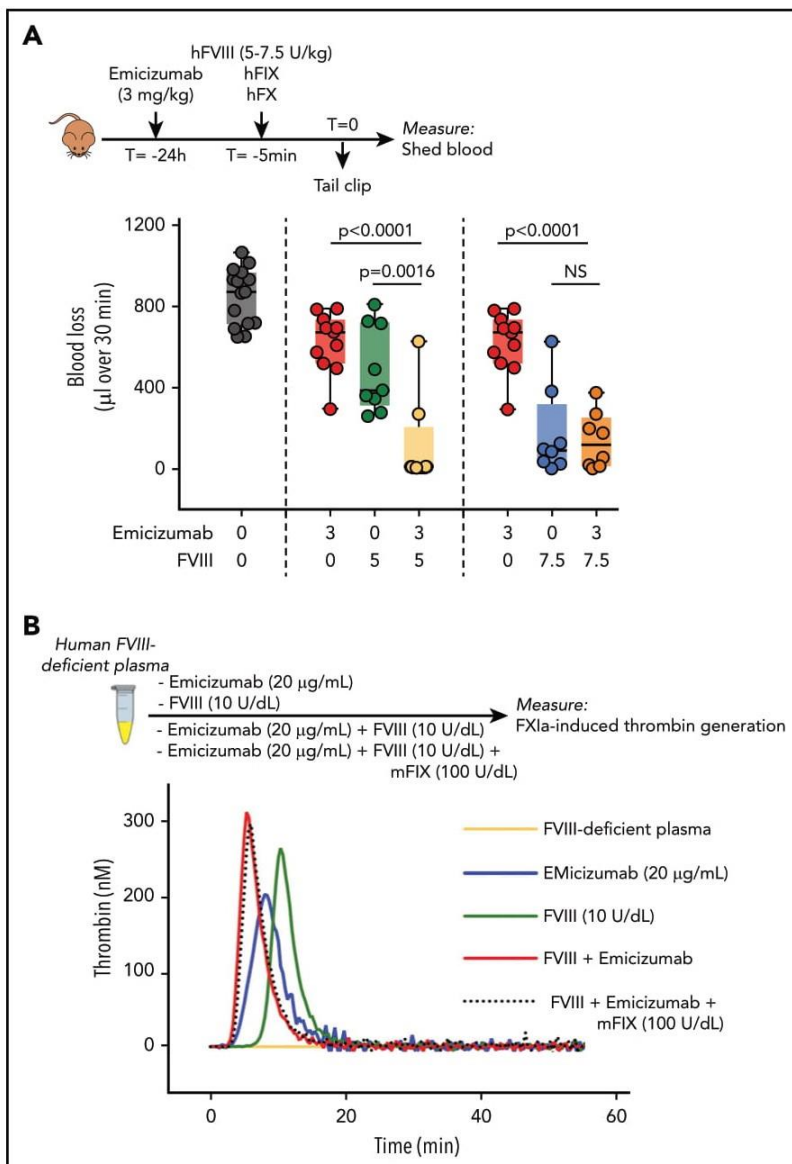


Figure 5. Combined activity of FVIII and emicizumab. (A) Emicizumab (3 mg/kg given 24 hours before tail bleeding) and FVIII (5 or 7.5 U/kg given 5 minutes before tail bleeding) were given separately or in combination together with human FIX/FX (100 U/kg) to FVIII-deficient mice as described for Figures 3 and 4. Each data point represents an individual mouse. Data for FVIII without emicizumab are similar to those presented in Figure 3A, and data for emicizumab without FVIII are similar to those presented in Figure 4B. Statistical analysis was performed via 1-way ANOVA with Tukey multiple comparison. Data of mice receiving only FIX/FX (but no emicizumab or FVIII) are similar as those presented in Figure 3A. (B) FXIa-induced thrombin generation of human FVIII-deficient plasma (orange), which was spiked with emicizumab (20 μg/mL; blue), FVIII (10 U/dL; green), or both in the absence (red) or presence (black dotted line) of recombinant murine FIX (mFIX; 100 U/dL). Thrombogram is representative for 3 independent experiments. NS, not significant.

(Figure 5A). No further reduction in blood loss was observed when emicizumab was combined with a dose of 7.5 U of FVIII per kilogram (Figure 5A). A potential pitfall of this experiment is that FVIII would be able to associate with both human and murine FIXa, whereas emicizumab is restricted to its interaction with human FIXa. To test whether this would affect the outcome, we designed an *in vitro* FIXa-induced thrombin-generation experiment using human FVIII-deficient plasma, to which we added purified recombinant murine FIX (Figure 5B). Compared with emicizumab (20 μg/mL) or FVIII (0.1 U/mL) alone, thrombin generation was increased when combining FVIII and emicizumab (Figure 5B). The addition of murine FIX (1 U/mL) to the mixture containing FVIII and emicizumab did not further modify thrombin generation. This supports the view that the presence of both human and murine FIXa does not affect the additive activity of FVIIIa and emicizumab. Together, these results show that emicizumab may provide

additional hemostatic support to the tenase complex at low FVIII concentrations.

Discussion

Given the impact that emicizumab has on the management of hemophilia A, it is surprising that accessible animal models are thus far lacking. This limitation is mostly due to the species-restricted interaction between emicizumab and its ligands, FIX and FX. To fill this gap, we here present a simple and straightforward mouse model, which allows for testing of emicizumab *in vivo*. The model is based on the IV infusion of emicizumab in combination with human FIX and FX. This combination indeed results in a significant reduction in blood loss compared with vehicle-treated FVIII-deficient mice, at least when doses between 1.5 and 10 mg/kg emicizumab are being used.

Table 2. Relation ternary complex formation and hemostatic potential

Emicizumab, mg/kg	FIX, U/kg	FX, U/kg	Estimated ternary complex, pM	Reduced blood loss?
0	100	100	0	No
5	0	100	0	No
5	100	0	0	No
0.5	100	100	129	No
1	100	100	333	Yes
3	100	100	748	Yes
5	100	100	1001	Yes
10	100	100	1270	Yes
5	25	25	66	No
5	50	50	258	Yes
5	200	100	1961	Yes

A single IV infusion of emicizumab 24 hours before the tail-clip intervention results in reproducible and dose-dependent levels of the antibody (Figure 1). FIX and FX were dosed such that their plasma levels were within the normal range (0.85 U/dL and 1.0 U/dL, respectively). Based on the respective emicizumab, FIX, and FX concentrations used in this study, the amount of circulating ternary complex varies between 128 pM for the lowest emicizumab concentration and 1270 pM for the highest emicizumab concentration (Figure 1C). Higher emicizumab concentrations would not lead to increased levels of ternary complex (red dots in Figure 1C), and could even lead to reduced complex formation. This bell-shaped curve is due to the fact that if the molar excess of emicizumab increases, there will be fewer emicizumab molecules that will bind both FIX and FX simultaneously.

Although emicizumab levels are expected to remain relatively stable during the 30-minute tail-clip intervention because of its long half-life, this is less so for concentrations of human FIX and FX. FIX and FX have half-lives that exceed 3 hours in mice,^{17,18} and it is thus anticipated that <30% of FIX and FX will be removed during the 30-minute experiment. To test whether the amounts of FIX and FX that remain would be sufficient, we performed experiments in which mice were given one-half the amount of FIX and FX, that is, 50 U/kg instead of 100 U/kg. Blood loss was similar between 50 and 100 U/kg doses (Figure 4). This suggests that when giving a 100 U/kg dose, and even if 50% of FIX and FX would be eliminated during the 30-minute observation period, there would still be sufficient amounts of FIX and FX remaining to mediate emicizumab-dependent hemostasis.

The opposite was true when FIX and FX were given a 25 U/kg dose, with blood loss being similar to that of vehicle-treated mice (Figure 4). Apparently, a minimal amount of FIX and FX is needed to support emicizumab activity. By using the calculation for ternary complexes, it appears that a minimum of 260 pM ternary complex is needed to achieve a reduction in blood loss,

at least in this model (Table 2). It is interesting to speculate on the consequences of these data in view of individuals with reduced FIX and FX levels, in particular newborns. Newborns have FIX and FX levels that are reduced 40% to 60% during the first month of their life.^{19,20} These levels restrict ternary complex formation, and will remain below 250 pM if the clinical therapeutic dose of 5.5 mg/dL is being used. It is possible, therefore, that emicizumab will be less efficient in these patients.

Observing that a low dose of FVIII, in itself too low to fully correct the bleeding, combined with emicizumab resulted in a complete correction of blood loss was of interest (Figure 5). Apparently, there is an additive effect of both components under these conditions. One could argue that FVIIIa has a much higher affinity than emicizumab for FIXa, and will thus outcompete emicizumab. Nevertheless, it is reasonable to assume that the amount of FVIIIa available (in our case 0.03 nM, if all 10 U of FVIII per deciliter are being activated) is much less than the amount of FIXa. Assuming that 5% of FIXa would be activated, then there is 3.8 nM human FIXa present in our experiments; if 0.03 nM of these interact with FVIIIa, there would be 3.77 nM left for the interaction with emicizumab. In other words, complex formation with emicizumab will be virtually unchanged. Indeed, we noticed that doubling the FIX concentration available for FVIII did not affect thrombin generation in the presence of a low dose of FVIII and emicizumab (Figure 5B).

Our proposed model is, like many other animal models, not without limitations. First, in contrast to the human system, only FIX and FX are of human origin in this mouse model. Moreover, murine FIX and FX are still present. The murine and human proteins may behave differently during the hemostatic process. It should be noted that both human FIX and FX are able to correct the deficiencies of their murine orthologs in the respective mouse knockout models,^{21,22} suggesting that the proteins are fully functional in the murine context. We analyzed this further in a diluted aPTT assay, in which we compared the clotting times of murine plasma containing only murine FIX with murine plasma containing both human and murine FIX (supplemental Figure 2). A similar dose response was observed, suggesting that both human and murine FIX are reacting similarly in this assay.

A second limitation is that the functionality of emicizumab has been tested only in the tail-clip-model. Emicizumab activity is driven by the amount of FIXa generated, and this amount may be different dependent on the severity of the injury and the location of the injury. We are currently exploring the hemostatic potential of emicizumab in other models with injuries at different locations and with different severities.

Finally, as mentioned earlier in "Discussion," levels of human FIX and FX are transient, and do not allow for long-term follow-up. However, there are strategies for obtaining stable levels over a longer period of time. Attempts to generate knock-in mice that express human FIX and FX have only been partially successful, as these mice express strongly reduced levels of both proteins (10% to 20%).²³ These levels are too low to form sufficient amounts of ternary emicizumab complexes. Alternatively, FIX and FX can be produced over a longer period of time following hydrodynamic injection (~2 weeks stable production) or by using viral vectors (eg, adeno-associated virus or lentivirus). The issue here is that the protein expression levels are often highly

variable and difficult to predict. However, our data using different doses of FIX and FX indicate that levels of FIX (85 U/dL) and FX (100 U/dL) can be halved or doubled without any major consequences, providing a relatively extended window of expression for which to aim.

In conclusion, we provide a relatively straightforward and robust mouse model that can be used to assess the in vivo action of emicizumab (or variants thereof) alone or in combination with other procoagulant agents.

Acknowledgments

The work was supported by the Société Française d'Hématologie (SFH) and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-14-OHRI-0013 and ANR-18-CE17-0010-01).

Authorship

Contribution: S.F., V.M., and C.K. performed experiments; S.F., I.P., C.C., O.D.C., P.J.L., and C.V.D. analyzed data; O.D.C., A.N., P.J.L., and C.V.D. conceived the study; A.K., O.D.C., P.J.L., and C.V.D. supervised the study; P.J.L. and C.V.D. wrote the manuscript; and all authors contributed to the editing of the final manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: P.J.L. received honoraria/speaker's fees from Biotest, Chugai, Roche, Sobi, and Takeda. The remaining authors declare no competing financial interests.

ORCID profiles: I.P., 0000-0002-3843-642X; C.K., 0000-0001-9126-6127; C.C., 0000-0002-8271-6795; P.J.L., 0000-0002-7937-3429; C.V.D., 0000-0001-5152-9156.

Correspondence: Peter J. Lenting, U1176, INSERM, 80 rue du General Leclerc, 94276 Le Kremlin-Bicêtre cedex, France; e-mail: peter.lenting@inserm.fr.

Footnotes

Submitted 27 November 2019; accepted 12 April 2020; prepublished online on *Blood* First Edition 5 May 2020. DOI 10.1182/blood.2019004334.

*S.F., I.P., and O.D.C. contributed equally to the study.

†P.J.L. and C.V.D. contributed equally to the study.

Requests for data sharing should be made to the corresponding author (peter.lenting@inserm.fr).

The online version of this article contains a data supplement.

There is a *Blood* Commentary on this article in this issue.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

REFERENCES

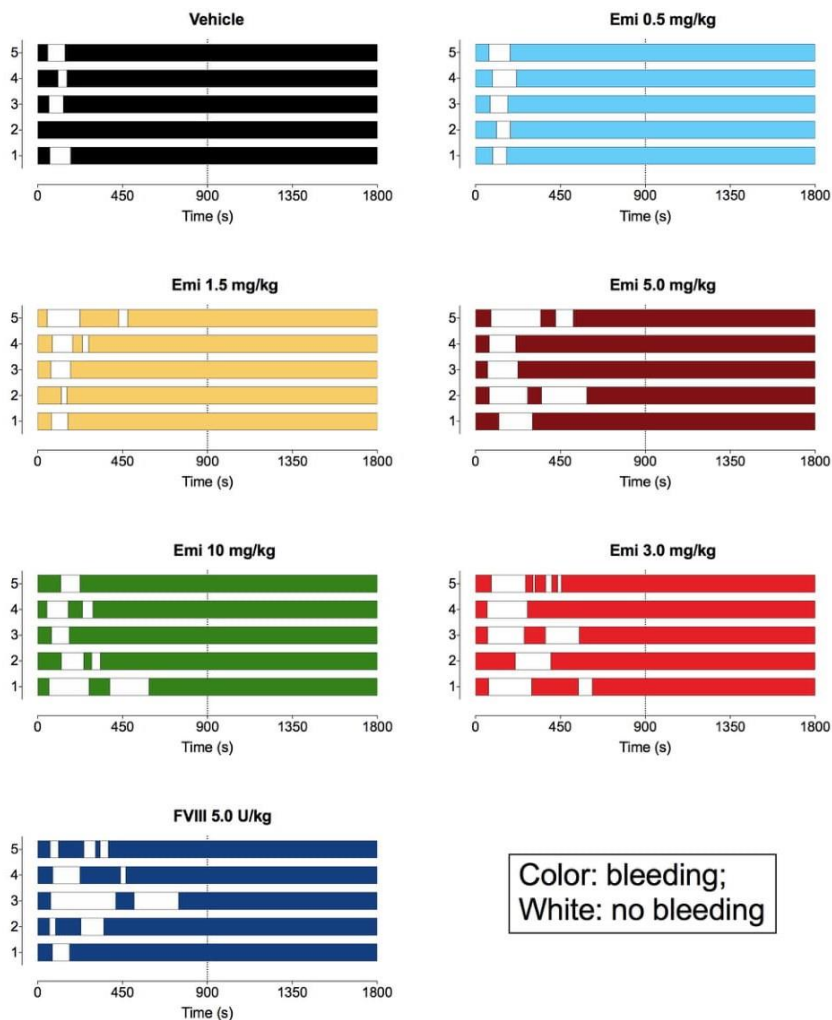
1. Weyand AC, Pipe SW. New therapies for hemophilia. *Blood*. 2019;133(5):389-398.
2. Muczynski V, Christophe OD, Denis CV, Lenting PJ. Emerging therapeutic strategies in the treatment of hemophilia A. *Semin Thromb Hemost*. 2017;43(6):581-590.
3. Kitazawa T, Igawa T, Sampei Z, et al. A bispecific antibody to factors IXa and X restores factor VIII hemostatic activity in a hemophilia A model. *Nat Med*. 2012;18(10):1570-1574.
4. Kitazawa T, Esaki K, Tachibana T, et al. Factor VIIIa-mimetic cofactor activity of a bispecific antibody to factors IX/IXa and X/Xa, emicizumab, depends on its ability to bridge the antigens. *Thromb Haemost*. 2017;117(7):1348-1357.
5. Lenting PJ, Denis CV, Christophe OD. Emicizumab, a bispecific antibody recognizing coagulation factors IX and X: how does it actually compare to factor VIII? *Blood*. 2017;130(23):2463-2468.
6. Oldenburg J, Mahlangu JN, Kim B, et al. Emicizumab prophylaxis in hemophilia A with inhibitors. *N Engl J Med*. 2017;377(9):809-818.
7. Mahlangu J, Oldenburg J, Paz-Priel I, et al. Emicizumab prophylaxis in patients who have hemophilia A without inhibitors. *N Engl J Med*. 2018;379(9):811-822.
8. Pipe SW, Shima M, Lehle M, et al. Efficacy, safety, and pharmacokinetics of emicizumab prophylaxis given every 4 weeks in people with haemophilia A (HAVEN 4): a multicentre, open-label, non-randomised phase 3 study. *Lancet Haematol*. 2019;6(6):e295-e305.
9. Young G, Liesner R, Chang T, et al. A multicenter, open-label phase 3 study of emicizumab prophylaxis in children with hemophilia A with inhibitors. *Blood*. 2019;134(24):2127-2138.
10. Leksa NC, Aleman MM, Goodman AG, Rabinovich D, Peters R, Salas J. Intrinsic differences between FVIIIa mimetic bispecific antibodies and FVIII prevent assignment of FVIII-equivalence. *J Thromb Haemost*. 2019;17(7):1044-1052.
11. Aleman MM, Leksa NC, Peters R, Salas J. Assay challenges (and opportunities) with non-factor VIII therapies for hemophilia A. *Expert Rev Mol Diagn*. 2019;19(1):1-3.
12. Hartmann R, Feenstra T, Valentino L, Dockal M, Scheiflinger F. In vitro studies show synergistic effects of a procoagulant bispecific antibody and bypassing agents. *J Thromb Haemost*. 2018;16(8):1580-1591.
13. Dargaud Y, Lienhart A, Janbain M, Le Quellec S, Enjolras N, Negrier C. Use of thrombin generation assay to personalize treatment of breakthrough bleeds in a patient with hemophilia and inhibitors receiving prophylaxis with emicizumab. *Haematologica*. 2018;103(4):e181-e183.
14. Bi L, Lawler AM, Antonarakis SE, High KA, Gearhart JD, Kazazian HH Jr. Targeted disruption of the mouse factor VIII gene produces a model of haemophilia A. *Nat Genet*. 1995;10(1):119-121.
15. Hemker HC, Giesen P, AlDieri R, et al. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypo-coagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2002;32(5-6):249-253.
16. Adamkewicz JI, Chen DC, Paz-Priel I. Effects and interferences of emicizumab, a humanised bispecific antibody mimicking activated factor VIII cofactor function, on coagulation assays. *Thromb Haemost*. 2019;119(7):1084-1093.
17. Gui T, Lin HF, Jin DY, et al. Circulating and binding characteristics of wild-type factor IX and certain Gla domain mutants in vivo. *Blood*. 2002;100(1):153-158.
18. Muczynski V, Verhenne S, Casari C, et al. A thrombin-activatable factor X variant corrects hemostasis in a mouse model for hemophilia A. *Thromb Haemost*. 2019;119(12):1981-1993.
19. Andrew M, Paes B, Milner R, et al. Development of the human coagulation system in the full-term infant. *Blood*. 1987;70(1):165-172.
20. Andrew M, Paes B, Milner R, et al. Development of the human coagulation system in the healthy premature infant. *Blood*. 1988;72(5):1651-1657.
21. Cooley B, Funkhouser W, Monroe D, et al. Prophylactic efficacy of BeneFIX vs Alprolix in hemophilia B mice. *Blood*. 2016;128(2):286-292.
22. Verhenne S, Loubière C, Denis CV, Lenting PJ, Christophe OD. An inducible mouse model of factor X deficiency to test novel factor X therapeutics [abstract]. *Res Pract Thromb Haemost*. 2019;3(suppl 1). Abstract OC 28.24.
23. Li W, Hu J, Leksa N, et al. A novel humanized hemophilia-a mouse model to facilitate pre-clinical in vivo studies of human specific FVIIIa-mimetic bispecific antibodies [abstract]. *Blood*. 2018;132(suppl 1). Abstract 2458.

Supplementary information

A hemophilia A mouse model for the in vivo assessment of Emicizumab function

Ferrière et al.

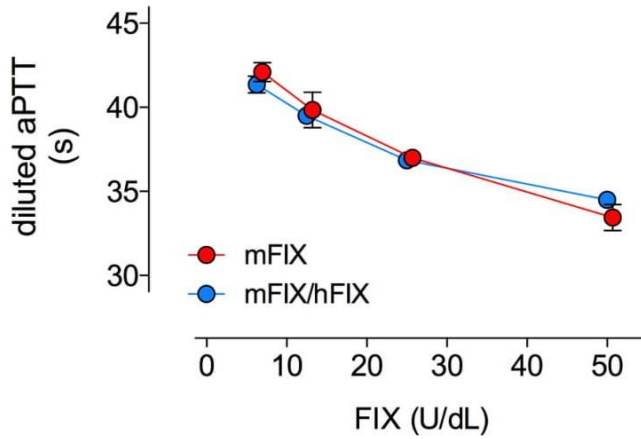
Supplementary Figure S1



Legend Supplementary Figure S1: Bleeding profiles of FVIII-deficient mice receiving Emicizumab or FVIII.

FVIII-deficient mice were given Emicizumab (0-10 mg/kg) or FVIII (0-10 U/kg) in combination with human FIX/FX (both 100 U/kg). Emicizumab was given 24 h before the tail amputation, whereas FVIII and FIX/FX were given 5 min before the intervention. All proteins were infused intravenously via the retro-orbital plexus. Following tail amputation, mice were monitored for 30 min, and bleeding arrests (white sections) and (re)-bleeds (colored sections) were noted for each mouse. For each group, the bleeding profiles of 5 mice are presented.

Supplementary Figure S2



Legend Supplementary Figure S2: Diluted aPTT of murine plasma with and without human FIX

Serial dilutions of murine wild-type plasma into murine FIX-deficient plasma were prepared to obtain FIX concentrations of 6.25-50 U/dL (red symbols). Similar serial dilutions were made, but with half of the FIX consisting of murine FIX supplemented with purified human FIX to obtain similar final FIX concentrations (blue dots).

Briefly, murine-only FIX samples were prepared by mixing 40 μ L murine wild-type (WT) plasma with 35 μ L murine FIX-deficient plasma and 5 μ L of Owren-Koller buffer (Stago cat# 00360, Asnières, France), generating a preparation of FIX levels of 50 U/dL. 40 μ L of this mixture was then mixed with 40 μ L murine FIX-deficient plasma (25 U/dL), and this was repeated another two times to obtain 12.5 U/dL and 6.25 U/dL. For the combined human and murine FIX samples, 20 μ L WT-plasma was mixed with 55 μ L murine FIX-deficient plasma, 4 μ L of Owren-Koller buffer and 1 μ L purified human FIX (2,000 U/dL). This generates a preparation of 25 U/dL murine FIX + 25 U/dL human FIX, *i.e.* 50 U/dL combined. This mixture was then serially diluted as indicated for the murine-only FIX samples. 40 μ L of each sample was then mixed with 120 μ L Owren-Koller buffer. The diluted aPTT clotting times were determined using the STA-PTT_a-kit (Stago).

Résultats/conclusions

Le développement et la caractérisation de ce modèle murin hémophilie A ont permis de mettre en évidence de nouvelles informations relatives à la fonction de l'emicizumab *in vivo*. Dans un premier temps, des souris hémophiles A reçoivent par voie intraveineuse deux injections en amont du test de « tail-clip », une première injection d'emicizumab 24 heures avant et une seconde injection de hFIX et hFX 5 minutes avant. Cette première approche permet d'obtenir des niveaux circulants constants d'emicizumab (0,7-19 mg/dL pour des doses injectées comprises entre 0,5-10 mg/kg), de hFIX et hFX (respectivement 85 et 101 U/dL pour une dose injectée de 100 U/kg). Les doses d'emicizumab supérieures ou égales à 1,5 mg/kg réduisent de façon significative la perte de sang chez ces souris dans le cadre du test de « tail-clip ». Néanmoins, la réduction observée est incomplète en comparaison de celle observée chez des souris hémophiles A traitées avec des concentrés de FVIII. De plus, aucune différence d'efficacité n'a été observée entre ces différentes doses d'emicizumab. Le plasma de ces souris présente dans des tests *in vitro* (TGT et TCA dilué) une activité FVIII-like similaire à celle enregistrée dans des échantillons de plasmas humains contenant de l'emicizumab. A partir de ce modèle, nous avons été en mesure de déduire une activité FVIII-like de l'emicizumab correspondant à une dose de FVIII de 4,5 U/kg. De manière surprenante, lorsqu'il est combiné avec une faible dose de FVIII de l'ordre de 5 U/kg, l'emicizumab est capable d'apporter une activité additionnelle permettant l'arrêt complet du saignement. En conclusion, nous avons donc été en mesure de développer et caractériser un modèle murin robuste qui peut être utilisé pour l'évaluation de l'action *in vivo* de l'emicizumab, seul ou combiné avec d'autres agents pro-coagulants.

DISCUSSION

L'apparition d'anticorps dirigés contre le FVIII thérapeutique injecté demeure une des complications la plus redoutées chez le patient hémophile A. La nécessité de pouvoir traiter des patients hémophiles A présentant de tels anticorps a motivé le développement d'agents thérapeutiques contournant l'effet du FVIII. Durant ma thèse, j'ai eu pour objectif l'étude du mode d'action de deux de ces agents thérapeutiques contournant l'effet du FVIII.

Premièrement, je me suis intéressé à mettre en évidence de façon plus précise le mécanisme d'action *in vivo* du FVIIa recombinant (Novoseven, rFVIIa). En effet, le rFVIIa est utilisé depuis un peu plus de vingt ans dans le traitement de l'hémophilie A chez les patients présentant des inhibiteurs. Bien que son efficacité en clinique ait été prouvée, le mode d'action exact reste flou et différentes possibilités ont été décrites dans la littérature. Ces discussions sont principalement liées à la question de savoir si l'action thérapeutique du rFVIIa chez les patients hémophiles repose sur une formation ou non d'un complexe avec le FT. Cette question a été soulevée car les niveaux thérapeutiques de rFVIIa sont élevés de plusieurs ordres de grandeur que les niveaux de FVIIa endogène. Savoir si le mode d'action du rFVIIa nécessite ou non la formation d'un complexe avec le FT est important car cela permettrait de développer des variants améliorés de cet agent thérapeutique. Dans une première partie de ma thèse, je me suis intéressé à caractériser la dépendance du rFVIIa au FT via un anticorps, de type nanobody, dirigé contre le FVIIa aussi bien *in vitro* que *in vivo*.

Dans une seconde partie, j'ai développé un modèle *in vivo* chez la souris afin d'évaluer le mécanisme d'action de l'emicizumab. En effet, l'utilisation de l'anticorps bispécifique dans le traitement de l'hémophilie A, avec ou sans inhibiteurs, est de plus en plus répandue. L'emicizumab mime dans une certaine mesure la fonction de cofacteur du FVIII dans l'activation du FX médiée par le FIXa. Cependant, il lui manque certaines des propriétés que possède le FVIII. Par conséquent, son potentiel de cofacteur est moins élevé que celui du FVIII. Les efforts visant à estimer de manière fiable l'équivalence en FVIII de l'emicizumab dans les tests *in vitro* ont échoué, car des valeurs comprises entre 10 % et plus de 100 % d'activité de type FVIII ont été obtenues dans les différents tests. Cette divergence provient du fait que les tests *in vitro* utilisent les différentes propriétés du FVIII, ils ne sont donc pas adaptés aux propriétés de l'emicizumab. Pour ce faire, il était nécessaire de disposer d'un modèle animal accessible, dans lequel l'activité cofacteur de l'emicizumab pourrait être abordée de manière impartiale. La haute spécificité de l'emicizumab pour les facteurs IX et X humains limite son utilisation actuelle aux modèles primates d'hémophilie A acquise, des modèles difficiles d'accès. C'est pourquoi il était intéressant de développer une approche *in vivo* chez la souris.

PROJET 1 : Caractérisation de la dépendance du rFVIIa pour le FT à l'aide de nanobodies

Les remarquables propriétés structurales, fonctionnelles et physico-chimiques des nanobodies en font des outils extrêmement utiles pour la recherche fondamentale, le diagnostic ou encore la thérapie. Depuis leur découverte il y a un peu plus de vingt ans, leur popularité a grandement augmenté et le champ de leurs utilisations est maintenant particulièrement vaste. Dans le contexte de l'hémostase, un certain nombre de nanobodies ont été développés en tant qu'outils de recherche. Leur capacité à pouvoir reconnaître des épitopes normalement hors d'atteinte des traditionnels anticorps monoclonaux a poussé leur utilisation dans l'identification de conformations spécifiques de protéines de l'hémostase, telles que le FVIIa. Plusieurs anticorps IgG classiques dirigés contre le FVIIa ont été développés et bien que pour la plupart ils reconnaissent sans distinction le FVII et le FVIIa, certains de ces anticorps ont tout de même été décrits comme étant spécifique de la forme activée du FVII. Il est possible de citer un anticorps se liant préférentiellement au FVIIa tout en étant capable de stimuler l'activité de l'enzyme (331) ou encore un anticorps polyclonal inhibiteur dirigé contre la partie C-terminale de la chaîne légère du FVIIa (332) qui reste inhibiteur en présence de FT. Qu'en est-il dans le domaine des nanobodies ? Des travaux existent déjà sur la description d'un nanobody liant uniquement le FVIIa et pas le FVII (333). Cependant, plusieurs détails sont manquants, nous ne savons ni si ce nanobody a un effet inhibiteur, ni ce potentiel effet inhibiteur est affecté ou non par la présence de FT. Néanmoins, ce nanobody s'est révélé être un excellent outil pour mesurer les concentrations de FVIIa dans différentes cohortes de patients. Au laboratoire nous nous sommes intéressés au mode d'action du FVIIa *in vivo*, nous avons cherché à mettre en évidence si le mode d'action de l'enzyme était principalement dépendant ou indépendant du cofacteur FT. C'est pourquoi nous avons décidé de générer des nanobodies capables de reconnaître le FVIIa plutôt que le FVII, mais aussi le FVIIa libre plutôt que le FVIIa complexé au FT.

a) Génération de nanobodies spécifiques du FVIIa

Nous avons construit des bibliothèques de nanobodies à partir des lymphocytes obtenus d'un lama préalablement immunisé contre le FVIIa. Nous avons sélectionné ces bibliothèques contre du rFVIIa purifié selon la technique de phage display afin d'obtenir ses nanobodies reconnaissant le FVIIa. Au terme de la procédure, 18 nanobodies uniques ont été obtenus. Cependant, les tests de spécificité que nous avons réalisés ont montré que seul un nanobody parmi ces 18 était capable de reconnaître le FVIIa de manière spécifique. En ce qui concerne les autres nanobodies, bien qu'ils étaient capables de reconnaître le FVIIa, ils étaient aussi capables de

lier avec une affinité similaire le FIXa, le FXa ou encore la thrombine. Puisque les facteurs de coagulation vitamine K-dépendants présentent une homologie de structure, il est possible d'obtenir des nanobodies qui ne sont pas spécifiques d'un seul facteur vitamine K-dépendant si l'épitope reconnu est conservé entre tous les facteurs de cette famille. Afin d'obtenir un plus grand nombre de nanobodies spécifiques du FVIIa, nous aurions pu réaliser une étape de sélection négative avant l'étape de sélection avec le FVIIa, en utilisant par exemple un mélange de FIXa, FXa et thrombine. Ainsi, il aurait été possible d'éliminer une partie des nanobodies non spécifiques, ce qui aurait permis à d'autres nanobodies potentiellement plus spécifiques du FVIIa d'être sélectionnés.

b) Etude de l'effet inhibiteur du nanobody KB-FVIIa-004

Nous nous sommes par la suite intéressés à la caractérisation du nanobody reconnaissant spécifiquement le FVIIa, que nous avons renommé KB-FVIIa-004. Les tests *in vitro* ont permis de montrer la spécificité de liaison du nanobody sur le FVIIa et non du FVII. En effet, dans les différents tests *in vitro* réalisés nous avons montré que la liaison du nanobody à la forme zymogène du FVII mais également aux formes zymogènes et activées de différents facteurs de coagulation vitamine K-dépendants était faible. Il en était de même pour l'effet inhibiteur du nanobody, uniquement présent à l'encontre du FVIIa et non pas d'autres facteurs de coagulation vitamine K-dépendants activés. Cela témoigne que le site de fixation du nanobody sur le FVIIa n'est pas formé d'une séquence qui serait conservée entre les différents facteurs de coagulation vitamine K-dépendants et qu'il est présent sur une région du FVIIa qui n'est pas exposée avant son activation. Au cours de nos analyses, nous avons remarqué de manière inattendue que l'activité inhibitrice du KB-FVIIa-004 dépendait fortement de la présence ou de l'absence de TF. La liaison du TF au FVIIa induit d'importants changements de conformation de l'enzyme tels que son activation allostérique, le repositionnement de son site actif, sa stabilisation dans l'espace etc. Il est très probable que le site de fixation du nanobody sur le FVIIa disparaisse suite à ces changements de conformation.

c) Caractérisation du site de fixation du nanobody sur le FVIIa

Le site exact de fixation sur le FVIIa est un élément qu'il reste à déterminer bien que plusieurs hypothèses s'offrent à nous (Figure 16). Tout d'abord, il est envisageable que le site de fixation puisse se trouver **au sein du site actif du FVIIa**. Il s'agirait dans ce cas d'une inhibition directe de l'activité du FVIIa. Les expériences d'inhibition du FVIIa par le nanobody nous ont permis de déterminer que l'inhibition provoquée par le nanobody était très probablement une inhibition

compétitive, c'est-à-dire une inhibition faisant intervenir directement le site actif de l'enzyme. De plus, les expériences que nous avons réalisées avec l'inhibiteur irréversible de site actif de sérine-protéase PPACK ont montré une diminution de liaison et d'inhibition du nanobody sur le FVIIa lorsque celui-ci est lié au PPACK de manière covalente. Néanmoins, le PPACK est une molécule volumineuse de par son groupement chlorométhylcétone, sa présence dans le site actif d'une sérine-protéase interdit l'accès à celui-ci mais peut aussi perturber l'accès aux régions périphériques très proches. C'est pourquoi il est aussi possible que le site de fixation du nanobody ne soit pas directement dans le site actif du FVIIa mais sur une zone du domaine catalytique très proche du site actif. Au contraire de l'hypothèse précédente, il est aussi envisageable que le site de fixation du nanobody sur le FVIIa soit localisé sur **une région éloignée du site actif**. Il s'agirait dans ce cas d'une inhibition indirecte de l'activité du FVIIa. Un autre type de sites de liaison présent sur le domaine catalytique du FVIIa sont les **exosites**, c'est-à-dire des sites secondaires de liaison aux substrats. En effet, deux inhibiteurs d'exosites nommés E-76 et A-183 ont été caractérisés, tous deux se lient sur des exosites présents sur le domaine catalytique mais différents du site actif. La liaison de l'un de ces inhibiteurs d'exosites au FVIIa entraîne une diminution significative de l'activité amidolytique et protéolytique de l'enzyme (334,335). Cependant, cet effet inhibiteur est observable que le FVIIa soit libre ou complexé au FT, ce qui est très différent des résultats que nous avons obtenus. De plus, l'inhibition provoquée par des inhibiteurs d'exosites n'est pas une inhibition compétitive mais une inhibition non compétitive. Hors du cadre du domaine catalytique, nous pouvons nous pencher sur des sites de fixation présents sur les domaines de la chaîne lourde du FVIIa. La liaison des facteurs de coagulation vitamine K-dépendants à une membrane phospholipidique via leur domaine Gla est importante pour leur activité enzymatique *in vivo*. Nous pouvons envisager que le nanobody reconnaisse **un site de fixation sur le domaine Gla** du FVIIa, par exemple un site de fixation aux ions Ca^{2+} , ce qui entraînerait une perte de liaison du FVIIa aux phospholipides et limiterait ainsi son efficacité enzymatique. En effet, la fixation des ions Ca^{2+} sur les acides aminés animés Gla induit la formation d'une boucle omega qui expose des acides aminés hydrophobes devant par la suite s'insérer dans la membrane phospholipidique. Il a été décrit que le FT permet un repositionnement du site actif du FVIIa après sa liaison à l'enzyme, ce qui permet alors un alignement optimal de la triade d'acides aminés du site actif du FVIIa avec le site de clivage protéolytique des substrats physiologiques. Cependant, cette observation a été aussi retrouvée avec un variant de FVIIa dépourvu de domaine Gla, ce qui démontre que le FT peut exercer cette action de repositionnement du site actif du FVIIa même en absence d'interactions entre l'enzyme et la membrane de phospholipides (232). De plus, dans la situation où le FVIIa n'est pas lié aux phospholipides, bien que l'activité protéolytique du FVIIa soit diminuée, l'activité amidolytique n'est quant à elle pas impactée (233). Cela va à l'encontre de nos résultats où nous montrons un important effet inhibiteur du nanobody sur

l'activité protéolytique mais aussi amidolytique du FVIIa. D'après les résultats que nous avons obtenus, l'hypothèse la plus probable est celle qui concerne **une liaison du nanobody dans le site actif du FVIIa**, ou tout du moins sur une région périphérique **très proche du site actif**. Afin de conclure plus efficacement sur cette question, il sera nécessaire d'entreprendre des études de cristallographie pour identifier le site de fixation exact du nanobody sur le FVIIa.

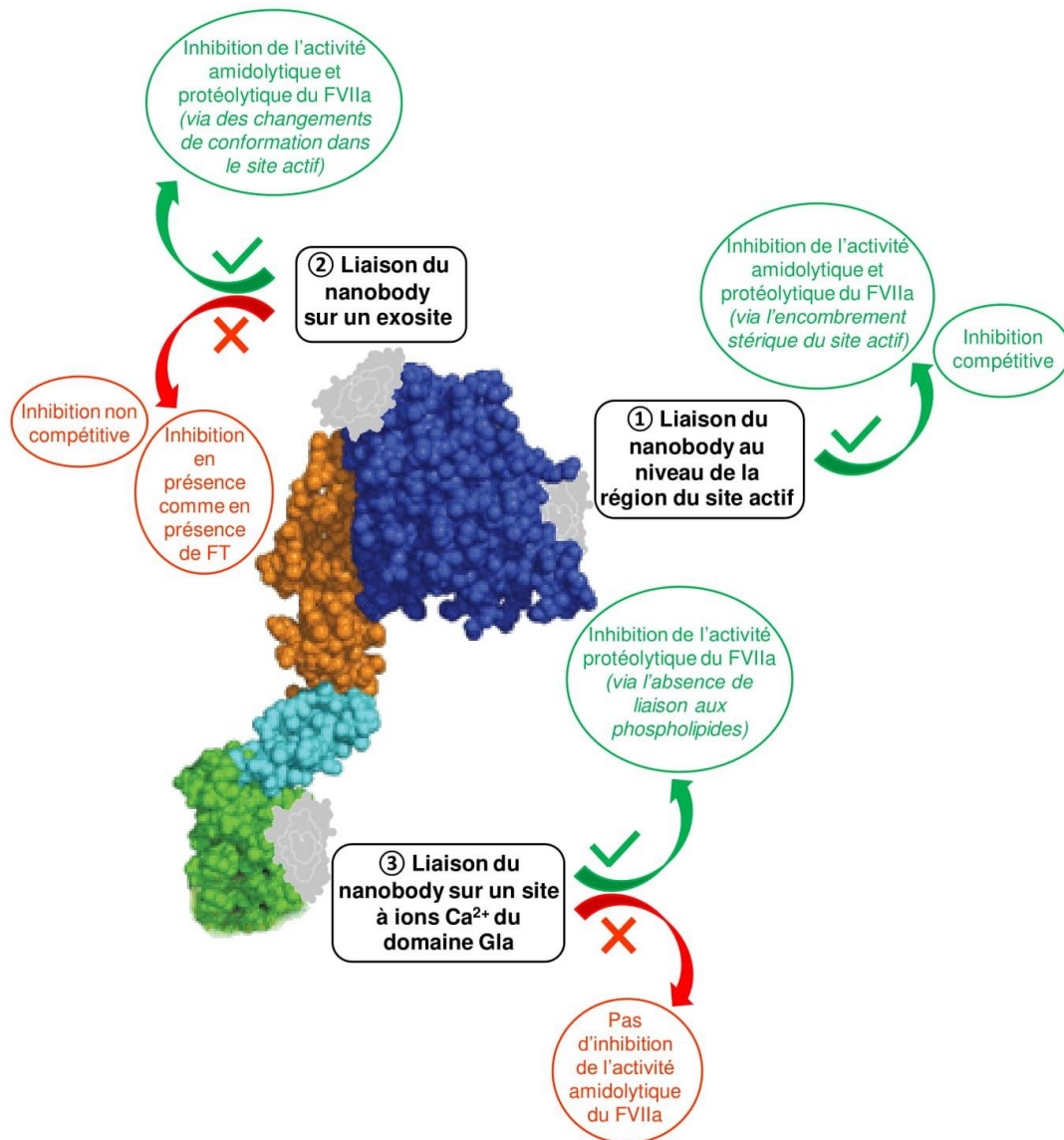


Figure 16 : Structure schématique des potentielles interactions entre le nanobody KB-FVIIa-004 (représenté en gris) et le FVIIa (représenté avec un domaine Gla vert, un domaine EGF1 cyan, un domaine EGF2 orange et un domaine catalytique bleu foncé). Les annotations dans les encadrés de couleur verte correspondent à des arguments étayant l'hypothèse correspondante. Au contraire, les annotations dans les encadrés de couleur rouge correspondent à des arguments réfutant l'hypothèse correspondante.

d) Étude du mécanisme d'action *in vivo* du FVIIa

La caractéristique unique de notre nanobody lui permettant de bloquer l'activité du FVIIa en l'absence mais non en présence de FT pouvait être utile pour mieux comprendre la physiologie de l'activité du FVIIa, non pas seulement dans des tests *in vitro* mais aussi dans des tests *in vivo* et notamment le temps de saignement mesurer à la queue ou « tail-clip ». Plus précisément, nous avons décidé d'explicitier à l'aide de ce nanobody l'activité *in vivo* du rFVIIa dans un modèle murin afin de déterminer si son effet thérapeutique dans du plasma déficient en FVIII est principalement FT-dépendant ou -indépendant ? Afin de préparer les expériences *in vivo*, une construction de fusion formée du nanobody et d'albumine humaine nommée 004-HSA a été générée. En effet, les nanobodies ont une durée de vie très courte dans l'organisme, de par leur petite taille ils sont éliminés rapidement par le système rénal. La présence d'albumine permet d'avoir une demi-vie bien prolongée. Trois hypothèses s'offraient à nous concernant ce test de « tail-clip ». Premièrement, si les souris déficientes en FVIII injectées avec du rFVIIa préalablement inhibé par le 004-HSA perdaient autant de sang que des souris déficientes en FVIII injectées avec la même dose de rFVIIa non inhibé, cela voudrait dire que l'inhibition provoquée par le nanobody était levée par la liaison entre le rFVIIa et le FT. Cela indiquerait donc que dans ces conditions expérimentales, l'activité *in vivo* du rFVIIa est de manière prédominante dépendante du FT. Au contraire, si les souris déficientes en FVIII injectées avec du rFVIIa préalablement inhibé par le 004-HSA perdaient autant de sang que des souris déficientes en FVIII ne recevant pas de rFVIIa, cela voudrait dire que l'inhibition provoquée par le nanobody était toujours présente malgré la présence de FT. Cela indiquerait donc que dans ces conditions expérimentales, l'activité *in vivo* du rFVIIa est de manière prédominante indépendante du FT. Enfin, si les résultats étaient compris entre les deux hypothèses précédentes, cela indiquerait que l'activité *in vivo* du rFVIIa est possible en présence comme en absence de FT. Les souris déficientes en FVIII injectées avec du rFVIIa préalablement inhibé par le 004-HSA se sont comportées de manière similaire à la seconde hypothèse, nous avons conclu que dans nos conditions expérimentales l'effet thérapeutique du **rFVIIa était principalement indépendant de la présence du FT**. Dans un tel cas de figure, ce serait l'interaction du rFVIIa avec les phospholipides plaquettaires qui serait importante pour l'activité de l'enzyme. Cette hypothèse a déjà été étudiée par le passé et plus récemment, Enoksson et al. l'ont à nouveau étudiée (336). Normalement, le rFVIIa a une affinité limitée pour les plaquettes activées. Cependant, ils ont montré qu'augmenter l'affinité du rFVIIa pour la surface des plaquettes, par le biais de la conjugaison du rFVIIa avec un fragment d'anticorps (Fab) reconnaissant un récepteur plaquettaire TLT-1 (Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-like Transcript-1) uniquement présent à la surface des plaquettes activées, ils ont réussi à augmenter l'affinité du rFVIIa pour les plaquettes activées. Ils ont ensuite montré que cette

augmentation d'affinité se traduisait par une augmentation de l'activité du rFVIIa de l'ordre de 50 fois, que ce soit dans des tests *in vitro* ou *in vivo*.

e) Limites de notre étude *in vivo*

Cependant, nos observations *in vivo* doivent être interprétées avec soin car notre modèle animal possède une limitation. En effet, la compatibilité du rFVIIa humain avec le FT de différentes espèces a été étudiée et il en ressort que l'interaction entre le rFVIIa et le FT murin est plus que limitée (337). Cette différence de fonctionnalité entre les FT humain et murin a été étudiée. Il a été conclu que la région comprise entre les acides aminés 40 à 105 du FT humain était essentielle pour l'interaction avec le FVIIa humain, et qu'elle ne pouvait pas être remplacée par la séquence murine correspondante. Plus précisément, la large boucle située entre les acides aminés 83 et 94 est très proche de la région interagissant avec le domaine catalytique du FVIIa. Chez la souris, cette boucle est plus longue de six acides aminés, ce qui empêche un contact suffisant avec le domaine protéase du FVIIa humain, cela se traduisant directement par une très faible affinité du FT murin pour le FVIIa humain. Néanmoins, la concentration de rFVIIa utilisée dans nos tests était suffisamment élevée pour espérer obtenir une légère interaction avec le FT murin. Nous avons été par la suite en mesure de montrer une inhibition de 15 à 20% de la liaison entre le FVIIa et le nanobody par le FT murin. Nous avons conclu que malgré le biais de notre modèle animal, les résultats que nous avons obtenus restaient plausibles. Afin de consolider nos résultats, ces expériences *in vivo* devraient être répétées dans un autre type de modèle murin, un modèle de souris des présentant à la fois un déficit en FVIII et une expression de FT humain. Parmi les souches existantes de souris humanisées pour le TF, la meilleure candidate est une souche générée grâce au « knock-in » du gène du FT humain (338). Contrairement aux autres souches existantes, cette souche de souris nommée TFKI a l'avantage de présenter une hémostasie normale, ainsi que des niveaux d'expression du FT humain physiologiquement proches de ceux du FT murin dans des souris sauvages.

f) Utilisation du KB-FVIIa-004 hors du cadre de notre étude

Outre son intérêt en tant qu'outil de recherche sur le FVIIa, notre nanobody pourrait être un outil intéressant permettant d'améliorer le rFVIIa actuellement disponible dans les cas où son activité nécessiterait la présence de FT. Une des principales limitations du rFVIIa est sa faible demi-vie de 2-3 heures, l'interaction avec le nanobody 004-HSA permettrait de lui conférer la demi-vie de l'albumine, soit environ trois semaines. Bien qu'il soit inhibé par la liaison avec le nanobody, la présence de FT dans ces cas particuliers serait à même de lever l'inhibition et

d'obtenir à nouveau un rFVIIa fonctionnel. De plus, nous avons montré dans des données expérimentales non publiées que la liaison du nanobody sur le FVIIa était responsable d'une diminution d'environ 30% de la liaison de l'antithrombine au FVIIa. Le nanobody n'étant pas assez volumineux pour induire un encombrement stérique pour l'antithrombine, il est possible en revanche que le nanobody se lie au niveau d'une région du FVIIa reconnue par l'antithrombine. Cette intéressante propriété pourrait permettre au rFVIIa d'être moins facilement reconnu dans la circulation par ses inhibiteurs naturels. Notre nanobody pourrait aussi être utilisé afin de caractériser des interactions faisant intervenir des protéines d'autres organismes, tels que les virus. En effet, Lin et al. se sont récemment intéressés à l'interaction entre le FVIIa humain et certaines protéines de l'Herpès Simplex Virus-1 (HSV1) dans le cadre de la génération de FXa (339). Ils ont mis en évidence que l'interaction entre le FVIIa et une protéine virale glycoprotéine C (gC) permet l'activation du FX en FXa, selon un mécanisme très similaire à celui obtenu avec un complexe physiologique FVIIa/FT. Cette protéine gC nécessite la présence d'une surface de phospholipides pour exercer cet effet cofacteur à l'encontre du FT mais il est à noter qu'elle est capable d'exercer cet effet même en absence de FT. De plus, dans le cas où le FT serait présent, l'interaction entre le FT et la gC entraînerait une synergie et un effet accru sur l'activation du FX. Il serait intéressant d'étudier si notre nanobody est capable ou non d'inhiber l'activité du FVIIa en présence de la gC. La génération locale de thrombine induite par la gC est responsable d'un certain nombre de complications hémostatiques. Si l'effet inhibiteur du nanobody sur le FVIIa perdure même en présence de gC, il est possible d'envisager l'utilisation du nanobody comme un moyen de réduire les différentes complications hémostatiques. Cependant, cette hypothèse ne serait valable que dans le cas où le FT serait absent et ne formerait pas un complexe avec la gC, notre nanobody ne serait donc pas un moyen d'endiguer les complications hémostatiques mais simplement de réduire leur occurrence.

PROJET 2 : Développement d'un modèle *in vivo* chez la souris pour la caractérisation du mode d'action de l'emicizumab

De nouvelles thérapies dans l'hémophilie A n'utilisant pas le FVIII nommées « nonfactor therapies », ont émergé ces dernières années. Bien qu'elles soient très prometteuses, leur arrivée a aussi apporté de nouvelles problématiques. En effet, l'analyse de ces molécules thérapeutiques est compliquée, il faut tout d'abord contrôler leurs doses ainsi que leurs effets. De plus, il ne s'agit plus ici de simplement déterminer l'activité FVIII de ces molécules thérapeutiques, mais de trouver **une équivalence entre leur efficacité thérapeutique et l'activité FVIII correspondante** à cet effet. Ceci est le cas avec l'anticorps bispécifique, l'emicizumab, où l'approche *in vitro* donne des résultats variables suivant les tests et les réactifs utilisés. Cette approche est tout à fait acceptable pour déterminer si l'emicizumab est présent ou non dans

le plasma, et s'il est encore actif ou non. En revanche, la mesure de son efficacité et l'équivalence en activité FVIII sont compliqués à mesurer et manque de fiabilité. En effet, les tests *in vitro* majoritairement utilisés ont été conçus sur le fait que le FVIII est le facteur limitant du complexe tenase. De plus, ces différents tests mais les différents réactifs utilisés génèrent des quantités de FIXa variables. Le FIXa étant le facteur limitant de la réaction du complexe tenase avec emicizumab, des variations de sa concentration impacte alors directement l'efficacité de l'emicizumab. Cependant, la caractérisation de la fonction de l'emicizumab peut être effectuée *in vivo*. Actuellement, le modèle est limité à l'utilisation du modèle d'hémophilie A acquise réalisée chez les primates non humains. Cette limitation réside dans le fait de la haute spécificité de l'anticorps bispécifique pour les FIX et FX humains et de primates. Cependant, ces modèles sont assez difficiles d'accès. Les modèles murins d'hémophilie A étant plus répandus et facile d'utilisation, nous avons entrepris de développer un modèle d'évaluation de l'action de l'emicizumab dans ces souris afin d'obtenir une mesure plus fiable que par les approches *in vitro* (Figure 17).



Figure 17 : Comparaison des thérapies actuellement disponible pour l'hémophilie A. Les similarités et différences à propos des groupes de patients ciblés, le mode d'administration et le taux thérapeutique au cours du temps sont indiquées pour les thérapies de remplacement à base de FVIII et l'emicizumab.

Comme il a été mentionné précédemment, l'emicizumab est un anticorps très spécifique des FIX et FX humains, en conséquence il ne reconnaît pas les facteurs murins. Afin de caractériser le mode d'action de l'emicizumab dans la souris, il était nécessaire d'apporter un environnement propice à son fonctionnement, c'est-à-dire d'injecter les facteurs humains dans les souris avant la réalisation des tests *in vivo*. Les souris ont reçu une dose de FIX et FX humains de 100 U/kg, permettant d'avoir en circulation la formation d'un complexe ternaire emicizumab/FIX/FX entre 128 pM pour la faible dose d'anticorps et 1270 pM pour la forte dose d'anticorps. Nous avons ensuite caractérisé l'action de l'emicizumab sur le saignement des souris à différentes doses d'anticorps. Nous avons mis en évidence que l'injection d'une dose d'emicizumab de 1,5 mg/kg était suffisante pour diminuer de manière significative la perte de

sang chez les souris hémophiles A. Cependant, nous avons aussi observé que l'augmentation de la dose d'emicizumab injectée jusqu'à une dose de 10 mg/kg n'augmentait pas significativement l'effet thérapeutique observé. Plusieurs hypothèses s'offraient à nous afin d'expliquer l'effet thérapeutique ne soit pas dose-dépendant :

1) Les doses d'emicizumab injectées étaient trop élevées. En effet, l'emicizumab se lie de manière similaire aux FIX et FX humains, qu'ils soient activés ou non. De ce fait, des doses trop élevées d'emicizumab entraîneraient une dilution de l'effet des complexes ternaires emicizumab/FIXa/FX car l'anticorps pourrait aussi réaliser des complexes emicizumab/FIX/FX ou emicizumab/FIXa/FX ou encore emicizumab/FIXa/FXa. Cependant, Kitazawa et al. ont montré que la dose maximale utilisable d'emicizumab avant que cet effet de dilution soit observé était comprise entre 2 et 4 μM (269). Le calcul nous donne des doses maximales utilisables comprises entre 300 et 600 $\mu\text{g/mL}$, plus élevées que les plus fortes doses que nous avons utilisées (10 mg/kg équivaut à 200 $\mu\text{g/mL}$) (Figure 18). Ceci rejette l'hypothèse de l'utilisation de doses trop élevées d'emicizumab.

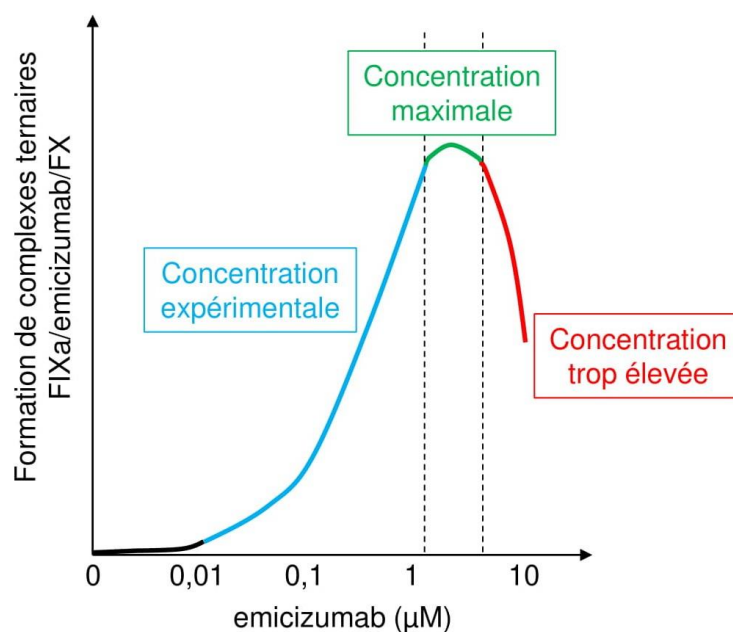


Figure 18 : Représentation graphique de l'effet croissant de la concentration en emicizumab (en μM) sur la formation de complexes ternaires FIXa/emicizumab/FX. La partie de courbe représentée en bleu comprend les concentrations d'emicizumab que nous avons utilisé durant notre étude. Dans cette phase, l'augmentation de la concentration d'emicizumab entraîne une augmentation de la formation de complexes ternaires. La partie de courbe représentée en vert comprend les concentrations maximales d'emicizumab qui peuvent être testées, elles sont comprises entre 2 et 4 μM . Dans cet intervalle de concentrations, l'augmentation de la concentration d'emicizumab n'augmente plus la formation de complexes ternaires et le niveau maximal est atteint. La partie représentée en rouge comprend des concentrations d'emicizumab trop élevées. Ces concentrations entraînent une diminution de la formation de complexes ternaires à cause d'un effet de dilution.

2) Nous pouvons envisager l'hypothèse selon laquelle les facteurs de coagulation humains injectés soient prématurément éliminés. Cependant, nous avons montré que les concentrations résiduelles de FIX et FX que nous avons mesuré dans le plasma des souris injectées pouvaient être diminuées de moitié sans pour autant impacter l'efficacité observée de l'emicizumab. Ceci suggère que les quantités restantes de facteurs de coagulation humains sont suffisantes pour permettre à l'emicizumab d'accomplir son rôle *in vivo*.

3) L'emicizumab dépend de la présence de FIXa et de FX pour exercer sa fonction de cofacteur. Plus particulièrement, le FIXa est le facteur limitant de la réaction et sa disponibilité dans la circulation impacte directement l'efficacité de l'emicizumab. Il est raisonnable d'envisager que la quantité de FIXa disponible dans les expériences n'est pas suffisante pour interagir avec toute la quantité d'emicizumab injectée passée un certain seuil. Nous nous sommes tout d'abord intéressés à savoir si la quantité de FIX que nous utilisons était suffisante ou non. Cette question a été étudiée chez les souris par l'injection d'une dose de FIX deux fois plus élevée, soit 200 U/kg. Cette dose plus élevée de FIX n'induisait aucune augmentation significative de l'activité thérapeutique de l'emicizumab, nous en avons donc conclu que la dose de FIX de 100 U/kg que nous utilisons était suffisante pour la formation de complexe tertiaire. Si le problème ne se situe pas au niveau de l'apport en FIX, il peut alors se situer au niveau de la génération de FIXa à partir du FIX injecté, après que la coupure du « tail-clip » ait été effectuée. Le FIX humain que nous injectons dans les souris dépend des facteurs de coagulation murins pour être activé. Il est probable que l'affinité de liaison du FIX humain pour ses activateurs murins ne soit pas aussi élevée que celle du FIX murin pour ces mêmes protéines. Une affinité de liaison plus faible entraînerait donc une génération de FIXa faible et dont la quantité maximale serait plafonnée. En répercussion, l'efficacité de l'emicizumab serait à son tour limitée, ce qui se traduirait directement par une absence d'effet dose.

Afin de pouvoir répondre à notre problématique concernant l'équivalence FVIII de l'activité de l'emicizumab *in vivo*, l'effet de différentes doses de FVIII a été vérifié dans notre modèle murin, selon les mêmes conditions expérimentales que chez les souris traitées avec l'emicizumab. La comparaison des volumes de sang perdu des souris hémophiles A traitées soit avec de l'emicizumab, soit avec du FVIII, nous a permis d'estimer que l'effet thérapeutique de l'emicizumab dans notre modèle murin était **équivalent à un taux de FVIII circulant de 9% de FVIII**. Cependant, comment se comparent nos résultats à ceux obtenus dans le modèle d'hémophilie A acquise de primate non humain de référence ? Kitazawa et al. ont reporté dans un premier temps avoir comparé l'efficacité d'une dose d'emicizumab de 0,3 mg/kg (6 µg/mL) par rapport à une dose de FVIII porcin équivalente à 1% de FVIII circulant (153). Les deux traitements permirent de réduire très significativement la perte de sang mesurée chez les primates non humains testés. Les auteurs avaient conclu que dans ces conditions

expérimentales l'emicizumab possédait une activité équivalente à 1% de FVIII. Cependant, cette dose utilisée d'emicizumab était plus faible que la dose thérapeutique utilisée par la suite chez les patients (environ 2,75 mg/kg). La question s'est donc posée de savoir si l'emicizumab pouvait avoir un effet plus important à des concentrations plus élevées. La même équipe japonaise a alors testé des doses plus élevées d'emicizumab dans leur modèle de primate non humain, à savoir 1 mg/kg et 3 mg/kg (274). Aux termes de leurs tests, ils ont estimé cette fois que l'emicizumab possédait une activité équivalente à un taux circulant de FVIII d'environ 10%. Ces résultats sont alors tout à fait comparables à ceux que nous avons obtenus dans notre modèle murin (Figure 19).

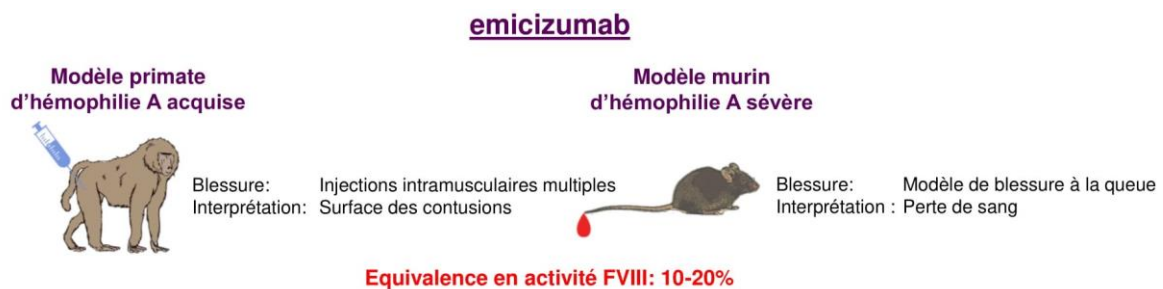


Figure 19 : Evaluation de l'emicizumab in vivo. Un modèle d'hémophilie A acquise chez le primate et un modèle de souris déficiente en FVIII semi-humanisée ont été utilisés pour évaluer l'effet de l'emicizumab. Dans les deux modèles avec des techniques de blessures différentes, l'utilisation d'une gamme de FVIII a permis d'estimer l'équivalence en FVIII entre 10-20%.

Une limitation de notre modèle concerne les facteurs de coagulation. En effet, bien que nous injectons les facteurs de coagulation humains afin de créer un environnement convenable à la fonction de l'emicizumab, le système de coagulation de notre modèle reste avant tout murin, avec les facteurs IX et X murins toujours présents. La génération d'un modèle murin hémophile A humanisé pour les facteurs IX et X permettrait de répondre à cette problématique. Cependant, comme en témoignent les récents essais Li et al. ont montré que cette approche reste compliquée (340). En effet, bien que les souris expriment les facteurs IX et X humains, les taux d'expression sont significativement réduits, ne dépassant pas 20% pour le FIX et 10% pour le FX. Nous pouvons aussi envisager la génération d'un modèle murin qui serait déficient en FVIII, FIX et FX, dans lequel nous pourrions injecter les facteurs de coagulation humains de la même manière que dans notre modèle actuel. Afin de générer un tel modèle, il faudrait croiser des souris hémophiles A avec des souris hémophiles B et des souris déficientes en FX. Les souris « knock-out » pour le FX sont sujettes à une mortalité embryonnaire et périnatale importante donc elles ne peuvent pas être utilisées. Néanmoins, nous avons développé au laboratoire un modèle murin où la déficience en FX peut être induite, un tel modèle pourrait être croisé avec les deux autres lignées de souris hémophiles (341). Enfin, l'évaluation de l'efficacité de l'emicizumab dans notre modèle a été effectuée par le biais d'un

test de temps de saignement « tail-clip ». Ce test consiste en la section des trois millimètres terminaux de la queue des souris et impacte veines et artère caudales à la fois. La taille de la coupure, sa profondeur et sa localisation ont une influence toute particulière sur la génération de FIXa via une libération variable de protéines initiatrices de la coagulation, telles que le FT. Il est donc important d'étudier le mode d'action de l'emicizumab dans notre modèle à l'aide d'autres procédures expérimentales de temps de saignement, comme le « tail vein transection ». En effet dans le cas de cette procédure, la coupure sur la queue de la souris impacte seulement une veine caudale. Il existe aussi une autre procédure similaire appelée « tail artery transection », dans laquelle la coupure sur la queue de la souris impacte seulement l'artère caudale. Puisque la coupure est plus localisée que celle effectuée durant un test de « tail-clip », la quantité de FIXa devrait être différente, ce qui devrait impacter l'efficacité de l'emicizumab dans ces tests-ci. Des résultats d'expériences préliminaires de « tail vein transection » effectuées au laboratoire semblent indiquer que pour une même dose, l'effet thérapeutique de l'emicizumab est plus important dans un test de « tail vein transection » que dans un test de « tail-clip ».

BIBLIOGRAPHIE

1. Berntorp E, Shapiro AD. Modern haemophilia care. *The Lancet*. avr 2012;379(9824):1447-56.
2. White et al. - 2001 - Definitions in Hemophilia Recommendation of the S.pdf.
3. Antonarakis SE. Molecular Genetics of Coagulation Factor VIII Gene and Hemophilia A. *Thromb Haemost*. 1995;74(7):322-8.
4. Byams VR, Kouides PA, Kulkarni R, Baker JR, Brown DL, Gill JC, et al. Surveillance of female patients with inherited bleeding disorders in United States Haemophilia Treatment Centres. *Haemophilia*. 2011;17(s1):6-13.
5. Michele DMD, Gibb C, Lefkowitz JM, Ni Q, Gerber LM, Ganguly A. Severe and moderate haemophilia A and B in US females. *Haemophilia*. 2014;20(2):e136-43.
6. Plug I, Mauser-Bunschoten EP, Bröcker-Vriends AHJT, van Amstel HKP, van der Bom JG, van Diemen-Homan JEM, et al. Bleeding in carriers of hemophilia. *Blood*. 1 juill 2006;108(1):52-6.
7. Rallapalli PM, Orengo CA, Studer RA, Perkins SJ. Positive Selection during the Evolution of the Blood Coagulation Factors in the Context of Their Disease-Causing Mutations. *Mol Biol Evol*. 1 nov 2014;31(11):3040-56.
8. Repessé Y, Slaoui M, Ferrandiz D, Gautier P, Costa C, Costa JM, et al. Factor VIII (FVIII) gene mutations in 120 patients with hemophilia A: detection of 26 novel mutations and correlation with FVIII inhibitor development. *J Thromb Haemost*. 2007;5(7):1469-76.
9. Wei W, Zhu X, Yang R, Zhang B. Characterization of Missense Mutations in Factor VIII That Lead to Abnormal N-Linked Glycosylation. *Blood*. 2 déc 2016;128(22):3764-3764.
10. Kodolitsch YV, Berger J, Rogan PK. Predicting severity of haemophilia A and B splicing mutations by information analysis. *Haemophilia*. 2006;12(3):258-62.
11. Lakich D, Kazazian HH, Antonarakis SE, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nat Genet*. nov 1993;5(3):236-41.
12. Naylor J, Brinke A, Hassock S, Green PM, Giannelli F. Characteristic mRNA abnormality found in half the patients with severe haemophilia A is due to large DNA inversions. *Hum Mol Genet*. 1 nov 1993;2(11):1773-8.
13. Pandey GS, Yanover C, Miller-Jenkins LM, Garfield S, Cole SA, Curran JE, et al. Synthesis of FVIII in Hemophilia-A patients with the intron-22-inversion may modulate immunogenicity. *Nat Med*. oct 2013;19(10):1318-24.
14. Amano K, Sarkar R, Pemberton S, Kemball-Cook G, Kazazian HH, Kaufman RJ. The molecular basis for cross-reacting material-positive hemophilia A due to missense mutations within the A2-domain of factor VIII. *Blood*. 15 janv 1998;91(2):538-48.
15. Cunningham MA, Pipe SW, Zhang B, Hauri H-P, Ginsburg D, Kaufman RJ. LMAN1 is a molecular chaperone for the secretion of coagulation factor VIII1. *J Thromb Haemost*. 2003;1(11):2360-7.
16. Zhang B, McGee B, Yamaoka JS, Guglielmone H, Downes KA, Minoldo S, et al. Combined deficiency of factor V and factor VIII is due to mutations in either LMAN1 or MCFD2. *Blood*. 1

marc 2006;107(5):1903-7.

17. Lapeere FPJG, Miossec P, Valentino LA. Physiopathology of haemophilic arthropathy. *Haemophilia*. 2008;14(s4):3-9.
18. Vehar GA, Keyt B, Eaton D, Rodriguez H, O'Brien DP, Rotblat F, et al. Structure of human factor VIII. *Nature*. nov 1984;312(5992):337-42.
19. Wood WI, Capon DJ, Simonsen CC, Eaton DL, Gitschier J, Keyt B, et al. Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones. *Nature*. nov 1984;312(5992):330-7.
20. Newell JL, Fay PJ. Acidic Residues C-Terminal to the A2 Domain Facilitate Thrombin-Catalyzed Activation of Factor VIII. *Biochemistry*. 1 août 2008;47(33):8786-95.
21. Pittman DD, Wang JH, Kaufman RJ. Identification and functional importance of tyrosine sulfate residues within recombinant factor VIII [Internet]. American Chemical Society; 2002 [cité 2 août 2020]. Disponible sur: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bi00128a003>
22. Michnick DA, Pittman DD, Wise RJ, Kaufman RJ. Identification of individual tyrosine sulfation sites within factor VIII required for optimal activity and efficient thrombin cleavage. *J Biol Chem*. 8 mai 1994;269(31):20095-102.
23. Church WR, Jernigan RL, Toole J, Hewick RM, Knopf J, Knutson GJ, et al. Coagulation factors V and VIII and ceruloplasmin constitute a family of structurally related proteins. *Proc Natl Acad Sci*. 1 nov 1984;81(22):6934-7.
24. Bihoreau N, Pin S, Kersabiec A-M de, Vidot F, Fontaine-Aupart M-P. Copper-atom identification in the active and inactive forms of plasma-derived FVIII and recombinant FVIII-ΔII. *Eur J Biochem*. 1994;222(1):41-8.
25. Toole JJ, Pittman DD, Orr EC, Murtha P, Wasley LC, Kaufman RJ. A large region (approximately equal to 95 kDa) of human factor VIII is dispensable for in vitro procoagulant activity. *Proc Natl Acad Sci*. 1 août 1986;83(16):5939-42.
26. Pipe SW, Morris JA, Shah J, Kaufman RJ. Differential Interaction of Coagulation Factor VIII and Factor V with Protein Chaperones Calnexin and Calreticulin. *J Biol Chem*. 4 mars 1998;273(14):8537-44.
27. Poole S, Firtel RA, Lamar E, Rowekamp W. Sequence and expression of the discoidin I gene family in *Dictyostelium discoideum*. *J Mol Biol*. 5 déc 1981;153(2):273-89.
28. Fay PJ, Walker FJ. Inactivation of human factor VIII by activated protein C: evidence that the factor VIII light chain contains the activated protein C binding site. *Biochim Biophys Acta BBA - Protein Struct Mol Enzymol*. 2 févr 1989;994(2):142-8.
29. Figueiredo MS, Brownlee GG. cis-Acting Elements and Transcription Factors Involved in the Promoter Activity of the Human Factor VIII Gene. *J Biol Chem*. 19 mai 1995;270(20):11828-38.
30. Zelechowska MG, van Mourik JA, Brodniewicz-Proba T. Ultrastructural localization of factor VIII procoagulant antigen in human liver hepatocytes. *Nature*. oct 1985;317(6039):729-30.
31. Wion KL, Kelly D, Summerfield JA, Tuddenham EGD, Lawn RM. Distribution of factor VIII mRNA and antigen in human liver and other tissues. *Nature*. oct 1985;317(6039):726-9.
32. Bontempo FA, Lewis JH, Gorenc TJ, Spero JA, Ragni MV, Scott JP, et al. Liver Transplantation

in Hemophilia A. *Blood*. juin 1987;69(6):1721-4.

33. Hollestelle MJ, Thinnis T, Crain K, Stiko A, Kruijt JK, van Berkel TJ, et al. Tissue distribution of factor VIII gene expression in vivo--a closer look. *Thromb Haemost*. sept 2001;86(3):855-61.
34. Hollestelle MJ, Poyck PPC, Hollestelle JM, Marsman HA, Mourik J a. V, Gulik TMV. Extra-hepatic factor VIII expression in porcine fulminant hepatic failure. *J Thromb Haemost*. 2005;3(10):2274-80.
35. Jacquemin M, Neyrinck A, Hermanns MI, Lavend'homme R, Rega F, Saint-Remy J-M, et al. FVIII production by human lung microvascular endothelial cells. *Blood*. 15 juill 2006;108(2):515-7.
36. Becker S, Simpson JC, Pepperkok R, Heinz S, Herder C, Grez M, et al. Confocal microscopy analysis of native, full length and B-domain deleted coagulation factor VIII trafficking in mammalian cells. *Thromb Haemost*. juill 2004;92(1):23-35.
37. Do H, Healey JF, Waller EK, Lollar P. Expression of Factor VIII by Murine Liver Sinusoidal Endothelial Cells. *J Biol Chem*. 7 sept 1999;274(28):19587-92.
38. Shahani T, Covens K, Lavend'homme R, Jazouli N, Sokal E, Peerlinck K, et al. Human liver sinusoidal endothelial cells but not hepatocytes contain factor VIII. *J Thromb Haemost*. 2014;12(1):36-42.
39. Fahs SA, Hille MT, Shi Q, Weiler H, Montgomery RR. A conditional knockout mouse model reveals endothelial cells as the principal and possibly exclusive source of plasma factor VIII. *Blood*. 12 juin 2014;123(24):3706-13.
40. Everett L, Khoriaty R, Ginsburg D. Analysis of Additional Targeted Lman1 Alleles in the Mouse Suggests a Dose Dependence for FV/FVIII Secretion and Novel Role for an LMAN1-Dependent Cargo in Thrombopoiesis. *Blood*. 6 déc 2014;124(21):103-103.
41. Kaufman RJ, Wasley LC, Dorner AJ. Synthesis, processing, and secretion of recombinant human factor VIII expressed in mammalian cells. *J Biol Chem*. 5 mai 1988;263(13):6352-62.
42. Lenting PJ, van Mourik JA, Mertens K. The Life Cycle of Coagulation Factor VIII in View of Its Structure and Function. *Blood*. 1 déc 1998;92(11):3983-96.
43. Medzihradzky KF, Besman MJ, Burlingame AL. Structural Characterization of Site-Specific N-Glycosylation of Recombinant Human Factor VIII by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal Chem*. 1 oct 1997;69(19):3986-94.
44. Hutton JC. Subtilisin-like proteinases involved in the activation of proproteins of the eukaryotic secretory pathway. *Curr Opin Cell Biol*. 1 déc 1990;2(6):1131-42.
45. Fay PJ, Smudzin TM. Characterization of the interaction between the A2 subunit and A1/A3-C1-C2 dimer in human factor VIIIa. *J Biol Chem*. 7 mai 1992;267(19):13246-50.
46. Tagliavacca L, Moon N, Dunham WR, Kaufman RJ. Identification and Functional Requirement of Cu(I) and Its Ligands within Coagulation Factor VIII. *J Biol Chem*. 24 oct 1997;272(43):27428-34.
47. 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*. 8 avr

2008;16(4):597-606.

48. Follenzi A, Benten D, Novikoff P, Faulkner L, Raut S, Gupta S. Transplanted endothelial cells repopulate the liver endothelium and correct the phenotype of hemophilia A mice. *J Clin Invest.* mars 2008;118(3):935-45.
49. Turner NA, Moake JL. Factor VIII Is Synthesized in Human Endothelial Cells, Packaged in Weibel-Palade Bodies and Secreted Bound to ULVWF Strings. *PLOS ONE.* 16 oct 2015;10(10):e0140740.
50. Pan J, Dinh TT, Rajaraman A, Lee M, Scholz A, Czupalla CJ, et al. Patterns of expression of factor VIII and von Willebrand factor by endothelial cell subsets in vivo. *Blood.* 7 juill 2016;128(1):104-9.
51. Vlot AJ, Koppelman SJ, Bouma BN, Sixma JJ. Factor VIII and von Willebrand Factor. *Thromb Haemost.* 1998;79(3):456-65.
52. Nishino M, Girma JP, Rothschild C, Fressinaud E, Meyer D. New variant of von Willebrand disease with defective binding to factor VIII. *Blood.* oct 1989;74(5):1591-9.
53. Mazurier C, Dieval J, Jorieux S, Delobel J, Goudemand M. A new von Willebrand factor (vWF) defect in a patient with factor VIII (FVIII) deficiency but with normal levels and multimeric patterns of both plasma and platelet vWF. Characterization of abnormal vWF/FVIII interaction. *Blood.* 1 janv 1990;75(1):20-6.
54. Koedam JA, Meijers JC, Sixma JJ, Bouma BN. Inactivation of human factor VIII by activated protein C. Cofactor activity of protein S and protective effect of von Willebrand factor. *J Clin Invest.* 1 oct 1988;82(4):1236-43.
55. Koedam JA, Hamer RJ, Beeser-Visser NH, Bouma BN, Sixma JJ. The effect of von Willebrand factor on activation of factor VIII by factor Xa. *Eur J Biochem.* 1990;189(2):229-34.
56. Lenting PJ, Donath MJ, van Mourik JA, Mertens K. Identification of a binding site for blood coagulation factor IXa on the light chain of human factor VIII. *J Biol Chem.* 11 mars 1994;269(10):7150-5.
57. Saenko EL, Scandella D. A Mechanism for Inhibition of Factor VIII Binding to Phospholipid by von Willebrand Factor. *J Biol Chem.* 6 sept 1995;270(23):13826-33.
58. Nesheim M, Pittman DD, Giles AR, Fass DN, Wang JH, Slonosky D, et al. The effect of plasma von Willebrand factor on the binding of human factor VIII to thrombin-activated human platelets. *J Biol Chem.* 25 sept 1991;266(27):17815-20.
59. Lenting PJ, Neels JG, Berg BMM van den, Clijsters PPFM, Meijerman DWE, Pannekoek H, et al. The Light Chain of Factor VIII Comprises a Binding Site for Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein. *J Biol Chem.* 20 août 1999;274(34):23734-9.
60. Dasgupta S, Repessé Y, Bayry J, Navarrete A-M, Wootla B, Delignat S, et al. VWF protects FVIII from endocytosis by dendritic cells and subsequent presentation to immune effectors. *Blood.* 15 janv 2007;109(2):610-2.
61. Leyte A, Schijndel HB van, Niehrs C, Huttner WB, Verbeet MP, Mertens K, et al. Sulfation of Tyr1680 of human blood coagulation factor VIII is essential for the interaction of factor VIII with von Willebrand factor. *J Biol Chem.* 15 janv 1991;266(2):740-6.

62. Saenko EL, Shima M, Rajalakshmi KJ, Scandella D. A role for the C2 domain of factor VIII in binding to von Willebrand factor. *J Biol Chem*. 15 avr 1994;269(15):11601-5.
63. Saenko EL, Scandella D. The Acidic Region of the Factor VIII Light Chain and the C2 Domain Together Form the High Affinity Binding Site for von Willebrand Factor. *J Biol Chem*. 18 juill 1997;272(29):18007-14.
64. Chiu P-L, Bou-Assaf GM, Chhabra ES, Chambers MG, Peters RT, Kulman JD, et al. Mapping the interaction between factor VIII and von Willebrand factor by electron microscopy and mass spectrometry. *Blood*. 20 août 2015;126(8):935-8.
65. Yee A, Oleskie AN, Dosey AM, Kretz CA, Gildersleeve RD, Dutta S, et al. Visualization of an N-terminal fragment of von Willebrand factor in complex with factor VIII. *Blood*. 20 août 2015;126(8):939-42.
66. Ganz PR, Atkins JS, Palmer DS, Dudani AK, Hashemi S, Luison F. Definition of the affinity of binding between human von willebrand factor and coagulation factor VIII. *Biochem Biophys Res Commun*. 15 oct 1991;180(1):231-7.
67. Vlot AJ, Koppelman SJ, Meijers JC, Dama C, van den Berg HM, Bouma BN, et al. Kinetics of factor VIII-von Willebrand factor association. *Blood*. 1 mars 1996;87(5):1809-16.
68. Weiss HJ, Sussman II, Hoyer LW. Stabilization of Factor VIII in Plasma by the von Willebrand Factor: *STUDIES ON POSTTRANSFUSION AND DISSOCIATED FACTOR VIII AND IN PATIENTS WITH VON WILLEBRAND'S DISEASE*. *J Clin Invest*. 1 août 1977;60(2):390-404.
69. Schambeck CM, Grossmann R, Zonnur S, Berger M, Teuchert K, Spahn A, et al. High factor VIII (FVIII) levels in venous thromboembolism: role of unbound FVIII. *Thromb Haemost*. 2004;92(7):42-6.
70. Noe DA. A Mathematical Model of Coagulation Factor VIII Kinetics. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 1996;26(6):289-303.
71. Saenko EL, Yakhyaev AV, Mikhailenko I, Strickland DK, Sarafanov AG. Role of the Low Density Lipoprotein-related Protein Receptor in Mediation of Factor VIII Catabolism. *J Biol Chem*. 31 déc 1999;274(53):37685-92.
72. Bovenschen N, Herz J, Grimbergen JM, Lenting PJ, Havekes LM, Mertens K, et al. Elevated plasma factor VIII in a mouse model of low-density lipoprotein receptor-related protein deficiency. *Blood*. 15 mai 2003;101(10):3933-9.
73. Cunningham N, Laffan MA, Manning RA, O'Donnell JS. Low-density lipoprotein receptor-related protein polymorphisms in patients with elevated factor VIII coagulant activity and venous thrombosis. *Blood Coagul Fibrinolysis Int J Haemost Thromb*. oct 2005;16(7):465-8.
74. Bovenschen N, Boertjes RC, Stempvoort G van, Voorberg J, Lenting PJ, Meijer AB, et al. Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein and Factor IXa Share Structural Requirements for Binding to the A3 Domain of Coagulation Factor VIII. *J Biol Chem*. 14 mars 2003;278(11):9370-7.
75. Sarafanov AG, Makogonenko EM, Pechik IV, Radtke K-P, Khrenov AV, Ananyeva NM, et al. Identification of Coagulation Factor VIII A2 Domain Residues Forming the Binding Epitope for Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein. *Biochemistry*. 1 févr 2006;45(6):1829-40.
76. Bovenschen N, Stempvoort GV, Voorberg J, Mertens K, Meijer AB. Proteolytic cleavage of

- factor VIII heavy chain is required to expose the binding-site for low-density lipoprotein receptor-related protein within the A2 domain. *J Thromb Haemost.* 2006;4(7):1487-93.
77. Spijkers PP, Denis CV, Blom AM, Lenting PJ. Cellular uptake of C4b-binding protein is mediated by heparan sulfate proteoglycans and CD91/LDL receptor-related protein. *Eur J Immunol.* 2008;38(3):809-17.
 78. Sarafanov AG, Ananyeva NM, Shima M, Saenko EL. Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans Participate in Factor VIII Catabolism Mediated by Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein. *J Biol Chem.* 13 avr 2001;276(15):11970-9.
 79. Swystun LL, Ogiwara K, Rawley O, Brown C, Georgescu I, Hopman W, et al. Genetic determinants of VWF clearance and FVIII binding modify FVIII pharmacokinetics in pediatric hemophilia A patients. *Blood.* 12 sept 2019;134(11):880-91.
 80. Pegon JN, Kurdi M, Casari C, Odouard S, Denis CV, Christophe OD, et al. Factor VIII and von Willebrand factor are ligands for the carbohydrate-receptor Siglec-5. *Haematologica.* 1 déc 2012;97(12):1855-63.
 81. Pipe SW, Montgomery RR, Pratt KP, Lenting PJ, Lillicrap D. Life in the shadow of a dominant partner: the FVIII-VWF association and its clinical implications for hemophilia A. *Blood.* 20 oct 2016;128(16):2007-16.
 82. Saenko EL, Scandella D, Yakhyaev AV, Greco NJ. Activation of Factor VIII by Thrombin Increases Its Affinity for Binding to Synthetic Phospholipid Membranes and Activated Platelets. *J Biol Chem.* 23 oct 1998;273(43):27918-26.
 83. 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.* 15 mai 1990;75(10):1999-2004.
 84. Meems H, Meijer AB, Cullinan DB, Mertens K, Gilbert GE. Factor VIII C1 domain residues Lys 2092 and Phe 2093 contribute to membrane binding and cofactor activity. *Blood.* 29 oct 2009;114(18):3938-46.
 85. Wakabayashi H, Fay PJ. Identification of Residues Contributing to A2 Domain-dependent Structural Stability in Factor VIII and Factor VIIIa. *J Biol Chem.* 25 avr 2008;283(17):11645-51.
 86. Wakabayashi H, Varfaj F, DeAngelis J, Fay PJ. Generation of enhanced stability factor VIII variants by replacement of charged residues at the A2 domain interface. *Blood.* 1 oct 2008;112(7):2761-9.
 87. Fay PJ, Smudzin TM, Walker FJ. Activated protein C-catalyzed inactivation of human factor VIII and factor VIIIa. Identification of cleavage sites and correlation of proteolysis with cofactor activity. *J Biol Chem.* 25 oct 1991;266(30):20139-45.
 88. Nogami K, Wakabayashi H, Fay PJ. Mechanisms of Factor Xa-catalyzed Cleavage of the Factor VIIIa A1 Subunit Resulting in Cofactor Inactivation. *J Biol Chem.* 5 sept 2003;278(19):16502-9.
 89. Furie B, Furie BC. Molecular and cellular biology of blood coagulation. *N Engl J Med.* 19 mars 1992;326(12):800-6.
 90. Dahlbäck B. Blood coagulation. *The Lancet.* 6 mai 2000;355(9215):1627-32.

91. Versteeg HH, Heemskerk JWM, Levi M, Reitsma PH. New Fundamentals in Hemostasis. *Physiol Rev.* 1 janv 2013;93(1):327-58.
92. Lawson JH, Kalafatis M, Stram S, Mann KG. A model for the tissue factor pathway to thrombin. I. An empirical study. *J Biol Chem.* 16 sept 1994;269(37):23357-66.
93. Choi SH, Smith SA, Morrissey JH. Polyphosphate is a cofactor for the activation of factor XI by thrombin. *Blood.* 22 déc 2011;118(26):6963-70.
94. Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry.* 29 oct 1991;30(43):10363-70.
95. Paroskie A, Gailani D, DeBaun MR, Sidonio RF. A cross-sectional study of bleeding phenotype in haemophilia A carriers. *Br J Haematol.* 2015;170(2):223-8.
96. Carcao MD, Aledort L. Prophylactic factor replacement in hemophilia. *Blood Rev.* 1 juin 2004;18(2):101-13.
97. Fischer K, van der Bom JG, Mauser-Bunschoten EP, Roosendaal G, Prejs R, Grobbee DE, et al. Changes in treatment strategies for severe haemophilia over the last 3 decades: effects on clotting factor consumption and arthropathy. *Haemoph Off J World Fed Hemoph.* sept 2001;7(5):446-52.
98. Berntorp E, Michiels JJ. A Healthy Hemophilic Patient without Arthropathy: From Concept to Clinical Reality. *Semin Thromb Hemost.* 2003;29(1):5-10.
99. Carcao M, Lambert T, Leissing C, Escuriola-Ettingshausen C, Santagostino E, Aledort L. Prophylaxis re-visited: The potential impact of novel factor and non-factor therapies on prophylaxis. *Haemophilia.* 2018;24(6):845-8.
100. Muczynski V, Christophe OD, Denis CV, Lenting PJ. Emerging Therapeutic Strategies in the Treatment of Hemophilia A. *Semin Thromb Hemost.* sept 2017;43(6):581-90.
101. Ironside JW. Variant Creutzfeldt–Jakob disease. *Haemophilia.* 2010;16(s5):175-80.
102. Viel KR, Ameri A, Abshire TC, Iyer RV, Watts RG, Lutcher C, et al. Inhibitors of Factor VIII in Black Patients with Hemophilia. *N Engl J Med.* 16 avr 2009;360(16):1618-27.
103. 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(1):11-20.
104. Turecek PL, Bossard MJ, Graninger M, Gritsch H, Höllriegl W, Kaliwoda M, et al. BAX 855, a PEGylated rFVIII product with prolonged half-life. Development, functional and structural characterisation. *Hamostaseologie.* 2012;32 Suppl 1:S29-38.
105. Mahlangu J, Powell JS, Ragni MV, Chowdary P, Josephson NC, Pabinger I, et al. Phase 3 study of recombinant factor VIII Fc fusion protein in severe hemophilia A. *Blood.* 16 janv 2014;123(3):317-25.
106. Muczynski V, Casari C, Moreau F, Aymé G, Kawecki C, Legendre P, et al. A factor VIII–nanobody fusion protein forming an ultrastable complex with VWF: effect on clearance and antibody formation. *Blood.* 13 sept 2018;132(11):1193-7.

107. Seth Chhabra E, Liu T, Kulman J, Patarroyo-White S, Yang B, Lu Q, et al. BIVV001, a new class of factor VIII replacement for hemophilia A that is independent of von Willebrand factor in primates and mice. *Blood*. 23 avr 2020;135(17):1484-96.
108. Ehrenforth S, Kreuz W, Linde R, Funk M, Güngör T, Krackhardt B, et al. Incidence of development of factor VIII and factor IX inhibitors in haemophiliacs. *The Lancet*. 7 mars 1992;339(8793):594-8.
109. Biasi R de, Rocino A, Papa ML, Salerno E, Mastrullo L, Blasi DD. Incidence of Factor VIII Inhibitor Development in Hemophilia A Patients Treated with Less Pure Plasma Derived Concentrates. *Thromb Haemost*. 1994;71(5):544-7.
110. Gouw SC, Berg HMVD, Cessie SL, Bom JGVD. Treatment characteristics and the risk of inhibitor development: a multicenter cohort study among previously untreated patients with severe hemophilia A. *J Thromb Haemost*. 2007;5(7):1383-90.
111. Gouw SC, van den Berg HM, Fischer K, Auerswald G, Carcao M, Chalmers E, et al. Intensity of factor VIII treatment and inhibitor development in children with severe hemophilia A: the RODIN study. *Blood*. 16 mai 2013;121(20):4046-55.
112. Oldenburg J, Pavlova A. Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX. *Haemophilia*. 2006;12(s6):15-22.
113. Eckhardt CL, van Velzen AS, Peters M, Astermark J, Brons PP, Castaman G, et al. Factor VIII gene (F8) mutation and risk of inhibitor development in nonsevere hemophilia A. *Blood*. 12 sept 2013;122(11):1954-62.
114. Sjamsoedin LJ, Heijnen L, Mauser-Bunschoten EP, van Geijlswijk JL, van Houwelingen H, van Asten P, et al. The effect of activated prothrombin-complex concentrate (FEIBA) on joint and muscle bleeding in patients with hemophilia A and antibodies to factor VIII. A double-blind clinical trial. *N Engl J Med*. 24 sept 1981;305(13):717-21.
115. Rangarajan S, Austin S, Goddard NJ, Négrier C, Rodriguez-Merchan EC, Stephensen D, et al. Consensus recommendations for the use of FEIBA® in haemophilia A patients with inhibitors undergoing elective orthopaedic and non-orthopaedic surgery. *Haemophilia*. 2013;19(2):294-303.
116. Hedner U. Dosing and Monitoring NovoSeven® Treatment. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 1996;26(Suppl. 1):102-8.
117. Astermark J, Donfield SM, DiMichele DM, Gringeri A, Gilbert SA, Waters J, et al. A randomized comparison of bypassing agents in hemophilia complicated by an inhibitor: the FEIBA NovoSeven Comparative (FENOC) Study. *Blood*. 15 janv 2007;109(2):546-51.
118. Peyvandi F, Garagiola I, Young G. The past and future of haemophilia: diagnosis, treatments, and its complications. *The Lancet*. 9 juill 2016;388(10040):187-97.
119. Antun A, Monahan PE, Manco-Johnson MJ, Callaghan MU, Kanin M, Knoll C, et al. Inhibitor recurrence after immune tolerance induction: a multicenter retrospective cohort study. *J Thromb Haemost*. 2015;13(11):1980-8.
120. Leissinger C, Josephson CD, Granger S, Konkle BA, Kruse-Jarres R, Ragni MV, et al. Rituximab for Treatment of Inhibitors in Haemophilia A: A Phase II Study. *Thromb Haemost*. 2 sept 2014;112(3):445-58.

121. Santagostino E. More than a decade of international experience with a pdFVIII/VWF concentrate in immune tolerance. *Haemophilia*. 2013;19(s1):8-11.
122. Oldenburg J, Mahlangu JN, Kim B, Schmitt C, Callaghan MU, Young G, et al. Emicizumab Prophylaxis in Hemophilia A with Inhibitors. *N Engl J Med*. 31 août 2017;377(9):809-18.
123. Darby SC, Keeling DM, Spooner RJD, Kan SW, Giangrande PLF, Collins PW, et al. The incidence of factor VIII and factor IX inhibitors in the hemophilia population of the UK and their effect on subsequent mortality, 1977–99. *J Thromb Haemost*. 2004;2(7):1047-54.
124. Gringeri A, Mantovani LG, Scalone L, Mannucci PM, COCIS Study Group. Cost of care and quality of life for patients with hemophilia complicated by inhibitors: the COCIS Study Group. *Blood*. 1 oct 2003;102(7):2358-63.
125. Field RA, Rickard CG, Hutt FB. Hemophilia in a family of dogs. *Cornell Vet*. oct 1946;36(4):285-300.
126. Graham JB, Buckwalter JA. Canine hemophilia; observations on the course, the clotting anomaly, and the effect of blood transfusions. *J Exp Med*. 1 août 1949;90(2):97-111.
127. Brinkhous KM, Graham JB. Hemophilia in the female dog. *Science*. 30 juin 1950;111(2896):723-4.
128. Giles AR, Tinlin S, Hoogendoorn H, Greenwood P, Greenwood R. Development of factor VIII:C antibodies in dogs with hemophilia A (factor VIII:C deficiency). *Blood*. févr 1984;63(2):451-6.
129. Brinkhous KM, Hedner U, Garris JB, Diness V, Read MS. Effect of recombinant factor VIIIa on the hemostatic defect in dogs with hemophilia A, hemophilia B, and von Willebrand disease. *Proc Natl Acad Sci*. 1 févr 1989;86(4):1382-6.
130. Giles AR, Tinlin S, Greenwood R. A canine model of hemophilic (factor VIII:C deficiency) bleeding. *Blood*. sept 1982;60(3):727-30.
131. Hutchins DR, Lephherd EE, Crook IG. A Case of Equine Haemophilia. *Aust Vet J*. 1967;43(3):83-7.
132. Neuenschwander S, Kissling-Albrecht L, Heiniger J, Backfisch W, Stranzinger G, Pliska V. Inherited defect of blood clotting factor VIII (haemophilia A) in sheep. *Thromb Haemost*. 10 nov 1992;68(5):618-20.
133. Backfisch W, Neuenschwander S, Giger U, Stranzinger G, Pliška V. Carrier Detection of Ovine Hemophilia A Using an RFLP Marker, and Mapping of the Factor VIII Gene on the Ovine X-Chromosome. *J Hered*. 1 nov 1994;85(6):474-8.
134. Tellez J, Van Vliet K, Tseng Y-S, Finn JD, Tschernia N, Almeida-Porada G, et al. Characterization of naturally-occurring humoral immunity to AAV in sheep. *PLoS One*. 2013;8(9):e75142.
135. Porada CD, Sanada C, Kuo C-J, Colletti E, Mandeville W, Hasenau J, et al. Phenotypic correction of hemophilia A in sheep by postnatal intraperitoneal transplantation of FVIII-expressing MSC. *Exp Hematol*. déc 2011;39(12):1124-1135.e4.
136. Booth CJ, Brooks MB, Rockwell S. Spontaneous coagulopathy in inbred WAG/RijYcb rats. *Comp Med*. févr 2010;60(1):25-30.

137. Booth CJ, Brooks MB, Rockwell S, Murphy JW, Rinder HM, Zelterman D, et al. WAG-F8(m1Ycb) rats harboring a factor VIII gene mutation provide a new animal model for hemophilia A. *J Thromb Haemost* JTH. nov 2010;8(11):2472-7.
138. Bi L, Lawler AM, Antonarakis SE, High KA, Gearhart JD, Kazazian HH. Targeted disruption of the mouse factor VIII gene produces a model of haemophilia A. *Nat Genet.* mai 1995;10(1):119-21.
139. Bi L, Sarkar R, Naas T, Lawler AM, Pain J, Shumaker SL, et al. Further characterization of factor VIII-deficient mice created by gene targeting: RNA and protein studies. *Blood.* 1 nov 1996;88(9):3446-50.
140. Di Minno G, Cerbone AM, Coppola A, Cimino E, Di Capua M, Pamparana F, et al. Longer-acting factor VIII to overcome limitations in haemophilia management: the PEGylated liposomes formulation issue. *Haemoph Off J World Fed Hemoph.* janv 2010;16 Suppl 1:2-6.
141. Siner JI, Iacobelli NP, Sabatino DE, Ivanciu L, Zhou S, Poncz M, et al. Minimal modification in the factor VIII B-domain sequence ameliorates the murine hemophilia A phenotype. *Blood.* 23 mai 2013;121(21):4396-403.
142. Meeks SL, Cox CL, Healey JF, Parker ET, Doshi BS, Gangadharan B, et al. A major determinant of the immunogenicity of factor VIII in a murine model is independent of its procoagulant function. *Blood.* 20 sept 2012;120(12):2512-20.
143. Qian J, Borovok M, Bi L, Jr HHK, Hoyer LW. Inhibitor Antibody Development and T Cell Response to Human Factor VIII in Murine Hemophilia A. *Thromb Haemost.* 1999;81(2):240-4.
144. Reipert BM, Sasgary M, Ahmad RU, Turecek PL, Schwarz HP. Blockade of CD40/CD40 Ligand Interactions Prevents Induction of Factor VIII Inhibitors in Hemophilic Mice but Does not Induce Lasting Immune Tolerance. *Thromb Haemost.* 2001;86(12):1345-52.
145. Chao BN, Baldwin WH, Healey JF, Parker ET, Shafer-Weaver K, Cox C, et al. Characterization of a genetically engineered mouse model of hemophilia A with complete deletion of the F8 gene. *J Thromb Haemost.* 2016;14(2):346-55.
146. Bril WS, MacLean PE, Kaijen PHP, van den Brink EN, Lardy NM, Fijnvandraat K, et al. HLA class II genotype and factor VIII inhibitors in mild haemophilia A patients with an Arg593 to Cys mutation. *Haemoph Off J World Fed Hemoph.* sept 2004;10(5):509-14.
147. Bril WS, van Helden PMW, Hausl C, Zuurveld MG, Ahmad RU, Hollestelle MJ, et al. Tolerance to factor VIII in a transgenic mouse expressing human factor VIII cDNA carrying an Arg(593) to Cys substitution. *Thromb Haemost.* févr 2006;95(2):341-7.
148. Barrow RT, Lollar P. Neutralization of antifactor VIII inhibitors by recombinant porcine factor VIII. *J Thromb Haemost.* 2006;4(10):2223-9.
149. Toschi V. OBI-1, porcine recombinant Factor VIII for the potential treatment of patients with congenital hemophilia A and alloantibodies against human Factor VIII. *Curr Opin Mol Ther.* oct 2010;12(5):617-25.
150. Kashiwakura Y, Mimuro J, Onishi A, Iwamoto M, Madoiwa S, Fuchimoto D, et al. Porcine Model of Hemophilia A. *PLOS ONE.* 28 nov 2012;7(11):e49450.
151. Ohmori T, Mizukami H, Ozawa K, Sakata Y, Nishimura S. New approaches to gene and cell therapy for hemophilia. *J Thromb Haemost.* 2015;13(S1):S133-42.

152. Hilden I, Lauritzen B, Sørensen BB, Clausen JT, Jespersgaard C, Krogh BO, et al. Hemostatic effect of a monoclonal antibody mAb 2021 blocking the interaction between FXa and TFPI in a rabbit hemophilia model. *Blood*. 14 juin 2012;119(24):5871-8.
153. Kitazawa T, Igawa T, Sampei Z, Muto A, Kojima T, Soeda T, et al. A bispecific antibody to factors IXa and X restores factor VIII hemostatic activity in a hemophilia A model. *Nat Med*. oct 2012;18(10):1570-4.
154. O'Hara PJ, Grant FJ, Haldeman BA, Gray CL, Insley MY, Hagen FS, et al. Nucleotide sequence of the gene coding for human factor VII, a vitamin K-dependent protein participating in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci*. 1 août 1987;84(15):5158-62.
155. Berkner K, Busby S, Davie E, Hart C, Insley M, Kisiel W, et al. Isolation and Expression of cDNAs Encoding Human Factor VII. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1 janv 1986;51:531-41.
156. Radcliffe R, Nemerson Y. Activation and control of factor VII by activated factor X and thrombin. Isolation and characterization of a single chain form of factor VII. *J Biol Chem*. 25 janv 1975;250(2):388-95.
157. Broze GJ, Majerus PW. Purification and properties of human coagulation factor VII. *J Biol Chem*. 25 févr 1980;255(4):1242-7.
158. Fair DS. Quantitation of factor VII in the plasma of normal and warfarin-treated individuals by radioimmunoassay. *Blood*. oct 1983;62(4):784-91.
159. Ostermann H, Haertel S, Knaub S, Kalina U, Jung K, Pabinger I. Pharmacokinetics of Beriplex P/N prothrombin complex concentrate in healthy volunteers. *Thromb Haemost*. 2007;98(10):790-7.
160. Mann KG, Nesheim ME, Church WR, Haley P, Krishnaswamy S. Surface-dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Blood*. 1 juill 1990;76(1):1-16.
161. Link KP. The discovery of dicumarol and its sequels. *Circulation*. janv 1959;19(1):97-107.
162. Stenflo J. Contributions of Gla and EGF-Like Domains to the Function of Vitamin K-Dependent Coagulation Factors. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr [Internet]*. 1999 [cité 3 août 2020];9(1).
163. Huang M, Furie BC, Furie B. Crystal Structure of the Calcium-stabilized Human Factor IX Gla Domain Bound to a Conformation-specific Anti-factor IX Antibody. *J Biol Chem*. 4 févr 2004;279(14):14338-46.
164. Dahlbäck B, Villoutreix BO. Molecular recognition in the protein C anticoagulant pathway. *J Thromb Haemost*. 2003;1(7):1525-34.
165. Jr GJB. Protein Z-Dependent Regulation of Coagulation. *Thromb Haemost*. 2001;86(7):8-13.
166. Melaragno MG, Fridell Y-WC, Berk BC. The Gas6/Axl System: A Novel Regulator of Vascular Cell Function. *Trends Cardiovasc Med*. 1 nov 1999;9(8):250-3.
167. Kulman JD, Harris JE, Haldeman BA, Davie EW. Primary structure and tissue distribution of two novel proline-rich γ -carboxyglutamic acid proteins. *Proc Natl Acad Sci*. 19 août 1997;94(17):9058-62.

168. Kulman JD, Harris JE, Xie L, Davie EW. Identification of two novel transmembrane γ -carboxyglutamic acid proteins expressed broadly in fetal and adult tissues. *Proc Natl Acad Sci.* 13 févr 2001;98(4):1370-5.
169. Hoang QQ, Sicheri F, Howard AJ, Yang DSC. Bone recognition mechanism of porcine osteocalcin from crystal structure. *Nature.* 30 oct 2003;425(6961):977-80.
170. Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature.* mars 1997;386(6620):78-81.
171. Wajih N, Sane DC, Hutson SM, Wallin R. The Inhibitory Effect of Calumenin on the Vitamin K-dependent γ -Carboxylation System CHARACTERIZATION OF THE SYSTEM IN NORMAL AND WARFARIN-RESISTANT RATS. *J Biol Chem.* 6 nov 2004;279(24):25276-83.
172. Furie B, Furie BC. Molecular basis of vitamin K-dependent γ -carboxylation. *Blood.* 1990;75(9):1753-62.
173. Bristol JA, Ratcliffe JV, Roth DA, Jacobs MA, Furie BC, Furie B. Biosynthesis of prothrombin: intracellular localization of the vitamin K-dependent carboxylase and the sites of gamma-carboxylation. *Blood.* 1 oct 1996;88(7):2585-93.
174. Presnell SR, Stafford DW. The vitamin K-dependent carboxylase. *Thromb Haemost.* juin 2002;87(6):937-46.
175. Morris DP, Stevens RD, Wright DJ, Stafford DW. Processive Post-translational Modification VITAMIN K-DEPENDENT CARBOXYLATION OF A PEPTIDE SUBSTRATE. *J Biol Chem.* 22 déc 1995;270(51):30491-8.
176. Knobloch JE, Suttie JW. Vitamin K-dependent carboxylase. Control of enzyme activity by the « propeptide » region of factor X. *J Biol Chem.* 15 nov 1987;262(32):15334-7.
177. Stenflo J. Structure-function relationships of epidermal growth factor modules in vitamin K-dependent clotting factors. *Blood.* 1 oct 1991;78(7):1637-51.
178. Stenflo J, Holme E, Lindstedt S, Chandramouli N, Huang LH, Tam JP, et al. 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.* 1 janv 1989;86(2):444-7.
179. Ohlin AK, Stenflo J. Calcium-dependent interaction between the epidermal growth factor precursor-like region of human protein C and a monoclonal antibody. *J Biol Chem.* 10 mai 1987;262(28):13798-804.
180. Ohlin AK, Landes G, Bourdon P, Oppenheimer C, Wydro R, Stenflo J. Beta-hydroxyaspartic acid in the first epidermal growth factor-like domain of protein C. Its role in Ca^{2+} binding and biological activity. *J Biol Chem.* 15 déc 1988;263(35):19240-8.
181. Sunnerhagen M, Forsén S, Hoffrén A-M, Drakenberg T, Teleman O, Stenflo J. Structure of the Ca^{2+} -free GLA domain sheds light on membrane binding of blood coagulation proteins. *Nat Struct Biol.* juin 1995;2(6):504-9.
182. Rao Z, Handford P, Mayhew M, Knott V, Brownlee GG, Stuart Z D. The structure of a Ca^{2+} -binding epidermal growth factor-like domain: Its role in protein-protein interactions. *Cell.* 14 juill 1995;82(1):131-41.

183. Furie B, Bing DH, Feldmann RJ, Robison DJ, Burnier JP, Furie BC. Computer-generated models of blood coagulation factor Xa, factor IXa, and thrombin based upon structural homology with other serine proteases. *J Biol Chem.* 4 oct 1982;257(7):3875-82.
184. Bode W, Schwager P, Huber R. The transition of bovine trypsinogen to a trypsin-like state upon strong ligand binding: The refined crystal structures of the bovine trypsinogen-pancreatic trypsin inhibitor complex and of its ternary complex with Ile-Val at 1.9 Å resolution. *J Mol Biol.* 5 janv 1978;118(1):99-112.
185. Huber R, Bode W. Structural basis of the activation and action of trypsin [Internet]. American Chemical Society; 2002
186. Furie B, Furie BC. The molecular basis of blood coagulation. *Cell.* 20 mai 1988;53(4):505-18.
187. Hedstrom L, Szilagyi L, Rutter WJ. Converting trypsin to chymotrypsin: the role of surface loops. *Science.* 6 mars 1992;255(5049):1249-53.
188. Dickinson CD, Kelly CR, Ruf W. Identification of surface residues mediating tissue factor binding and catalytic function of the serine protease factor VIIa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 10 déc 1996;93(25):14379-84.
189. Rao LV, Bajaj SP, Rapaport SI. Activation of human factor VII during clotting in vitro. *Blood.* janv 1985;65(1):218-26.
190. Nakagaki T, Foster DC, Berkner KL, Kisiel W. Initiation of the extrinsic pathway of blood coagulation: evidence for the tissue factor dependent autoactivation of human coagulation factor VII [Internet]. American Chemical Society; 2002
191. Neuenschwander PF, Fiore MM, Morrissey JH. Factor VII autoactivation proceeds via interaction of distinct protease-cofactor and zymogen-cofactor complexes. Implications of a two-dimensional enzyme kinetic mechanism. *J Biol Chem.* 15 oct 1993;268(29):21489-92.
192. Römisch J. Factor VII activating protease (FSAP): a novel protease in hemostasis. *Biol Chem.* août 2002;383(7-8):1119-24.
193. Butenas S, Mann KG. Kinetics of Human Factor VII Activation. *Biochemistry.* 1 janv 1996;35(6):1904-10.
194. Higashi S, Nishimura H, Aita K, Iwanaga S. Identification of regions of bovine factor VII essential for binding to tissue factor. *J Biol Chem.* 22 juill 1994;269(29):18891-8.
195. Morrissey JH, Macik BG, Neuenschwander PF, Comp PC. Quantitation of activated factor VII levels in plasma using a tissue factor mutant selectively deficient in promoting factor VII activation. *Blood.* 1 févr 1993;81(3):734-44.
196. Kondo S, Kisiel W. Regulation of factor viia activity in plasma: evidence that antithrombin iii is the sole plasma protease inhibitor of human factor viia. *Thromb Res.* 15 avr 1987;46(2):325-35.
197. Lindley CM, Sawyer WT, Macik BG, Lusher J, Harrison JF, Baird-Cox K, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant factor VIIa. *Clin Pharmacol Ther.* 1994;55(6):638-48.

198. Seligsohn U, Østerud B, Brown SF, Griffin JH, Rapaport SI. Activation of Human Factor VII in Plasma and in Purified Systems: *ROLES OF ACTIVATED FACTOR IX, KALLIKREIN, AND ACTIVATED FACTOR XII*. J Clin Invest. 1 oct 1979;64(4):1056-65.
199. Carson SD, Henry WM, Shows TB. Tissue factor gene localized to human chromosome 1 (1pter----1p21). Science. 6 sept 1985;229(4717):991-3.
200. N M. Regulation of the tissue factor gene. Thromb Haemost. 1 juill 1997;78(1):747-54.
201. Spicer EK, Horton R, Bloem L, Bach R, Williams KR, Guha A, et al. Isolation of cDNA clones coding for human tissue factor: primary structure of the protein and cDNA. Proc Natl Acad Sci. 1 août 1987;84(15):5148-52.
202. Morrissey JH, Fakhrai H, Edgington TS. Molecular cloning of the cDNA for tissue factor, the cellular receptor for the initiation of the coagulation protease cascade. Cell. 3 juill 1987;50(1):129-35.
203. Harlos K, Martin DMA, O'Brien DP, Jones EY, Stuart DI, Polikarpov I, et al. Crystal structure of the extracellular region of human tissue factor. Nature. août 1994;370(6491):662-6.
204. Boys CWG, Miller A, Harlos K, Martin DMA, Tuddenham EGD, O'Brien DP. Crystallization and Preliminary X-ray Analysis of Human Tissue Factor Extracellular Domain. J Mol Biol. 20 déc 1993;234(4):1263-5.
205. Paborsky LR, Harris RJ. Post-translational modifications of recombinant human tissue factor. Thromb Res. 1 déc 1990;60(5):367-76.
206. Krudysz-Amblo J, Jennings ME, Mann KG, Butenas S. Carbohydrates and Activity of Natural and Recombinant Tissue Factor. J Biol Chem. 29 janv 2010;285(5):3371-82.
207. Hogg PJ. Contribution of allosteric disulfide bonds to regulation of hemostasis. J Thromb Haemost. 2009;7(s1):13-6.
208. Rehemtulla A, Ruf W, Edgington TS. The integrity of the cysteine 186-cysteine 209 bond of the second disulfide loop of tissue factor is required for binding of factor VII. J Biol Chem. 6 mai 1991;266(16):10294-9.
209. Kothari H, Nayak RC, Rao LVM, Pendurthi UR. Cystine 186–cystine 209 disulfide bond is not essential for the procoagulant activity of tissue factor or for its de-encryption. Blood. 27 mai 2010;115(21):4273-83.
210. Ahamed J, Versteeg HH, Kerver M, Chen VM, Mueller BM, Hogg PJ, et al. Disulfide isomerization switches tissue factor from coagulation to cell signaling. Proc Natl Acad Sci U S A. 19 sept 2006;103(38):13932-7.
211. Sen M, Herzik M, Craft JW, Creath AL, Agrawal S, Ruf W, et al. Spectroscopic Characterization of Successive Phosphorylation of the Tissue Factor Cytoplasmic Region. Open Spectrosc J. 1 janv 2009;3:58-64.
212. Ruf W, Kalnik MW, Lund-Hansen T, Edgington TS. Characterization of factor VII association with tissue factor in solution. High and low affinity calcium binding sites in factor VII contribute to functionally distinct interactions. J Biol Chem. 25 août 1991;266(24):15719-25.

213. Morrissey JH, Neuenschwander PF, Huang Q, McCallum CD, Su B, Johnson AE. Factor VIIa-Tissue Factor: Functional Importance of Protein-Membrane Interactions. *Thromb Haemost.* 1997;78(7):112-6.
214. Fiore MM, Neuenschwander PF, Morrissey JH. The biochemical basis for the apparent defect of soluble mutant tissue factor in enhancing the proteolytic activities of factor VIIa. *J Biol Chem.* 1 juill 1994;269(1):143-9.
215. Paborsky LR, Caras IW, Fisher KL, Gorman CM. Lipid association, but not the transmembrane domain, is required for tissue factor activity. Substitution of the transmembrane domain with a phosphatidylinositol anchor. *J Biol Chem.* 15 nov 1991;266(32):21911-6.
216. Waters EK, Morrissey JH. Restoring full biological activity to the isolated ectodomain of an integral membrane protein. *Biochemistry.* 21 mars 2006;45(11):3769-74.
217. Ohkubo YZ, Morrissey JH, Tajkhorshid E. Dynamical view of membrane binding and complex formation of human factor VIIa and tissue factor. *J Thromb Haemost.* 2010;8(5):1044-53.
218. Persson E, Bak H, Olsen OH. Substitution of valine for leucine 305 in factor VIIa increases the intrinsic enzymatic activity. *J Biol Chem.* 3 août 2001;276(31):29195-9.
219. Rand KD, Jørgensen TJD, Olsen OH, Persson E, Jensen ON, Stennicke HR, et al. Allosteric Activation of Coagulation Factor VIIa Visualized by Hydrogen Exchange. *J Biol Chem.* 8 nov 2006;281(32):23018-24.
220. Song H, Olsen OH, Persson E, Rand KD. Sites Involved in Intra- and Interdomain Allostery Associated with the Activation of Factor VIIa Pinpointed by Hydrogen-Deuterium Exchange and Electron Transfer Dissociation Mass Spectrometry. *J Biol Chem.* 19 déc 2014;289(51):35388-96.
221. Persson E, Petersen LC. Structurally and Functionally Distinct Ca²⁺ Binding Sites in the γ -Carboxyglutamic Acid-Containing Domain of Factor VIIa. *Eur J Biochem.* 1995;234(1):293-300.
222. Bajaj SP, Schmidt AE, Agah S, Bajaj MS, Padmanabhan K. High Resolution Structures of p-Aminobenzamidine- and Benzamidine-VIIa/Soluble Tissue Factor UNPREDICTED CONFORMATION OF THE 192-193 PEPTIDE BOND AND MAPPING OF Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, AND Zn²⁺ SITES IN FACTOR VIIa. *J Biol Chem.* 25 août 2006;281(34):24873-88.
223. Vadivel K, Agah S, Messer AS, Cascio D, Bajaj MS, Krishnaswamy S, et al. Structural and Functional Studies of γ -Carboxyglutamic Acid Domains of Factor VIIa and Activated Protein C: Role of Magnesium at Physiological Calcium. *J Mol Biol.* 12 juin 2013;425(11):1961-81.
224. de Courcy B, Pedersen LG, Parisel O, Gresh N, Silvi B, Pilmé J, et al. Understanding selectivity of hard and soft metal cations within biological systems using the subvalence concept. I. Application to blood coagulation: direct cation-protein electronic effects vs. indirect interactions through water networks. *J Chem Theory Comput.* 12 mars 2010;6(4):1048-63.
225. Tavoosi N, Morrissey JH. Influence of membrane composition on the enhancement of factor VIIa/tissue factor activity by magnesium ions. *Thromb Haemost.* 1 avr 2014;111(4):770-2.
226. Sekiya F, Yoshida M, Yamashita T, Morita T. Magnesium(II) Is a Crucial Constituent of the Blood Coagulation Cascade POTENTIATION OF COAGULANT ACTIVITIES OF FACTOR IX BY Mg IONS. *J Biol Chem.* 4 déc 1996;271(15):8541-4.

227. Persson E, Olsen OH, Østergaard A, Nielsen LS. Ca²⁺ Binding to the First Epidermal Growth Factor-like Domain of Factor VIIa Increases Amidolytic Activity and Tissue Factor Affinity. *J Biol Chem.* 8 août 1997;272(32):19919-24.
228. Petersen LC, Ård P-OF, Persson E, Olsen OH, Nielsen LS. Binding of Zn²⁺ to a Ca²⁺ loop allosterically attenuates the activity of factor VIIa and reduces its affinity for tissue factor. *Protein Sci.* 2000;9(5):859-66.
229. McCallum CD, Hapak RC, Neuenschwander PF, Morrissey JH, Johnson AE. The Location of the Active Site of Blood Coagulation Factor VIIa above the Membrane Surface and Its Reorientation upon Association with Tissue Factor A FLUORESCENCE ENERGY TRANSFER STUDY. *J Biol Chem.* 11 août 1996;271(45):28168-75.
230. Mutucumarana VP, Duffy EJ, Lollar P, Johnson AE. The active site of factor IXa is located far above the membrane surface and its conformation is altered upon association with factor VIIa. A fluorescence study. *J Biol Chem.* 25 août 1992;267(24):17012-21.
231. Husten EJ, Esmon CT, Johnson AE. The active site of blood coagulation factor Xa. Its distance from the phospholipid surface and its conformational sensitivity to components of the prothrombinase complex. *J Biol Chem.* 25 sept 1987;262(27):12953-61.
232. McCallum CD, Su B, Neuenschwander PF, Morrissey JH, Johnson AE. Tissue Factor Positions and Maintains the Factor VIIa Active Site Far above the Membrane Surface Even in the Absence of the Factor VIIa Gla Domain A FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER STUDY. *J Biol Chem.* 28 nov 1997;272(48):30160-6.
233. Waters EK, Yegneswaran S, Morrissey JH. Raising the Active Site of Factor VIIa above the Membrane Surface Reduces Its Procoagulant Activity but Not Factor VII Autoactivation. *J Biol Chem.* 9 août 2006;281(36):26062-8.
234. Olsen OH, Rand KD, Østergaard H, Persson E. A combined structural dynamics approach identifies a putative switch in factor VIIa employed by tissue factor to initiate blood coagulation. *Protein Sci Publ Protein Soc.* avr 2007;16(4):671-82.
235. Colina CM, Venkateswarlu D, Duke R, Perera L, Pedersen LG. What causes the enhancement of activity of factor VIIa by tissue factor? *J Thromb Haemost.* 2006;4(12):2726-9.
236. Soejima K, Yuguchi M, Mizuguchi J, Tomokiyo K, Nakashima T, Nakagaki T, et al. The 99 and 170 Loop-modified Factor VIIa Mutants Show Enhanced Catalytic Activity without Tissue Factor. *J Biol Chem.* 13 déc 2002;277(50):49027-35.
237. Banner DW, D'Arcy A, Chène C, Winkler FK, Guha A, Konigsberg WH, et al. The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor. *Nature.* 7 mars 1996;380(6569):41-6.
238. Pike ACW, Brzozowski AM, Roberts SM, Olsen OH, Persson E. Structure of human factor VIIa and its implications for the triggering of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci.* 3 août 1999;96(16):8925-30.
239. Ruf W, Miles DJ, Rehemtulla A, Edgington TS. Tissue factor residues 157-167 are required for efficient proteolytic activation of factor X and factor VII. *J Biol Chem.* 11 mai 1992;267(31):22206-10.
240. Kirchofer D, Lipari MT, Moran P, Eigenbrot C, Kelley RF. The tissue factor region that interacts with substrates factor IX and Factor X. *Biochemistry.* 27 juin 2000;39(25):7380-7.

241. Huang Q, Neuenschwander PF, Rezaie AR, Morrissey JH. Substrate Recognition by Tissue Factor-Factor VIIa EVIDENCE FOR INTERACTION OF RESIDUES Lys165 AND Lys166 OF TISSUE FACTOR WITH THE 4-CARBOXYGLUTAMATE-RICH DOMAIN OF FACTOR X. *J Biol Chem.* 9 juin 1996;271(36):21752-7.
242. Roy S, Hass PE, Bourell JH, Henzel WJ, Vehar GA. Lysine residues 165 and 166 are essential for the cofactor function of tissue factor. *J Biol Chem.* 15 nov 1991;266(32):22063-6.
243. Kirchhofer D, Eigenbrot C, Lipari MT, Moran P, Peek M, Kelley RF. The tissue factor region that interacts with factor Xa in the activation of factor VII. *Biochemistry.* 23 janv 2001;40(3):675-82.
244. Hagen FS, Gray CL, O'Hara P, Grant FJ, Saari GC, Woodbury RG, et al. Characterization of a cDNA coding for human factor VII. *Proc Natl Acad Sci.* 1 avr 1986;83(8):2412-6.
245. Jurlander B, Thim L, Klausen NK, Persson E, Kjalke M, Rexen P, et al. Recombinant Activated Factor VII (rFVIIa): Characterization, Manufacturing, and Clinical Development. *Semin Thromb Hemost.* 2001;27(4):373-84.
246. Hedner U, Kisiel W. Use of human factor VIIa in the treatment of two hemophilia A patients with high-titer inhibitors. *J Clin Invest.* 1 juin 1983;71(6):1836-41.
247. Hedner U, Bjoern S, Bernvil SS, Tengborn L, Stigendahl L. Clinical Experience with Human Plasma-Derived Factor VIIa in Patients with Hemophilia A and High Titer Inhibitors. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 1989;19(6):335-43.
248. Diness V, Lund-Hansen T, Hedner U. Effect of recombinant human FVIIA on warfarin-induced bleeding in rats. *Thromb Res.* 15 sept 1990;59(6):921-9.
249. Erhardtsen E. Pharmacokinetics of Recombinant Activated Factor VII (rFVIIa). *Semin Thromb Hemost.* août 2000;26(4):385-92.
250. Hedner U, Glazer S, Pingel K, Alberts KA, Blombäck M, Schulman S, et al. SUCCESSFUL USE OF RECOMBINANT FACTOR VIIa IN PATIENT WITH SEVERE HAEMOPHILIA A DURING SYNOVECTOMY. *The Lancet.* 19 nov 1988;332(8621):1193.
251. Macik BG, Hohneker J, Roberts HR, Griffin AM. Use of recombinant activated factor VII for treatment of a retropharyngeal hemorrhage in a hemophilic patient with a high titer inhibitor. *Am J Hematol.* 1989;32(3):232-4.
252. Telgt DSC, Macik BG, McCord DM, Monroe DM, Roberts HR. Mechanism by which recombinant factor VIIa shortens the aPTT: Activation of factor X in the absence of tissue factor. *Thromb Res.* 1 déc 1989;56(5):603-9.
253. Rao LV, Rapaport SI. Factor VIIa-catalyzed activation of factor X independent of tissue factor: its possible significance for control of hemophilic bleeding by infused factor VIIa. *Blood.* 1 mars 1990;75(5):1069-73.
254. Monroe DM, Hoffman M, Oliver JA, Roberts HR. Platelet activity of high-dose factor VIIa is independent of tissue factor. *Br J Haematol.* 1997;99(3):542-7.
255. Monroe Dougald M., Hoffman Maureane, Roberts Harold R. Platelets and Thrombin Generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1 sept 2002;22(9):1381-9.

256. Augustsson C, Persson E. In vitro evidence of a tissue factor-independent mode of action of recombinant factor VIIa in hemophilia. *Blood*. 13 nov 2014;124(20):3172-4.
257. Konkle BA, Ebbesen LS, Erhardtsen E, Bianco RP, Lissitchkov T, Rusen L, et al. Randomized, prospective clinical trial of recombinant factor VIIa for secondary prophylaxis in hemophilia patients with inhibitors. *J Thromb Haemost*. 2007;5(9):1904-13.
258. Clark CA, Vatsyayan R, Hedner U, Esmon CT, Pendurthi UR, Rao LVM. Endothelial cell protein C receptor-mediated redistribution and tissue-level accumulation of factor VIIa. *J Thromb Haemost*. 2012;10(11):2383-91.
259. GOPALAKRISHNAN R, HEDNER U, CLARK C, PENDURTHI UR, RAO LVM. rFVIIa transported from blood stream into tissues is functionally active. *J Thromb Haemost JTH*. oct 2010;8(10):2208-13.
260. Bengtén E, Wilson M, Miller N, Clem LW, Pilström L, Warr GW. Immunoglobulin isotypes: structure, function, and genetics. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2000;248:189-219.
261. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. *Front Immunol* [Internet]. 2014
262. Wedemayer GJ, Patten PA, Wang LH, Schultz PG, Stevens RC. Structural Insights into the Evolution of an Antibody Combining Site. *Science*. 13 juin 1997;276(5319):1665-9.
263. Davies DR, Cohen GH. Interactions of protein antigens with antibodies. *Proc Natl Acad Sci*. 9 janv 1996;93(1):7-12.
264. Kabat EA, Wu TT. Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different specificities. Relative contributions of VH and VL genes, minigenes, and complementarity-determining regions to binding of antibody-combining sites. *J Immunol*. 1 sept 1991;147(5):1709-19.
265. Zuckier LS, Chang CJ, Scharff MD, Morrison SL. Chimeric Human-Mouse IgG Antibodies with Shuffled Constant Region Exons Demonstrate that Multiple Domains Contribute to in Vivo Half-Life. *Cancer Res*. 1 sept 1998;58(17):3905-8.
266. Edelman GM. The structure and function of antibodies. *Sci Am*. août 1970;223(2):34-42.
267. Filpula D. Antibody engineering and modification technologies. *Biomol Eng*. 1 juin 2007;24(2):201-15.
268. Sampei Z, Igawa T, Soeda T, Okuyama-Nishida Y, Moriyama C, Wakabayashi T, et al. Identification and Multidimensional Optimization of an Asymmetric Bispecific IgG Antibody Mimicking the Function of Factor VIII Cofactor Activity. *PLOS ONE*. 28 févr 2013;8(2):e57479.
269. Kitazawa T, Esaki K, Tachibana T, Ishii S, Soeda T, Muto A, et al. Factor VIIIa-mimetic cofactor activity of a bispecific antibody to factors IX/IXa and X/Xa, emicizumab, depends on its ability to bridge the antigens. *Thromb Haemost*. juill 2017;117(7):1348-57.
270. 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*. 24 janv 2012;51(3):820-8.
271. Rosenberg RD. Actions and interactions of antithrombin and heparin. *N Engl J Med*. 16 janv 1975;292(3):146-51.

272. Schmaier AH, Dahl LD, Rozemuller AJ, Roos RA, Wagner SL, Chung R, et al. Protease nexin-2/amyloid beta protein precursor. A tight-binding inhibitor of coagulation factor IXa. *J Clin Invest.* nov 1993;92(5):2540-5.
273. Muto A, Yoshihashi K, Takeda M, Kitazawa T, Soeda T, Igawa T, et al. 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(2):206-13.
274. Muto A, Yoshihashi K, Takeda M, Kitazawa T, Soeda T, Igawa T, et al. Anti-factor IXa/X bispecific antibody ACE910 prevents joint bleeds in a long-term primate model of acquired hemophilia A. *Blood.* 13 nov 2014;124(20):3165-71.
275. Uchida N, Sambe T, Yoneyama K, Fukazawa N, Kawanishi T, Kobayashi S, et al. A first-in-human phase 1 study of ACE910, a novel factor VIII-mimetic bispecific antibody, in healthy subjects. *Blood.* 31 mars 2016;127(13):1633-41.
276. Shima M, Hanabusa H, Taki M, Matsushita T, Sato T, Fukutake K, et al. Factor VIII–Mimetic Function of Humanized Bispecific Antibody in Hemophilia A. *N Engl J Med.* 26 mai 2016;374(21):2044-53.
277. Young G, Sidonio RF, Liesner R, Oldenburg J, Chang T, Uguen M, et al. HAVEN 2 Updated Analysis: Multicenter, Open-Label, Phase 3 Study to Evaluate Efficacy, Safety and Pharmacokinetics of Subcutaneous Administration of Emicizumab Prophylaxis in Pediatric Patients with Hemophilia A with Inhibitors. *Blood.* 7 déc 2017;130(Supplement 1):85-85.
278. Mahlangu J, Oldenburg J, Paz-Priel I, Negrier C, Niggli M, Mancuso ME, et al. Emicizumab Prophylaxis in Patients Who Have Hemophilia A without Inhibitors. *N Engl J Med.* 30 août 2018;379(9):811-22.
279. Jimenez-Yuste V, Shima M, Fukutake K, Lehle M, Chebon S, Retout S, et al. Emicizumab Subcutaneous Dosing Every 4 Weeks for the Management of Hemophilia A: Preliminary Data from the Pharmacokinetic Run-in Cohort of a Multicenter, Open-Label, Phase 3 Study (HAVEN 4). *Blood.* 7 déc 2017;130(Supplement 1):86-86.
280. Ungar-Waroni H, Elias E, Gluckman A, Trainin Z. Dromedary IgG: purification, characterization and quantitation in sera of dams and newborns. *Isr J. Vet. Med.*, 1987; 43: 198–203. *Isr J Vet Med.* 43: 198–203. 1987;
281. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hammers C, Songa EB, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature.* juin 1993;363(6428):446-8.
282. Maass DR, Sepulveda J, Pernthaner A, Shoemaker CB. Alpaca (*Lama pacos*) as a convenient source of recombinant camelid heavy chain antibodies (VHHs). *J Immunol Methods.* 31 juill 2007;324(1-2):13-25.
283. Nguyen VK, Desmyter A, Muyldermans S. Functional heavy-chain antibodies in Camelidae. *Adv Immunol.* 2001;79:261-96.
284. Nguyen VK, Hamers R, Wyns L, Muyldermans S. Loss of splice consensus signal is responsible for the removal of the entire C(H)1 domain of the functional camel IGG2A heavy-chain antibodies. *Mol Immunol.* juin 1999;36(8):515-24.
285. Lee Y-K, Brewer JW, Hellman R, Hendershot LM. BiP and Immunoglobulin Light Chain Cooperate to Control the Folding of Heavy Chain and Ensure the Fidelity of Immunoglobulin Assembly. *Mol Biol Cell.* 1 juill 1999;10(7):2209-19.

286. Woolven BP, Frenken LGJ, van der Logt P, Nicholls PJ. The structure of the llama heavy chain constant genes reveals a mechanism for heavy-chain antibody formation. *Immunogenetics*. 1 oct 1999;50(1):98-101.
287. Roux KH, Greenberg AS, Greene L, Strelets L, Avila D, McKinney EC, et al. Structural Analysis of the Nurse Shark (New) Antigen Receptor (NAR): Molecular Convergence of NAR and Unusual Mammalian Immunoglobulins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(20):11804-9.
288. Greenberg AS, Avila D, Hughes M, Hughes A, McKinney EC, Flajnik MF. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *Nature*. 9 mars 1995;374(6518):168-73.
289. Dooley H, Flajnik MF. Antibody repertoire development in cartilaginous fish. *Dev Comp Immunol*. 1 janv 2006;30(1):43-56.
290. Nguyen V, Su C, Muyldermans S, van der Loo W. Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation. *Immunogenetics*. 1 avr 2002;54(1):39-47.
291. van der Linden RHJ, Frenken LGJ, de Geus B, Harmsen MM, Ruuls RC, Stok W, et al. Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. *Biochim Biophys Acta BBA - Protein Struct Mol Enzymol*. 12 avr 1999;1431(1):37-46.
292. Decanniere K, Desmyter A, Lauwereys M, Ghahroudi MA, Muyldermans S, Wyns L. A single-domain antibody fragment in complex with RNase A: non-canonical loop structures and nanomolar affinity using two CDR loops. *Structure*. 15 avr 1999;7(4):361-70.
293. Skottrup PD, Leonard P, Kaczmarek JZ, Veillard F, Enghild JJ, O'Kennedy R, et al. Diagnostic evaluation of a nanobody with picomolar affinity toward the protease RgpB from *Porphyromonas gingivalis*. *Anal Biochem*. 15 août 2011;415(2):158-67.
294. Desmyter A, Transue TR, Ghahroudi MA, Dao Thi M-H, Poortmans F, Hamers R, et al. Crystal structure of a camel single-domain V H antibody fragment in complex with lysozyme. *Nat Struct Biol*. sept 1996;3(9):803-11.
295. Muyldermans S, Atarhouch T, Saldanha J, Barbosa J a. RG, Hamers R. Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein Eng Des Sel*. 1 sept 1994;7(9):1129-35.
296. Muyldermans S. Single domain camel antibodies: current status. *Rev Mol Biotechnol*. 1 juin 2001;74(4):277-302.
297. Spinelli S, Frenken L, Bourgeois D, de Ron L, Bos W, Verrips T, et al. The crystal structure of a llama heavy chain variable domain. *Nat Struct Biol*. sept 1996;3(9):752-7.
298. Nguyen VK, Hamers R, Wyns L, Muyldermans S. Camel heavy-chain antibodies: diverse germline VHH and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire. *EMBO J*. 1 mars 2000;19(5):921-30.
299. Padlan EA. Anatomy of the antibody molecule. *Mol Immunol*. févr 1994;31(3):169-217.
300. Ward ES, Güssow D, Griffiths AD, Jones PT, Winter G. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature*. oct 1989;341(6242):544-6.

301. Vu KB, Ghahroudi MA, Wyns L, Muyldermans S. Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies. *Mol Immunol*. 1 nov 1997;34(16):1121-31.
302. Harmsen MM, Ruuls RC, Nijman IJ, Niewold TA, Frenken LGJ, de Geus B. Llama heavy-chain V regions consist of at least four distinct subfamilies revealing novel sequence features. *Mol Immunol*. 1 août 2000;37(10):579-90.
303. Decanniere K, Muyldermans S, Wyns L. Canonical antigen-binding loop structures in immunoglobulins: more structures, more canonical classes? Edited by J. Thornton. *J Mol Biol*. 30 juin 2000;300(1):83-91.
304. Muyldermans S, Baral TN, Retamozzo VC, De Baetselier P, De Genst E, Kinne J, et al. Camelid immunoglobulins and nanobody technology. *Vet Immunol Immunopathol*. 15 mars 2009;128(1):178-83.
305. Smithies O. Antibody Variability: Somatic recombination between the elements of « antibody gene pairs » may explain antibody variability. *Science*. 21 juill 1967;157(3786):267-73.
306. Seidman JG, Leder P. The arrangement and rearrangement of antibody genes. *Nature*. déc 1978;276(5690):790-5.
307. Muyldermans S. Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. *Annu Rev Biochem*. 2013;82(1):775-97.
308. Frenken LG, Hensing JG, Van den Hondel CA, Verrips CT. Recent advances in the large-scale production of antibody fragments using lower eukaryotic microorganisms. *Res Immunol*. août 1998;149(6):589-99.
309. Frenken LGJ, van der Linden RHJ, Hermans PWJJ, Bos JW, Ruuls RC, de Geus B, et al. Isolation of antigen specific Llama VHH antibody fragments and their high level secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol*. 29 févr 2000;78(1):11-21.
310. Smolarek D, Bertrand O, Czerwinski M. Variable fragments of heavy chain antibodies (VHHs): a new magic bullet molecule of medicine? *Postepy Hig Med Doswiadczalnej Online*. 14 juin 2012;66:348-58.
311. Stijlemans B, Conrath K, Cortez-Retamozo V, Xong HV, Wyns L, Senter P, et al. Efficient Targeting of Conserved Cryptic Epitopes of Infectious Agents by Single Domain Antibodies AFRICAN TRYPANOSOMES AS PARADIGM. *J Biol Chem*. 1 sept 2004;279(2):1256-61.
312. Lauwereys M, Arbabi Ghahroudi M, Desmyter A, Kinne J, Hölzer W, De Genst E, et al. Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies. *EMBO J*. 1 juill 1998;17(13):3512-20.
313. Genst ED, Silence K, Decanniere K, Conrath K, Loris R, Kinne J, et al. Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. *Proc Natl Acad Sci*. 21 mars 2006;103(12):4586-91.
314. Pérez JM, Renisio JG, Prompers JJ, van Platerink CJ, Cambillau C, Darbon H, et al. Thermal unfolding of a llama antibody fragment: a two-state reversible process. *Biochemistry*. 9 janv 2001;40(1):74-83.
315. Dumoulin M, Last AM, Desmyter A, Decanniere K, Canet D, Larsson G, et al. A camelid antibody fragment inhibits the formation of amyloid fibrils by human lysozyme. *Nature*. 14 août 2003;424(6950):783-8.

316. Rothbauer U, Zolghadr K, Tillib S, Nowak D, Schermelleh L, Gahl A, et al. Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies. *Nat Methods*. nov 2006;3(11):887-9.
317. Wang D, Yang S, Yin S, Shang Y, Du P, Guo J, et al. Characterization of single-domain antibodies against Foot and Mouth Disease Virus (FMDV) serotype O from a camelid and imaging of FMDV in baby hamster kidney-21 cells with single-domain antibody-quantum dots probes. *BMC Vet Res*
318. Leduc C, Si S, Gautier J, Soto-Ribeiro M, Wehrle-Haller B, Gautreau A, et al. A Highly Specific Gold Nanoprobe for Live-Cell Single-Molecule Imaging. *Nano Lett*. 10 avr 2013;13(4):1489-94.
319. Vaneycken I, Devoogdt N, Gassen NV, Vincke C, Xavier C, Wernery U, et al. Preclinical screening of anti-HER2 nanobodies for molecular imaging of breast cancer. *FASEB J*. 2011;25(7):2433-46.
320. Romer T, Leonhardt H, Rothbauer U. Engineering antibodies and proteins for molecular in vivo imaging. *Curr Opin Biotechnol*. 1 déc 2011;22(6):882-7.
321. Platonova E, Winterflood CM, Junemann A, Albrecht D, Faix J, Ewers H. Single-molecule microscopy of molecules tagged with GFP or RFP derivatives in mammalian cells using nanobody binders. *Methods*. 15 oct 2015;88:89-97.
322. Desmyter A, Spinelli S, Roussel A, Cambillau C. Camelid nanobodies: killing two birds with one stone. *Curr Opin Struct Biol*. 1 juin 2015;32:1-8.
323. Abskharon RNN, Giachin G, Wohlkonig A, Soror SH, Pardon E, Legname G, et al. Probing the N-terminal β -sheet conversion in the crystal structure of the human prion protein bound to a nanobody. *J Am Chem Soc*. 22 janv 2014;136(3):937-44.
324. Pardon E, Laeremans T, Triest S, Rasmussen SGF, Wohlkönig A, Ruf A, et al. A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology. *Nat Protoc*. mars 2014;9(3):674-93.
325. Jobling SA, Jarman C, Teh M-M, Holmberg N, Blake C, Verhoeyen ME. Immunomodulation of enzyme function in plants by single-domain antibody fragments. *Nat Biotechnol*. janv 2003;21(1):77-80.
326. Rothbauer U, Zolghadr K, Muyldermans S, Schepers A, Cardoso MC, Leonhardt H. A Versatile Nanotrap for Biochemical and Functional Studies with Fluorescent Fusion Proteins. *Mol Cell Proteomics*. 1 févr 2008;7(2):282-9.
327. Caussin E, Kanca O, Affolter M. Fluorescent fusion protein knockout mediated by anti-GFP nanobody. *Nat Struct Mol Biol*. janv 2012;19(1):117-21.
328. Jiménez JI, Fraile S, Zafra O, de Lorenzo V. Phenotypic knockouts of selected metabolic pathways by targeting enzymes with camel-derived nanobodies (VHHs). *Metab Eng*. 1 juill 2015;30:40-8.
329. Borg S, Popp F, Hofmann J, Leonhardt H, Rothbauer U, Schüler D. An Intracellular Nanotrap Redirects Proteins and Organelles in Live Bacteria. *mBio [Internet]*. 27 févr 2015 [cité 3 août 2020];6(1).
330. Pollithy A, Romer T, Lang C, Müller FD, Helma J, Leonhardt H, et al. Magnetosome Expression of Functional Camelid Antibody Fragments (Nanobodies) in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Appl Environ Microbiol*. 1 sept 2011;77(17):6165-71.

331. Andersen LM, Andreasen PA, Svendsen I, Keemink J, Østergaard H, Persson E. Antibody-induced Enhancement of Factor VIIa Activity through Distinct Allosteric Pathways. *J Biol Chem*. 16 mars 2012;287(12):8994-9001.
332. Philippou H, Adami A, Amersey RA, Stubbs PJ, Lane DA. A Novel Specific Immunoassay for Plasma Two-Chain Factor VIIa: Investigation of FVIIa Levels in Normal Individuals and in Patients With Acute Coronary Syndromes. *Blood*. 1 févr 1997;89(3):767-75.
333. Hyseni A, Kemperman H, Lange DW de, Groot PG de, Linssen M, Kesecioglu J, et al. Increased mortality in systemic inflammatory response syndrome patients with high levels of coagulation factor VIIa. *J Thromb Haemost*. 2013;11(12):2111-7.
334. Dennis MS, Eigenbrot C, Skelton NJ, Ultsch MH, Santell L, Dwyer MA, et al. Peptide exosite inhibitors of factor VIIa as anticoagulants. *Nature*. 30 mars 2000;404(6777):465-70.
335. Dennis MS, Roberge M, Quan C, Lazarus RA. Selection and characterization of a new class of peptide exosite inhibitors of coagulation factor VIIa. *Biochemistry*. 14 août 2001;40(32):9513-21.
336. Enoksson M, Martin EJ, Holmberg H, Jensen MS, Kjølgaard-Hansen M, Egebjerg T, et al. Enhanced potency of recombinant factor VIIa with increased affinity to activated platelets. *J Thromb Haemost*. 2020;18(1):104-13.
337. Knudsen T, Olsen OH, Petersen LC. Tissue factor and factor VIIa cross-species compatibility. *Front Biosci Landmark Ed*. 1 juin 2011;16:3196-215.
338. Snyder LA, Rudnick KA, Tawadros R, Volk A, Tam SH, Anderson GM, et al. Expression of human tissue factor under the control of the mouse tissue factor promoter mediates normal hemostasis in knock-in mice. *J Thromb Haemost*. 2008;6(2):306-14.
339. Lin BH, Sutherland MR, Rosell FI, Morrissey JH, Pryzdial ELG. Coagulation factor VIIa binds to herpes simplex virus 1-encoded glycoprotein C forming a factor X-enhanced tenase complex oriented on membranes. *J Thromb Haemost*. 2020;18(6):1370-80.
340. Li W, Hu J, Leksa N, Aleman MM, Peters R, Salas J, et al. A Novel Humanized Hemophilia-a Mouse Model to Facilitate Preclinical In Vivo Studies of Human Specific Fviiiia-Mimetic Bispecific Antibodies. *Blood*. 29 nov 2018;132(Supplement 1):2458-2458.
341. Verhenne S, Loubière C, Denis C, Lenting P, Christophe O. An inducible mouse model of factor X deficiency to test novel factor X therapeutics. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*. 3^e-Suppl S1:OC 28.24 éd. 2019

Titre : Etude du mode d'action d'agents contournant l'action du facteur VIII dans l'hémophilie A

Mots clés : hémophilie, hémostase, facteurs de coagulation, anticorps

Résumé : L'hémophilie A est une maladie hémorragique due à un déficit en facteur VIII de la coagulation (FVIII). Le traitement est une thérapie dite de substitution utilisant des concentrés de FVIII. Toutefois, lors d'apparition d'inhibiteurs dirigés contre le FVIII, la stratégie thérapeutique consiste à utiliser des agents contournant l'action du FVIII tel que le FVIIa recombinant (rFVIIa) ou d'un anticorps bispécifique mimant l'activité du FVIII (emicizumab). Le but de cette thèse a consisté à étudier les modes d'action de ces deux thérapies de contournement à l'aide d'outils biologiques innovants développés spécialement.

En ce qui concerne le rFVIIa, bien qu'il soit efficace cliniquement, son mode d'action était encore sujet à discussion au début de ce travail. Dans une première partie de cette thèse, nous avons étudié le mode d'action du rFVIIa au moyen d'un anticorps de type « nanobody » que nous avons généré et caractérisé. Nous montrons dans un premier temps que cet anticorps appelé KB-FVIIa-004, possède une activité inhibitrice du FVIIa uniquement lorsque le FVIIa est libre et non lié à son cofacteur, le facteur tissulaire (FT).

Cette caractéristique originale nous a permis de montrer *in vivo* que l'activité du rFVIIa est indépendante en grande majorité de son cofacteur FT.

Dans une seconde partie de ce travail, nous avons étudié le mode d'action de l'emicizumab *in vivo*. En effet, la mesure de son efficacité et l'équivalence en activité FVIII sont compliquées à mesurer et manque de fiabilité dans les tests *in vitro*. Nous avons développé un modèle murin innovant semi-humanisé en utilisant des souris hémophilie A dans lesquelles nous avons injectés du Facteur IX et du Facteur X humain. Nous avons montré une activité « FVIII-like » de l'anticorps (pour une dose $\geq 1,5$ mg/kg) correspondante à une équivalence de 4,5 U FVIII/kg (soit 9,0 U/dL). De manière intéressante, l'association d'une faible dose de FVIII (5 U/kg) avec l'emicizumab nous a permis de montrer un arrêt complet du saignement dans notre modèle murin, suggérant un effet additif entre le FVIII et l'emicizumab.

Title : Study of the mechanism of action of agents by-passing factor VIII action in hemophilia A

Keywords : hemophilia, hemostase, coagulation factors, antibodies

Abstract : Hemophilia A is a hemorrhagic disorder linked to the functional deficiency of coagulation factor VIII (FVIII). Clinical management of hemophilia A mostly relies on substitution therapy using FVIII concentrates. However, since patients may develop inhibitory antibodies against FVIII, alternative treatment strategies are required that bypass FVIII function, such as the use of recombinant Factor VIIa (rFVIIa) or a bispecific antibody that mimics FVIII activity, emicizumab. The aim of this thesis was to study the mode of action of both FVIII-bypassing therapeutics using novel, innovative tools specifically designed for this purpose.

Although rFVIIa is clinically efficient, its mode of action was still unclear at the start of my studies. In a first part of this thesis, we have studied the mode of action of rFVIIa using a novel single-domain antibody (nanobody) that we generated and characterized. We first established that this nanobody, designated KB-FVIIa-004, inhibits FVIIa activity selectively in the absence but not presence of its cofactor, tissue factor (TF).

This unique characteristic allowed us to show the *in vivo* activity of rFVIIa is predominantly independent of its cofactor TF.

In a second part of the study, we have examined the *in vivo* mode of action of the FVIII-mimetic emicizumab. Indeed, to measure its efficacy and equivalence to FVIII using *in vitro* assays is complicated and will generate inaccurate data. We therefore developed an innovative semi-humanized mouse model for hemophilia A, in which infused human factors IX and X. We were able to establish a FVIII-like activity of emicizumab (for a dose $\geq 1,5$ mg/kg) corresponding to FVII dose of 4,5 U/kg (i.e. 9,0 U/dL). Interestingly, combining a low dose of FVIII (5 U/kg) with emicizumab resulted in a complete correction of the bleeding in our mouse model, suggesting an additive effect between FVIII and emicizumab.